

# 保元汤加减方对正常小鼠免疫功能的影响

胡雪灵, 苏洁, 颜美秋, 俞静静, 周衡朴, 傅萌, 郑佳亿, 陈紫妍, 吕圭源\*, 陈建真\*

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** **目的** 探究保元汤加减方对正常小鼠免疫功能的影响。**方法** 将120只BALB/c小鼠随机分成3个免疫组(免疫I组、免疫II组、免疫III组), 每组40只。每个免疫组小鼠按体质量随机分成正常组和保元汤加减方低、中、高剂量组(0.9、1.4、1.9 g/kg), 每组10只。连续灌胃给药30 d后, 检测免疫I组小鼠行为学指标、脾脏T淋巴细胞增殖能力, NK细胞活性, 血常规指标, 血清中免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白G(IgG)、补体3(C3)、补体4(C4)水平, 外周血及脾脏中T、B淋巴细胞比例; 检测免疫II组小鼠溶血空斑数、半数溶血值; 检测免疫III组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬功能, 脾脏中CD4、CD8表达。**结果** 与正常组比较, 保元汤加减方可升高小鼠自主活动次数和抓力, 增强脾淋巴细胞增殖能力、NK细胞活性, 增加溶血空斑数、半数溶血值、腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数、全血白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYMPH)数量和比例及IgM、IgG、C4水平、外周血和脾脏的CD4<sup>+</sup>T细胞占比及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值、脾脏CD4阳性表达量及CD4/CD8比值( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 降低外周血CD3<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T细胞占比、脾脏CD8<sup>+</sup>T细胞占比( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 保元汤加减方具有增强免疫力功能。

**关键词:** 保元汤加减方; 免疫功能; 免疫细胞; 免疫分子

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)05-1677-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.044

免疫系统是人体的一道天然屏障, 可分为特异性免疫(包括细胞免疫和体液免疫)和非特异性免疫<sup>[1]</sup>。《内经》中记载的“正气存内, 邪不可干”等论述均强调了正气在疾病中的作用<sup>[2]</sup>。“正气”被当代医学家归结为“免疫”, 中医认为, 由于外部邪气与内部正气不断斗争, 从而导致正气亏虚产生一系列免疫低下的表现, “正气为本”是防病治病根本<sup>[3,4]</sup>。中医中药可提升“正气”来达到增强机体免疫功能的目的。

保元汤源自明代孙志宏所著《简明医彙》, 为经典名剂, 处方药味组成包括人参、黄芪、甘草、肉桂, 加生姜一片<sup>[5]</sup>, 补气温阳, 主治元气虚弱之证<sup>[6]</sup>。俗话说“一年之内, 秋不食姜; 一日之内, 夜不食姜”, 鉴于生姜辛温, 易助火伤阴, 故热盛及阴虚内热、患有疮者不应长期服用生姜。红景天具有益气活血、扶正固本等作用。原方中人参、黄芪、甘草补后天之气, 肉桂补先天之气, 辅以红景天, 可共奏大补元气之功效。因此, 本研究去生姜加红景天制成保元汤加减方(又称景天保元汤), 依据《保健食品功能检验与评价方法(2022年版)(征求意见稿)》<sup>[7]</sup>中增强免疫力功能评价方法, 研究其对正常小鼠免疫功能的影响, 以期为开发增强免疫力功能产品提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF级BALB/c雄性小鼠120只, 体质量18~22 g, 购自杭州启真实验动物科技有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(浙)2022-0005], 于浙江中医药大学动物实验室[实验动物使用许可证号SYXK(浙)2019-0024]中饲养, 环境温度20~26℃, 相对湿度45%~60%, 12 h照明/12 h黑暗。动物实验由浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过(伦理号IACUC-20230918-28)。

1.2 药物 人参、黄芪、甘草、肉桂、红景天(杭州华东中药饮片有限公司, 批号20220509、20220803、20220509、20220507、20220721)。取上述药材, 按照6:12:3:1:6的比例称取, 加入一定体积纯化水, 提取3次, 过滤, 合并提取液, 提取液以4 000 r/min离心5 min, 取上清液, 上清液减压浓缩至生药量1 g/mL, 备用, 使用前分别稀释至质量浓度为0.09、0.14、0.19 g/mL的药液。

1.3 试剂 红景天苷、毛蕊异黄酮、山柰酚对照品(成都普菲德生物技术有限公司, 批号JOT-10012、JOT-10389、JOT-10060); 木犀草素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号111520-200504); YAC-1(武汉普诺赛生命科技有限

收稿日期: 2024-01-24

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2020C04020); 浙江省重点实验室项目(2012E10002)

作者简介: 胡雪灵(1998—), 女, 硕士生, 从事中药药效物质及新药开发研究。Tel: 18357489831, E-mail: hxl9831@163.com

