

阿胶对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠的免疫保护作用*

李 晓 高慧婕 朱桐林 张腾元 王清华 刘 超[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘 要 目的 探究不同品牌阿胶对环磷酰胺(Cy)所致免疫功能低下小鼠的免疫调节作用。方法 ICR 小鼠随机分成 5 组:对照组、Cy 组、A 品牌阿胶组、B 品牌阿胶组和 C 品牌阿胶组。Cy 腹腔注射致免疫抑制,3 组阿胶组小鼠均灌服 5% 不同品牌阿胶溶液,7d 后,测定并比较各组小鼠的脾脏和胸腺指数、小鼠血清溶血素的含量,ELISA 检测小鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的表达,RT-PCR 检测各组小鼠脾脏 TNF- α 和 GM-CSF mRNA 的表达。结果 与 Cy 组相比,A、B、C 3 种品牌阿胶小鼠的胸腺和脾脏指数均显著升高,小鼠血清抗体的含量显著提高,其中 A、B 品牌阿胶小鼠提高更为显著($P < 0.001$);与 Cy 组相比,A、B、C 3 种品牌的阿胶小鼠血清中 TNF- α 和 GM-CSF 的表达显著增加,小鼠脾脏 TNF- α 和 GM-CSF mRNA 的表达升高,其中 A 品牌阿胶小鼠提高更为明显($P < 0.001$)。结论 3 种品牌阿胶对 Cy 导致的免疫功能低下小鼠均有免疫保护作用,提高尤以 A 品牌阿胶效果最好。

关键词 阿胶;环磷酰胺;肿瘤坏死因子 α ;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子

中图分类号:R285.6 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)12-385-05

Immunoprotective of Colla Corii Asini on immune function in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide

LI Xiao, GAO Huijie, ZHANG Tengyuan, WANG Qinghua, LIU Chao[△]

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To explore the immunoregulatory function of different brands of Colla Corii Asini in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. **Methods** ICR mice were randomly divided into five groups: control group, cyclophosphamide (Cy) group, and brand A, B and C Colla Corii Asini group. The immunosuppression was induced by receiving intraperitoneal injection of Cy. The mice in Colla Corii Asini group received intragastric administration of 5% brand A, B and C Colla Corii Asini solution every day. After 7 days, the thymus and spleen index, the content of serum hemolysin were analyzed. The expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (GM-CSF) in peripheral blood was detected by ELISA. RT-PCR was used to detect the changes of TNF- α and GM-CSF mRNA expression in spleen cells of mouse. **Results** Compared with the Cy group, three brands of Colla Corii Asini increased the thoracic (spleen) index, the serum hemolysin level, while Brand A and B increased them more significantly ($P < 0.001$). Compared with the Cy group, three brands of Colla Corii Asini increased the expression of TNF- α and GM-CSF in peripheral blood and spleen cells of mouse, while Brand A increased them more significantly ($P < 0.001$). **Conclusion** Three brands of Colla Corii Asini can improve the immune function in immunodepressed mice induced by Cy. Among them, brand A has the best effect.

Keywords: Colla Corii Asini; Cyclophosphamide (Cy); TNF- α ; GM-CSF

* [基金项目] 山东省自然科学基金项目 (ZR2016HL22); 济宁医学院大学生科研项目 (JYXS2017KJ022); 济宁医学院青年教师科研扶持基金 (JY2017KJ046)

[△] [通信作者] 刘超, E-mail: lcanatomy@163.com

阿胶是传统的滋补佳品,李时珍著《本草纲目》载:阿胶为马科动物驴的皮,经煎煮、浓缩制成的固体胶^[1]。阿胶主要由骨胶原组成,其水解可得明胶、蛋白质及多种氨基酸^[2-3]。现代药理研究表明,阿胶对血液、造血系统、钙代谢、免疫系统等均有保护作用,且有增强记忆、抗疲劳、耐缺氧等作用^[4-8]。但是,长期以来由于技术条件和传统中药制药思想的制约,阿胶的很多功效作用还未得到足够的实验证实,特别是在调节机体免疫功能方面,相关的实验研究较少。本文旨在通过观察对比不同品牌阿胶对由环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)致免疫低下小鼠免疫功能的影响,为阿胶的合理开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 ICR 小鼠,4~8 周鼠龄,平均体重为 19~22g,雌雄各半,由济宁医学院动物房提供。所有动物实验均遵循国家实验动物饲养管理条例和使用指南以及济宁医学院实验动物管理条例。

