

小茴香对小鼠免疫功能的影响

董华泽, 王艳苹*, 袁新松, 王丽平 (合肥师范学院化学化工系, 安徽合肥 230061)

摘要 [目的] 研究小茴香对环磷酰胺模型小鼠免疫功能的影响。[方法] 以环磷酰胺制备小鼠免疫低下模型并结合体外药理试验, 测定灌胃给药后小鼠体内巨噬细胞吞噬率、血清溶血素抗体水平, 并观察植物血凝素诱导 T 淋巴细胞的增殖反应。采用含药血清体外培养小鼠腹腔巨噬细胞, MTT 法考察巨噬细胞的活性, 并观察体外培养的巨噬细胞吞噬红细胞的吞噬百分率和吞噬指数。[结果] 小茴香提高免疫抑制小鼠碳粒廓清率, 促进血清溶血素形成以及促进 T 淋巴细胞增殖。[结论] 小茴香有提高小鼠免疫功能的作用。

关键词 小茴香; 碳粒廓清; 巨噬细胞; 溶血素; T 淋巴细胞

中图分类号 S865.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)27-13419-02

Effect of *Foeniculum vulgare* Mill on the Immunological Functions in Mice

DONG Hua-ze et al (Department of Chemistry and Chemical Engineering, Hefei Teachers College, Hefei, Anhui 230061)

Abstract [Objective] The research aimed to study the effects of *Foeniculum vulgare* Mill on the immunological functions of the immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide (CTX). [Method] Cyclophosphamide was used to prepare the immunosuppressive mice model. Based on the pharmacology test *in vitro*, the phagocytosis rate of macrophage and the serum hemolysin antibody level in mice after stomach administration were determined. The proliferative response of T lymphocyte induced by phytohemagglutinin (PHA) was measured. The serum containing drug was used to culture peritoneal macrophage (M ϕ) *in vitro*. The activity of macrophage was studied by using MTT assay. The phagocytic percent and phagocytic index of chicken red blood cell by macrophage cultured *in vitro* were measured. [Result] *F. vulgare* improved the carbon particle clearance rate of the immunosuppressive mice, promoted the formation of serum hemolysin and promoted the proliferation of T lymphocyte. [Conclusion] *F. vulgare* could improve the immunological functions of mice.

Key words *Foeniculum vulgare* Mill; Carbon particle clearance; Macrophage; Hemolysin; T lymphocyte

小茴香被国家卫生部正式确定为既是药品, 又是食品的极具开发潜力的资源之一, 受到人们的广泛关注, 但迄今为止未见小茴香有提高机体免疫功能作用的试验研究报道。因此, 笔者采用含药血清体外培养小鼠腹腔巨噬细胞(M ϕ)试验, 考察 M ϕ 的活性及其体外吞噬 CRBC 功能, 并结合整体试验方法, 多角度研究小茴香对单核巨噬细胞的活性及其吞噬能力的影响, 以期探讨体内试验的相关性提供理论参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物。 18~22 g 昆明种小鼠, 雌雄兼用。

1.1.2 药品。 试验用小茴香经安徽中医学院凤良元教授鉴定符合 2005 年版中国药典规定。将药材用 6 倍量水煮沸煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 合并提取液, 在水浴上浓缩成 1 g 生药/ml 供试验用。环磷酰胺 (CTX) 粉针剂; 左旋咪唑 (LMS) 片等。

1.1.3 主要仪器。 318 酶标仪 (上海 SANCO); SW-CJ-1F 型净化工作台 (上海一恒科技有限公司); HH.CP-TW 型二氧化碳培养箱 (上海一恒科技有限公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 分组给药及免疫低下模型的制备。 小鼠按体重随机分为 4 组: ①正常对照组、②CTX 模型组、③LMS 阳性对照组、④给药组, 每组 10 只。给药组按 15 ml/kg ig 给药, LMS 组按 30 mg/kg ig 给药, 正常对照组及 CTX 模型组 ig 给等量生理盐水, 每日 1 次, 连续 8 d。给药后第 3 天, 除正常对照组外, 其余各组每只小鼠均 ip CTX 30 mg/kg, 连续 3 d, 制备 CTX 致小鼠免疫低下模型。

1.2.2 含药血清的制备。 取 18~22 g 雄性昆明种小鼠 9

只, 按体重随机分为 3 组: ①正常血清对照组、②含 LMS 血清对照组、③含药血清组, 每组 3 只。含药血清组按 15 ml/kg ig 给药, 含 LMS 血清组按 50 mg/kg ig 给药, 正常对照组 ig 等量生理盐水, 每日 2 次, 连续 3 d。于末次给药 1 h 后分别采血, 分离血清, 同组血清混合, 滤过除菌, 分装, -20℃ 冻存以备用。