\*通信作者: 吕圭源(1954—), 男, 博士, 教授, 从事中药药理与新产品开发研究。Tel: 13906523168, E-mail: zjtcmlgy@163.com

陈建真(1965—), 女, 博士, 教授, 从事中药药效物质及新药开发研究。Tel: 13429610767, E-mail: chjz102@aliyun.com

公司,批号 54BI86YWVN);刀豆蛋白 A (ConA)、10% SRBC、补体 (豚鼠血清)、1% 鸡红细胞 (上海源叶生物科技有限公司,批号 W13F10E80699、M12IR209519、D10HS203741、M12IS209517);MTT、红细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 111721220209、030922220602);LDH 基质液 (北京酷来搏科技有限公司,批号 SL32221705);都氏试剂 (广东翁江化学试剂有限公司,批号 2022120964A);Anti-mouse PerCP-Cy5.5 CD3 $\epsilon$ 、Anti-mouse APC CD4、Anti-mouse PE CD8 $\alpha$ 、Anti-mouse FITC CD19、Mouse IgM ELISA Kit、Mouse IgG ELISA Kit (杭州联科生物技术股份有限公司,批号 A21143、A21034、A21025、A20732、A27610841、A27110735);Mouse C3 ELISA Kit、Mouse C4 ELISA Kit (泉州市睿信生物科技有限公司,批号 RX2023028M、RX2023027M);CD4 antibody、CD8 antibody (杭州华安生物科技有限公司,批号 HLO118、HG0806)。

1.4 仪器 安捷伦 1200 色谱仪 [安捷伦科技 (中国) 有限公司];YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪、YLS-1A 型多功能小鼠自动活动记录仪 (山东省医学科学院设备站);XT-2000i 型全自动血液分析仪 (日本 SYSMEX 株式会社);C13210-01 型数字病理切片扫描系统 (日本滨松光子学株式会社);CytoFlex 型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司);Powerwave 340 型酶标仪 (美国 BioTek 公司);Tissue-Tek VIP5Jr 型自动脱水机 (日本樱花检验仪器株式会社);MEIKOEC360 型包埋机 (德国 MEIKO 公司);M2245 型半自动切片机 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

### 2.1 保元汤加减方主要成分含量测定

2.1.1 溶液制备 对照品溶液:称取红景天苷 1.93 mg、木犀草素 1.57 mg、山柰酚 1.60 mg、毛蕊异黄酮 2.23 mg,用甲醇溶于 10 mL 量瓶中,配制成每 1 mL 分别含 193  $\mu$ g 红景天苷、157  $\mu$ g 木犀草素、160  $\mu$ g 山柰酚、223  $\mu$ g 毛蕊异黄酮的溶液,即得。

供试品溶液:取 25 mL 保元汤加减方,加入 25 mL 水饱和正丁醇萃取,滤过,取 20 mL 滤液,水浴蒸干后用甲醇溶解,定容于 5 mL 量瓶中,即得。

2.1.2 色谱条件 Ultimate LP-C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱,流动相水 (A)-甲醇 (B),梯度洗脱 (0~10 min, 21% B; 10~30 min, 21%~50% B; 30~50 min, 50%~60% B; 50~65 min, 60% B);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 222 nm;柱温 25  $^{\circ}$ C;进样量 10  $\mu$ L。

2.2 分组及给药 将 120 只 BALB/c 小鼠随机分成 3 个免疫组 (免疫 I 组、免疫 II 组、免疫 III 组),每组 40 只。每个免疫组小鼠按体质量随机分成正常组和保元汤加减方低、中、高剂量组 (0.9、1.4、1.9 g/kg),每组 10 只。正常组小鼠灌胃给予蒸馏水,给药组小鼠分别灌胃给予相应剂量的药物,灌胃体积为 10 mL/kg,每天 1 次,连续给药 30 d。

### 2.3 行为学指标检测

2.3.1 自主活动测定 给药 28 d 时,在安静环境下,将免疫 I 组小鼠放入自主活动记录仪中适应 3 min 后,记录 5 min 内小鼠自主活动次数。

2.3.2 抓力测定 给药 28 d 时,抓持免疫 I 组小鼠尾根处,待小鼠用力抓住抓力测定仪的抓力板时及时加力后拉,记录所测数据,测定 3 次,取平均值。

2.4 细胞免疫功能测定 免疫 I 组小鼠于第 30 天灌胃 2 h 后处死,无菌取脾,制备单细胞悬液。取 24 孔板,实验孔加 1 mL 脾细胞悬液和 75  $\mu$ L ConA 液,对照孔加 1 mL 脾细胞悬液,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 68 h。每孔吸去上清液 0.7 mL,加入等量 RPMI 1640 培养液和 50  $\mu$ L MTT,继续培养 4 h。培养结束后,每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,吹打溶解紫色结晶。加入到 96 孔板中,用酶标仪于 570 nm 波长处检测光密度 (OD) 值,计算 OD 值差。

