

# 复方人参免疫增强方配比优选及其对小鼠的免疫活性和急性毒性研究<sup>△</sup>

赵 或<sup>\*</sup>, 万志强, 张荣榕, 马馨桐, 王 苗, 邵 帅, 严铭铭<sup>#a</sup>, 齐 滨<sup>#b</sup>(长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

中图分类号 R967 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0196-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.13

**摘要** 目的: 优选复方人参免疫增强方4味组方药材(人参、黄芪、黄精、枸杞)的最佳配伍比例, 并对最佳配比提取物进行免疫活性及急性毒性研究。方法: 在采用细胞活性试验筛选4味药材生药量浓度范围的基础上, 以不同生药量浓度的药材提取物作用后小鼠RAW264.7巨噬细胞中的一氧化氮(NO)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量为指标, 采用均匀设计法确定复方人参免疫增强方各药材的最佳配比。取小鼠240只, 随机分为4批, 每批60只, 均随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性药物组[左旋咪唑, 4 mg/(kg·d)]和复方人参免疫增强方最佳配比提取物低、中、高剂量组[0.952 8、1.905 6、3.811 2 g/(kg·d)], 每组10只, 灌胃给药, qd, 连续给药30 d; 除空白组外, 其余组小鼠于首次给药后第24天时腹腔注射环磷酰胺[40 mg/(kg·d)], qd, 连续注射3 d以建立免疫低下模型。通过测定各组小鼠脏器系数, 脾淋巴细胞转化能力, 血清溶血素、IL-2、IgM、IgG、IgA含量, 腹腔巨噬细胞吞噬功能, 来评价最佳配比提取物的免疫活性。另取小鼠20只, 灌胃最佳配比提取物20 mL/kg, 给药2次, 以经口最大耐受剂量(MTD)考察其急性毒性。结果: 复方人参免疫增强方的最佳配比为人参、黄芪、黄精、枸杞生药质量比1:2:2:4。免疫活性实验结果显示, 该方最佳配比提取物可显著提高小鼠的脏器指数, 脾淋巴细胞增殖能力, 血清中溶血素、IL-2、IgM、IgG、IgA含量以及腹腔巨噬细胞吞噬功能( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 急性毒性实验结果显示, 其经口MTD均大于15 g/kg, 口服无毒性。结论: 复方人参免疫增强方最佳配比提取物可显著增强小鼠的免疫功能, 且口服无毒性。

**关键词** 人参免疫增强方; 药对; 均匀设计法; 小鼠; 免疫功能; 急性毒性

## Optimization of Composition Proportion of Compound Ginseng Immune-enhancing Formula and Study of Its Immunomodulatory Activity and Acute Toxicity on Mice

ZHAO Yu, WAN Zhiqiang, ZHANG Rongrong, MA Xintong, WANG Miao, SHAO Shuai, YAN Mingming, QI Bin (Jilin Institute of Ginseng, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the optimal composition proportion of 4 ingredients (*Panax ginseng*, *Astragalus membranaceus*, *Polygonatum sibiricum*, *Lycium chinensis*) in Compound ginseng immune-enhancing formula (CGIF), and to study immune activity and acute toxicity of the extracts with the optimal ratio. METHODS: The cell activity test was used to screen the crude drug concentration range of 4 ingredients. After treated with different crude drug concentrations of each medicinal material, using the contents of NO, IL-6 and TNF- $\alpha$  as indexes, uniform design was used to determine the optimal ratio of each ingredient in CGIF. Totally 240 mice were taken and randomly divided into 4 batches, with 60 mice in each batch. Each batch of mice was randomly divided into blank group (normal saline), model group (normal saline), positive drug group [levamisole, 4 mg/(kg·d)], and optimal proportion extract of CGIF low-dose, medium-dose and high-dose groups [0.952 8, 1.905 6, 3.811 2 g/(kg·d)], with 10 mice in each group; they were given medicine intragastrically, qd, for consecutive 30 d. Except for blank group, mice in the other groups were intraperitoneally injected with cyclophosphamide [40 mg/(kg·d)] on the 24th day after first administration, qd, for consecutive 3 d to induce immunocompromised model. The immune activity of the optimal proportion extract was evaluated by determining visceral coefficients, spleen lymphocyte transformation capacity, serum contents of hemolysin, IL-2, IgM, IgG and IgA, phagocytosis function of peritoneal macrophages. Another 20 mice were collected and given the optimal proportion extract 20 mL/kg intragastrically, twice; acute toxicity of the formula was investigated with oral maximum

tolerated dose (MTD). RESULTS: The optimal ratio of CGIF was that crude drug mass ratio of *P. ginseng*, *A. membranaceus*, *P. sibiricum*, *L. chinensis* was 1 : 2 : 2 : 4. The immunological activity experiment showed that the optimal proportion extract can significantly improve visceral indexes of mice, spleen lymphocyte proliferation ability, serum contents of hemolysin, IL-2, IgM, IgG and IgA as well as macrophage phagocytosis ability ( $P<0.05$  or  $P<$

