

3 讨论

我国传统医学中有许多药食兼用的中草药被认为具有润肺功能,其中某些配方已有很长的应用历史,其润肺功能亦被广泛认可,由于在动物实验中很难找到一个能较准确反映润肺功能的指标,因此评价润肺作用时一般只进行免疫调节功能的检测,缺乏特异性。而肺巨噬细胞是参与肺内非特异性免疫的重要细胞,其吞噬功能的高低可在一定程度上反映肺的免疫水平。早在七十年代末,Holt 等人就建立了通过支气管肺泡灌洗术获得肺巨噬细胞的方法,^[1]此法具有操作简便,不需昂贵仪器及试剂等优点,近几十年来在国内外被广泛应用。

秋梨膏是一种有百年历史的传统中药制品,其药用成分是具有清热宣肺、祛痰止咳、利咽润喉等功能的中草药,加上秋梨汁等食品成分蜜炼成膏,在长期的应用中被认为有较好的润肺功能。我们用该试样比较了其对大鼠肺巨噬细胞及小鼠腹腔巨噬细胞的影响,结果显示虽然低、中剂量组小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能略高于对照组,但只有当剂量达到 15 000 mg/kg BW 时,才出现具有统计学意义的升高,且剂量一效应关系不明显;而肺巨噬细胞吞噬功能与对照组相比,低剂量组(500 mg/kg BW)即出现具统计学

意义的升高,且其吞噬功能随秋梨膏剂量的增加而增加,低、中、高三个剂量组肺巨噬细胞吞噬功能与对照组相比分别升高 1.53 2.18 4.13 倍,存在一定的剂量一效应关系。提示对于某种特异性调节肺部免疫功能的保健食品的评价,肺巨噬细胞吞噬功能是一项比较敏感的指标,我们认为可以作为免疫调节功能的补充指标。

值得注意的是,肺巨噬细胞吞噬功能随动物年龄而有很大差异,我们在预实验中发现,8~10 月龄老龄大鼠的肺巨噬细胞吞噬功能明显低于 4~5 月龄的成年大鼠(数据未列出),故选用老龄大鼠作为肺巨噬细胞吞噬功能低下的动物模型进行实验,可以提高本法的灵敏度。另外,动物的自发感染、规范化手术操作及统一的镜下观察判断标准都对实验结果的准确性有很大影响,因此本方法的质量控制至关重要。

4 参考文献

- 1 Holt P G. J Immun Methods, 1979, 27: 189
- 2 费丽华,等.肺巨噬细胞的生物特性及其辐射效应的研究(一)资料汇编:1987, 1, 27
- 3 卫生部监督司.保健食品功能学评价程序和检验方法, 1996, 27

高效液相色谱法定量测定刺五加浸膏中异秦皮定

赵秀娟¹ 汪鸾鸣² 张 牧³ 张宇秋¹ 崔洪斌¹

刺五加(*Acanthopanax senticosus*) 属人参科植物,具有益气健脾、补肾安神等功效。^[1]国外实验研究发现刺五加药理作用是极其广泛的。^[2]近年来,许多食品科学工作者已将其应用于保健食品的研制、开发上,如刺五加袋泡茶、冲剂等等。刺五加中的主要功效成分为异秦皮定(isofraxidin),因此刺五加保健食品中异秦皮定的含量是衡量该食品质量的重要标志。测定刺五加中异秦皮定的方法有薄层层析法、^[3]高效液相色谱法。^[4]前者采用柱层析和薄层层析分离后,刮下色斑进行比色测定,操作复杂;后者实验中所用流动相异氰氢甲烷在国内很难购买,限制了该测定方

法的应用。本方法选用 HPLC 中常用的甲醇-水为流动相,选择适宜的比例,使试样中异秦皮定的吸收峰与其它成分吸收峰得到了很好分离。操作简便,结果准确、可靠,易于推广使用。

1 材料与方法

1.1 材料

异秦皮定 日本和光纯药工业株式会社提供。
甲醇(色谱纯) 上海普侨化工技术研究所提供。
甲醇(分析纯) 北京化工厂产品。
刺五加浸膏 哈尔滨横仓药业海林中药厂提供。

1.2 HPLC 色谱条件及测定方法

仪器 高效液相色谱仪(Water 公司产品) 附带多波长紫外检测器(Shimadzu SPD-2A), 色谱柱为 ODS-120T C18 不锈钢柱(200mm × 5mm)。

