



# 环磷酰胺致大鼠免疫抑制和免疫亢进模型的建立与评价

张俊<sup>1</sup>, Yong-Seong Shin<sup>1</sup>, 胡安君<sup>1</sup>, 杜芳芳<sup>2</sup>, 李永亮<sup>1</sup>, 王学兵<sup>1,2</sup>, 张红英<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450000; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450000)

**【摘要】** 目的 用环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)建立大鼠免疫抑制和免疫亢进模型,并从免疫器官、免疫细胞、抗体和细胞因子等方面对该模型进行评价。方法 SD大鼠随机分为A、B、C三大组,所有大鼠腹腔注射100 μg 鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)进行免疫,B组大鼠于免疫OVA后6 h,以不同的方式腹腔注射不同剂量的Cy,C组大鼠于免疫OVA前3 d,以不同的方式腹腔注射不同剂量的Cy,A组为对照组。结果 免疫OVA后6 h,一次性注射不同剂量Cy(125、100 mg/kg),能使大鼠产生明显的免疫抑制,免疫OVA前3 d注射不同剂量Cy,超大剂量时(225 mg/kg)依然会引起动物的免疫抑制,小剂量(20 mg/kg)一次注射或者更小剂量(每天5 mg/kg,连续3d)注射在不同时间点均能引起机体免疫亢进。结论 为免疫抑制和免疫亢进模型的建立提供方法和数据支持具有重要参考意义。

**【关键词】** 环磷酰胺;卵清白蛋白;大鼠模型;免疫亢进;免疫抑制

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0395-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.012

## Establishment and evaluation of a rat model of immunosuppression and immune hyperfunction induced by cyclophosphamide

ZHANG Jun<sup>1</sup>, SHIN Yong-seong<sup>1</sup>, HU An-jun<sup>1</sup>, DU Fang-fang<sup>2</sup>, LI Yong-liang<sup>1</sup>, WANG Xue-bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-ying<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China;  
2. Key laboratory for Animal-Derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** **Objective** The aim of this study was to establish rat models of immunosuppression and immune hyperfunction. **Methods** Sixty-four SPF Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups A, B, and C. All rats were immunized with intraperitoneal injection of 100 μg ovalbumin (OVA). The group A was used as control. At 6 hours after immunization, the rats of group B were injected with different doses of cyclophosphamide (Cy) at different time points. The rats of group C were injected with Cy in different ways at 3 days before immunization. **Results** Immunosuppressed rats were successfully induced by Cy (125 mg/kg or 100 mg/kg) at 6 h after immunization and also by injection of 225 mg/kg Cy at 3 days before immunization with ovalbumin. Small dose (20 mg/kg) of Cy injected once or a smaller dose (5 mg/kg/d) injected once a day for consecutive 3 days can also result in immune hyperfunction. **Conclusions** Rat models of immunosuppression and immune hyperfunction are successfully established, which provide methodological and data support for establishment of such animal models and useful reference for related research.

**【Key words】** Cyclophosphamide; Ovalbumin; Rat model; Immunosuppression; Immune-hyperfunction

抗癌药环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy)是临床上广泛应用的烷化剂类化疗药物之一,由于其高度且广谱的细胞毒性作用,除了用于治疗急慢性白血病、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤,也常常被用作免疫

[基金项目] 河南省高校科技创新人才资助项目(2012HASTII008),郑州市创新型科技人才队伍建设工程资助项目(10CXTD148)。

[作者简介] 张俊(1988-),男,在读硕士,主要从事中药免疫调节作用研究。E-mail: jun15036070926@163.com。

[通讯作者] 张红英(1968-),女,博士,副教授,主要从事中药抗微生物与免疫调节作用研究。E-mail: hongyingnd@163.com。

抑制药,例如在骨髓移植时的免疫抑制治疗以及治疗一些自身免疫性疾病<sup>[1-2]</sup>。但是研究表明,环磷酰胺作用于机体的机制是相当复杂的,往往不同剂量,不同作用时间,会引起机体免疫抑制和免疫亢进两种不同结果<sup>[3-4]</sup>。现有文献报道的免疫抑制模型的建立方法,有一次性大剂量(100 或 150 mg/kg)注射 Cy<sup>[5-7]</sup>和多次小剂量(20、40 mg/kg 或 80 mg/kg)给药<sup>[8-11]</sup>两种方式,但药物的使用剂量和次数也各有差异。Cy 不同剂量和给药方式对机体的免疫指标影响到底如何,未见有系统研究。本实验拟通过不同的给药时间和剂量比较,建立大鼠的免疫抑制和免疫亢进模型,并通过对第 7 天和第 15 天大鼠的免疫学和血液学指标的分析,确定建立大鼠免疫模型的最佳剂量和给药方式,为临床药物筛选动物模型建立提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂

