

石斛参芝含片的免疫功能研究

邹思颖^{1*}, 郑华², 黄聘和²

(1. 成都市第五人民医院, 成都 611130; 2. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610041)

摘要: **目的** 研究石斛参芝含片增强小鼠免疫力功能的作用。**方法** 本研究设低、中、高 3 个剂量组, 另设蒸馏水阴性对照组, 连续给予 30 d。试验结束时取脾脏和胸腺计算其脏/体比值, 并测定足趾肿胀度、淋巴细胞增殖能力、溶血空斑数、抗体水平积数、碳廓清能力、巨噬细胞吞噬率和吞噬指数以及 NK 细胞活性。**结果** 各剂量组动物的脾脏/体重比值、胸腺/体重比值、淋巴细胞增殖能力、抗体水平积数、碳廓清能力、巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、NK 细胞活性与阴性对照组之间无显著性差异($P>0.05$); 3 个剂量组动物的足趾肿胀度均高于阴性对照组动物, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 3 个剂量组动物的溶血空斑数均高于阴性对照组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 石斛参芝含片对昆明种小鼠有增强免疫力功能的作用。**关键词:** 石斛参芝含片; 小鼠; 免疫力

Study on the immunity function of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet

ZOU Si-Ying^{1*}, ZHENG Hua², HUANG Pin-He²

(1. Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China;
2. Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on immunity functions of mice. **Methods** In this study, low, medium and high dose groups were set, and the negative control group of distilled water was set, which was continuously given for 30 days. At the end of the experiment, spleen and thymus were taken, and the organ/body weight ratio of spleen and thymus, paw swelling, ability of lymphocyte proliferation, number of hemolytic plaques, antibody forming ability, ability of carbon clearance, the phagocytosis ratio and phagocytosis index of macrophage, and activity of NK cells were measured. **Results** There were no significant differences in the organ/body weight ratio of spleen and thymus, ability of lymphocyte proliferation antibody forming ability, ability of carbon clearance, the phagocytosis ratio and phagocytosis index of macrophage, and activity of NK cells between each dosage group and the negative control group ($P>0.05$). The degree of paw swelling in the 3 dose groups was higher than that in the negative control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The number of hemolytic plaques in the 3 dose groups was higher than that in the negative control group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** Dendrobium, ginseng and ganoderma tablet can strengthen the immunity functions of Kunming mice.

KEY WORDS: dendrobium, ginseng and ganoderma tablet; mice; immunity functions

*通讯作者: 邹思颖, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为保健食品的功能性检测。Email: zsyqq666@163.com

*Corresponding author: ZOU Si-Ying, Ph.D, Associate Professor, Function and Safety Testing of Health Food, ChengDu Fifth People's Hospital, No.33, Mashi Street, Wenjiang District, Chengdu 611130, China. E-mail: zsyqq666@163.com

1 引言

石斛本品为兰科植物金银石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.)、铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.) 或 马鞭石斛 (*Dendrobium fimbriatum* Hook. var. *oculatum* Hook.) 及其近似种的新鲜或干燥茎^[1,2]。其主要功效是益胃生津, 滋阴清热。中医临床上常用于阴伤津亏, 口干烦渴, 食少干呕, 病后虚热, 目暗不明等。目前已有药理研究表明, 石斛属植物具有多种保健功能, 如增强机体免疫力、抗衰老、抗肿瘤、抗血小板聚集、抗病毒等^[3-8]。目前开发应用的石斛类保健食品通常是 2 种以上中药材配伍制成, 主要是考虑到 2 个方面因素, 一是石斛单品价格较高, 如果单一服用要达到相同效果则对于消费者来说费用较高; 二是根据中医学基础理论, 通过中药配伍以尽可能发挥药物的最大疗效, 使其保健效果更好^[9]。段立群等^[10]研究表明, 由金钗石斛、党参和黄芪等 3 味药材组成的石斛复方制剂能够提高小鼠非特异性和特异性免疫功能, 具有显著的免疫增强作用。赵铮蓉等^[11]研究也表明, 以铁皮石斛为主分别配伍黄精、西洋参的铁皮石斛黄精片和铁皮石斛洋参颗粒均具有增强免疫功能的功效。

本研究以石斛为主的复方制剂样品石斛参芝含片为研究对象, 研究该样品的增强免疫功能, 以期为其推广应用提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 样品来源

石斛参芝含片由成都润馨堂药业有限公司生产, 贵州仙草生物科技有限公司提供。样品为淡绿色薄膜衣片, 片芯棕褐色, 成人每日推荐量为 4 g/日, 试验时用蒸馏水溶解受试物, 4 °C 冷藏保存。