<sup>△</sup> 基金项目: 吉林省科技成果转化计划项目(No.20170311030YY); 吉林省科技条件与平台建设计划项目(No.20180623041TC); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(No.JJKH20181276KJ, No.JJKH20190482KJ)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药化学、新药开发。E-mail: 435307889@qq.com

#a 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药物化学、中药化学、新药开发。E-mail: 386759102@qq.com

#b 通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 药物化学、中药化学、新药开发。E-mail: 24328678@qq.com

0.01)。The acute toxicity test indicated that oral MTD was over 15 g/kg, which was non-toxic. CONCLUSIONS: The optimal proportion extract of CGIF can significantly enhance the immune function of mice and are non-toxic.

**KEYWORDS** Ginseng immune-enhancing formula; Couplet medicine; Uniform design method; Mice; Immune function; Acute toxicity

免疫力是人体自身的一种主动防御机制,对维持生理和生命活动具有十分重要的意义。在正常生理情况下,机体的免疫系统依赖其先天具有的固有免疫和后天获得的适应性免疫共同发挥免疫作用,使机体的生理功能保持在相对稳定的状态;若机体免疫功能出现异常将会导致如过敏反应、自身免疫性疾病等不良后果,免疫力低下的人群更容易受到疾病的侵袭<sup>[1-2]</sup>。因此,研究开发安全、高效的具有免疫调节功效的药物以提高人们的免疫力,具有重要的临床意义。

中医药临床及实验研究证明,人参、黄芪、灵芝、枸杞、当归、黄精、川芎等多种中药具有良好的免疫调节作用,可调节机体免疫过程的多个环节<sup>[3-7]</sup>。多种中药活性成分均具有免疫调节作用,包括糖类、苷类、生物碱类、挥发油类、有机酸类等<sup>[8-12]</sup>。复方人参免疫增强方是本课题组与长春中医药大学附属医院多位免疫学、中药学等领域的专家共同协商,根据中医临床经验及相关文献组方而得的方剂<sup>[13-16]</sup>。该方中人参和黄芪作为补气药对,两者共用具有补五脏之气、扶卫阳之气、清心内固的功效;枸杞和黄精作为补血药对,两者共用可达到补气生血的功效<sup>[7-9]</sup>。复方人参免疫增强方由两组药对联合配伍而成,以期达到气血双补、增强机体免疫力的功效。

本研究采用均匀设计法分组设计,以RAW264.7巨噬细胞中一氧化氮(NO)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量为指标筛选复方人参免疫增强方各组方药材的最佳配比;建立小鼠免疫低下模型,考察该方最佳配比提取物对小鼠各免疫指标的影响,以评价其免疫增强活性;同时,考察该提取物对小鼠的急性毒性,旨在为开发一种高效、安全的增强免疫力的中药复方制剂提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

3111型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Infinite M200PRO型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司);ALB-224型万分之一分析天平(德国Sartorius公司);Stemi 508型倒置显微镜(德国Zeiss公司);BPZ-LC型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DZTW型电子调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

环磷酰胺原料药(上海金穗生物科技有限公司,批号:20180601,纯度:>98%);盐酸左旋咪唑片(北流市铜州药业有限公司,批号:170701,规格:25 mg);胎牛血清(澳洲Cellmax公司);脂蛋白(LPS,批号:320V0313)、DMEM高糖培养基、刀豆蛋白(ConA)、噻唑蓝(MTT)、

Hank's液、RPMI1640细胞培养液、台盼蓝染色剂、2-巯基乙醇、青霉素、链霉素、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)、水杨酸(SA)缓冲液、都氏试剂、Giemsa染液、豚鼠血清均购自北京索莱宝科技有限公司;NO检测试剂盒以及IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2、血清免疫球蛋白(IgM、IgG、IgA)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均购自北京博奥森生物技术公司;盐酸、异丙醇、丙酮、甲醇等试剂均购自北京化工厂;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格;水为蒸馏水。

### 1.3 药材饮片

人参饮片(批号:20170328)购自吉林省仙草医药药材有限公司;黄芪饮片(批号:20170605)、枸杞饮片(批号:20170713)、黄精饮片(批号:20171026)均购自酒泉市培丰中药材有限公司。

### 1.4 细胞

小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞株购自长沙赢润生物技术有限公司;鸡红细胞(上海源叶生物科技有限公司);绵羊血红细胞(SRBC,北京索莱宝科技有限公司)。

### 1.5 动物

SPF级昆明种小鼠260只,雌雄各半,体质量18~22 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

## 2 方法

### 2.1 药材提取物制备

复方人参免疫增强方的4味组方药材的单味提取物由长春中医药大学中药保健食品科技创新中心制备:取人参饮片50 g,水煎3次,每次1 h,合并3次水煎提取液,浓缩,减压干燥,粉碎,即得人参提取物粉末;同法制备黄芪、黄精、枸杞饮片提取物粉末。人参、黄芪、黄精、枸杞4味饮片提取物得率分别为12%、14%、15%、20%。