### 2.5 体液免疫功能检测

2.5.1 抗体生成细胞数测定 免疫 II 组小鼠于灌胃给药第 26 天腹腔注射 0.2 mL 2% SRBC 进行免疫。第 30 天灌胃给药 2 h 后,每组随机取处死 3 只,制备脾细胞悬液。取表层培养基与等量 Hank's 液的混合液 0.5 mL,加入 50  $\mu$ L 10% SRBC 和 20  $\mu$ L 脾细胞悬液,迅速混匀,倾倒入玻片上的琼脂糖薄层,待琼脂凝固后,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1.5 h,加入补体,继续孵育 1 h,计数溶血空斑数,以溶血空斑数/脾细胞数 ( $\times 10^5$ ) 表示抗体生成细胞数。

2.5.2 血清溶血素检测 免疫 II 组小鼠于第 30 天灌胃 2 h 后,取血分离得血清。设样品孔,加 SA 缓冲液稀释 200 倍的血清 50  $\mu$ L;空白对照孔,加 SA 缓冲液 50  $\mu$ L。各孔加入 25  $\mu$ L 10% SRBC 和 50  $\mu$ L 补体,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 30 min,冰浴终止反应,离心取 50  $\mu$ L 上清液至新的 96 孔板中,再加 150  $\mu$ L 都氏试剂,同时设半数溶血孔,加入 12.5  $\mu$ L 10% SRBC 和 187.5  $\mu$ L 都氏试剂。充分混匀,放置 10 min 后,用酶标仪于 540 nm 波长处检测 OD 值,计算半数溶血值。

2.6 单核-巨噬细胞功能检测 通过腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验分析单核-巨噬细胞功能。免疫 III 组小鼠于灌胃给药第 26 天,腹腔注射 0.2 mL 2% SRBC 进行免疫。第 30 天灌胃 2 h 后处死小鼠,腹腔注射含胎牛血清的 Hank's 液 4 mL,取 0.5 mL 腹腔洗液与 0.5 mL 1% 鸡血红细胞悬液混匀,用注射器吸取 0.5 mL 混合液,加入玻片的琼脂圈内,37  $^{\circ}$ C 孵育 20 min,生理盐水冲洗后,甲醇液固定 1 min, Giemsa 液染色 15 min。蒸馏水冲洗、晾干后计数吞噬率和吞噬指数。

2.7 NK 细胞活性检测 于 U 型 96 孔培养板中,设反应孔,加入“2.4”项下的脾细胞悬液和靶细胞 (YAC-1 细胞) 各 100  $\mu$ L (效靶比 50 : 1),靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100  $\mu$ L,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1% NP40 各 100  $\mu$ L,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h,离心取 100  $\mu$ L 上清液置于平底 96 孔板中,加入 100  $\mu$ L LDH 基质液,反应 6 min,每孔加入 1 mol/L HCl 30  $\mu$ L,用酶标仪

于490 nm波长处检测OD值,计算NK细胞活性,公式为NK细胞活性 =  $[(OD_{\text{反应孔}} - OD_{\text{自然释放孔}}) / (OD_{\text{最大释放孔}} - OD_{\text{自然释放孔}})] \times 100\%$ 。

2.8 血常规检测 灌胃给药21 d后免疫I组小鼠眼眶取血约0.2 mL于含EDTA的抗凝管中,用全自动血液分析仪检测白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYMPH)。

2.9 血清中免疫球蛋白和补体水平检测 于灌胃给药第30天,免疫I组小鼠眼眶取血置于1.5 mL离心管中,4℃静置2 h,3 500 r/min离心10 min,吸取上清,3 500 r/min离心10 min,吸取上清。按照试剂盒说明书操作检测免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白G(IgG)、补体3(C3)、补体4(C4)水平。

2.10 流式细胞术检测外周血T、B淋巴细胞比例 于灌胃给药第29天,免疫I组小鼠取50 μL血样于流式管中,加入1 mL红细胞裂解液裂解10 min,离心弃上清。加入PBS洗涤,离心弃上清。加入流式抗体PerCP-Cy5.5 CD3ε、APC CD4、PE CD8α、FITC CD19各2 μL,避光孵育20 min。加入PBS洗涤,离心弃上清。加入300 μL PBS重悬,用细胞筛过滤后上机检测T淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>)、辅助性T细胞(Th, CD4<sup>+</sup>)、杀伤性T细胞(Tc, CD8<sup>+</sup>)、B淋巴细胞(CD19<sup>+</sup>)占淋巴细胞的比例。