2.1.2 仪器和试剂

100 μ L 微量注射器(美国 Corning 公司); SANYO 二氧化碳培养箱(日本三洋公司); KDC-1044L 离心机(安徽中科中佳公司)。

Hank's 液、S_A 缓冲液、琼脂糖(分析纯, 美国 Sigma 公司)。

2.2 实验动物

由四川省中医药科学院实验动物中心提供的昆明种小鼠 160 只, 全雌, 体重 18~22 g, 生产许可证号为 SCXK(川)2013-19 SPF 级。

2.3 剂量选择与受试物给予方式

设人体推荐摄入量 10、20、30 倍等 3 个剂量组即 667、1333、2000 mg/kg·BW 等低、中、高 3 个剂量组, 另设阴

性对照组(蒸馏水)。动物按 20 mL/kg·BW 体重连续经口灌胃 30 d。

2.4 实验方法

本研究根据卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)增强免疫力功能试验中的相关试验方法进行^[12]。本研究主要进行 4 个方面的实验, 分别是细胞免疫功能检测(包括迟发性变态反应实验、淋巴细胞转化实验); 体液免疫已检测(包括抗体生成细胞实验、血清溶血素测定); 单核-巨噬细胞吞噬功能检测(包括小鼠碳廓清试验、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验); 以及 NK 细胞活性测定。其中迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)检测利用足跖肿胀度来表示 DTH 的程度; 小鼠淋巴细胞转化试验采用 MTT 比色法在 570 nm 处测定光密度值来表示淋巴细胞增殖能力; 抗体生成细胞检测采用 Jerne 改良玻片法计数溶血空斑数; 血清溶血素测定采用血凝法来记录每孔的凝集程度并计算抗体积数; 小鼠碳廓清试验测定光密度值来计算吞噬指数; 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验采用半体内法计算吞噬百分率及吞噬指数; NK 细胞活性测定采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定法在 490 nm 处测定光密度值来计算 NK 细胞活性率。

2.5 数据统计

采用 SPSS 13.0 for Windows 软件处理。对照组与剂量组的数据经方差齐性检验, 方差齐, 进行方差分析, 如 $P < 0.05$, 则用 Dunnett 法进行两两比较; 若方差不齐, 则进行数据转换, 仍不齐, 改用秩和检验, 如 $P < 0.05$, 则用 Dunnett's T3 法进行两两比较。

2.6 结果判定

在细胞免疫功能、体液免疫功能、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞活性等 4 个试验, 任意 2 个试验结果阳性, 则可认为该受试物具有增强免疫力功能的作用。

3 结果与分析

3.1 石斛参芝含片对小鼠脏器/体重比值的影响

由表 1 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物与阴性对照组相比, 脾脏/体重比值、胸腺/体重比值无显著性差异($P > 0.05$)。

3.2 石斛参芝含片对小鼠细胞免疫功能的影响

由表 2 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的足趾肿胀度均高于阴性对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 表明石斛参芝含片能够增强绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC)引起的小鼠迟发性变态反应; 比较 3 个剂量组动物和阴性对照组动物的淋巴细胞增殖能力, 其差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明小鼠淋巴转化实验结果为阴性。

石斛参芝含片对小鼠细胞免疫试验结果为阳性。

3.3 石斛参芝含片对小鼠体液免疫的影响

由表 3 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的溶血空斑数均高于阴性对照组, 经统计学处理, 中, 高剂量组动物有显著性差异($P < 0.01$), 表明抗体生成细胞检测结果为阳性; 比较 3 个剂量组动物和阴性对照组的抗体积数, 其差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明血清溶血素测定结果为阴性。石斛参芝含片对小鼠体液免疫试验结果阳性。

3.4 石斛参芝含片对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

由表 4 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的

碳廓清能力与阴性对照组相比, 经统计学处理, 无显著性差异($P > 0.05$), 表明小鼠碳廓清实验结果为阴性。由表 5 可见, 3 个剂量组动物的吞噬率和吞噬指数与阴性对照组相比, 经统计学处理, 无显著性差异($P > 0.05$), 表明小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验结果为阴性。石斛参芝含片对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能试验结果阴性。

3.5 石斛参芝含片对小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 6 可见, 连续灌胃 30 d 后, 3 个剂量组动物的 NK 细胞活性与阴性对照组相比, 经统计学处理, 无显著性差异($P > 0.05$)。石斛参芝含片对小鼠 NK 细胞活性试验结果阴性。