### 2.2 组方药材生药量浓度范围筛选

2.2.1 细胞培养 取RAW264.7细胞,以含100 U/mL青霉素-链霉素双抗、10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(以下简称“完全培养基”)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,隔日传代。

2.2.2 提取物药液配制 取“2.1”项下各味药材提取物粉末适量,以DMEM高糖培养基为溶剂配制人参提取物质量浓度分别为0.12、0.18、0.36、0.54、0.72、0.90、1.08、1.44、1.80、2.40 mg/mL,黄芪提取物质量浓度分别为0.14、0.21、0.42、0.63、0.84、1.05、1.26、1.68、2.10、2.80 mg/mL,黄精提取物质量浓度分别为0.15、0.225、0.45、0.675、0.90、1.125、1.35、1.80、2.25、3.00 mg/mL,枸杞提取物质量浓度分别为0.2、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.4、

3.0、4.0 mg/mL 的药液(按各药材饮片的提取率换算,均分别相当于原生药材质量浓度为1、1.5、3、4.5、6、7.5、9、12、15、20 mg/mL)。

2.2.3 4味药材生药量浓度范围筛选 采用CCK-8法测定各味药材提取物作用后RAW264.7细胞的增殖率,并根据细胞增殖率变化趋势筛选生药量浓度。取“2.2.1”项下对数生长期细胞,按 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁后,分为阴性对照组和提取物组,阴性对照组加入完全培养基100  $\mu$ L/孔,提取物组分别加入“2.2.2”项下不同浓度的各味药材提取物药液100  $\mu$ L/孔;另设不加细胞、仅加入完全培养基200  $\mu$ L/孔的空白组,每组设10个复孔。各组细胞于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后,弃去原培养基,每孔均先后加入无血清和双抗的DMEM高糖培养基100  $\mu$ L和CCK-8试剂10  $\mu$ L,按上述条件继续培养1 h。培养完毕后,采用酶标仪在450 nm波长处检测各孔光密度(OD)值,根据公式计算细胞的增殖率:细胞增殖率(%)=(提取物组细胞OD值-空白组OD值)/(阴性对照组OD值-空白组OD值) $\times$ 100%。

### 2.3 组方药材最佳配比优选

2.3.1 均匀设计试验方案 采用均匀设计法<sup>[17]</sup>进行试验设计。以人参、黄芪、黄精、枸杞各饮片的生药量浓度(分别表示为 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ ,g/mL)为因素,并基于“2.2”项下筛选获得的上述4味组方药材的生药量浓度范围选取7个浓度梯度为不同水平,根据 $U_7(7^4)$ 表设计药材配比试验。均匀设计试验方案详见表1。

表1 均匀设计试验方案

Tab 1 Uniform design test plan

| 实验号 | $X_1$ ,g/mL | $X_2$ ,g/mL | $X_3$ ,g/mL | $X_4$ ,g/mL |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 配比1 | 1.5         | 4           | 5           | 5.5         |
| 配比2 | 2           | 6           | 8           | 5           |
| 配比3 | 2.5         | 8           | 4           | 4.5         |
| 配比4 | 3           | 3           | 7           | 4           |
| 配比5 | 3.5         | 5           | 3           | 3.5         |
| 配比6 | 4           | 7           | 6           | 3           |
| 配比7 | 4.5         | 9           | 9           | 6           |

### 2.3.2 细胞因子试验优选组方药材生药量的最佳配比

取“2.2.1”项下对数生长期细胞,以完全培养基制成细胞悬液,按 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中,每孔100  $\mu$ L,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。待细胞贴壁后,随机分为空白对照组、阳性对照组和均匀设计配比1~7组,空白对照组加入完全培养基,阳性对照组加入10  $\mu$ g/mL的LPS溶液(以完全培养基配制),均匀设计配比1~7组按表1方案(各水平均按生药量计)加入4种药材提取物混合物药液(以完全培养基配制),每孔100  $\mu$ L,按上述条件继续培养24 h。每组设10个复孔平行试验。收集各组细胞上清液,采用相应试剂盒按说明书方法操作,检测NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量。以人参、黄芪、黄精、枸杞的生药量浓度( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ )为自变量,以NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量为因变量( $Y$ ),进行多元逐步回归分析并得出各指标的回归方程。当 $Y$ 取最大值时,即NO、

IL-6、TNF- $\alpha$ 含量最高时,表示所对应的药材配比可达到最佳药物效应。

### 2.4 复方人参免疫增强方最佳配比提取物的免疫活性考察

2.4.1 最佳配比提取物制备 按照“2.3”项下优选出的复方人参免疫增强方各组方药材的最佳配比(质量比1:2:2:4),称取人参1.5 g、黄芪3 g、黄精3 g、枸杞6 g(人日服处方量)药材饮片混合后,按“2.1”项下方法制备最佳配比方提取物粉末(以下简称“复方提取物”),以水配制成相应浓度药液用于后续实验。

