

# The Effect of “The Tonifying Secret Recipe of Taoists” on Non-Specific Immune Function in Mice<sup>\*</sup>

Qingyun Zong, Li Sheng<sup>#</sup>, Jiangtao He

Medical College, The Northwest University for Nationalities, Lanzhou  
Email: <sup>#</sup>yxsl@xbmu.edu.cn

Received: Oct. 24<sup>th</sup>, 2013; revised: Nov. 5<sup>th</sup>, 2013; accepted: Nov. 8<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2013 Qingyun Zong et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract: Objective:** To explore the effect of “The tonifying secret recipe of Taoists” on non-specific immune function in mice, to establish the foundation for its development and utilization. **Methods:** To assay the immunity function and cytokine of mice with MTT, hemolysis spectrophotometric method, improved Mayer method and ELISA method. **Results:** “The tonifying secret recipe of Taoists” improved activity of NK and the total complement activity in serum, while increasing content of IL 2 and reduced that of IL 8. **Conclusion:** “The tonifying secret recipe of Taoists” could reinforce non-specific immune response, accommodate lymphocyte to secrete cytokine and enhance the body’s non-specific immune function effectively.

**Keywords:** The Tonifying Secret Recipe of Taoists; Non-Specific Immune Function; Empirical Study

## “道家补益禁方”对小鼠非特异性免疫功能的影响<sup>\*</sup>

宗庆芸, 胜利<sup>#</sup>, 何江涛

西北民族大学医学院, 兰州  
Email: <sup>#</sup>yxsl@xbmu.edu.cn

收稿日期: 2013年10月24日; 修回日期: 2013年11月5日; 录用日期: 2013年11月8日

**摘要: 目的:** 探讨“道家补益禁方”对小鼠非特异性免疫功能的影响, 为其开发利用奠定基础。 **方法:** 采用MTT法、溶血分光光度法、改良Mayer法及抗体芯片法检测小鼠非特异性免疫功能及细胞因子含量。 **结果:** 应用“道家补益禁方”后, 小鼠的NK细胞杀伤力、CH50活性均增加; IL 2含量显著提高, IL 8分泌减少。 **结论:** “道家补益禁方”能提高小鼠的非特异性免疫应答水平, 调节细胞因子分泌, 可以有效地增强机体非特异性免疫功能。

**关键词:** 道家补益禁方; 非特异性免疫功能; 实验研究

### 1. 引言

敦煌医学资料是指发现于敦煌地区寺院千佛洞莫高窟石室中的中医药古文献<sup>[1]</sup>。就医学内容而言, 敦煌医学资料有医经诊法类、医术医方类、针灸药物类、养生辟谷服石类等, 此外, 还有部分藏医药文献、

道家医方类和佛家医方类资料<sup>[2]</sup>。对敦煌医学资料的研究, 尤其是对佚散古药方的临床和实验研究, 不仅具有学术方面的价值, 又具有现实意义。故本课题选取敦煌医学资料中“道医药卷子”编号为P·4038(即法国巴黎国立图书馆馆藏文献)的“道家补益禁方”<sup>[3]</sup>, 研究其对机体免疫功能的影响, 为“道家补益禁方”的进一步开发应用奠定基础, 使这一民族医药中的瑰

<sup>\*</sup>西北民族大学国家大学生创新创业项目(201210742021)。

<sup>#</sup>通讯作者。

宝更好地为人类服务。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 主要试剂与仪器

“道家补益禁方”、黄芪：兰州众友药业公司；四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、RNAases: Sigma 公司；RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、GIBCO 公司；胎牛血清:民海生物；小鼠 IL 2、IL 8 ELISA 试剂盒:晶美生物工程有限公司；其它试剂均为国产分析纯。

YJ-875 型超净工作台：苏州净化设备公司；DNM-960IG 型酶联免疫检测仪：北京普朗；752C 型紫外可见分光光度计：上海第三分析仪器厂；Heal force HF160 型细胞培养箱：力康公司；IX51 倒置显微镜：奥林巴斯；PB303-S 型电子天平：瑞士 Mettler-Toledo 仪器有限公司。