2.11 流式细胞术检测脾脏T淋巴细胞比例 取“2.4”项下的脾细胞悬液50 μL,加入流式抗体PerCP-Cy5.5 CD3ε、APC CD4、PE CD8α各2 μL,避光孵育20 min。加入PBS洗涤,离心弃上清,加入300 μL PBS重悬,用细胞筛过滤后上机检测CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>占淋巴细胞的比例。

2.12 免疫组化法检测脾脏组织中CD4、CD8表达 免疫III组小鼠处死后取脾脏,于10%中性福尔马林固定液中固定,脱水、包埋、切片(4 μm),经抗原修复、封闭、4℃孵育抗CD4和CD8一抗过夜、37℃孵育二抗30 min、DAB显色、苏木素染色、脱水、透明及中性树脂封片干燥后,于显微镜下观察脾脏CD4、CD8的表达情况。

2.13 统计学分析 通过SPSS 25.0软件进行处理,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析及t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

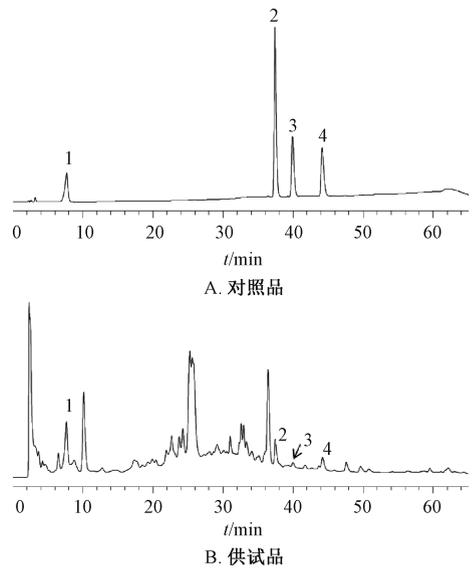
### 3 结果

3.1 保元汤加减方主要成分分析 HPLC色谱图见图1。保元汤加减方主要成分为红景天苷、木犀草素、山柰酚、毛蕊异黄酮,成分含量见表1。

表1 保元汤加减方主要成分含量

编号	保留时间/min	成分	含量/(μg·mL <sup>-1</sup> )
1	7.617	红景天苷	380.16
2	37.498	木犀草素	42.84
3	39.967	山柰酚	27.27
4	44.266	毛蕊异黄酮	76.52

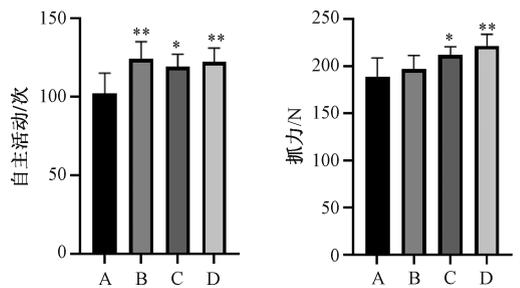
3.2 保元汤加减方对正常小鼠行为学的影响 与正常组比较,保元汤加减方各剂量组小鼠自主活动次数增加( $P <$



1. 红景天苷 2. 木犀草素 3. 山柰酚 4. 毛蕊异黄酮

图1 混合对照品溶液和保元汤加减方样品溶液的HPLC色谱图

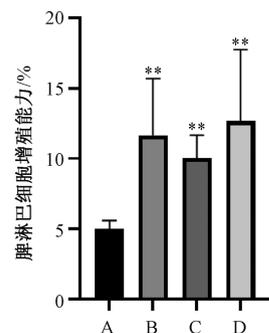
0.01),保元汤加减方中、高剂量组小鼠抓力增大( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),见图2。



注: A为正常组, B~D分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图2 保元汤加减方对正常小鼠行为学的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

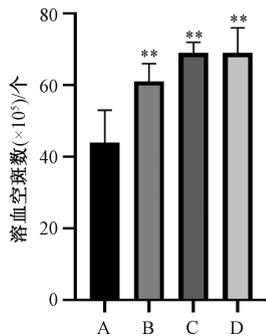
3.3 保元汤加减方对正常小鼠细胞免疫功能的影响 与正常组比较,保元汤加减方各剂量组小鼠脾淋巴细胞增殖能力增强( $P < 0.01$ ),见图3。



注: A为正常组, B~D分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

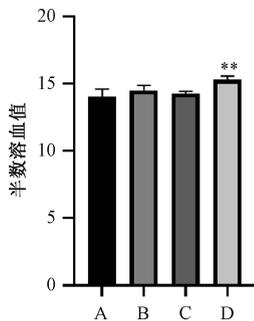
图3 保元汤加减方对正常小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

3.4 保元汤加减方对正常小鼠溶血空斑数和半数溶血值的影响 与正常组比较,保元汤加减方各剂量组小鼠溶血空斑数增加 ( $P<0.01$ ),保元汤加减方高剂量组小鼠的半数溶血值增加 ( $P<0.01$ ),见图4~5。