2.4.2 动物分组、造模及给药 取小鼠240只,随机分为4批,每批60只。每批小鼠均随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性药物组[左旋咪唑,4 mg/(kg $\cdot$ d),参照文献方法<sup>[18]</sup>设置剂量]和复方提取物低、中、高剂量组[0.952 8、1.905 6、3.811 2 g/(kg $\cdot$ d),以提取物质量计算,分别相当于人日服处方量的10、20、30倍],每组10只。各组小鼠分别灌胃生理盐水或相应药液,灌胃体积为10 mL/kg, qd,连续给药30 d。除空白组外,其余组小鼠自开始给药起第24天时腹腔注射环磷酰胺40 mg/(kg $\cdot$ d), qd,连续注射3 d,以建立免疫低下模型。给药结束后,各批小鼠分别进行后续指标检测或考察。

2.4.3 小鼠脾脏和胸腺指数的测定 取“2.4.2”项下第1批小鼠,于末次灌胃给药后禁食15 h,称定体质量后,脱颈处死;无菌条件下取其脾脏、胸腺,称定质量并计算脏器系数(胸腺指数=胸腺质量/体质量 $\times$ 100%;脾指数=脾质量/体质量 $\times$ 100%)。

2.4.4 小鼠脾淋巴细胞增殖能力考察 采用脾淋巴细胞转化试验考察小鼠脾淋巴细胞的增殖能力。取“2.4.3”项下小鼠脾脏,置于装有适量Hank's液的平皿中,制成单个细胞悬液,滤过,以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,调整细胞浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL。每份脾细胞悬液分两孔加入24孔板中,每孔1 mL,然后一孔加入ConA试液75  $\mu$ L,另一孔加入含100 U/mL青-链霉素双抗、10%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养液75  $\mu$ L作为对照孔。细胞置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养72 h。培养结束前4 h,每孔吸弃上清0.7 mL,另加入不含血清和双抗的RPMI 1640培养基0.7 mL和5 mg/mL的MTT试液50  $\mu$ L,继续培养至结束;然后每孔细胞加入酸性异丙醇1 mL,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。采用酶标仪在570 nm波长处测定各孔OD值,以光密度差值表示脾淋巴细胞的增殖能力(光密度差值=ConA诱导孔OD值-对照孔OD值),光密度差值越大,则表示细胞增殖能力越强。

2.4.5 小鼠血清溶血素含量测定 取“2.4.2”项下第2批小鼠,在灌胃给药第25天时,腹腔注射4%SRBC悬液(以生理盐水配制)0.2 mL, qd,连续注射3 d。于末次灌胃给药后1 h时,眼球取血,收集血清。血清以SA缓冲液稀释200倍后,取1 mL置于试管内,依次加入4%SRBC悬液0.5 mL、补体(取SRBC 1 mL、豚鼠血清5 mL

混匀,4℃冷藏后取上清液,以8倍体积SA缓冲液稀释,即得)1 mL;同时设置不加血清的空白对照管(以SA缓冲液代替)。将试管置于37℃水浴中保温20 min,在冰浴中终止反应,以2 000 r/min离心10 min;取上清液1 mL,加都氏试剂3 mL,充分混匀,放置10 min,采用酶标仪于540 nm波长处测定吸收度。另取4%SRBC细胞悬液0.25 mL,加入都氏试剂3.75 mL混匀,在540 nm波长处测定SRBC半数溶血时的吸收度<sup>[19]</sup>。以半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示血清溶血素含量,按公式计算:HC<sub>50</sub>=(样品管吸收度-空白对照管吸收度)/(SRBC半数溶血时的吸收度-空白对照管吸收度)×稀释倍数。

**2.4.6 小鼠血清中IL-2、IgM、IgG、IgA含量测定** 取“2.4.2”项下第3批小鼠,于末次灌胃给药后1 h时,眼球取血,收集血清。采用相应ELISA试剂盒,按说明书要求操作测定血清中IL-2、IgM、IgG、IgA的含量。

**2.4.7 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定** 取“2.4.2”项下第4批小鼠,于末次灌胃给药后1 h时腹腔注射20%鸡红细胞悬液(生理盐水配制)1 mL,30 min后脱颈处死,取其仰卧位固定于鼠板中,腹腔注射生理盐水2 mL,以适当速度转动鼠板1 min。吸取小鼠腹腔液1 mL,平均分滴于2片载玻片上,放入垫有湿纱布的搪瓷盒内,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养30 min后,在生理盐水中漂洗,晾干;加入丙酮-甲醇混合液(1:1, V/V)固定,以4% Giemsa的PBS溶液染色3 min,再以水漂洗,晾干。在油镜下对巨噬细胞(镜下紫红色为细胞核染色,蓝紫色为细胞质染色)计数,并计算吞噬百分率和吞噬指数[吞噬百分率(%)=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/巨噬细胞总数×100%;吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞总数/巨噬细胞数]。

