

· 论 著 ·

石斛灵芝口服液增强小鼠免疫功能的研究

金伟¹, 雷林²

1.四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 2.四川省自然资源科学研究所

摘要: **目的** 评价石斛灵芝口服液对昆明种雌鼠免疫功能的影响。**方法** 选用正常昆明种雌鼠 160 只, 分为 3.33、6.67、10 mL/kgbw 石斛灵芝口服液 3 个剂量组和阴性对照组, 连续灌胃 30 d 后, 取胸腺和脾称重并计算脏器比值, 测定体液免疫功能 (抗体积数和溶血空斑数)、细胞免疫功能 (光密度值和足跖肿胀度)、单核-巨噬细胞吞噬功能 (吞噬指数和吞噬率) 和 NK 细胞活性, 其中 2 项出现阳性结果判定石斛灵芝口服液具有增强免疫功能的作用。**结果** 4 组雌鼠的脏器比值、抗体积数、光密度差值、吞噬指数、吞噬率和 NK 细胞活性比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 中、高剂量组雌鼠的溶血空斑数分别为 $(315.5 \pm 49.9) / 10^6$ 脾细胞和 $(343.0 \pm 43.8) / 10^6$ 脾细胞, 均多于对照组的 $(249.5 \pm 41.3) / 10^6$ 脾细胞 ($P < 0.05$); 中、高剂量组雌鼠的足跖肿胀度分别为 (1.34 ± 0.42) 、 (1.37 ± 0.49) mm, 均高于对照组的 (0.89 ± 0.37) mm ($P < 0.05$)。**结论** 石斛灵芝口服液具有增强昆明种雌鼠免疫功能的作用。

关键词: 石斛; 灵芝; 免疫功能; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2019) 05-0456-04

Dendrobium and Ganoderma lucidum oral liquid on immunity enhancement of mice

JIN Wei*, LEI Lin

*Sichuan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To evaluate the immune function of *Dendrobium* and *Ganoderma lucidum* oral liquid in female KM mice. **Methods** A total of 160 healthy female KM mice were selected and divide into three dose groups and a control group. *Dendrobium* and *Ganoderma lucidum* oral liquid was administered to the mice in the three dose groups at 3.33, 6.67 and 10.00 mL/kgbw by intragastric lavage for 30 days, while distilled water was given to the mice in the control group in the same way. The thymus and spleen were weighed and the visceral organ coefficients were calculated. The humoral immune function, cellular immune function, monocyte-macrophage phagocytosis function and natural killer(NK) cell activity were detected, then the effects of the oral liquid on immunity enhancement of mice could be proved with any two items above positive. **Results** No statistically significant differences were found between the dose groups and the control group in the visceral organ coefficients, serum hemolysis, lymphocyte proliferation ability, macrophage phagocytosis and NK cell activity ($P > 0.05$). In the middle- and high-dose group, the number of plague-forming cells per 10^6 spleen cells were 315.5 ± 49.9 and 343.0 ± 43.8 , respectively, which were more than that in the control group (249.5 ± 41.3 , $P < 0.05$); the capacity of toe swelling in the middle- and high-dose group were (1.34 ± 0.42) and (1.37 ± 0.49) mm, respectively, which were more than that in the control group [(0.89 ± 0.37) mm, $P < 0.05$]. **Conclusion** *Dendrobium* and *Ganoderma lucidum* oral liquid have the effect of enhancing immunity on female KM mice.

Key words: *Dendrobium*; *Ganoderma lucidum*; Immunity; Mice

石斛隶属兰科第二大属, 多生长于亚洲热带、亚热带地区湿润的岩石或树皮上, 其茎为名贵中药材,

主要活性成分有石斛碱、多糖、黄酮类、酚类和苷类等^[1], 具有缓解疲劳、抗菌消炎、抗氧化、抗肿瘤和调节免疫等功效^[2-11]。由于野生石斛急剧减少, 导致石斛价格较贵, 故目前大多数石斛相关产品多是中药配伍复方制剂, 即在以石斛为主的基础上配伍西