注: A 为正常组, B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较, \*\*  $P<0.01$ 。

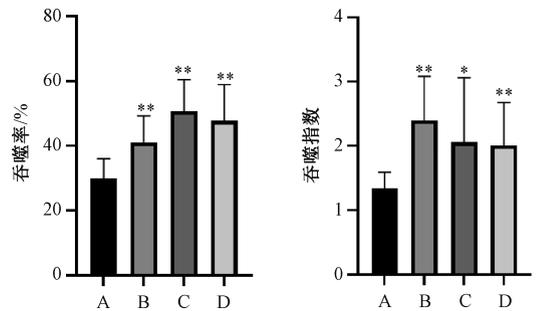
图4 保元汤加减方对正常小鼠溶血空斑数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )



注: A 为正常组, B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较, \*\*  $P<0.01$ 。

图5 保元汤加减方对正常小鼠半数溶血值的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

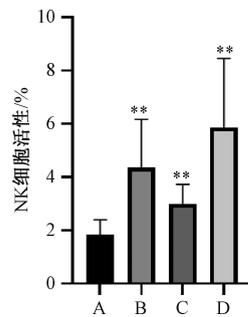
3.5 保元汤加减方对正常小鼠单核-巨噬细胞功能的影响 与正常组比较,保元汤加减方各剂量组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数均增加 ( $P<0.05, P<0.01$ ),见图6。



注: A 为正常组, B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图6 保元汤加减方对正常小鼠单核-巨噬细胞功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

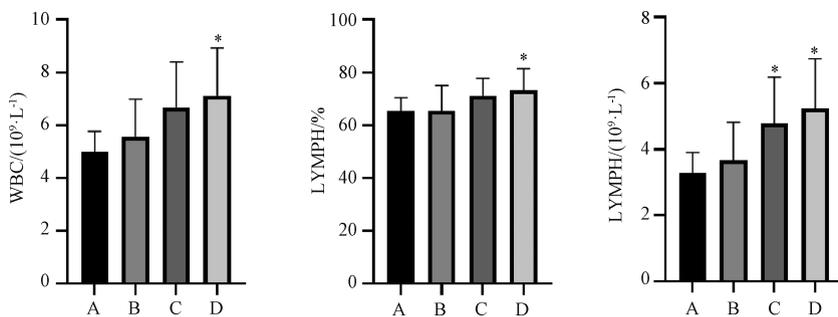
3.6 保元汤加减方对正常小鼠NK细胞活性的影响 与正常组比较,保元汤加减方各剂量组小鼠NK细胞活性增强 ( $P<0.01$ ),见图7。



注: A 为正常组, B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较, \*\*  $P<0.01$ 。

图7 保元汤加减方对正常小鼠NK细胞活性的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

3.7 保元汤加减方对正常小鼠血常规指标的影响 与正常组比较,保元汤加减方高剂量组小鼠白细胞数、淋巴细胞比例及数量均增加 ( $P<0.05$ ),保元汤加减方中剂量组小鼠淋巴细胞数增加 ( $P<0.05$ ),见图8。

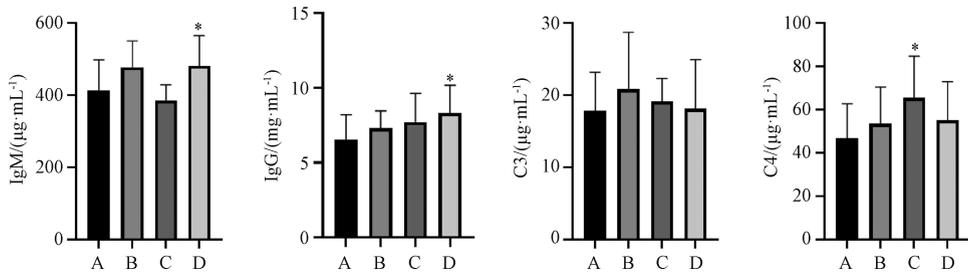


注: A 为正常组, B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较, \*  $P<0.05$ 。

图8 保元汤加减方对正常小鼠血常规指标的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

3.8 保元汤加减方对正常小鼠血清中免疫球蛋白和补体水平的影响 与正常组比较,保元汤加减方高剂量组小鼠IgM、IgG水平增加 ( $P<0.05$ ),保元汤加减方中剂量组小

鼠C4水平增加 ( $P<0.05$ ),保元汤加减方各剂量组小鼠C3水平有所增加,但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见图9。

