

人参醇提物及沉淀对免疫低下小鼠的影响

李勇敏¹, 张尚华², 吕元¹, 谭小宁¹, 罗吉¹, 肖德华²

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙, 410006;
2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410006)

[摘要] 目的:探讨人参醇提后的沉淀是否对免疫功能仍具有影响。方法:利用环磷酰胺免疫低下小鼠模型,观察人参水提物、醇提物和沉淀对小鼠免疫器官和血清免疫球蛋白 G(IgG)、白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的影响。结果:空白组、模型组及给药各组小鼠胸腺、脾脏指数差异均无统计学意义($P>0.05$);与空白组比较,模型组小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,阳性组和人参水提物组小鼠血清 IgG、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),给药各组小鼠血清 IL-2 水平均较模型组升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:人参水提物能提高小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平,醇提物及沉淀能提高小鼠血清 IL-2 水平,说明沉淀物对免疫功能也有影响。

[关键词] 人参醇提物;沉淀;免疫低下模型;实验研究

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.10.061

Effect of Panax ginseng alcohol extract and precipitation on immunocompromised mice

LI Yongmin¹, ZHANG Shanghua², LYU Yuan¹, TAN Xiaoning¹, LUO Ji¹, XIAO Dehua²

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;
2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether the precipitation after Panax ginseng alcohol extraction has a certain effect on immune function. Methods: An immunocompromised mouse model was established by cyclophosphamide to observe the effect of Panax ginseng water extract, Panax ginseng alcohol extract, and precipitation after extraction on immune organs and serum levels of immunoglobulin G (IgG), interleukin-2 (IL-2), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Results: There were no significant differences in thymus index and spleen index between the blank group, the model group, and treatment groups ($P>0.05$). Compared with the blank group, the model group had significant reductions in the serum levels of IgG, IL-2, and TNF- α ($P<0.01$). Compared with the

基金项目:湖南省中医药科技计划项目(编号:201440);中医肿瘤学湖南省重点实验室资助(编号:2017TP1033);抗肿瘤中药创新平台资助(编号:2018CT5005)

第一作者:李勇敏,男,研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药药理

通讯作者:肖德华,男,主任药师,硕士研究生导师,研究方向:中药制剂, E-mail: hntcmakjc@163.com

参考文献

- [1] 罗海霞,周丽青,杨晓莹,等.某地区胃病流行病学调查分析[J].中国医疗前沿,2008,3(15):102,92.
- [2] 冯源.猴头菇的营养价值及在食品中的应用研究进展[J].现代农村科技,2019(4):105-106.
- [3] 涂彩虹,罗小波,郑旗,等.猴头菇药用功效及安全性研究进展[J].农产品加工,2019(1):61-65.
- [4] 王欣,李敏,许文频,等.柴芍和胃颗粒对小鼠慢性浅表性胃炎模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(1):76-79.
- [5] Li Kang, He Chaohui. Gastric Mucosal Lesions in Tibetans with High-Altitude Polycythemia Show Increased HIF-1 α Expression and ROS Production [J]. BioMed research international, 2019,14(2019):6317015.
- [6] Osoegawa Takashi, Minoda Yosuke, Ihara Eikichi, et al. A mucosal incision assisted biopsy vs. endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration with a rapid on-site evaluation for gastric subepithelial lesions: A randomized crossover study [J]. Digestive endoscopy: official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society, 2019, 31(4):413-421.
- [7] 邵梦茹.猴头菇多糖对胃肠黏膜保护作用的实验研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [8] 纪伟,唐宁,赵端,等.猴头菇的药理作用及栽培与应用[J].基因组学与应用生物学,2016,35(5):1252-1257.

(收稿日期:2018-10-04)

model group, the positive group and the Panax ginseng water extract group had significant increases in the serum levels of IgG and TNF- α ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and compared with the model group, the treatment groups had a significant increase in the serum level of IL-2 ($P < 0.05$). Conclusion: Panax ginseng water extract can increase the serum levels of IgG, IL-2, and TNF- α in mice, and Panax ginseng alcohol extract and precipitation can increase the serum level of IL-2, suggesting that the precipitation also has a certain effect on immune function.