1.2.3 碳粒廓清试验^[1]。 按“1.2.1”方法, 于末次给药 1 h 后, 各鼠尾静脉注入稀释印度墨汁 10 ml/kg 体重, 于注后 3 min 和 13 min 从鼠眼眶后静脉丛取血 25 μ l, 加到 Na₂CO₃ 溶液 2.0 ml 中摇匀。于 600 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。计算吞噬指数 K 和吞噬系数 α (校正吞噬指数)。

1.2.4 对体外培养的 M ϕ 活性的影响^[2]。 按“1.2.2”方法制备各组血清。常规制备小鼠 M ϕ 悬液 (2×10^6 /ml)^[3]。取 M ϕ 悬液 100 μ l, 加入 96 孔培养板中。试验分为 4 组: ①无血清对照组 (每孔加生理盐水 50 μ l)、②正常血清对照组 (每孔加正常对照血清 50 μ l)、③阳性药对照组 (每孔加含阳性药血清 50 μ l)、④给药组 (每孔加含药血清 50 μ l), 每组 3 复孔。各组每孔均加 RPMI1640 培养液 100 μ l。培养板置 37℃、浓度 5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养 48 h。采用 MTT 法测定各组的吸收度 (A) 值 (测定波长 578 nm, 参比波长为 630 nm)^[3]。

1.2.5 对体外培养的 M ϕ 吞噬 CRBC 的影响^[4]。 按“1.2.2”及“1.2.4”方法培养 M ϕ 。培养结束后, 弃上清, 用 Hank's 液洗脱孔中 M ϕ 1 次, 每孔加 CRBC 悬液 100 μ l (每孔含 CRBC 1×10^6 个), 37℃ 培养 30 min, 每 10 min 摇动 1 次。弃上清, 每孔加 4℃ Hank's 液 200 μ l, 轻轻吹吸洗脱粘附的 M ϕ , 按文献[3]方法制片。在油镜下计数 200 个 M ϕ , 计算吞噬百分率和吞噬指数。

1.2.6 血清溶血素试验^[3]。 按“1.2.1”方法, 于给药后第 3 天, 每只小鼠均 ip CRBC 悬液 0.2 ml。末次给药后 1~2 h, 摘眼球采血, 分离血清, 备用。采用微量溶血分光光度法测定血清溶血素含量^[4], 取各组血清 50 μ l, 用生理盐水稀释 80

作者简介 董华泽 (1977-), 男, 安徽宿州人, 博士, 讲师, 从事合成化学方面的研究工作。* 通讯作者, 助教。

收稿日期 2009-09-03

倍,取各血清稀释液 100 μl ,加入 96 孔培养板中,继而依次加入浓度 2.5% CRBC 悬液 100 μl 和生理盐水稀释的豚鼠血清(1 \rightarrow 20)100 μl 。空白对照孔用生理盐水代替血清,设 3 复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内温育 1 h 后,准时取出培养板置冰块上终止反应。冷却后,离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 r/min, 10 min)。取离心后的上清液 150 μl ,置另一 96 孔培养板内,置酶标仪测定 A 值,检测波长为 414 nm。按文献[3]方法计算溶血素含量。

1.2.7 淋巴细胞转化试验。按“1.2.2”方法制备各组血清。将 CTX 致免疫功能低下的小鼠(给小鼠 ip CTX 50 mg/kg \cdot d, 每天 1 次,连续 4 d)放血致死,常规制备脾细胞悬液^[3],用 RPMI1640 培养液调成 1×10^7 个细胞/ml。取脾细胞悬液 100 μl ,加入 96 孔培养板孔中。试验分为 4 组:①正常对照组(每孔加正常组血清 50 μl)、②模型对照组(每孔加正常对照血清 50 μl)、③阳性药对照组(每孔加含阳性药血清 50 μl)、④给药组(每孔加含药血清 50 μl),每组 3 复孔。除正常对照组加不完全 RPMI1640 培养液 100 μl 外,其余各组每孔均加 RPMI1640 细胞培养液制备的植物血凝素(PHA)溶液(250 $\mu\text{g/ml}$)溶液 100 μl 。培养板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、浓度 5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养 72 h。采用 MTT 法测定各组的 A 值(测定波长 578 nm,参比波长 630 nm)^[3]。

1.2.8 数据统计。试验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 小茴香对体外培养的 M ϕ 活性及其吞噬 CRBC 的影响 由表 1 可知,与无血清对照组比较,正常小鼠血清明显提高 M ϕ 活性及促进 M ϕ 吞噬 CRBC($P < 0.01$)。与正常血清对照组比较,LMS 和小茴香均显著提高 M ϕ 活性及促进

表 1 小茴香对体外培养的 M ϕ 活性及其吞噬 CRBC 的测定结果

Table 1 The activity and phagocytic CRBC M ϕ cultured *in vitro* induced by *F. vulgare*

组别 Group	M ϕ 活性(A 值) M ϕ activity	吞噬百分率 Phagocytic percent	吞噬指数 Phagocytic index
无血清对照组	0.259 \pm 0.012	15.67 \pm 1.53	0.183 \pm 0.015
正常血清对照组	0.369 \pm 0.024 ^{**}	32.67 \pm 2.31 ^{**}	0.393 \pm 0.015 ^{**}
LMS 阳性对照组	0.484 \pm 0.026 ^{###}	64.67 \pm 2.08 ^{###}	0.767 \pm 0.031 ^{###}
小茴香	0.534 \pm 0.010 ^{###}	56.67 \pm 3.06 ^{###}	0.637 \pm 0.025 ^{###}

注: ** 表示与无血清对照组比较在 0.01 水平有差异;### 表示与正常血清对照组比较在 0.01 水平有差异。

Note: ** means difference with control group without serum at 0.01 level;

means difference with normal serum control group at 0.01 level.