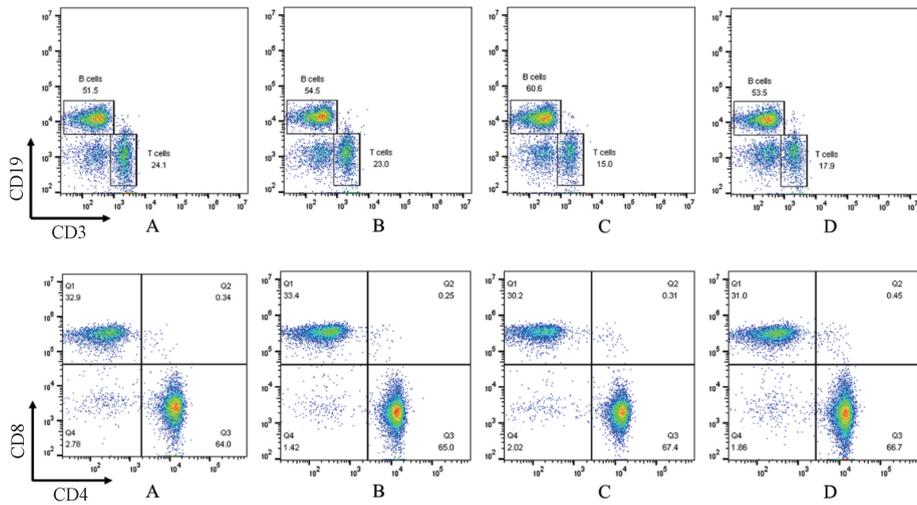


注：A为正常组，B~D分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较，\* $P < 0.05$ 。

图9 保元汤加减方对正常小鼠血清中免疫球蛋白和补体水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

3.9 保元汤加减方对正常小鼠外周血 T、B 淋巴细胞比例的影响 与正常组比较，保元汤加减方中、高剂量组小鼠外周血 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞比例降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，保

元汤加减方高剂量组 CD4<sup>+</sup>细胞比例及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值升高 ( $P < 0.01$ )，CD19<sup>+</sup>细胞比例有升高趋势，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见图 10、表 2。



注：A为正常组，B~D分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。

图10 各组小鼠外周血 T、B 淋巴细胞流式代表图

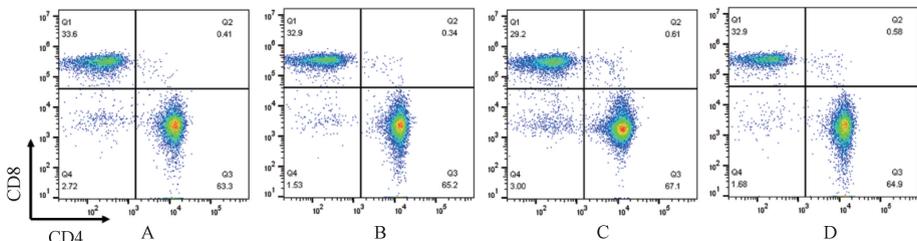
表2 保元汤加减方对正常小鼠外周血 T、B 淋巴细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	CD3 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /%	CD8 <sup>+</sup> /%	CD19 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
正常组	24.33 ± 5.84	61.69 ± 2.23	36.35 ± 2.14	55.43 ± 5.49	1.71 ± 0.16
保元汤加减方低剂量组	23.80 ± 3.72	62.99 ± 3.12	34.90 ± 2.95	57.30 ± 6.72	1.82 ± 0.24
保元汤加减方中剂量组	19.29 ± 3.09*	63.46 ± 2.12	33.71 ± 2.47*	56.80 ± 6.21	1.91 ± 0.19
保元汤加减方高剂量组	20.21 ± 3.89*	67.11 ± 3.34**	29.87 ± 3.35**	59.06 ± 4.25	2.28 ± 0.38**

注：与正常组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

3.10 保元汤加减方对正常小鼠脾脏 T 淋巴细胞比例的影响 与正常组比较，保元汤加减方中剂量组小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>

细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值增加 ( $P < 0.05$ )，CD8<sup>+</sup>细胞比例减少 ( $P < 0.05$ )，见图 11、表 3。