## 2.5 复方人参免疫增强方最佳配比提取物的急性毒性考察

参照本课题组前期研究<sup>[20]</sup>并进行改良实验。取小鼠20只,灌胃复方提取物药液(以水配制成0.40 g/mL的药液,以提取物计算),每次20 mL/kg,灌胃2次,给药间隔6 h(相当于人推荐日摄入量的178倍)。连续观察14 d,观察并记录小鼠的一般状态、体质量变化、中毒特征以及死亡情况等,测定半数致死量(LD<sub>50</sub>)和最大耐受剂量(MTD)。

## 2.6 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件对实验数据进行处理。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析;采用逐步回归分析对均匀设计试验结果进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 复方人参免疫增强方组方药材生药量浓度范围

细胞活性试验结果显示,人参生药量浓度为1.5~4.5 mg/mL(相当于提取物0.18~0.54 mg/mL)、黄芪生药量浓度为3~12 mg/mL(相当于提取物0.42~1.68

mg/mL)、黄精生药量浓度为3~9 mg/mL(相当于提取物0.45~1.35 mg/mL)、枸杞生药量浓度为3~6 mg/mL(相当于提取物0.6~1.2 mg/mL)时,细胞增殖率呈上升趋势,因此在上述浓度范围内进行后续均匀设计试验。不同生药浓度的组方药材对细胞活性的影响见图1。

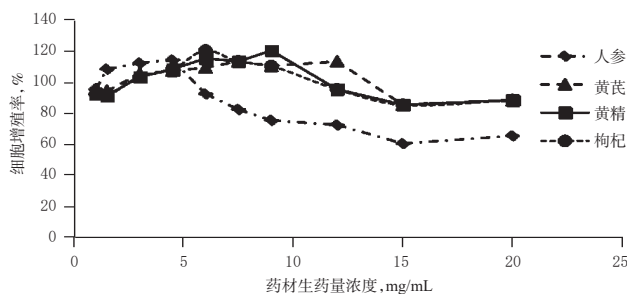


图1 不同生药量浓度的组方药材对细胞活性的影响  
Fig 1 Effects of medicinal materials with different crude drug concentrations on cell activity

### 3.2 复方人参免疫增强方组方药材最佳配比

细胞因子试验结果显示,与空白对照组比较,阳性对照组和均匀设计试验配比1~7组细胞中NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 的含量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见表2。

表2 各组细胞中NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 的含量( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Contents of NO, IL-6 and TNF- $\alpha$  in cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别       | NO, $\mu\text{mol/mL}$ | IL-6, pg/mL      | TNF- $\alpha$ , pg/mL |
|----------|------------------------|------------------|-----------------------|
| 空白对照组    | 4.3±0.7                | 115.476±10.182   | 185.687±9.164         |
| 阳性对照组    | 9.2±1.1**              | 315.288±9.118**  | 412.405±10.135**      |
| 均匀设计配比1组 | 9.8±0.9**              | 381.406±8.076**  | 523.518±11.355**      |
| 均匀设计配比2组 | 5.6±0.7*               | 316.081±8.687**  | 501.849±8.978**       |
| 均匀设计配比3组 | 13.2±3.1**             | 347.209±11.216** | 474.063±11.358**      |
| 均匀设计配比4组 | 9.4±0.8**              | 359.591±9.338**  | 442.950±9.683**       |
| 均匀设计配比5组 | 11.7±0.7**             | 344.734±8.755**  | 404.578±11.624**      |
| 均匀设计配比6组 | 8.8±1.5**              | 312.999±8.320**  | 373.672±8.926**       |
| 均匀设计配比7组 | 7.8±1.4**              | 295.841±11.202*  | 342.258±10.215*       |

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

对表2结果进行逐步回归分析,得出各指标回归方程,NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量水平越高,即Y取值越大时,该方增强免疫力效果越好。回归分析结果见表3。

表3 均匀设计回归分析结果

Tab 3 Results of uniform design regression analysis

| 指标            | 回归方程  | R     | P      | 药材生药量优选结果          |
|---------------|---|-------|--------|--------------------|
| NO            | $Y = 15.288 - 0.971X_1$                         | 0.500 | <0.001 | 黄精3 g/mL           |
| IL-6          | $Y = 623.902 - 62.116X_1$                       | 0.971 | <0.001 | 人参1.5 g/mL         |
| TNF- $\alpha$ | $Y = 393.499 - 9.714X_1 - 8.854X_2 + 12.165X_3$ | 0.792 | <0.002 | 黄芪3 g/mL, 枸杞6 g/mL |

由表3结果换算,复方人参免疫增强方的最佳配比为:人参、黄芪、黄精、枸杞生药质量比1:2:2:4。

### 3.3 复方人参免疫增强方最佳配比提取物的免疫活性

**3.3.1 小鼠脏器指数** 与空白组比较,模型组小鼠的脾指数和胸腺指数均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和复方提取物低、中、高剂量组小鼠的

脾指数和胸腺指数均显著升高( $P<0.01$ ),详见表4。

表4 各组小鼠脾指数和胸腺指数比较( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$ )