表 1 石斛参芝含片对小鼠脏器/体重比值的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on organ/body weight ratio in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	脾脏/体重			胸腺/体重		
		比值/%	F 值	P 值	比值/%	F 值	P 值
阴性对照组	10	0.36±0.08	1.11	0.356	0.29±0.07	0.248	0.862
低剂量组	10	0.31±0.07			0.27±0.06		
中剂量组	10	0.36±0.11			0.29±0.07		
高剂量组	10	0.38±0.11			0.28±0.07		

表 2 石斛参芝含片对小鼠细胞免疫功能的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on cellular immune function in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	足趾肿胀度/mm	F 值	P 值	淋巴细胞增殖能力(OD 差值)	F 值	P 值
阴性对照组	10	0.74±0.04	29.083		0.205±0.064	0.411	0.746
低剂量组	10	0.90±0.07*		0.000	0.202±0.033		
中剂量组	10	1.00±0.10*		0.000	0.214±0.033		
高剂量组	10	1.03±0.09*		0.000	0.221±0.025		

注: *与空白组比较在 $P < 0.01$ 水平下具有显著性差异。

表 3 石斛参芝含片对小鼠体液免疫能力的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on humoral immunity in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	溶血空斑数/ 10^6 脾细胞	F 值	P 值	抗体积数	F 值	P 值
阴性对照组	10	264.0±41.08	8.263		133.80±13.23	0.895	0.453
低剂量组	10	303.5±59.49		0.371	123.80±10.82		
中剂量组	10	381.0±72.33*		0.001	127.70±18.65		
高剂量组	10	376.5±73.34*		0.001	130.50±12.83		

注: *与空白组比较在 $P < 0.01$ 水平下具有显著性差异。

表 4 石斛参芝含片对小鼠单核—巨噬细胞碳廓清功能的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)Table 4 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on carbon clearance function of mononuclear macrophages in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	吞噬指数	F 值	P 值
阴性对照组	10	4.30±0.60	0.442	0.725
低剂量组	10	4.65±1.32		
中剂量组	10	4.85±1.62		
高剂量组	10	4.89±1.34		

表 5 石斛参芝含片对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)Table 5 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on the ability of macrophages to engulf chicken erythrocytes in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	吞噬率/%	F 值	P 值	吞噬指数	F 值	P 值
阴性对照组	10	21.85±1.90	2.276	0.096	0.87±0.03	2.152	0.111
低剂量组	10	22.80±2.31			0.89±0.04		
中剂量组	10	23.75±1.93			0.91±0.03		
高剂量组	10	23.95±1.92			0.91±0.04		

表 6 石斛参芝含片对小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{X} \pm s, n=3$)Table 6 Effect of dendrobium, ginseng and ganoderma tablet on the activity of NK cells in mice ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	动物数/只	NK 细胞活性/%	F 值	P 值
阴性对照组	10	21.22±2.21	2.200	0.105
低剂量组	10	24.15±2.82		
中剂量组	10	24.11±3.80		
高剂量组	10	23.12±2.65		

4 结论与讨论

本实验所用样品石斛参芝含片主要功效成分是金钗石斛, 目前已有许多研究报道石斛的多种功效, 如增强免疫功能、抗氧化、抗肿瘤以及抗炎等。本实验主要检测丹霞仙草牌金钗石斛参芝含片 30 d 喂养小鼠后体内免疫水平的变化, 为其开发应用提供动物实验依据。

本研究结果表明, 石斛参芝含片在对小鼠连续灌胃 30 d 后, 小鼠的体重脏器/体重比值与阴性对照比较无明显影响, 对小鼠的单核—巨噬细胞吞噬功能试验结果阴性, 对小鼠的 NK 细胞活性试验结果阴性; 对小鼠的细胞免疫试验结果阳性, 对小鼠的体液免疫试验结果阳性。根据结果判定标准, 石斛参芝含片对动物具有增强免疫力的功能。

目前有多项研究表明石斛增强免疫力的主要物质基础是其多糖类成分。Zha 等^[13]研究发现霍山石斛多糖在促进小鼠体外培养的脾、肝、小肠细胞的增殖以及干扰素 γ 的分泌的同时, 也可以促进体外培养肝细胞中白细胞介素

4 的分泌, 同时促进甲氨蝶呤所导致的免疫能力低下小鼠的免疫功能紊乱的恢复。Meng 等^[14]通过比较铁皮石斛、马鞭石斛、霍山石斛、金钗石斛、鼓缢石斛等不同种类石斛的多糖成分对小鼠巨噬细胞的影响, 发现其均可以增强巨噬细胞吞噬能力, 同时释放一氧化氮和细胞因子白细胞介素 1 α 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α , 但增强能力有高低不同, 这可能与其石斛多糖的种类相关。