[Key words] Panax ginseng alcohol extract; precipitation; immunocompromised model; experimental study

中药材人参中所含的成分诸多,一般认为水煮汤剂是药物的全成分,在制成中成药时,采用水煮醇沉所得到的 10%~30% 含人参皂苷类的浸膏被认为是人参的有效成分。中药处方在熬制成汤药时有效,而制成成品后效果却欠佳,考虑其与制作成品时所丢弃的 70%~90% 药物沉淀有关。为此,本实验进行了人参醇提物及沉淀对免疫低下小鼠免疫器官和血清免疫球蛋白 G (IgG)、白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的影响研究,现报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 选取 SPF 级 ICR 小鼠 60 只,体质量 18~20g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,批号:43004700038552,生产许可证:SCXK(湘)2016-0002。实验动物饲养于湖南省中医药研究院 SPF 级动物房,使用许可证号:SYXK(湘)2015-0008。

1.2 药物 人参(湖南省中医药研究院附属医院中药房),注射用环磷酰胺溶液(江苏盛迪医药有限公司,批准文号:国药准字 H32020857,批号:17032425),匹多莫德分散片(北京朗依制药有限公司,批准文号:国药准字 H20060718,批号:170411)。

2 实验方法

2.1 中药制备 1) 人参水提物制备。取人参(片状)500g,10 倍水浸泡 1h 后以大火煮开,小火煎 1h 后用双层纱布热滤出其中的药液。滤渣再加 8 倍水,大火煮开,然后小火煎 1h,过滤,合并 2 次滤液。立即取 1/4 滤液水浴浓缩至 125ml,浓度为 1g 生药/ml。2) 人参醇提物制备。上述 3/4 滤液静置过夜,次日滤液 3000 转离心 10min,得上清与沉淀 A。上清液用水浴浓缩至 500ml,加入乙醇至浓度为 70%,静置过夜。次日滤液 3000 转离心 10min,得上清与沉淀 B。上清液再用水浴挥去乙醇并浓缩至 400ml,相当于浓度为 1g 生药/ml。3) 人参醇提物的沉淀制备。上述沉淀 A、B 合并,用纯净水稀释至浓度为 1g 生药/ml。上述样品置于 4℃ 进行冷藏保存。

2.2 动物分组 将 60 只 ICR 小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,即空白组、模型组、阳性组、人参水提物组(简称水提组)、人参醇提物组(简称醇提组)、人参沉淀组(简称沉淀组),雌雄各半。

2.3 造模与给药 1) 造模:空白组动物腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 20mg/(kg·d) 外,其余组动物腹腔注射环磷酰胺 20mg/(kg·d),连续 10d。2) 给药:空白组与模型组以纯净水 20ml/(kg·d) 灌胃;阳性组以匹多莫德分散片

0.2g/(kg·d) 灌胃;人参水提物组、人参醇提物组、人参沉淀组均以相应药物 20g/(kg·d) 灌胃,连续 10d。

2.4 观察指标 1) 小鼠免疫器官指数。末次给药 1h 后,称重,处死小鼠,取胸腺及脾脏,去除周围结缔组织,吸除残血,称重,计算免疫器官指数。2) 小鼠胸腺指数及脾脏指数。小鼠胸腺指数=胸腺重量(mg)/体质量(g),小鼠脾脏指数=脾脏重量(mg)/体质量(g)。3) 血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平。末次给药 1h 后,摘取小鼠眼球进行取血,静置,离心,分离血清,按照 IgG、IL-2 和 TNF- α 试剂盒进行检测。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠免疫器官指数的比较 与空白组比较,模型组小鼠胸腺、脾脏指数差异无统计学意义;与模型组比较,给药各组小鼠胸腺、脾脏指数差异均无统计学意义。(见表 1)