注射用环磷酰胺,美国 Baxter 公司,购于郑州大学第一附属医院;RPMI-1640 培养基(Gibco);ConA, Sigma 公司产品;鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA), Solarbio 公司产品;CCK-8 日本同仁;YAC-1 细胞(ATCC, B04005, 购自上海复祥生物科技有限公司);大鼠 OVA-sIgG 抗体检测试剂盒,卡尔文生物科技进口分装试剂盒;Drewe 大鼠 IL-6 预包被 ELISA 检测试剂盒;Drewe 大鼠 TNF- $\alpha$  预包被 ELISA 检测试剂盒。

### 1.2 仪器

酶联免疫检测仪(FC 型, Thermo), BC-2800Vet Mindray 血液全自动分析。

### 1.3 动物分组与处理

SPF 级 SD 大鼠 64 只,体重(120  $\pm$  20)g,雌雄不拘,购自河南省实验动物中心【SCXK(豫)2010-0002】,实验于河南省中医学院进行【SYXK(豫)2010-0001】,实验动物随机分为 A、B、C 三组, A 组为对照组, B 组又分为 B1、B2、B3 三个小组, C 组分为 C1、C2、C3、C4 四个小组, 每组各 8 只。各组均腹腔注射 10% OVA 1 mL 进行免疫。B 组在注射 OVA 后 6 h 腹腔注射 Cy, 各组剂量分别为: B1 组 125 mg/kg, 一次注射; B2 组 100 mg/kg, 一次注射; B3 组每日 40 mg/kg, 每天一次连续 3 d。C 组在免疫 OVA 前 3 d 腹腔注射 Cy, 每日剂量分别为: C1 组 225 mg/kg; C2 组 80 mg/kg; C3 组 20 mg/kg; C4 组 5

mg/kg, 连续 3d。对照组注射等量生理盐水。

### 1.4 血液学指标检测

OVA 免疫后第 7 天和第 15 天大鼠尾静脉采血, 血液全自动分析仪对大鼠血液进行分析。

### 1.5 免疫学指标检测

#### 1.5.1 免疫器官指数的测定

SD 大鼠 OVA 免疫后第 7 天和第 15 天各组分别处死 4 只, 取脾脏和胸腺, 剔除脂肪, 称重, 按公式计算免疫器官指数: 免疫器官指数(mg/g) = 脏器质量(mg)/体重(g)。

#### 1.5.2 淋巴细胞转化实验

免疫后第 7 天和第 15 天处死大鼠后, 无菌取脾脏, PBS 洗两遍, 后置于含有 5mL PBS 的灭菌平皿中, 在 200 目不锈钢网上研磨并过筛制成单细胞悬液。收集细胞悬液于灭菌离心管中, 1200 r/min 离心 6min, 弃上清。加入 10 倍体积的 Tris-NH<sub>4</sub>Cl, 混匀, 并于 37 $^{\circ}$ C 放置 5 min, 使红细胞充分裂解后, 1200 r/min 离心 6 min, 弃上清。用 PBS 洗细胞两次后, 用含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养液洗细胞一次, 然后用 1640 完全培养液重悬细胞, 调整细胞浓度为 2  $\times$  10<sup>6</sup> 个/mL。将上述细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ L, 每组 6 个重复, 同时每孔加入 20  $\mu$ L ConA, 使其终浓度为 5  $\mu$ g/mL。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 于培养结束前 3 h, 每孔加 CCK-8 试剂 20  $\mu$ L, 并用酶标仪检测各孔 A<sub>450nm</sub> 吸光度。

#### 1.5.3 NK 细胞活性检测

淋巴细胞悬液的制备同 1.5.2, 制备的淋巴细胞作为效应细胞; 取培养 24h 并处在对数生长期的 YAC-1 细胞作为靶细胞, 用 1640 完全培养液洗细胞两次, 0.5% 台盼兰染色检测细胞活性大于 95%, 调整细胞浓度, 使其与效应细胞比值为 1:20。96 孔板每孔加效应细胞和靶细胞各 100  $\mu$ L, 同时设效应细胞对照孔和靶细胞对照孔, 每组 6 个重复, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4h, 每孔加 CCK-8 试剂 20  $\mu$ L, 继续培养 3 h 后, 酶标仪检测各孔 A<sub>450nm</sub> 吸光度。NK 细胞活性计算公式: NK 细胞活性% = [1 - (A 实验孔 - A 效应孔)/A 靶细胞]  $\times$  100%