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.05.006

作者简介: 金伟, 硕士, 副主任医师, 主要从事卫生毒理工作

通信作者: 雷林, E-mail: 535092635@qq.com

洋参、枸杞子、人参果等其他滋补药材。而灵芝具有止咳平喘、补气安神的功能^[12]，并能通过增强免疫调节机制起到抗肿瘤作用^[13]。本研究旨在通过动物实验探讨石斛灵芝口服液对正常小鼠免疫功能的影响，为拓展石斛资源的运用提供实验依据，现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 超净工作台（苏州净化设备有限公司）；二氧化碳培养箱（SANYO公司）；2010型酶标仪（SIGMA公司）；723分光光度仪（上海美析仪器有限公司）；电子分析天平（上海天美天平仪器有限公司）；离心机（AID科技有限公司）；石斛灵芝口服液（某药业有限公司）；Hank's液、RPMI1640培养液（Hyclone公司）；乳酸锂、氯化硝基四氮唑蓝、吩嗪二甲酯硫酸盐、氧化型辅酶 I、ConA（SIGMA公司）；MTT（萨思化学技术上海有限公司）；小牛血清、青链霉素（GIBCO公司）；印度墨汁（Solarbic公司）；Na₂CO₃（成都科龙化工试剂厂公司）等。

1.2 实验动物 160只昆明种雌性小鼠，由四川省中医药科学院实验动物中心提供，体重18~22g，SPF级。实验动物生产许可号：SCXK（川）2013-19。

1.3 分组与处理 将160只小鼠分为免疫I套、II套、III套和IV套，每套40只；I套用于小鼠碳廓清实验；II套用于NK细胞活性测定、淋巴细胞转化实验；III套用于小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验；IV套用于血清溶血素测定、抗体生成细胞实验和迟发性变态反应实验。每套小鼠根据石斛灵芝口服液人体每日推荐摄入量（20 mL/60 kgbw）的10倍、20倍和30倍，分别设3.33 mL/kgbw（低剂量组）、6.67 mL/kgbw（中剂量组）和10 mL/kgbw（高剂量组）3个剂量组，分别量取该样品42、83、125 mL，用蒸馏水定容至250 mL。另设阴性对照组（蒸馏水组）。上述4组，每组10只。小鼠按20 mL/kgbw不间断30 d灌胃，根据每周体重变化调整灌胃量。

1.4 免疫功能检测 检测体液免疫功能、细胞免疫功能、单核-巨噬细胞吞噬功能和NK细胞活性，其中2项出现阳性结果，则判定该石斛灵芝口服液具有增强免疫力的作用^[14]。体液免疫功能实验包括抗体生成细胞实验、血清中溶血素的测定（血凝法）；细胞免疫功能实验包括淋巴细胞转化实验（MTT法）、迟发性变态反应实验（足跖增厚法）；单核-巨噬细

胞吞噬功能实验包括小鼠碳廓清实验、腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验（半体内法）；NK细胞活性通过乳酸脱氢酶LDH测定法检测^[14]。

1.4.1 测定脏器比值 于第31天称重，后用颈椎脱臼法处死小鼠并称取胸腺和脾的质量，计算脏器比值。

1.4.2 检测抗体生成细胞 将2%压积的SRBC 0.2 mL腹腔注射于雌鼠。5.5 d后颈椎脱臼法处死雌鼠，取出脾脏，置于平皿中（内含Hank's液）磨碎，通过过滤、离心、洗涤、染色计数等步骤将细胞悬浮浓度调为 5×10^6 个/mL。将1%琼脂糖的水溶液水浴30 min后，加入双倍浓度等量的Hank's液，混合分装至小试管，每管0.5 mL，再加入50 μ L 10%压积SRBC、20 μ L脾细胞悬液，快速混匀后倾倒在玻片上，做2个平行样。琼脂凝固后将玻片平扣放在片架上，置于CO₂培养箱孵育1.5 h，然后加补体至玻片架凹槽内，继续温育1.5 h，计数最终的溶血空斑数。

1.4.3 测定血清溶血素 用2% SRBC 0.2 mL免疫每只雌鼠，继续灌胃5 d后取血，离心，取血清用生理盐水作倍比稀释，每份稀释12孔。不同浓度的血清以每孔100 μ L置于血凝板中，加入100 μ L 0.5% SRBC悬液混匀，放置在湿盒中37 $^{\circ}$ C观察3 h，记录每孔的凝集程度并计算抗体积数。抗体水平 = $S_1 + 2S_2 + 3S_3 \cdots nS_n$ ，式中1、2、3 \cdots n表示对倍稀释的指数，S表示凝集程度的级别，抗体积数越大，说明血清抗体越高。