1 哈尔滨医科大学公共卫生学院 (150086)
2 黑龙江省食品卫生监督检验所 (150030)
3 哈尔滨市南岗区卫生防疫站 (150080)

比妥钠(50 mg/kg BW),在腹主动脉放血处死后进行气管插管,另吸取10 mL 4℃预冷的生理盐水缓慢注入肺脏,轻轻按揉动物胸廓20次,吸出支气管肺泡灌洗液(BALF),连续灌洗4次,记录吸出液体积。

肺巨噬细胞存活率测定:取一滴BALF原液于玻片上,再加一滴0.2%台盼兰生理盐水溶液,镜下观察肺巨噬细胞存活率大于95%的试样,方可进行下一步实验。

细胞计数 用细胞计数盘计数BALF原液中肺巨噬细胞数,根据灌洗液体积计算每个试样的细胞总数。灌洗液于4℃1500 r/min离心10 min,弃上清,再用4℃预冷的生理盐水将沉淀细胞稀释成 4×10^6 /mL的悬液。

肺巨噬细胞吞噬功能测定 分别吸取0.5 mL细胞悬液及0.5 mL 1%鸡红细胞悬液在试管中混匀,然后吸取0.5 mL混合液滴于玻片上,37℃培养30 min,用Hank's液冲洗,甲醇固定,Giemsa染色,油镜下观察100个肺巨噬细胞,计数吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞数及被吞噬的鸡红细胞数,根据下列公式计算吞噬率及吞噬指数。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的观察巨噬细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的观察巨噬细胞总数}}$$

腹腔巨噬细胞吞噬功能测定^[4]

于末次给药的第二天,给予所有小鼠腹腔注射1%鸡红细胞悬液,30 min后断髓处死,用2 mL Hank's液冲洗腹腔,取腹腔灌洗液0.5 mL直接滴片,37℃培养30 min, Hank's液冲洗,甲醇固定,Giemsa染色,于油镜下对每张玻片计数100个巨噬细胞,计算吞噬率及吞噬指数。

对所有数据采用汉化EPI info统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表达。

2 实验结果

2.1 秋梨膏对大鼠肺巨噬细胞吞噬功能的影响(表1)。

表1 秋梨膏对大鼠肺巨噬细胞吞噬功能的影响

组别	动物数 只	总观察细胞数 个	吞噬率 %	吞噬指数
阴性对照	10	1000	3.8 ± 3.52	0.05 ± 0.06
低剂量组(500 mg/kg BW)	10	1000	9.6 ± 8.15 ⁽¹⁾	0.13 ± 0.12 ⁽¹⁾
中剂量组(2500 mg/kg BW)	10	1000	12.1 ± 6.67 ⁽²⁾	0.17 ± 0.13 ⁽²⁾
高剂量组(15000 mg/kg BW)	10	1000	19.5 ± 4.53 ⁽²⁾	0.33 ± 0.11 ⁽²⁾

注:由于方差不齐,采用Kruskal-wallis检验;与阴性对照组相比,(1) $P < 0.05$; (2) $P < 0.01$

表2 秋梨膏对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

组别	动物数 只	总观察细胞数 个	吞噬率 %	吞噬指数
阴性对照	10	1000	43.2 ± 9.7	0.89 ± 0.25
低剂量组(500 mg/kg BW)	10	1000	50.2 ± 12.9	1.04 ± 0.32
中剂量组(5000 mg/kg BW)	10	1000	45.8 ± 16.8	1.07 ± 0.33
高剂量组(15000 mg/kg BW)	10	1000	57.3 ± 13.1 ⁽¹⁾	1.17 ± 0.31 ⁽¹⁾

(1)与对照组相比 $P < 0.05$

由表1所列结果可见,与阴性对照组相比,各剂量组的吞噬率及吞噬指数均明显升高,经统计学检验,差异有显著性或高度显著性,且存在一定的剂量-效应关系。

2.2 秋梨膏对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

(表2)。

由表2所列结果可见,与阴性对照组相比,各剂量组的吞噬率及吞噬指数均有所升高,高剂量组的升高具统计学意义。

7.4%, 吞噬指数为 0.37 ± 0.24 , 接近于 8~10 月龄小鼠参考值的下限, 而本实验室对 8~10 月龄小鼠的测定结果正介于 3 月少龄鼠和 18 月老龄鼠之间。说明随着实验动物的衰老, 其胸腺将发生退化, T、B 淋巴细胞功能亦将随之降低, 从而导致对外来抗原的细胞免疫和体液免疫反应降低。因此动物的选择应有年龄要求, 以便进行质量控制。