1.1.2 仪器与试剂 DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏洁医疗有限公司);Multiskan 酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司);T100TM Thermal Cycler PCR 仪(BIORAD 公司)。阿胶:A、B、C 3 种品牌的阿胶购自日照海力日盛药业有限公司,阿胶经粉碎机粉碎后,室温贮存,实验时以蒸馏水配置成 5% (0.08g/1.6ml) 的悬浊液,备用;环磷酰胺注射液(上海源叶生物科技有限公司);10% 豚鼠血清;PBS 溶液。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 健康 ICR 小鼠 75 只,随机分成 5 组:对照组、Cy 组、A 品牌阿胶组、B 品牌阿胶组和 C 品牌阿胶组,每组 15 只。3 种品牌阿胶组每天灌胃 5% 的阿胶溶液 0.1ml,对照组每天灌胃等体积的氯化钠溶液。Cy 造模:实验第 4 天,3 种品牌阿胶组和 Cy 组腹腔注射 80mg/kg Cy 0.2ml,对照组腹腔注射 0.2ml 的氯化钠溶液。

1.2.2 小鼠免疫器官胸腺、脾脏指数的测定 第 7 天实验结束后,称取小鼠的体重并做好记录,颈椎脱臼,处死小鼠后,经无菌操作解剖取其胸腺和

脾脏,称重并做记录,计算脾脏及胸腺指数。计算公式:胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg)/体重(g)。

1.2.3 小鼠血清溶血素测定 在实验第 6 天每组小鼠均腹腔注射 10% 的绵羊红细胞进行初次免疫,实验第 7 天最后一次给药 2h 后,眼球取血 2ml,置于 EP 管中,用 2000r/min 离心 10min,取上清,标注,分别稀释为 1:25,1:100,1:800,1:1500,1:2500,1:3000,37℃ 放置 1h 后,分别取 0.1ml 与 0.2% SRBC 0.1ml 和 0.1ml 10% 豚鼠血清混合,2000r/min 离心 10min,取上清,置于酶标板 4 个孔中,检测 OD 值。

1.2.4 小鼠血清 TNF- α 和 GM-CSF 含量测定 实验第 7 天最后一次灌胃后,小鼠眼球取血 1ml,置于 37℃ 放置 30min 后,2000r/min 转速,离心 10min,吸取上层血清置于微量反应孔,参照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,酶标仪在 450nm 处测量 OD 值。

1.2.5 小鼠脾脏 TNF- α 和 GM-CSF mRNA 表达测定 最后一次灌胃后 8h,取小鼠脾脏,Trizol 法提取脾脏总 RNA,将获得的总 RNA 进行反转录。首先将 2 μ l RNA,1 μ l Oligo dT Primer,1 μ l dNTP mixture 和 6 μ l ddH₂O 加入 0.2ml EP 管中,然后在 65℃ 下保温 5min,拿出后冰上迅速冷却,然后加入 4 μ l 5 $\times$ PrimeScript II Buffer,0.5 μ l RNase Inhibitor,1 μ l PrimeScript RTase 和 4.5 μ l ddH₂O,反转录得 cDNA,随即进行 PCR 扩增反应。TNF- α 引物(209bp):上游 5'-ACCGTCAGCCGAT TTGCTAT-3' 下游 3'-CCGGACTCCGCAAAGTCTAA-5'; GM-CSF 引物(283bp):上游 5'-GCCAGGAGA TTCCA-CAACTCAG-3',下游 5'-GCATGTCATCCAGGAGGTTCAGG-3'。内参采用小鼠 GAPDH(183bp):上游 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3',下游 5'-GCAGAAGGGGCCGGAGATGA-3'。PCR 产物行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,计算光密度值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS21.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 阿胶对小鼠胸腺和脾脏指数的影响

与对照组比,Cy 模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数显著降低($P < 0.001$),说明成功制备免疫抑制

小鼠模型。与 Cy 组相比,3 种品牌阿胶组的胸腺和脾脏指数均升高($P < 0.001$),说明不同品牌的阿胶均能够提升小鼠免疫器官的功能。A、B、C 3 种品牌阿胶相比较,A、B 两种品牌阿胶效果较好。

表 1 阿胶对小鼠免疫器官的影响($\bar{x} \pm s$,mg/g,n = 15)

组别	胸腺指数	脾指数
对照组	2.17 ± 0.26	4.20 ± 0.43
Cy 模型组	1.31 ± 0.17 *	2.69 ± 0.27 *
C 品牌阿胶组	1.68 ± 0.18 #	3.47 ± 0.39 #
B 品牌阿胶组	1.96 ± 0.29 **	3.70 ± 0.42 **
A 品牌阿胶组	1.99 ± 0.21 **	3.79 ± 0.44 **
F 值	21.25	19.95
P	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与 Cy 模型组比较,# $P < 0.001$;与 C 品牌阿胶组比较,** $P < 0.001$