1.4.4 小鼠淋巴细胞转化试验 在无菌条件下，将小鼠脾脏制成细胞悬液，通过过滤、离心、洗涤、染色计数等步骤将细胞悬液的浓度调为 3×10^6 个/mL。将悬液分2孔，以每孔1 mL加入培养板（24孔）中，1孔作为对照，另1孔加入75 μ L的ConA液，置于5%CO₂孵箱，37 $^{\circ}$ C培养72 h。在第68 h时吸去每孔上清液0.7 mL，并加入0.7 mL RPMI1640培养液（不含小牛血清）和5 mg/mL MTT 50 μ L，继续在孵箱中培养，4 h后每孔加入1 mL酸性异丙醇。每孔做3个平行孔，分装至培养板（96孔）。用酶标仪（2010型）在570 nm波长下测定光密度值（OD）。

1.4.5 检测迟发型变态反应 将2%压积SRBC通过腹腔注射方式致敏小鼠，4 d后测量左后足跖厚度，并在该部位皮下注射20 μ L 20%（v/v）SRBC，24 h后再次测量左后足跖厚度，测量3次取平均值，以足跖肿胀度（即攻击前后足跖厚度差值）表示迟发型变态反应的程度。

1.4.6 碳廓清实验 用5倍生理盐水稀释后的印度墨

汁按 0.1 mL/10 gbw 注入小鼠尾静脉后立即计时, 于第 2、10 min 各取血 20 μ L 加到 2 mL Na_2CO_3 溶液中, 在 723 分光光度计 600 nm 处测定 OD 值, 空白对照为 Na_2CO_3 溶液。处死小鼠后取肝、脾称重并计算吞噬指数。吞噬指数 = [体重 / (肝重 + 脾重)] $\times \sqrt[3]{k}$, $k = (\lg\text{OD}_1 - \lg\text{OD}_2) / (t_2 - t_1)$ 。

1.4.7 腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 将 1 mL 20% 鸡红细胞悬液用生理盐水洗涤 3 次后注射入小鼠腹腔, 0.5 h 后颈椎脱臼法处死小鼠并固定在鼠板上, 剪开正中腹壁皮肤, 注入 2 mL 生理盐水并转动鼠板 1 min。将腹腔洗液吸出 1 mL, 滴于 2 张载玻片上, 置于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0.5 h, 经过漂洗、晾干、固定和染色等步骤, 显微镜下观察并计算吞噬百分率 (每 100 个巨噬细胞中, 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞所占的比例)、吞噬指数 (每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的个数)。

1.4.8 测定 NK 细胞活性 将小鼠脾脏制成细胞悬液, 通过过滤、离心、裂解红细胞和染色计数等步骤将细胞悬液浓度调为 2×10^7 个/mL。每只小鼠的细胞悬液取 300 μ L 分置于 96 孔培养板中, 每只小鼠 3 个孔, 每孔 100 μ L。每孔加 100 μ L 靶细胞 (4×10^5 个/mL YAC-1 细胞), 同时各做靶细胞自然释放孔、最大释放孔各 3 孔。置于 5% CO_2 孵箱, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 后, 各孔离心出上清液, 各吸取 100 μ L 转于另一空白培养板中, 每孔加入 100 μ L 基质液, 10 min 后终止反应 (加入 1 mol/L HCl 30 μ L), 测定 490 nm 处 OD 值并计算 NK 细胞活性率。NK 细胞活性 (%) = [(反应孔 OD - 自然释放孔 OD) / (最大释放孔 OD - 自然释放孔 OD)] $\times 100\%$ 。

1.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件统计分析。资料符合正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组雌鼠脏器比值比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的脾体重比值分别为 0.44 ± 0.06 、 0.39 ± 0.06 、 0.40 ± 0.07 和 0.43 ± 0.04 , 差异无统计学意义 ($F=1.669$, $P=0.191$); 胸腺体重比值分别为 0.35 ± 0.08 、 0.32 ± 0.06 、 0.33 ± 0.05 和 0.34 ± 0.03 , 差异无统计学意义 ($F=0.490$, $P=0.691$)。