### 2.2. 研究对象

昆明株纯系小鼠，8 周龄，雌雄各半，体重  $25 \pm 2$  g，甘肃中医学院医学实验动物中心提供，动物合格证：川疾控动检(2008)第 10362 号。

### 2.3. 药物处理

将方剂(皂荚子 10 g、鹿茸 10 g、白茯苓 10 g、地黄 13 g、菟丝子 12 g、枸杞 10 g、杏仁 10 g、生天冬 15 g)及黄芪常规熬制成汤剂  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，滤过除菌， $4^\circ\text{C}$  贮存，用时以含 10%胎牛血清的培养基稀释至所需浓度。

### 2.4. 给药方法

小鼠随机分为 3 组：方剂组、黄芪组，生理盐水组，每组 10 只。结合中药的药理学特点，参照小鼠口服用量，将方剂及黄芪口服用药浓度定为  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。连续灌胃 21 天。

### 2.5. 实验方法

#### 2.5.1. 参照<sup>[4]</sup>用 MTT 法检测 NK 细胞活性。

无菌分离、提取小鼠 NK 细胞，采用 MTT 比色法检测 NK 细胞活性，步骤同参考文献。靶细胞为 YAC21 细胞，效应细胞为小鼠的 NK 细胞，效、靶细

胞的比例为 10:1。

#### 2.5.2. 参照<sup>[4]</sup>用改良 Mayer 法测定血清总体溶血活性(CH50)。

无菌分离、提取小鼠血清，采用改良 Mayer 法测定血清总体溶血活性(CH50)，步骤同参考文献。

#### 2.5.3. 参照<sup>[4]</sup>用抗体芯片法测定 IL 2、IL 8 含量。

无菌分离、提取小鼠血清，采用抗体芯片法测定 IL 2、IL 8 含量，步骤同参考文献。

### 2.6. 统计学处理

所有数据用  $X \pm S$  表示，组间配对 T 检验，用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

## 3. 结果

### 3.1. 各组小鼠免疫指标的变化，见表 1

结果显示，方剂组、黄芪组小鼠的 NK 细胞杀伤力、CH50 活性均增加，与对照组间有明显差异，而方剂组与黄芪组间无差异。

### 3.2. 各组小鼠 IL 2、IL 8 含量的变化，见表 2

结果显示，方剂组、黄芪组小鼠的 IL 2 含量增加、IL 8 含量减少，与对照组间有明显差异，而方剂组与黄芪组间无差异。

## 4. 讨论

自然杀伤细胞(natural killer cells, NK cells)是有别于 T、B 淋巴细胞的大颗粒淋巴细胞，分布于外周淋巴器官和血液中，可以不需要抗原的预先刺激与活化就能发挥细胞毒效应，是机体非特异性免疫的主要承担者，也是特异性细胞免疫的核心调节细胞，在肿瘤免疫、抗病毒感染及清除非己细胞中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。补体广泛存在于血清、组织液和细胞膜表面，是具有精密调控机制的蛋白质级联反应系统，其活化过程表现为一系列丝氨酸蛋白酶的级联酶解反应。补体的主要生理功能为增强吞噬作用、增强吞噬细胞的趋化性；增加血管的通透性；中和病毒；细胞溶解作用；免疫反应的调节作用等，因此是机体免疫防御机制的重要组成部分，对消除外来抗原的侵害，维护机体内环境的平衡具有重要作用<sup>[6]</sup>。张晓明<sup>[7]</sup>等研究表明黄

**Table 1. Comparison of different groups in immunization index ( $\bar{x} \pm s$ )**

**表 1. 各组小鼠免疫指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	NK 细胞杀伤率(%)	CH50 活性(U·ml <sup>-1</sup> )
生理盐水组	34.88 ± 1.35	54.85 ± 1.59
方剂组	40.87 ± 1.34*	77.49 ± 1.44*
黄芪组	39.12 ± 1.32*	75.35 ± 2.09*

与生理盐水组比较, \*P < 0.01。

**Table 2. Comparison of different groups in IL 2 and IL 8 levels ( $\bar{x} \pm s$ )**

**表 2. 各组小鼠 IL 2、IL 8 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )**

	生理盐水组	方剂组	黄芪组
IL 2	88.44 ± 6.58	121.03 ± 7.36	113.02 ± 8.01
IL 8	546.03 ± 61.15	416.17 ± 46.87*	398.05 ± 43.10*