2.2 阿胶对小鼠血清溶血功能的影响

与对照组小鼠比较,Cy 组小鼠血清溶血素 OD 值降低($P < 0.001$),说明使用环磷酰胺造模成功。与 Cy 组比,3 种品牌阿胶组的小鼠血清溶血素 OD 值均升高($P < 0.001$),提示阿胶能够提高小鼠体液免疫。A、B、C 3 种品牌阿胶组相比较,A、B 两种品牌阿胶组效果较好。

表 2 5 组小鼠溶血功能的影响($\bar{x} \pm s$,n = 15)

组别	OD 值(450nm)
对照组	0.44 ± 0.08
Cy 模型组	0.19 ± 0.03 *
C 品牌阿胶组	0.29 ± 0.06 #
B 品牌阿胶组	0.31 ± 0.06 **
A 品牌阿胶组	0.34 ± 0.07 **
F 值	20.95
P	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与 Cy 模型组比较,# $P < 0.001$;与 C 品牌阿胶组比较,** $P < 0.001$

2.3 阿胶对小鼠血清 TNF-α 和 GM-CSF 的含量的影响

与对照组比较,Cy 组小鼠血清中 TNF-α 和 GM-CSF 浓度均显著降低($P < 0.001$)。与 Cy 组比,3 种品牌阿胶组小鼠血清中的 TNF-α 和 GM-CSF 浓度均明显提高($P < 0.001$)。其中,A 品牌阿胶组与 B、C 品牌阿胶组相比较,GM-CSF 的浓度最高($P < 0.001$),3 种品牌阿胶组 TNF-α 的浓度无显著性差异。

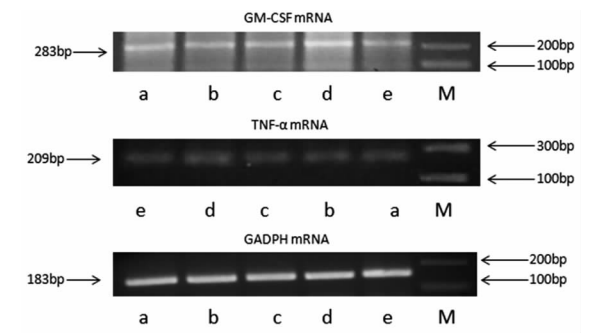
表 3 5 组小鼠血清 TNF-α 和 GM-CSF 的比较($\bar{x} \pm s$,n = 15)

组别	TNF-α	GM-CSF
对照组	1.48 ± 0.22	1.94 ± 0.23
Cy 模型组	0.89 ± 0.23 *	1.16 ± 0.29 *
C 品牌阿胶组	1.21 ± 0.13 #	1.39 ± 0.16 #
B 品牌阿胶组	1.20 ± 0.22 #	1.45 ± 0.23 #
A 品牌阿胶组	1.25 ± 0.11 #	1.66 ± 0.19 **
F 值	12.31	16.78
P	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与 Cy 模型组比较,# $P < 0.001$;与 B、C 品牌阿胶组比较,** $P < 0.001$

2.4 阿胶对小鼠脾脏 TNF-α 和 GM-CSF mRNA 表达的影响

与对照组相比较,Cy 组小鼠脾脏 TNF-α 和 GM-CSF mRNA 的表达均显著下降($P < 0.001$)。与 Cy 组小鼠比较,3种品牌的阿胶均可提高小鼠脾脏 TNF-α 和 GM-CSF mRNA 的表达($P < 0.001$),其中,与 B、C 品牌阿胶组相比较,A 品牌阿胶组提高 GM-CSF mRNA 的表达更为显著($P < 0.001$)。



注:a. A 品牌阿胶;b. B 品牌阿胶;c. C 品牌阿胶;d. 对照组;e. Cy M:Marker

图 1 各组 GM-CSF mRNA 和 TNF-α mRNA 的表达

表 4 5 组小鼠 TNF-α mRNA 和 GM-CSF mRNA 的比较($\bar{x} \pm s$,n = 15)

组别	TNF-α	GM-CSF
对照组	1.46 ± 0.10	1.52 ± 0.10
Cy 模型组	0.81 ± 0.12 *	0.86 ± 0.13 *
C 品牌阿胶组	1.21 ± 0.06 #	1.27 ± 0.09 #
B 品牌阿胶组	1.22 ± 0.11 #	1.33 ± 0.13 #
A 品牌阿胶组	1.26 ± 0.12 #	1.46 ± 0.09 **
F 值	52.00	54.46
P	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与 Cy 模型组比较,# $P < 0.001$;与 B、C 品牌阿胶组比较,** $P < 0.001$