2.2 4 组雌鼠血清溶血素比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的抗体积数分别为 110.80 ± 19.62 、 115.80 ± 19.01 、 130.20 ± 14.78 和 $120.80 \pm$

16.80 , 差异无统计学意义 ($F=2.197$, $P=0.105$)。

2.3 4 组雌鼠抗体生成细胞比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的溶血空斑数分别为 $(249.5 \pm 41.3) / 10^6$ 脾细胞、 $(269.5 \pm 36.0) / 10^6$ 脾细胞、 $(315.5 \pm 49.9) / 10^6$ 脾细胞和 $(343.0 \pm 43.8) / 10^6$ 脾细胞, 差异有统计学意义 ($F=9.796$, $P < 0.001$)。中、高剂量组雌鼠的溶血空斑数多于对照组 ($P=0.004$, $P < 0.001$)。

2.4 4 组雌鼠淋巴细胞增殖能力比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的淋巴细胞增殖能力 OD 差值分别为 0.120 ± 0.023 、 0.201 ± 0.034 、 0.197 ± 0.031 和 0.214 ± 0.037 , 差异无统计学意义 ($F=0.544$, $P=0.656$)。

2.5 4 组雌鼠迟发型变态反应比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的足跖肿胀度分别为 (0.89 ± 0.37) 、 (1.31 ± 0.34) 、 (1.34 ± 0.42) 、 (1.37 ± 0.49) mm, 差异有统计学意义 ($F=3.151$, $P=0.037$)。中、高剂量组雌鼠的足跖肿胀度大于对照组 ($P=0.046$, $P=0.030$)。

2.6 4 组雌鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的吞噬率分别为 $(24.30 \pm 2.51)\%$ 、 $(25.50 \pm 3.21)\%$ 、 $(25.15 \pm 3.06)\%$ 和 $(26.45 \pm 2.29)\%$, 差异无统计学意义 ($F=1.672$, $P=0.190$); 吞噬指数分别为 0.89 ± 0.07 、 0.91 ± 0.06 、 0.90 ± 0.07 和 0.95 ± 0.04 , 差异无统计学意义 ($F=1.017$, $P=0.397$)。

2.7 4 组雌鼠单核-巨噬细胞碳廓清功能比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的吞噬指数分别为 3.84 ± 1.07 、 4.27 ± 0.80 、 4.53 ± 0.91 和 4.31 ± 0.90 , 差异无统计学意义 ($F=0.971$, $P=0.417$)。

2.8 4 组雌鼠 NK 细胞活性比较 对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组雌鼠的 NK 细胞活性分别为 $(13.89 \pm 4.27)\%$ 、 $(14.04 \pm 2.11)\%$ 、 $(15.88 \pm 3.71)\%$ 和 $(15.02 \pm 3.67)\%$, 差异无统计学意义 ($F=0.690$, $P=0.564$)。

3 讨论

实验结果显示, 石斛灵芝口服液连续灌胃 30 天后, 对雌鼠的免疫脏器比值没有明显影响; 单核-巨噬细胞吞噬功能实验和 NK 细胞活性测定实验均为阴性; 体液免疫功能实验中, 中、高剂量组雌鼠的溶血空斑数明显增多, 反映抗体生成细胞数明显增多; 细胞免疫实验中, 中、高剂量组雌鼠的足跖肿胀度较对照组明显增加, 足跖肿胀度可反映迟发型变态反应程

度,故石斛灵芝口服液对雌鼠体液和细胞免疫实验结果均为阳性。提示石斛灵芝口服液对雌鼠具有增强免疫力的作用,与既往研究结果^[8-11]有部分相似但不完全一致,可能与石斛的种类和配伍对象不同有关,导致最终发挥免疫调节作用的活性成分浓度不同,或协同效应存在差异。

免疫增强剂通过调节胸腺和脾脏两大免疫器官,促进免疫细胞调节细胞免疫和体液免疫功能,并诱发多种在免疫细胞之间传递信号的免疫因子来提升机体的免疫力。目前对于石斛调节免疫功能的研究较多集中在铁皮石斛增强免疫力方面,段立群等^[15]发现金钗石斛、党参、黄芪的复方制剂能明显增强小鼠淋巴细胞的增殖能力、抗体生成细胞分泌抗体的能力及巨噬细胞的吞噬能力;徐海军等^[16]发现霍山石斛对免疫亢进或缺陷模型小鼠的淋巴细胞增殖能力、巨噬细胞吞噬功能和胸腺指数均有良好的双向免疫调节作用。

