

铁皮石斛及其冻干粉对免疫抑制小鼠的免疫调节作用差异研究

张静^{1,2,3,4}, 朱雅琴^{1,2,4}, 祝宇龙^{1,2,4}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽合肥 230012; 3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽合肥 230012; 4. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽合肥 230012)

摘要 [目的]探讨铁皮石斛及其冻干粉对提升免疫抑制小鼠的免疫调节作用差异。[方法]120只SPF级昆明雄性小鼠分为空白对照组、环磷酰胺模型组、铁皮石斛组和铁皮石斛冻干粉组。两组给药组连续灌胃30d后,24h内模型组、铁皮石斛及其冻干粉组一次性腹腔注射200mg/kg的环磷酰胺免疫抑制造模。试验结束后测定胸腺系数、脾脏系数、足趾肿胀度,以及血清中的细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-6的含量。[结果]铁皮石斛及其冻干粉均可以升高免疫抑制小鼠的胸腺和脾脏系数;增加免疫抑制小鼠的足趾肿胀度;上调免疫抑制小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-2和IL-6的水平。[结论]铁皮石斛及其冻干粉对环磷酰胺引起的免疫抑制具有明显的改善作用,且后者药效更好。

关键词 铁皮石斛;冻干粉;环磷酰胺;细胞因子;免疫调节

中图分类号 R285.5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)24-0180-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.24.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Difference of Immunomodulatory Effects of *Dendrobium officinale* and Its Lyophilized Power on Immunosuppressed Mice

ZHANG Jing^{1,2,3,4}, ZHU Ya-qin^{1,2,4}, ZHU Yu-long^{1,2,4} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012; 2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicine Formula, Hefei, Anhui 230012; 3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012; 4. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei, Anhui 230012)

Abstract [Objective] The research aimed to study the difference in immunomodulatory effects of *Dendrobium officinale* and its lyophilized power on immunosuppressed mice. [Method] 120 SPF Kunming male mice were divided into control group, cyclophosphamide model group, *Dendrobium officinale* and its lyophilized power group. *Dendrobium officinale* and its lyophilized power groups were continuously administrated for 30 days. At 24 hours before the end of the experiment, the model group, *Dendrobium officinale* and its lyophilized power group were intraperitoneally injected with 200 mg/kg cyclophosphamide. At the end of the experiment, the thymus index, spleen index, DTH, and serum cytokines IFN- γ , IL-2 and IL-6 were measured. [Result] *Dendrobium officinale* and its lyophilized power increased the thymus index, spleen index and toe swelling, up-regulated the levels of IFN- γ , IL-2 and IL-6 in the serum of immunosuppressed mice. [Conclusion] *Dendrobium officinale* and its lyophilized power has a significant improvement on the immunosuppression caused by cyclophosphamide, and the latter is better.

Key words *Dendrobium officinale*; Lyophilized power; Cyclophosphamide; Cytokine; Immunoregulation

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科石斛属植物,位列中华九大仙草之首,是一种名贵的中草药。铁皮石斛中主要活性成分为多糖、生物碱、氨基酸、萜类及其衍生物、挥发性成分以及微量元素等^[1-4]。铁皮石斛因其具有免疫调节作用、抗肿瘤和抗氧化等特性^[5-7],越来越受到现代医学的关注。而在实际应用中,铁皮石斛的应用人群往往是免疫力低下者。铁皮石斛冻干粉不仅最大限度地保留了铁皮石斛有效成分的生物活性和临床有效性,并且生物活性更高、临床有效性更好,更容易被人体消化吸收,能够更好地发挥药效。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)属于烷化剂类免疫抑制剂,是可阻断复制,破坏DNA结构从而导致细胞死亡的一种细胞毒性化合物。因此为了探讨铁皮石斛及其冻干粉在增强免疫力功效方面的差异性,笔者采用CP建立免疫抑制动物模型^[8],通过比较铁皮石斛冻干粉和铁皮石斛免疫调节药效,为铁皮石斛冻干粉的药用价值提供依据,也为其深层次的开发和应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 仪器 离心机(TG16-WS,常州市万丰仪器制造有限公司);十万分之一电子天平(BT 25 S型,赛多利斯科学仪器北

京有限公司);酶标仪(RT-6000,雷杜生命科学有限公司);恒温水浴锅。

1.2 试材 铁皮石斛购买于安徽亳州药材市场,由安徽中医药大学俞年军老师鉴定为兰科石斛属植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的干燥根茎,铁皮石斛纯粉和铁皮石斛冻干粉是于安徽中医药大学药学院药剂实验室制得。环磷酰胺购自江苏恒瑞医药股份有限公司;ELISA试剂盒购于武汉基因美生物科技有限公司;绵羊红细胞(SR-BC)、生理盐水等。