与生理盐水组比较, \*P < 0.01。

芪能增强 NK 细胞活性, 刺激 NK 细胞增殖。周显青<sup>[8]</sup>等研究证实黄芪对补体 C3 和 C4 的合成有明显的促进作用。本实验结果表明应用方剂后, 小鼠的 NK 细胞杀伤力、CH50 活性均增加, 与对照组有显著性差异(P < 0.01), 且与黄芪组的结果相似。说明此方能提高小鼠的非特异性免疫应答水平, 从而有效地增强免疫功能, 但是其机理是否和黄芪相同需进一步实验证实。

本实验结果显示, 此方能够提高 IL 2 含量, 同时减少 IL 8 分泌, 两种细胞因子的含量在实验组和对照组之间有显著性差异(P < 0.01)。IL 2 由活化的 T 细胞产生, 可诱导 CTL、NK 和 LAK 等多种杀伤细胞的分化和效应功能<sup>[9]</sup>, 干预 IL 2 或 IL 2R 会影响到 NK 细胞的效应功能<sup>[10]</sup>。IL 8 是一种强而有力的中性粒细胞趋化和活化因子, 由单核细胞、上皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞及 T 淋巴细胞在 IL 1、TNF 和外源性因子细菌多糖(LPS)的刺激下产生, 主要生物学作用是趋化并激活中性粒细胞, 促进中性粒细胞的溶酶体酶活性和吞噬作用, 对嗜碱性粒细胞和 T 细胞也有一定的趋

化作用。目前认为 TNF、IL 1、IL 6 诱发的炎症反应在很大程度上是通过诱导产生以 IL 8 为代表的趋化因子所介导的<sup>[11]</sup>。所以减少 IL 8 含量必然会减轻炎症反应。

综上所述: 此方能够提高小鼠 NK 细胞杀伤率、增加 CH50 活性、提高 IL 2 含量、减少 IL 8 分泌, 可以有效地增强机体非特异性免疫功能。由此提示, 此方可能通过提高 IL 2 含量, 增强 NK 细胞自身的活性, 间接增进 NK 细胞杀伤率; 也可能激 NK 细胞增殖, 直接提高其杀伤率, 但具体作用理尚待进一步研究阐明。另外、此方引起小鼠细胞因子含量的变化, 既可能是影了机体免疫功能导致免疫细胞分泌细胞因子发改变, 也可能直接作用于免疫细胞, 调节细胞因分泌, 仍需作深入的研究, 以揭示此方提高非特异性免疫功能的具体分子基础。

## 参考文献 (References)

- [1] 马继兴 (1991) 继敦煌残卷中发现《内经》古诊法后的再发现. *上海中医药杂志*, **5**, 38-40.
- [2] 赵建雄 (1989) 敦煌遗书“残医书”卷考析. *中国医药学报*, **4**, 53-55.
- [3] 刘喜平 (2006) 敦煌古医药方研究. 第 1 版, 科学普及出版社, 北京, 367-368.
- [4] Falchetti, R., Fuggetta, M.P., Lanzilli, G., et al. (2001) Effect of resveratrol on human immune cell function. *Life Sciences*, **70**, 81-96.
- [5] 李明琦, 白雪峰, 王锡山 (2012) 自然杀伤细胞的基础研究和进展. *国际免疫学杂志*, **35**, 90-94.
- [6] 王会会, 陈国江, 黎燕等 (2010) 补体 C5a、C5a 受体及其拮抗剂的研究进展. *国际药学研究杂志*, **37**, 181-186.
- [7] 张晓明, 苗榕生, 唐岩等 (2000) 白细胞介素 2 和黄芪多糖对人 NK 细胞活性和增殖的影响. *北京中医药大学学报*, **12**, 27-29.
- [8] 周显青, 牛翠娟, 孙儒泳 (2002) 黄芪和酸应激对中华鳖幼鳖血清补体 C3 和 C4 含量的影响. *动物学研究*, **23**, 177-180.
- [9] Jin, B.Q. (2001) Cell and molecular immunology (Version 2). Science Publisher, Peking, 475-479.
- [10] Paul, Compile, Wu, Y.Z., et al. Translate. (2003) Basi immunology. Science Publisher, Peking, 655-657.
- [11] Reddy, K.P., Markowitz, J.E., Ruchelli, E.D., et al. (2007) Lamina propria and circulating interleukin 8 in newly and previously diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Digestive Diseases and Sciences*, **52**, 365-372.