表 1 各组小鼠免疫器官指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量(g/kg)	胸腺指数	脾脏指数
空白组	10	/	2.529 $\pm$ 0.515	4.441 $\pm$ 0.898
模型组	10	/	2.323 $\pm$ 0.832 ^a	4.128 $\pm$ 1.391 ^a
阳性组	10	0.2	2.368 $\pm$ 0.648 ^b	4.439 $\pm$ 1.268 ^b
沉淀组	10	20	2.455 $\pm$ 0.569 ^b	4.374 $\pm$ 1.386 ^b
醇提组	10	20	2.463 $\pm$ 0.437 ^b	4.324 $\pm$ 1.437 ^b
水提组	10	20	2.485 $\pm$ 0.615 ^b	4.372 $\pm$ 1.463 ^b

注:与空白组比较,^a $P > 0.05$;与模型组比较,^b $P > 0.05$ 。

3.2 各组小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平的比较 与空白组比较,模型组小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平均显著降低,差异有统计学意义;与模型组比较,阳性组和水提组小鼠血清 IgG、TNF- α 水平升高,差异有统计学意义;给药各组小鼠血清 IL-2 水平均较模型组升高,差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量(g/kg)	IgG(mg/ml)	IL-2(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
空白组	10	/	5.48 $\pm$ 0.93	232.3 $\pm$ 60.6	152.9 $\pm$ 47.0
模型组	10	/	4.44 $\pm$ 0.61 ^a	126.3 $\pm$ 37.2 ^a	85.4 $\pm$ 28.4 ^a
阳性组	10	0.2	5.26 $\pm$ 0.85 ^b	187.2 $\pm$ 57.8 ^a	126.3 $\pm$ 39.0 ^b
沉淀组	10	20	5.03 $\pm$ 0.86	169.4 $\pm$ 52.3 ^a	112.1 $\pm$ 32.2
醇提组	10	20	5.05 $\pm$ 0.78	166.0 $\pm$ 45.8 ^a	108.4 $\pm$ 35.3
水提组	10	20	5.17 $\pm$ 0.84 ^b	190.7 $\pm$ 62.6 ^a	141.8 $\pm$ 55.7 ^c

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

4 讨 论

人参的功效是大补元气,其中许多成份如人参皂苷 Rg1 等有增强免疫的作用。本次实验发现,环磷酰胺未对免疫器官造成严重影响,可能与使用剂量及给药时间有关,另一个方面说明造模型时要其严重影响免疫器官重量并不容易。观察人参对小鼠血清 IgG、IL-2、TNF- α 影响的结果表明,以人参水提物(全成份)效果最好,70%的乙醇提取物与沉淀的效果相当,说明沉淀对小鼠免疫还有一定的影响。一般水煮汤剂认为是全成分,在制成中成药时,采用醇沉后丢掉部分有效成份。此外,由于中药作用机制复杂,现有人参的有效成份很难界定,沉淀中可能存在有效物质。

物质在机体的运动过程与该物质的分子量、结构、相容性等相关。一般而言,细胞摄取物质的方式有被动运输、主动运输、吞噬、胞饮等。细胞允许通过的最大尺寸难以测定,有报道称植物细胞的胞间连丝为 800~1000Da^[1],表明 1000Da 以下物质理论上可以自由运动于植物体内。人参皂苷 Rg1 等分子量约为 1000Da 左右,可能被机体直接吸收。而醇沉物中的物质分子量会大于 1000Da,直接吸收难度大。早期认为,巨噬细胞可直接吸收脂多糖(内毒素,分子量约 10000Da)。而最新研究表明脂多糖不能被巨噬细胞直接吸收,而是由大肠埃希菌的外膜囊泡携带,再被巨噬细胞吸收^[2]。中药除了被机体吸收有效物质起作用外,还会通过影响肠道微环境起作用。肠道微环境由进入肠道物质-肠

道细胞-肠道微生物-黏膜化学屏障组成^[3]。中药在微环境中,更多的研究表明是影响肠道菌群结构,而其后的研究并不多见。

中药大分子物质有可能通过肠道微生物分泌的外膜囊泡将其带入机体细胞。此外,在考虑肠道微环境时,忽略了微环境的溶液。溶液中的成份改变,且该物质不一定被机体吸收,也会影响机体反应。有人研究不同食物中的纤维素对动物肠道菌群有很大的影响^[4],但纤维素并不一定被机体吸收。微环境改变,肠道菌群分泌的外膜囊泡改变,从而影响肠道细胞乃至全机体。因此,人参沉淀物有作用,可能与上两种原因有关,值得深入研究。