1.3 试验动物及分组处理 健康SPF级昆明雄性小鼠120只,来自安徽医科大学实验动物中心,生产许可证号为Scxk(皖)2017-001。小鼠随机分为4组(铁皮石斛原药材组、铁皮石斛冻干粉组、模型组和空白对照组),每组30只,铁皮石斛及其冻干粉按照《中华人民共和国药典》推荐量6~12g的中间量9g/(人·d)[0.15g/(kg·d)]的10倍,即1.5g/(kg·d)给药。空白对照组和模型组等剂量给予生理盐水,1.5g铁皮石斛及其冻干粉加蒸馏水至100mL,煎煮后水浴蒸发浓缩,灌胃。每日一次,连续30d。试验结束前24h,模型组、铁皮石斛及其冻干粉组一次性腹腔注射200mg/kg的环磷酰胺^[8-9]。

1.4 指标测定

1.4.1 免疫器官脏器系数。末次给药24h禁食不禁水后,精确称定小鼠体质量,4组每组10只小鼠摘眼球取血后处死,

基金项目 安徽省科技重大专项(17030801015)。

作者简介 张静(1996—),女,安徽宿州人,硕士研究生,研究方向:药剂学。

收稿日期 2019-07-02

取小鼠胸腺和脾脏,用滤纸吸干脏器表面血污,并称其质量,按照公式:脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(10 g)来分别计算胸腺系数和脾脏系数。

1.4.2 迟发型变态反应(DTH)。4组每组10只小鼠用2%绵羊红细胞(SRBC)0.2 mL腹腔注射致敏。致敏4 d后,测量左后足趾部厚度,并在该测量部位皮下注射20%的SRBC 20 μ L,注射24 h后再重新测量左后足趾部厚度。用注射前后足趾厚度的差值(足趾肿胀度)来表示迟发型变态反应的程度。

1.4.3 血清中细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-6的含量。末次给药24 h禁食不禁水后,每组10只小鼠摘眼球取血,室温静置30 min,3 000 r/min离心15 min,取上清,-80 $^{\circ}$ C冰箱冻存

备用。按照ELISA试剂盒说明书操作,检测血清中IFN- γ 、IL-2和IL-6的含量。

1.5 数据统计分析 用Excel和SPSS软件进行数据分析处理,数据用 $\bar{x}\pm S$ 表示。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛及其冻干粉对免疫抑制小鼠免疫器官脏器系数及迟发型变态反应(DTH)的影响 由表1可见,与空白对照组相比,模型组小鼠的脾脏系数、胸腺系数和足趾肿胀系数都有极为显著的统计学意义($P<0.01$);铁皮石斛冻干粉组与环磷酰胺模型组相比有显著的统计学差异($P<0.05$);铁皮石斛组与模型组相比仅有统计学差异($P<0.05$)。

表1 免疫抑制小鼠的免疫器官系数及迟发型变态反应结果($n=10$)

Table 1 Results of immune organ coefficient and delayed type allergic reaction in immunosuppressed mice

组别 Group	小鼠数 Number of mice//只	终体重 Final weight//g	脾重 Spleen weight//g	脾脏系数 Spleen coefficient	胸腺重 Thymus weight//g	胸腺系数 Thymic coefficient	足趾肿胀度 Toe swelling mm
空白对照组 Blank control group	10	33.2 \pm 3.1	0.17 \pm 0.04	0.52 \pm 0.09	0.15 \pm 0.04	0.44 \pm 0.08	0.27 \pm 0.09
环磷酰胺模型组 Cyclophosphamide model group	10	29.8 \pm 4.69 [#]	0.10 \pm 0.05 [#]	0.32 \pm 0.10 [#]	0.08 \pm 0.03 [#]	0.26 \pm 0.07 [#]	0.11 \pm 0.05 [#]
铁皮石斛组 Dendrobium officinale group	10	31.4 \pm 3.5 ^{**}	0.14 \pm 0.07 [*]	0.43 \pm 0.17 [*]	0.10 \pm 0.03 [*]	0.30 \pm 0.06 [*]	0.20 \pm 0.05 ^{**}
铁皮石斛冻干粉组 Dendrobium officinale lyophilized power group	10	32.5 \pm 4.8 ^{**}	0.17 \pm 0.06 ^{**}	0.51 \pm 0.11 ^{**}	0.13 \pm 0.04 [*]	0.38 \pm 0.07 ^{**}	0.23 \pm 0.06 ^{**}