从本次统计结果中亦发现, 各项免疫指标测定值的相对标准偏差(RSD)有一定差距(表 5)。如脾/体比值、吞噬率、抗体积数, 其 RSD 为 20%~30%, 胸腺/体比值、吞噬指数, 其 RSD 为 30%~40%, 接近于 J. H. Dean 等介绍的免疫功能检测质量控制范围。^[6]而 DTH 测定值和 PFC 数的 RSD 则偏高, 分别为 46.7% 和 53.5%, 其原因除实验动物个体差异外, 实验条件和操作程序是否规范化也会产生一定影响。如: 不同实验室或同一实验室不同批试验中测得的 PFC 结果变化较大, 估计与脾细胞存活率和豚鼠血清补体活性有一定关系。因为在制备脾细胞悬液时, 环境温度、缓冲液 pH 以及细胞保存时间的长短均会影响细胞存活率, 而血清补体由于其性质不稳定,^[7]在各种理化因素影响下, 活性也可降低, 从而导致不同

批试验中小鼠脾脏抗体形成空斑数有一定范围的浮动。因此在进行 PFC 实验时要求各种试剂应经过严格筛选, 人员要经过培训, 某些操作步骤应固定专人来完成。如能将各种试剂和操作程序标准化, 估计实验结果会更理想。究竟采用何种方法进行质量控制, 使各实验室结果有更好的可比性, 需进一步研究探讨。

4 参考文献

- 1 薛彬, 等. 免疫毒性检测与安全性评价. 卫生毒理学杂志, 1989, 3(1): 53~56
- 2 卫生部监督司. 保健食品功能学评价程序和方法, 1996
- 3 雷志明, 等. 单个动物多项免疫功能检测研究. 北京医科大学学报, 1991, 23(5): 399~401
- 4 马玲, 等. 花旗参乳对小鼠的免疫促进作用及抗氧化作用. 中国食品卫生杂志, 1997; 9(6): 4~6
- 5 韩秀坤, 等. 野玫瑰根煎剂对老龄小鼠免疫功能的恢复作用. 佳木斯医学院学报, 1994, 17(3): 1~3
- 6 Dean J H, et al. An introduction to immunotoxicology assessment. Immunotoxicology of drugs and chemicals, 1986, 16
- 7 杨廷彬, 等. 实用免疫学. 长春: 长春出版社

评价保健食品对肺巨噬细胞吞噬功能影响的实验方法

穆效群 姚小曼
牛铁芹 马玲
北京市卫生防疫站 (100013)

我国传统医学中的某些药食兼用的药物被认为具有润肺功能, 而肺巨噬细胞吞噬功能是一项能较好地反映肺部非特异性免疫功能的指标, 故检测保健食品对肺巨噬细胞的吞噬功能的影响可较好地反映其对肺免疫水平的调节作用。目前评价保健食品对巨噬细胞吞噬功能的影响多采用小鼠腹腔巨噬细胞检测作为调节免疫功能的指标之一。本研究以中医认为具有润肺功能的秋梨膏作为受试物, 将其对大鼠肺巨噬细胞及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能进行了比较, 旨在建立一种评价保健食品对肺免疫功能影响的实验方法, 作为评价调节免疫功能的补充实验方法。

1 材料和方法

受试物 秋梨膏, 由北京某保健食品公司提供。

动物 Wistar 种大鼠, 40 只, 雌性, 8~10 月龄,

体重 300~400g; 昆明种小鼠, 40 只, 雌性, 8~9 月龄, 体重 45~55g, 均由军事医学科学院实验动物中心提供。

实验方法

动物分组及给药

Wistar 大鼠及昆明种小鼠均按体重分别随机分为 4 个组, 每组 10 只, 即阴性对照组和 3 个受试物剂量组, 大鼠分别采取人推荐摄入量的 1 倍、5 倍和 30 倍(即 500 mg/kg BW、2500 mg/kg BW 和 15 000 mg/kg BW); 小鼠分别采取人推荐摄入量的 1 倍、10 倍和 30 倍(即 500 mg/kg BW、5000 mg/kg BW 和 15 000 mg/kg BW), 连续灌胃 28 d。

肺巨噬细胞吞噬功能检测^[1~3]

支气管肺泡原位灌洗(BAL) 于末次给药第二天, 对所有大鼠进行 BAL。具体方法是腹腔注射戊巴