Tab 4 Comparison of spleen index and thymus index in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$ )

| 组别        | 脾指数                          | 胸腺指数                         |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| 空白组       | 2.615 ± 0.665                | 1.963 ± 0.506                |
| 模型组       | 1.559 ± 0.392*               | 1.230 ± 0.180**              |
| 阳性药物组     | 2.764 ± 0.396 <sup>#</sup>   | 1.960 ± 0.496 <sup>##</sup>  |
| 复方提取物低剂量组 | 3.822 ± 1.309 <sup>###</sup> | 2.106 ± 0.275 <sup>###</sup> |
| 复方提取物中剂量组 | 3.587 ± 1.025 <sup>###</sup> | 2.014 ± 0.508 <sup>###</sup> |
| 复方提取物高剂量组 | 3.655 ± 1.35 <sup>###</sup>  | 2.655 ± 0.569 <sup>###</sup> |

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

3.3.2 小鼠脾淋巴细胞增殖能力 与空白组比较,模型组小鼠的脾淋巴细胞增殖能力显著减弱( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和复方提取物低、中、高剂量组小鼠脾淋巴细胞增殖能力显著增强( $P<0.01$ ),详见表5。

表5 各组小鼠脾淋巴细胞增殖能力和血清溶血素含量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 5 Comparison of proliferative ability of spleen lymphocytes and the content of serum hemolysin in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别        | 脾淋巴细胞光密度差值                   | HC <sub>50</sub>           |
|-----------|------------------------------|----------------------------|
| 空白组       | 0.088 ± 0.021                | 85.4 ± 9.5                 |
| 模型组       | 0.049 ± 0.068**              | 73.4 ± 9.1 <sup>#</sup>    |
| 阳性药物组     | 0.095 ± 0.069 <sup>##</sup>  | 84.3 ± 4.6 <sup>#</sup>    |
| 复方提取物低剂量组 | 0.248 ± 0.035 <sup>###</sup> | 84.3 ± 3.9 <sup>#</sup>    |
| 复方提取物中剂量组 | 0.233 ± 0.097 <sup>###</sup> | 94.4 ± 11.9 <sup>###</sup> |
| 复方提取物高剂量组 | 0.197 ± 0.072 <sup>###</sup> | 83.0 ± 6.1 <sup>#</sup>    |

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

3.3.3 小鼠血清溶血素含量 与空白组比较,模型组小鼠血清溶血素含量显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,阳性药物组和复方提取物低、中、高剂量组小鼠血清溶血素含量显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表5。

3.3.4 小鼠血清中IL-2、IgM、IgG、IgA含量 与空白组比较,模型组小鼠血清中IL-2、IgA、IgM、IgG含量均显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,阳性药物组和复方提取物低、中、高剂量组小鼠血清中上述指标含量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表6。

3.3.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能 与空白组比较,模型组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和复方提取物低、中、高剂量组小鼠巨噬细胞吞噬率和吞噬指数均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表7。

3.4 复方人参免疫增强方最佳配比提取物对小鼠的急性毒性

给药14 d内,小鼠外观、行为、体质量、食欲等均正

常,无死亡现象发生,故无法测得LD<sub>50</sub>值;复方提取物对不同性别小鼠的经口MTD均大于15 g/kg,表明口服无毒性,详见表8。

表6 各组小鼠血清中IL-2、IgM、IgG、IgA含量比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 6 Comparison of serum contents of IL-2, IgM, IgG and IgA in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别        | IL-2, pg/mL                | IgM, μg/mL                  | IgG, μg/mL                   | IgA, μg/mL                |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 空白组       | 47.80 ± 3.84               | 257.31 ± 40.92              | 182.52 ± 35.39               | 3.37 ± 0.68               |
| 模型组       | 35.85 ± 5.26*              | 223.33 ± 40.08*             | 158.13 ± 26.96*              | 2.61 ± 0.45*              |
| 阳性药物组     | 51.50 ± 2.14 <sup>##</sup> | 279.70 ± 57.79 <sup>#</sup> | 191.96 ± 24.53 <sup>##</sup> | 4.14 ± 1.19 <sup>##</sup> |
| 复方提取物低剂量组 | 49.99 ± 3.26 <sup>##</sup> | 259.96 ± 31.04 <sup>#</sup> | 171.14 ± 17.88 <sup>#</sup>  | 4.07 ± 0.64 <sup>##</sup> |
| 复方提取物中剂量组 | 48.91 ± 3.56 <sup>##</sup> | 261.38 ± 32.18 <sup>#</sup> | 170.28 ± 28.87 <sup>#</sup>  | 3.95 ± 1.15 <sup>##</sup> |
| 复方提取物高剂量组 | 48.50 ± 4.58 <sup>##</sup> | 263.47 ± 34.91 <sup>#</sup> | 170.77 ± 19.49 <sup>#</sup>  | 3.39 ± 1.20 <sup>#</sup>  |