参考文献

- [1] 张孝英,杨世杰. 胞间连丝与大分子物质的胞间转移[J]. 植物学报,1999,16(2):150-156.
- [2] Sivapriya Kailasan Vanaja, Ashley J Russo, Bharat Behl, et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation[J]. Cell, 2016, 165(5):1106-1119.
- [3] 糜迪,方明月,李德利,等. 中药与肠道微环境相互作用研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2018,48(4):379-389.
- [4] 白冰瑶,刘新愚,周茜,等. 红枣膳食纤维改善小鼠功能性便秘及调节肠道菌群功能[J]. 食品科学·营养卫生,2016,37(23):254-259.

(收稿日期:2018-10-23)

(上接第140页)邪痹阻经络”的结果,又是加重气血不畅而导致膝痛的新致病因素,同时本病也与个人体质强弱、劳损程度、年龄因素密切相关。

中医药治疗膝痹由来已久,且疗效确切,系统地对膝痹病古籍整理分析能有助于从整体上把握用药规律,进而提高膝痹的临床疗效。笔者选用第五版《中华医典》以“膝痹”为检索词,将得到的82条详细条文中用药进行系统梳理及分析,结果显示膝痹用药多选用补虚、理气血、祛风湿之类,性属温热之品,药物性味以辛、甘、苦味居多,依其药物归经分析可见本病主要与肝、脾、肾三脏相关。现代医家对膝骨关节炎中医诊疗共识基于对膝痹病因病机的认识,中药内服多采用滋补肝肾、补养气血、活血化瘀通络、温经通脉止痛为法,选用血府逐瘀汤、蠲痹汤、左归丸、八珍汤为主要方剂,对古籍记载之“钩吻”因药物毒性大已不再使用,再者如“孔公孽”“五灵脂”则依据药物本身特殊性及临床需要,已减少使用或选取同类药物替代。总的来说,现代诊疗共识用药规律与本次梳理结果相一致。因此,发掘膝痹古籍用药规律,以管窥其治“膝痹”之法,对提高临证治疗膝痹病的疗效大有裨益。

参考文献

- [1] 李满意,娄玉铃,潘宏伟. 肢体痹的源流及临床意义[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(9):54-60,72.

- [2] 祝文锋,王永炎,唐由之,等. 中医临床诊疗术语·疾病部分[M]. 北京:中国标准出版社,1997.
- [3] 刘军,曾令烽,杨伟毅,等. 基于中医大健康理念探讨膝骨关节炎循证分期及阶梯治疗[J]. 中华中医药杂志,2019,34(4):1321-1327.
- [4] 黄松珉,谢利民,徐颖鹏,等. 膝骨关节炎中医证候 PRO 量表的信度效度及反应度评价[J]. 中华中医药杂志,2019,34(1):280-283.
- [5] 王斌,邢丹,董圣杰,等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志,2018,18(2):134-142.
- [6] 宋莹,秦月鹏,李璐,等. 中医治疗膝骨关节炎的临床研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(12):68-72.
- [7] 陈卫衡,刘献祥,童培建,等. 膝骨关节炎中医诊疗专家共识(2015年版)[J]. 中医正骨,2015,27(7):4-5.
- [8] 钟赣生. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2017.
- [9] 宋恩峰,张彩蝶. 钩吻现代功效研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2017,31(5):74-77.
- [10] 曹利,卢金清,叶欣,等. 顶空固相微萃取-气质联用技术分析川芎酒炙前后的挥发性成分[J]. 中国药房,2017,28(28):3945-3948.
- [11] 屠万倩,张留记,刘晓苗,等. 多指标正交试验法优选牛膝酒炙工艺[J]. 中药材,2018,41(7):1589-1592.

(收稿日期:2019-07-11)