目前认为多糖是石斛的主要有效活性成分。石斛的茎是多糖的主要提取部位,但由于提取方法不同,产出的多糖含量、分子量大小也不同,造成其生物活性存在较大差异。李光等^[9]也发现不同种类石斛多糖对小鼠的免疫功能影响是不同的。多糖含量大于干重的30%的石斛品种被公认为优质品种,铁皮石斛、金钗石斛、束花石斛和美花石斛的多糖含量均大于30%,故被认为是理想的药材^[17]。宋燕华等^[18]报道高剂量二代繁殖SD大鼠长期食用铁皮石斛叶后,NK活性、足跖厚度和淋巴细胞转化能力显著提高,可能与铁皮石斛叶中的黄酮碳苷有关。所以对石斛活性成分和提取部位的研究以及提取工艺的优化还需进一步加深。由于本研究中受试物的石斛种类和多糖含量不明确,可能是导致单核-巨噬细胞吞噬功能和NK细胞活性欠佳的原因,加上石斛活性成分的多样性,尚不能明确各成分在增强免疫功能机制中的对应关系,有待更深入的研究。

参考文献

- [1] 王洪云,李铭.石斛多糖的药用功能研究进展[J].环球中医药,2014,7(10):817-820.
- [2] 陈玉满,鹿伟,傅剑云,等.铁皮石斛西洋参混合物对不同性别小鼠缓解体力疲劳作用的研究[J].浙江预防医学,2011,23

- (10): 19-21, 30.
- [3] 鹿伟,陈玉满,徐彩菊,等.铁皮石斛抗疲劳作用研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2488-2490.
- [4] LIN X, SHAW P C, SZE S C, et al. Dendrobium officinale polysaccharides ameliorate the abnormality of aquaporin 5, pro-inflammatory cytokines and inhibit apoptosis in the experimental Sjögren's syndrome mice [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(12): 2025-2032.
- [5] 张娥珍,黄梅华,辛明,等.铁皮石斛纳米粉与超微粉的物理特性和体外抗氧化活性比较研究[J].热带作物学报,2015,36(12):2184-2191.
- [6] 王再花,章金辉,李杰,等.3种药用石斛多糖的抗氧化活性比较研究[J].华南师范大学学报(自然科学版),2015,47(5):65-70.
- [7] JIN L H, LIU C F, TANG T, et al. Experimental study on anti-tumor effect of Dendrobium candidum polysaccharides [J]. Chin Pharm J, 2010, 45(22): 1734-1737.
- [8] MENG L Z, LYU G P, HU D J, et al. Effects of polysaccharides from different species of Dendrobium (Shihu) on macrophage function [J]. Molecules, 2013, 18(5): 5779-5791.
- [9] 李光,宋美芳,李宜航,等.不同种类石斛多糖成分对小鼠脾脏免疫功能的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(10):1108-1111.
- [10] 施仁潮,竹剑平,李明焱,等.铁皮石斛抗肿瘤作用的研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(19):1641-1644.
- [11] 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,2016,45(1):137-139.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版[M].北京:中国医药科技出版社,2015:92-93,188-189.
- [13] WANG P Y, ZHU X L, LIN Z B. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of Ganoderma lucidum [J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 135.
- [14] 陈成章.免疫毒理学[M].郑州:郑州大学出版社,2008:430-442.
- [15] 段立群,姚晓东,张渊,等.石斛复方制剂对小鼠免疫功能的影响[J].遵义医学院学报,2015,38(1):41-44.
- [16] 徐海军,方予,汪俊涛,等.霍山石斛多糖对小鼠的双向免疫调节作用[J].免疫学杂志,2018,34(8):731-736.
- [17] 李妮亚,高培元,王紫.海南石斛属和金钗石斛属植物多糖及氨基酸含量分析[J].植物资源与环境学报,2004,13(4):57-58.
- [18] 宋燕华,蔡德雷,傅剑云,等.铁皮石斛叶对二代繁殖雌性大鼠免疫水平影响的研究[J].浙江预防医学,2016,28(2):109-112.

收稿日期:2018-11-27 修回日期:2019-01-21 本文编辑:徐文璐