3 讨论

阿胶与人参、鹿茸并称为“滋补三宝”,被收入《中华人民共和国药典》。阿胶味甘、性平,临床应用广泛,具有补血、止血、抗氧化、抑制肿瘤、增强免疫力等多方面的功效。本次研究主要关注阿胶对机体免疫功能的影响。阿胶能够增强由氢化可的松诱导免疫抑制小鼠的固有免疫应答,改善迟发型超敏反应、碳清除指数,显著提高脾脏内淋巴细胞转化能力和腹腔巨噬细胞吞噬活性^[9-10]。但目前有关阿胶对机体免疫功能调节的具体机制及对细胞因子的影响研究较少。近年来,阿胶市场火爆,涌现出大量不同品牌,其制备工艺有所不同,产品价格也高低不一,市场份额差别大。不同品牌的阿胶在免疫方面的功效是否存在差异,也有待验证。本实验使用 Cy 建立免疫低下模型,探究阿胶对小鼠免疫活性的影响及对细胞因子产生的影响;同时对比分析不同品牌的阿胶对机体免疫活性的影响是否存在较大差异。

Cy 属于烷化剂类的抗肿瘤药物,除用于肿瘤的治疗外,也可以作为免疫抑制剂使用^[11]。高剂量 Cy 能够通过抑制 DNA 复制,促使细胞凋亡,从而使机体处于免疫抑制状态,可用于构建免疫功能低下的动物模型;而低剂量的 Cy 可通过下调 Treg 细胞的数量,提高免疫细胞的功能,反而产生免疫促进作用^[12-13]。因此,本次实验采用了腹腔注射高剂量(80mg/kg)的 Cy 建立免疫低下模型,结果显示无论是小鼠的胸腺指数,还是外周血抗体的生成率,均表现为显著下降,说明免疫抑制模型成功制备。

免疫器官的脏器系数是衡量机体免疫功能的初步指标。胸腺是 T 细胞分化成熟的场所,胸腺指数的改变可直观反映出机体的细胞免疫水平的变化;脾脏作为 T、B 细胞定居及发生免疫应答的场所,脾脏指数也能够很好地反映机体的免疫水平。本文结果显示,阿胶能显著的增加由 Cy 所致的免疫低下小鼠的胸腺及脾脏指数,对机体有很好的免疫保护作用。溶血素实验结果显示外周血抗体生成增加,反映了免疫应答较后期阶段体液免疫的增强,3 组品牌的阿胶均能够提升小鼠外周血抗体的浓度,增强小鼠特异性免疫功能。

阿胶的一大著名功效是能够刺激造血,增强造

血干细胞的活性^[14]。GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) 是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,是造血干细胞向巨噬细胞和粒细胞定向分化过程中所需的一种非常重要的造血细胞因子。TNF- α 主要由单核细胞和巨噬细胞产生,因此 TNF- α 水平可很好地评价巨噬细胞的免疫效应,而巨噬细胞在非特异性免疫中发挥极为重要的作用。TNF- α 含量升高后,能够刺激单核-巨噬细胞增殖,进一步增加 GM-CSF 的合成^[15-16]。因此, TNF- α 和 GM-CSF 的变化一致,相辅相成。本文结果显示,无论是小鼠的外周血还是脾脏中,阿胶的应用可大大提高由免疫抑制所导致的 GM-CSF 的下降,说明阿胶可刺激造血,提升造血性细胞因子的表达;同时,阿胶能显著提高小鼠 TNF- α 水平,促进机体的非特异性免疫,进一步增加 GM-CSF 的合成,刺激造血。

综上所述,3 种品牌的阿胶均对由 Cy 致免疫抑制的小鼠具有很好的免疫保护作用,提升整体免疫水平,对体液免疫和非特异性免疫均有良好的促进作用。提示阿胶可能是通过促进 TNF- α 和 GM-CSF 的表达,促进免疫细胞的功能,提升机体造血能力。作为一种药食同源的传统本草,阿胶具有很好的研究价值与应用前景,其对机体免疫机能的调节机制今后仍需进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Sun T, Li S, Xia X, et al. ASIP gene variation in Chinese donkeys [J]. Anim Genet, 2017, 48 (3): 372-373. DOI: 10.1111/age.12530.
- [2] 杜怡波, 樊慧蓉. 阿胶的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24 (3): 267-270.
- [3] 刘谷全. 中药阿胶的临床应用及药理作用 [J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7 (12): 74-75. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3296.2014.35.063.
- [4] Wu H, Ren C, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from Colla Corii Asini [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 182: 129-136. DOI: 10.1016/j.jep.2016.02.019.
- [5] 李敏, 庞萌萌, 田晨颖, 等. 不同阿胶酶解液相对分子量分布及补血升白作用对比研究 [J]. 中国食品添加剂, 2017, 28 (6): 105-111.
- [6] Ma LX, Ai P, Li H, et al. The prophylactic use of Chi-