注：A为正常组，B~D分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。

图11 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞流式代表图

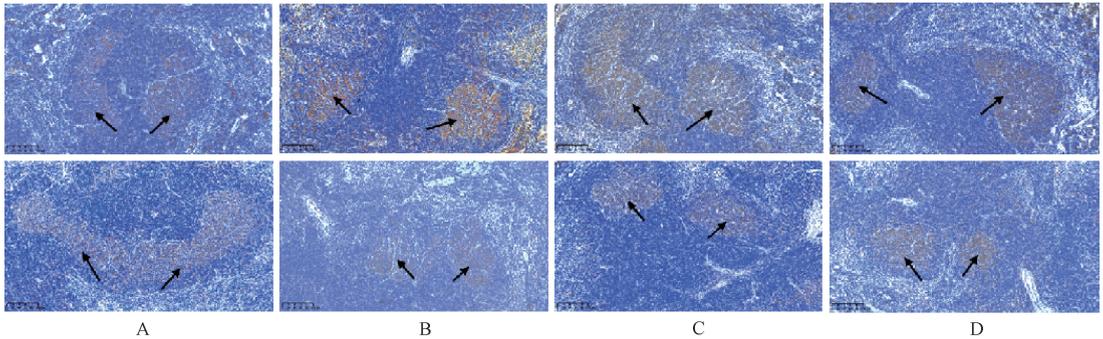
表3 保元汤加减方对正常小鼠脾脏 T 淋巴细胞的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> /%	CD8 <sup>+</sup> /%	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
正常组	67.68±12.52	23.45±3.69	2.94±0.75
保元汤加减方低剂量组	72.12±8.22	21.99±3.16	3.36±0.76
保元汤加减方中剂量组	76.22±3.86*	18.87±5.13*	4.44±1.70*
保元汤加减方高剂量组	74.01±5.73	20.18±4.31	3.85±1.03

注：与正常组比较，\* $P<0.05$ 。

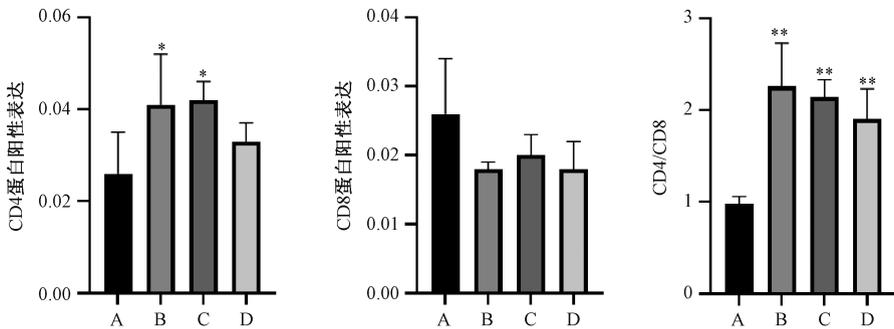
3.11 保元汤加减方对正常小鼠脾脏 CD4、CD8 表达的影响 与正常组比较，保元汤加减方低、中剂量组小鼠脾脏 CD4 蛋白阳性表达增加 ( $P<0.05$ )，保元汤加减方各剂量

组小鼠脾脏 CD4/CD8 蛋白阳性表达比值增加 ( $P<0.01$ )，见图 12~13。



注：A 为正常组，B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。黑色箭头指示阳性表达区域。

图 12 各组小鼠脾脏 CD4、CD8 免疫组化染色图 ( $\times 200$ )



注：A 为正常组，B~D 分别为保元汤加减方低、中、高剂量组。与正常组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ 。

图 13 保元汤加减方对正常小鼠脾脏 CD4、CD8 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

#### 4 讨论

《内经》云：“邪之所凑，其气必虚”，指出防病治病根本是“正气为本”<sup>[8]</sup>。免疫系统中医学中所指的“正气”是指人体内具有抗病、修复、免疫等作用的一类细微物质，维护人体的正常功能活动<sup>[9-10]</sup>。红景天助益气之效，使得机体正气充盈。本研究以保元汤为基础，去生姜加红景天进行配伍，加大补气之功效，顾护正气，从特异性免疫和固有免疫全方位探讨保元汤加减方的增强免疫力功能。

淋巴细胞是淋巴系统大部分免疫功能的主要执行者<sup>[11]</sup>。本研究结果显示，保元汤加减方小鼠的淋巴细胞数量增加，淋巴细胞比例升高。通常使用 ConA 刺激 T 淋巴细胞体外增殖，来评价机体细胞免疫功能<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示，保元汤加减方能增强脾脏 T 淋巴细胞增殖能力。CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞可提高免疫功能，CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞则相反，CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值可反映免疫机体内环境<sup>[14-15]</sup>。本研究结果

显示，保元汤加减方能升高 CD4<sup>+</sup>T 细胞占比、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值及脾脏 CD4 阳性表达，降低 CD8<sup>+</sup>T 细胞占比。另外，B 淋巴细胞介导体液免疫，而溶血空斑的数量可反映出 B 淋巴细胞免疫能力<sup>[16]</sup>。血清溶血素测定是利用进入机体的抗原，刺激机体产生特异性抗体<sup>[17]</sup>。本研究发现保元汤加减方给药后小鼠溶血空斑数和半数溶血值均升高。IgM 和 IgG 是介导体液免疫的主要抗体<sup>[18]</sup>。本研究发现保元汤加减方通过增加血清中免疫球蛋白水平而发挥免疫保护作用。