注:#表示与空白对照组比较差异极显著($P<0.01$);与环磷酰胺模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:# indicates that the difference is extremely significant compared with the blank control group ($P<0.01$);compared with the cyclophosphamide model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 血清中细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-6的含量 由表2可见,与空白对照组相比,模型组小鼠的细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-6有显著性差异($P<0.01$)。铁皮石斛冻干粉组与铁皮石斛组相比,小鼠血清中IFN- γ 、IL-2和IL-6水平增

加,铁皮石斛冻干粉组与模型组相比有显著性差异($P<0.01$);铁皮石斛组与模型组相比细胞因子IFN- γ 和IL-6有显著性差异($P<0.01$),而因子IL-2有统计学差异($P<0.05$)。

表2 铁皮石斛及其冻干粉对免疫抑制小鼠血清细胞因子的影响($n=10$)

Table 2 Effects of *Dendrobium officinale* and its lyophilized power on serum cytokines in immunosuppressed mice

组别 Group	小鼠数 Number of mice//只	IFN- γ	IL-2	IL-6
空白对照组 Blank control group	10	167.8 \pm 10.2	52.0 \pm 10.8	113.2 \pm 9.5
环磷酰胺模型组 Cyclophosphamide model group	10	142.8 \pm 9.3 [#]	34.7 \pm 10.0 [#]	83.2 \pm 8.3 [#]
铁皮石斛组 Dendrobium officinale group	10	157.9 \pm 12.7 ^{**}	45.4 \pm 8.3 [*]	108.9 \pm 10.2 ^{**}
铁皮石斛冻干粉组 Dendrobium officinale lyophilized power group	10	166.8 \pm 11.3 ^{**}	52.8 \pm 8.7 ^{**}	117.3 \pm 11.3 ^{**}

注:#表示与空白对照组比较差异极显著($P<0.01$);与环磷酰胺模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:# indicates that the difference is extremely significant compared with the blank control group ($P<0.01$);compared with the cyclophosphamide model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

天然植物多糖被认为是最有前途的免疫调节剂,相对无毒且没有明显的副作用。铁皮石斛经常以水提取物的方式服用,其中发挥最大药效的成分是石斛多糖。植物多糖可诱导如TNF- α 、IL-1h、IL-2、IL-6、IL-12、IFN- γ 和IFN- β 细胞因子的产生^[10]。该研究中通过煎煮铁皮石斛及其冻干粉的浓缩液灌胃给药,腹腔注射环磷酰胺后,结果显示模型组

小鼠的免疫器官脏器系数、足趾肿胀度和血清中IFN- γ 、IL-2、IL-6均降低,表明免疫抑制模型建立成功。而灌胃给予铁皮石斛及其冻干粉后,各个指标数均明显升高,表明铁皮石斛及其冻干粉具有增强免疫力的作用,且尤以铁皮石斛冻干粉的疗效更加显著。

该研究发现铁皮石斛具有增强免疫力的作用,其作用机

(下转第249页)

桃番茄产业长远发展的角度考虑,应进一步引进筛选或选育优质、丰产、抗病性好的新品种,促进陵水樱桃番茄品种更新换代,一定程度上解决当前“千禧”品种退化、连作障碍、病虫害高发等难题,另一方面也可实现樱桃番茄产品多样化,更好地满足市场消费需要,增加产品销量和市场占有率。例如,黄文枫等^[12]从4个有限生长型樱桃番茄品种筛选出适合在海南栽培、品质佳且青枯病和病毒病抗性强的品种“海贝斯”;白会超等^[14]从引进的18个新品种中筛选出可在陵水地区推广种植、抗TY性强、产量高且果实性状好的5个品种,分别为“艳妃202”“丽妃2号”“西大樱粉1号”“粉樱”“云河”。此外,为降低樱桃嫁接苗的死苗率,应同步加快优质、高抗砧木品种的筛选与更新。海南省农科院蔬菜研究所近年来开展的樱桃番茄砧木筛选试验工作,发现“海茄1号”“亚辉”等茄子砧木和“阿拉姆”“萨瓦”等番茄砧木均有较强的抗病性、嫁接苗生长势旺盛、所结果实品质佳,可适当进行示范推广^[5]。