根据目前已有研究, 不同种类的石斛均具有增强免疫功能, 但不同种类是通过不同作用机制发挥作用。在本研究中所用样品石斛参芝含片, 其增强免疫作用可能与金钗石斛增强免疫功能的主要功效成分精制多糖和粗多糖有关, 它对脾淋巴细胞有促进增殖的作用, 同时能与刀豆蛋白 A、脂多糖 Con A, LPS 一起协同刺激 T、B 淋巴细胞的增殖^[15]。这一作用机制可能在丹霞仙草牌金钗石斛参芝含片增强免疫功能的保健功能中发挥了重要作用, 为本研究所用样品开发作为保健食品奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 药典国家委员会. 中华人民共和国药典(2005 版 1 部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
National committee on pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 I) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [2] 戴忠华, 笄舫芳, 朱华, 等. 《中华人民共和国药典》(一部)中石斛药材的演变[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(2): 370-372.
Dai ZH, Da FF, Zhu H, et al. Evolution of varieties of *Dendrobium nobile* in first volume of pharmacopoeia of People's Republic of China [J]. Chin Archiv Tradit Chin Med, 2017, 35(2): 370-372.
- [3] 张诗航. 铁皮石斛化学成分及药理作用的研究进展[J]. 当代医药论丛, 2018, 16(20): 26-27.
Zhang SH. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of *Dendrobium officinale* [J]. Contemp Med Forum, 2018, 16(20): 26-27.
- [4] 相萍萍, 王旭, 刘超. 铁皮石斛的最新应用研究[J]. 西部中医药, 2016, 29(1): 129-131.
Xiang PP, Wang X, Liu C. The latest study on TiePi ShiHu [J]. Western J Chin Med [J]. 2016, 29(1): 129-132.
- [5] 唐汉庆, 韦祎, 卢兰. 铁皮石斛对小鼠端粒酶活性及抗衰老能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(8): 1809-1811.
Tang HQ, Wei Y, Lu L. Effect of *Dendrobium officinale* on telomerase activity and anti-aging ability of mice [J]. Chin J Gerontol, 2016, 36(8): 1809-1811.
- [6] 施仁潮, 竹剑平, 李明焱. 铁皮石斛抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2013, (19): 1641-1643.
Shi RC, Zhu JP, Li MY. Research progress of anti-tumor effect of *Dendrobium officinale* [J]. Chin Pharm J, 2013, (19): 1641-1643.
- [7] 林萍, 汤依群, 杨莉. 束花石斛抗凝血作用的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(1): 44-47.
Lin P, Tang YQ, Yang L. Preliminary studies on anticoagulant function of *Dendrobium chrysanthum* [J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(1): 44-47.
- [8] 金乐红, 刘传飞, 唐婷. 石斛多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, (22): 1734-1737.
Jin LH, Liu CF, Tang T. Experimental study on anti-tumor effect of *Dendrobium nobile* polysaccharides [J]. Chin J Pharm, 2010, (22): 1734-1737.
- [9] 陈素红, 颜美秋, 吕圭源, 等. 铁皮石斛保健食品开发现状与进展[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1625-1628.
Chen SH, Yan MQ, Lv GY, et al. Development status and progress of *Dendrobium officinale* health food [J]. Chin Pharm J, 2013, 48(19): 1625-1628.
- [10] 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.
Duan LQ, Yao XD, Zhang Y, et al. Immunological effect of *Dendrobium nobile* compound preparation in mice [J]. J Zunyi Med Univ, 2015, 38(1): 41-44.
- [11] 赵铮蓉, 吴月国, 腾士元, 等. 铁皮石斛复方制剂免疫调节作用的研究[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 47-48.
Zhao ZR, Wu YG, Teng SY, et al. Study on immune regulation of *Dendrobium officinale* compound preparation [J]. Strait Pharm J, 2017, 29(3): 47-48.
- [12] 保健食品检验与评价技术规范[Z].
Technical specification for health food inspection and evaluation [Z].
- [13] Zha XQ, Zhao HW, Bansal V, et al. Immunoregulatory activities of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides in mouse intestine, spleen and liver [J]. Int J Biol Macromol, 2014, (64): 377-382.
- [14] Meng LZ, Lv GP, Hu DJ, et al. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (Shihu) on macrophage function [J]. Molecules, 2013, 18(5): 5779-5791.
- [15] 陈志国, 叶松山, 范迎. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 27-31.
Chen ZG, Ye SS, Fan Y. Optimization of extraction technology of polysaccharide from *Dendrobium nobile* Lindl and effects on pro-liferation of mouse splenocytes [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2011, 17(15): 27-31.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



邹思颖, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为保健食品的功能性检测。
E-mail: zsyqq666@163.com