(上接第 13418 页)

持水土、减少噪音和净化空气等目的和要求。

参考文献

- [1] BONGHO H, KYONG J L. A study on the analysis of the physiological growth condition and improvement of street trees in Seoul[J]. Environmental Ecology, 2001, 10(1): 39-48.
- [2] KENT M, STEVEN R A, ZHANG L, et al. Urban plant ecology patterns and processes: A case study of the flora of the city of Plymouth[J]. Journal of Biogeography, 1999, 26(6): 1281-1298.
- [3] 王小德. 城市园林绿化特色研究[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(2): 150-154.
- [4] 中国绿城. 南宁[EB/OL]. <http://www.gx.xinhua.org/dtzx/nanning/>

M ϕ 吞噬 CRBC($P < 0.01$)。

2.2 小茴香对碳粒廓清率、淋巴细胞转化和血清溶血素生成水平的影响 由表 2 可知,与正常组比较,CTX 显著抑制正常小鼠的碳粒廓清率和血清溶血素生成水平($P < 0.01$),与正常血清对照组比较,添加 PHA 能明显促进淋巴细胞的转化($P < 0.01$)。与模型组比较,LMS 和小茴香显著提高 CTX 诱导的免疫抑制小鼠的碳粒廓清率和血清溶血素生成水平,显著促进淋巴细胞的转化($P < 0.01$)。

表 2 小茴香对小鼠碳粒廓清水平、血清溶血素生成水平及小鼠淋巴细胞增殖影响的测定结果

Table 2 The effects of *F. vulgare* on the carbon particle clearance level, serum hemolysin level and the lymphocyte proliferation of immunosuppressive mice

组别 Group	α 值($n=10$) α value	溶血素含量($n=10$) Hemolysin content	淋巴细胞增殖($n=3$) Lymphocyte proliferation
正常对照组	5.42 \pm 0.47	37.03 \pm 9.98	0.044 \pm 0.006
模型组	3.42 \pm 0.29 ^{**}	1.93 \pm 1.56 ^{**}	0.169 \pm 0.007 ^{**}
	(CTX)	(CTX)	(PHA)
LMS 组	4.04 \pm 0.46 ^{###}	6.11 \pm 2.83 ^{###}	0.230 \pm 0.010 ^{###}
小茴香	4.45 \pm 0.54 ^{###}	5.70 \pm 2.98 ^{###}	0.274 \pm 0.055 ^{###}

注: ** 表示与正常组相比,在 0.01 水平有差异;### 表示与模型组比较,在 0.01 水平有差异。

Note: ** means difference with normal group at 0.01 level; ### means difference with model group at 0.01 level.

3 结论

单核巨噬细胞的活性及其吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一。体外培养的 M ϕ 虽不具增殖能力,但当 M ϕ 活化时,其还原 MTT 能力比静止细胞还原作用强^[2]。体外试验结果表明,小茴香具有显著提高 M ϕ 活性及其促进 M ϕ 吞噬 CRBC 的作用,且小茴香对淋巴细胞的增殖有显著促进作用。体内试验结果揭示小茴香显著提高小鼠碳粒廓清水平,并显著促进免疫抑制小鼠的血清溶血素的生成,体内外试验结果相关一致。

参考文献

- [1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 757-759.
- [2] 柯岩, 刘振龙, 陈哲生. 鹭鸶咯口服液对小鼠巨噬细胞活化作用的研究[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(6): 355-357.
- [3] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1455-1457, 1427-1428, 1436-1437, 1421.
- [4] 李康生, 董菁. 微量溶血分光光度法测定抗体形成细胞[J]. 中国免疫学杂志, 1999, 1(4): 46.
- [5] 200603. ht.
- [5] 吴泽民, 黄成林, 白林波, 等. 合肥城市森林结构分析研究[J]. 林业科学, 2002, 38(4): 7-13.
- [6] 任继周. 草业科学研究与方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 16, 22.
- [7] LEE C E. Morphological and phylogenetic studies on the larvae and male genitalia of the East Asiatic Tingidae (Heteroptera) [J]. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 1969, 15(2): 137-256.
- [8] 杨淑秋, 李炳发. 道路系统绿化与美化[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [9] 张庆费, 夏福. 上海城区主要交通绿带木本植物多样性分析[J]. 中国园林, 2002, 18(1): 72-74.