3.5 加强农民培训,完善技术体系建设,提升标准化生产水平 由于种植户自身知识水平限制,过多依赖传统种植经验,缺乏系统、科学的樱桃番茄种植技术,产量和品质均不稳定。当地农技部门一方面应加强对种植户的培训,改变农户传统落后的种植习惯,推广普及病虫害绿色防控、测土配方施肥、水肥一体化等先进栽培技术,提高农户的标准化生产水平。另一方面,应针对当前樱桃番茄生产中出现的

问题,加强与农业科研院所(校)的合作,通过产学研联合攻关与专题研究来破解生产难题,不断完善樱桃番茄绿色优质高效栽培技术,提升陵水地区樱桃番茄标准化生产水平,推动陵水樱桃番茄产业可持续发展。

参考文献

- [1] 荆子桓,覃连红,王先裕,等.不同樱桃番茄品种比较试验[J].安徽农业科学,2016,44(21):29-33.
 - [2] 祖兆忠,张波,黄武强.樱桃番茄设施栽培研究进展[J].黑龙江农业科学,2017(6):136-140.
 - [3] 马恋,陆智明,宋乃庆.中国居民果蔬消费与营养发展的趋势预测及战略思考[J].西南师范大学学报(自然科学版),2017,42(4):68-75.
 - [4] 何哲良,小小“圣女”果 开拓大市场[J].今日海南,2001(9):48.
 - [5] 伍壮生,李雪娇,吴月燕,等.海南樱桃番茄生产现状及发展瓶颈分析[J].中国蔬菜,2018(5):98-100.
 - [6] 刘行.基于供应链管理的海南冬季瓜菜流通模式研究[D].海口:海南大学,2016:24-25.
 - [7] 海南:一颗圣女果 富了一个镇[J].农业工程技术,2019,39(3):60-61.
 - [8] 张朝坤,罗燕华,张连水.嫁接栽培对樱桃番茄抗青枯病和产量的影响[J].江西农业学报,2008,20(4):68-69.
 - [9] 朱庆胜.陵水县樱桃番茄嫁接栽培技术[J].中国农技推广,2017,33(7):32-33.
 - [10] 万学闪,周才旻,陈青.土壤养分对樱桃番茄果实可溶性固形物含量的影响[J].广东农业科学,2014,41(2):47-49,53.
 - [11] 陈青,万学闪,陈国明,等.海南露地樱桃番茄需肥特点研究[J].安徽农业科学,2015,43(33):202-203,225.
 - [12] 黄文枫,邓长智,符坚,等.海南冬种樱桃番茄品种比较试验[J].长江蔬菜,2014(4):14-16.
 - [13] 章宁.设施番茄—水稻循环轮作生产示范[J].农民致富之友,2019(9):143.
 - [14] 白会超,何声团,林春梅,等.樱桃番茄品种比较试验[J].蔬菜,2019(6):78-82.
-
- (上接第181页)
- 制可能与上调细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-6 等的表达水平有关。但是机体免疫调节系统是一个极其复杂的系统,目前对石斛尤其是铁皮石斛及其冻干粉的研究依然处于比较浅显的阶段,其具体机制还有待进一步的深入研究。
- 参考文献**
- [1] HUANG M Q, CAI T Y. Extration, separation and analysis of polysaccharide in *Dendrobium candidum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 25(3): 128-129.
 - [2] 杨洋, 罗在染, 黄安香, 等. 气相色谱检测不同种植方式铁皮石斛中石斛碱含量及其挥发性成分分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1835-1840.
 - [3] YAMAKI M, HONDA C. The stilbenoids from *Dendrobium plicatile*[J]. Phytochemistry, 1996, 43(1): 207-208.
 - [4] 诸燕, 苑鹤, 李国栋, 等. 铁皮石斛中 11 种金属元素含量的研究[J]. 中

国中药杂志, 2011, 36(3): 356-359.

- [5] XIA L J, LIU X F, GUO H Y, et al. Partial characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from the stem of *Dendrobium officinale* (*Tiēpishihu*) *in vitro*[J]. Journal of functional foods, 2012, 4(1): 294-301.
- [6] 王杰, 葛颖华, 周萃, 等. 鲜铁皮石斛提取物抗 Lewis 肺癌的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(8): 953-957.
- [7] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 对氧自由基和脂质过氧化的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 410-414.
- [8] 宋雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 218-225.
- [9] 李伟, 张静, 周雯, 等. 铁皮石斛对免疫抑制小鼠的免疫调节作用和血清细胞因子的影响[J]. 卫生研究, 2016(1): 137-139.
- [10] SCHEPETKIN I A, QUINN M T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential[J]. International immunopharmacology, 2006, 6(3): 317-333.