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

表7 各组小鼠巨噬细胞吞噬功能比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 7 Comparison of phagocytic function of macrophages in mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别        | 吞噬率, %                   | 吞噬指数                      |
|-----------|--------------------------|---------------------------|
| 空白组       | 27.6 ± 5.3               | 0.40 ± 0.16               |
| 模型组       | 20.1 ± 4.4**             | 0.18 ± 0.12**             |
| 阳性药物组     | 29.2 ± 5.0 <sup>##</sup> | 0.34 ± 0.13 <sup>#</sup>  |
| 复方提取物低剂量组 | 33.7 ± 4.4 <sup>##</sup> | 0.44 ± 0.18 <sup>##</sup> |
| 复方提取物中剂量组 | 36.7 ± 7.0 <sup>##</sup> | 0.49 ± 0.15 <sup>##</sup> |
| 复方提取物高剂量组 | 39.7 ± 6.5 <sup>##</sup> | 0.52 ± 0.20 <sup>##</sup> |

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

表8 小鼠急性毒性试验结果( $n=20$ )

Tab 8 Results of acute toxicity tests in mice ( $n=20$ )

| 性别 | 给药前体质量( $\bar{x} \pm s$ ), g | 观察结束后体质量( $\bar{x} \pm s$ ), g | 形态 | 中毒特征 | 死亡只数 | MTD, g/kg |
|----|------------------------------|--------------------------------|----|------|------|-----------|
| 雄性 | 19.25 ± 2.3                  | 33.28 ± 1.7                    | 正常 | 无    | 0    | 16        |
| 雌性 | 19.45 ± 1.6                  | 32.15 ± 1.5                    | 正常 | 无    | 0    | 16        |

## 4 讨论

药对是中医临床遣药组方的常用配伍形式,是历代医药学家长期医疗实践的经验总结。其组成简单却具备中药配伍的基本特征,两药物配伍后可能形成新的功效方向,或促进原有作用以增强疗效,或同用后相互兼治复杂病症等,从而发挥协同增效或配伍减毒的作用<sup>[21-24]</sup>。药对配伍可以为组建新方提供依据。许多方剂的主要功效很可能是由一个或几个药对来承担,其他药味可能只是起到辅助作用;有些药对本身就是方剂,也可以一起作为君药,还可以针对病机在中医理论指导下作为辅助药物组合在方剂中配伍其他药对<sup>[25-26]</sup>。复方人参免疫增强方是以药对理论为基础,结合中医药理论,将两组药对联合应用,以期达到补气生血、增强机体免疫功能的疗效。

均匀设计法是将多元统计和数论结合开发出的一种适用于多因素、多水平的一种设计方法,可有效减少

实验次数;其实验结果可采用计算机软件处理,并通过回归分析得出结论,目前已被广泛用于复方药物筛选研究<sup>[27]</sup>。细胞因子IL-6、TNF- $\alpha$ 主要是由巨噬细胞产生的,并能促进巨噬细胞的增殖,具有调节固有免疫和适应性免疫、细胞生长以及损伤组织修复等多种功能;巨噬细胞内NO是通过一氧化氮合酶途径合成,其合成能力与抗炎作用密切相关,生物活性效应分子NO的分泌与释放,能使巨噬细胞有效识别肿瘤等靶细胞,在信息传递、激活与免疫调节过程中发挥了重要的作用<sup>[28-29]</sup>。因此,本研究通过均匀设计试验,以RAW264.7巨噬细胞中NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量为指标进行体外免疫活性研究,经优选得到复方人参免疫增强方的最佳配比为人参、黄芪、黄精、枸杞生药质量比1:2:2:4。

本研究通过建立免疫低下小鼠模型,从体内层面考察该方最佳配比提取物的免疫增强作用。结果显示,最佳配比提取物具有增强小鼠免疫力的作用,可显著提高免疫低下小鼠的脏器指数,增强脾淋巴细胞的增殖能力,提高血清溶血素、IL-2、IgM、IgG、IgA含量以及单核-巨噬细胞的吞噬功能。这表明优选获得的最佳配比提取物在细胞免疫与体液免疫方面均具有增强作用,可为相关免疫复方制剂的开发研究提供依据。此外,通过小鼠急性毒性试验初步证实该方口服安全无毒。

综上所述,复方人参免疫增强方的最佳配比为人参、黄芪、黄精、枸杞生药质量比1:2:2:4;该方提取物可有效增强免疫低下模型小鼠的免疫功能且口服无毒,具有良好的应用开发前景。但由于中药材的有效成分受药材产地、采收期及饮片炮制方法的影响,故存在含量上的差异,而药材配伍比例的效果是否同样受上述因素影响,尚有待进一步研究。

## 参考文献

[1] HWANG YY, MC KENZIE AN. *Innate lymphoid cells in immunity and disease, crossroads between innate and adaptive immunity* IV[M]. Germany: Springer, 2013:9.