- nese herbal medicine for chemotherapy-induced leucopenia in oncology patients: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Support Care Cancer, 2015, 23 (2): 561-579. DOI: 10. 1007/s00520-014-2469-8.
- [7] Xu HY, Wang SS, Yang HJ, et al. Study on action mechanism of adjuvant therapeutic effect compound Ejiao slurry in treating cancers based on network pharmacology [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2014, 39 (16): 3148-3151.
- [8] 孙叙敏, 陈信义. 复方阿胶浆对小鼠 lewis 肺癌 CyclinD1、CD44 表达的影响 [J]. 世界中医药, 2013, 8 (3): 318-321. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7202. 2013. 03. 025.
- [9] 樊庆利. 探讨中药阿胶的临床应用和药理 [J]. 中医临床研究, 2016, 8 (11): 28-30. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-7860. 2016. 11. 012.
- [10] 吴伯姝. 阿胶的临床应用及药理作用 [J]. 首都医药, 2014, 48 (24): 151.
- [11] Jia D, Lu W, Wang C, et al. Investigation on immunomodulatory activity of calf spleen extractive injection in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice and underlying mechanisms [J]. Scand J Immunol, 2016, 84 (1): 20-27. DOI: 10. 1111/sji. 12442.
- [12] 康慧琳, 樊卫平, 雷波, 等. 不同剂量环磷酰胺对小鼠免疫功能的影响 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34 (4): 308-312. DOI: 10. 13431/j. cnki. immunol. j. 20180047.
- [13] Heylmann D, Bauer M, Becker H, et al. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e83384. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0083384.
- [14] Wang D, Ru W, Xu Y, et al. Chemical constituents and bioactivities of Colla corii asini [J]. Drug Discov Ther, 2014, 8 (5): 201-207.
- [15] Santiago E, Mora L, Bautista M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor induces neutrophils to secrete macrophage colony-stimulating factor [J]. Cytokine, 2001, 15 (6): 299-304. DOI: 10. 1006/cyto. 2001. 0937.
- [16] 吕慧, 刘建忠. 小儿急性肾炎患者血清中 TNF- α 、IGF-II、GM-CSF 和 VEGF 水平的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29 (25): 4089-4091. DOI: 10. 7620/zgfybj. j. issn. 1001-4411. 2014. 25. 23.
- (收稿日期 2018-08-21)
(本文编辑: 石俊强)
-
- (上接第 384 页)
- [26] De Luca R, Leonardi S, Spadaro L, et al. Improving cognitive function in patients with stroke: can computerized training be the future [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27 (4): 1055-1060. DOI: 10. 1016/j. jstrokecerebrovasdis. 2017. 11. 008.
- [27] 邱立云, 石雯娟, 张尚裕. 认知康复训练治疗脑卒中后认知功能障碍效果分析 [J]. 数理医药学杂志, 2018, 31 (7): 1008-1009.
- [28] Wang Z, Dong B, Zeng G, et al. Is there an association between mild cognitive impairment and dietary pattern in Chinese elderly results from a cross-sectional population study [J]. BMC Public Health, 2010, 10: 595. DOI: 10. 1186/1471-2458-10-595.
- [29] Richard E, Ligthart SA, Moll van Charante EP. Vascular risk factors and dementia--towards prevention strategies [J]. Neth J Med, 2010, 68 (10): 284-290.
- [30] Merriman NA, Sexton E, McCabe G, et al. Addressing cognitive impairment following stroke: systematic review and meta-analysis of non-randomised controlled studies of psychological interventions [J]. BMJ Open, 2019, 9 (2): e024429. DOI: 10. 1136/bmjopen-2018-024429.
- [31] 王娟, 郑婵娟, 崔晓阳, 等. 重复经颅磁刺激联合认知训练治疗脑卒中后认知障碍的疗效观察 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14 (1): 11-14, 18.
- [32] 张艳, 杨雪玉, 吕文. 五音联合认知训练对脑卒中患者认知障碍的影响 [J/CD]. 实用临床护理学电子杂志, 2018, 3 (25): 47.
- (收稿日期 2019-11-09)
(本文编辑: 石俊强)