固有免疫细胞包括巨噬细胞、自然杀伤细胞 (NK) 等。本研究结果显示，保元汤加减方能增加腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数，并能增强 NK 细胞活性。补体系统是参与固有免疫应答的重要免疫效应分子，其含量影响着机体免疫状态<sup>[19]</sup>。本研究结果显示，保元汤加减方能增加小鼠 C4 水平。

白细胞水平常用于反映免疫功能，免疫抑制会导致白

细胞数量减少, 而白细胞数量升高, 很可能与机体免疫力增强有关<sup>[20-21]</sup>。本研究结果显示, 保元汤加减方可增加小鼠白细胞数量, 还可增加小鼠自主活动次数和抓力, 表明保元汤加减方能通过益气促使机体精力旺盛。

综上所述, 保元汤加减方能增强脾 T 淋巴细胞功能、调节 T 淋巴细胞亚群分化来提高细胞免疫; 增强脾 B 淋巴细胞与补体结合能力, 促进抗体释放来提高体液免疫; 增强固有免疫细胞功能及数量、促进固有免疫分子分泌来提高固有免疫。因此, 保元汤加减方通过“补气”来维持“正气”, 增强特异性免疫和非特异性免疫功能, 具有良好的开发应用价值。

#### 参考文献:

[1] 冯学轩, 王 弋, 严家荣, 等. 天然蛋白与酵母  $\beta$ -葡聚糖组合物增强免疫力功能研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 1938-1942.

[2] 牛壮伟, 颜美秋, 苏 洁, 等. 铁皮石斛水提物对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠的抑瘤及免疫调节作用研究[J]. 中草药, 2023, 54(1): 131-141.

[3] 刘俊秋. 补气药黄芪、人参及其配伍免疫调节和代谢组学研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.

[4] 王 晨, 于冰莉, 崔 洁, 等. 黄芪及其复配组合调节正常小鼠免疫功能的探索[J]. 中国现代中药, 2018, 20(5): 545-549; 555.

[5] 成焕波, 胡 辉, 李清安, 等. 保元汤古代文献分析与现代研究概况[J]. 中国现代中药, 2021, 23(10): 1842-1850.

[6] 张 祎, 陈桂芳, 袁玲玲, 等. 保元汤对正常小鼠免疫力功能的影响[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2020, 29(3): 185-189.

[7] 国家市场监督管理总局. 《保健食品功能检验与评价方法》(2022年版) 征求意见稿[EB/OL]. (2022-01-12) [2023-05-06]. [https://www.samr.gov.cn/hd/zjdc/art/2023/art\\_b9d0712d43524224945af6ef21903403.html](https://www.samr.gov.cn/hd/zjdc/art/2023/art_b9d0712d43524224945af6ef21903403.html).

[8] 赵凯维, 宋 阳, 张玉辉, 等. 论基于正气为本“生生之

道”研究治未病理论体系的意义[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(7): 1046-1048.

[9] 程荣菲, 马 千. 正气与六经病发病关系探析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(22): 40-42.

[10] 王晓东. 从《伤寒论》角度小议中医正气[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(62): 219; 221.

[11] 焦蓓蕾, 葛旭升, 张 楠, 等. 浅析热应激对奶牛生理机能的影响[J]. 中国乳业, 2020(9): 38-45.

[12] 刘 奇, 慎凯峰, 周丹英, 等. 当归口服液对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 海峡药学, 2020, 32(12): 19-23.

[13] Ni J, Bi S, Xu W, *et al.* Improved immune response to an attenuated pseudorabies virus vaccine by ginseng stem-leaf saponins (GSLs) in combination with thimerosal (TS) [J]. *Antiviral Res*, 2016, 132: 92-98.

[14] 刘晓宇, 磨榕芸, 于师洋, 等. 绞股蓝对环磷酰胺致免疫力低下小鼠的免疫调节及菌群紊乱调节[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(4): 420-425; 430.

[15] Raphael I, Nalawade S, Eagar T N, *et al.* T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Cytokine*, 2015, 74(1): 5-17.

[16] 董权锋, 方耀桑, 奚 彧, 等. 一种复合益生菌粉增强免疫力功能的动物研究[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(12): 1401-1407.

[17] 李耀燕, 张 曼, 闫国跃, 等. 骆越壮酒对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(2): 185-188.

[18] 张 爽, 姜希红, 刘树民. 复方斑龙强壮膏滋配比优选及其对免疫低下模型小鼠保护作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10): 2396-2400.

[19] 张小峰. 黄芪杂多糖对正常小鼠免疫功能的影响[D]. 太原: 山西农业大学, 2014.

[20] 黄启迪, 苏 洁, 刘 静, 等. 白术水提物对自然衰老小鼠的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 72-77.

[21] 陈进汝, 吴道勋, 张海珠, 等. 云南松塔提取物对免疫抑制和正常小鼠血常规的影响[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(24): 4-7.