[2] YAZDANI R, SHARIFI M, SHIRVAN AS, et al. Characteristics of innate lymphoid cells (ILCs) and their role in immunological disorders: an update[J]. *Cell Immunol*, 2015, 298(1/2):66-76.

[3] 周悦芳,范培红.中药免疫调节作用研究进展[J].*时珍国医国药*, 2017, 28(1):204-207.

[4] 李金玉,李金耀,张富春.中药抗肿瘤免疫调节机制研究进展[J].*时珍国医国药*, 2016, 27(7):1705-1707.

[5] 黄振华,邓向亮,张凯敏,等.枸杞多糖对免疫抑制小鼠红细胞免疫功能的影响[J].*中国免疫学杂志*, 2018, 34(2):214-217.

[6] 金凌云,黄样增,周岩飞,等.灵芝咖啡对小鼠免疫功能影响的研究[J].*食品科技*, 2017, 42(3):83-87.

[7] 韩飞,彭珍,周志渝,等.功效性分类中药对提高机体免疫功能的研究进展[J].*中草药*, 2016, 47(14):2549-2555.

[8] 晏继红,王仕宝,刘文虎.中药免疫增强剂研究进展[J].*西*

北药学杂志, 2013, 28(5):549-552.

[9] 陈秋莹,詹剑华.中药免疫调节作用及其研究进展[J].*江西医药*, 2019, 54(2):181-184.

[10] 赵伟伟,刘孟安,王斌胜.单味中药免疫增强作用的研究进展[J/CD].*中西医结合心血管病电子杂志*, 2018, 6(3):17-18.

[11] 董碧莲,蔡延渠,吕莉,等.中药多糖增强免疫、抗疲劳作用的研究进展[J].*中成药*, 2019, 41(5):1119-1124.

[12] 吕小成,张乐帅,王富军.中药多糖的免疫调节作用及研究进展[J].*上海中医药大学学报*, 2016, 30(3):97-101.

[13] 朱宝玉,黄海英,刘雅敏,等.人参、黄芪药对血中移行成分质谱分析[J].*中医学报*, 2018, 33(12):2401-2405.

[14] 赵令富,宋金香,胡明.汪机“参芪论”对治未病的意义探讨[J].*中医药临床杂志*, 2018, 30(11):1977-1980.

[15] 张东伟,杨关林,赵宏月.李东垣伍用黄芪人参之经验探析[J].*辽宁中医杂志*, 2019, 46(5):952-956.

[16] 潘琼,徐力生,吴承霖,等.二精方多糖提取工艺实验及含量测定[J].*时珍国医国药*, 2014, 25(8):1856-1858.

[17] 李红山,应豪,胡爱荣,等.基于均匀设计的HJJB方改善非酒精性脂肪肝肝脏脂肪代谢的主效应组分研究[J].*中华中医药学刊*, 2017, 35(7):1676-1679.

[18] 叶雪丹,徐彤彤,陆圆圆,等.盐酸左旋咪唑对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].*中国临床药理学杂志*, 2019, 35(6):550-552, 570.

[19] 单玉,张振秋,董晓茜,等.黄芪和苦参不同配伍比例对小鼠免疫功能影响的研究[J].*中华中医药学刊*, 2010, 28(1):208-209.

[20] 王天宁,万志强,赵彧,等.复方增氧方耐缺氧作用及初步血清药物化学研究[J].*长春中医药大学学报*, 2019, 35(4):715-719.

[21] 唐于平,束晓云,李伟霞,等.药对研究: I:药对的形成与发展[J].*中国中药杂志*, 2013, 38(24):4185-4190.

[22] 王付.经方药对研究与应用的思路与方法[J].*中医药通报*, 2005(3):24-26.

[23] 邓树泳,李静,罗来成.中药药对的现代研究进展[J].*时珍国医国药*, 2012, 23(4):1003-1005.

[24] 杨鸿珠,龚雨萍.中药药对的研究进展与思考[J].*中国中西医结合杂志*, 2010, 30(2):218-220.

[25] 李玥.中药药对配伍后药效物质基础变化研究进展[J].*海峡药学*, 2017, 29(8):72-74.

[26] 曹华,何国,李政木.经方“药对”配伍规律研究的现状及分析[J].*国医论坛*, 2003(4):1-3.

[27] 吕秀梅,王静,赵可惠.均匀设计法优化藏药多血康提取工艺[J].*中国药房*, 2017, 28(10):1361-1364.

[28] 热西代姆·阿卜力孜,李敏,胡君萍.锁阳多糖对巨噬细胞RAW264.7的免疫调节作用的影响[J].*食品安全质量检测学报*, 2018, 9(21):5694-5698.

[29] 李自辉,张宁,董婉茹,等.玄参拆分组分对免疫低下小鼠功能及其物质基础的研究[J].*时珍国医国药*, 2017, 28(5):1065-1068.

(收稿日期:2019-06-13 修回日期:2019-12-02)

(编辑:段思怡)