#### 1.5.4 OVA 抗体检测(ELISA 法)

免疫后第 7 天和第 15 天, 大鼠眼球采血, 37 $^{\circ}$ C 温箱至血清析出, 2500 r/min, 离心 10 min 后小心抽取上清液, 按试剂盒说明检测各组血清 OVA 抗体水平。

#### 1.5.5 IL-6 和 TNF-含量的检测(ELISA 法)

免疫后第 7 天和第 15 天,大鼠眼球采血,分离血清,按试剂盒说明检测各组血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量。

### 1.5.6 各组免疫指标综合得分

检测的免疫指标显著高于对照组按 1 分计算,显著低于对照组按-1 分计算,与对照组差异不显著按 0 分计算,各指标得分相加为各组的免疫指标综合得分。

### 1.6 数据处理和统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计分析软件处理,数据以均值  $\pm$  标准差表示,组间比较采用方差分析统计分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同处理 Cy 对大鼠免疫器官指数的影响

B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy)与对照组相比,在第 7 天,大鼠脾脏和胸腺指数均显著降低;第 15 天,脾脏指数又显著升高,胸腺指数各组差

表 1 不同 Cy 处理对大鼠脏器指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	免疫后第 7 天 7days after immunization		免疫后第 15 天 15 days after immunization	
	脾脏指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index
A	3.54 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	3.12 $\pm$ 0.35 <sup>A</sup>	2.49 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	3.14 $\pm$ 0.74 <sup>A</sup>
B1	1.49 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.34 <sup>BC</sup>	6.24 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	2.55 $\pm$ 0.33 <sup>AB</sup>
B2	1.89 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.26 <sup>BC</sup>	6.39 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup>	2.72 $\pm$ 0.31 <sup>AB</sup>
B3	1.67 $\pm$ 0.148 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.09 <sup>D</sup>	7.75 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	2.81 $\pm$ 0.11 <sup>AB</sup>
C1	1.97 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.11 <sup>D</sup>	4.91 $\pm$ 1.16 <sup>d</sup>	2.32 $\pm$ 0.40 <sup>B</sup>
C2	6.75 $\pm$ 0.33 <sup>d</sup>	2.04 $\pm$ 0.23 <sup>B</sup>	2.93 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	2.92 $\pm$ 0.30 <sup>AB</sup>
C3	4.49 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	3.21 $\pm$ 0.57 <sup>A</sup>	2.51 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.93 $\pm$ 0.33 <sup>AB</sup>
C4	3.62 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	3.16 $\pm$ 0.77 <sup>A</sup>	7.75 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	2.35 $\pm$ 0.15 <sup>B</sup>

注:同列数据肩标相同字母表示差异无显著性( $P > 0.05$ ),肩标不同字母表示差异有显著性( $P < 0.05$ )。下同。

Note. The same letters in the same row mean no significant difference ( $P > 0.05$ ), different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

表 2 不同 Cy 处理对大鼠血液学指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	免疫后第 7 天 7days after immunization			免疫后第 15 天 15 days after immunization		
	WBC ( $10^9/L$ )	RBC ( $10^{12}/L$ )	PLT ( $10^9/L$ )	WBC ( $10^9/L$ )	RBC ( $10^{12}/L$ )	PLT ( $10^9/L$ )
A	4.80 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	3.69 $\pm$ 0.27 <sup>BC</sup>	414.75 $\pm$ 108.10	11.30 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	5.32 $\pm$ 0.44 <sup>AB</sup>	590.25 $\pm$ 56.05
B1	0.28 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	3.14 $\pm$ 0.12 <sup>AB</sup>	67.25 $\pm$ 12.53 *	12.60 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	2.41 $\pm$ 0.45 <sup>D</sup>	1615.50 $\pm$ 54.45 *
B2	0.30 $\pm$ 0.082 <sup>a</sup>	4.05 $\pm$ 0.98 <sup>CD</sup>	96.33 $\pm$ 7.51 *	10.00 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	4.60 $\pm$ 0.32 <sup>B</sup>	1224.67 $\pm$ 75.87 *
B3	0.87 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	4.4 $\pm$ 0.30 <sup>CD</sup>	140.00 $\pm$ 24.04 *	27.93 $\pm$ 10.34 <sup>b</sup>	3.40 $\pm$ 0.75 <sup>C</sup>	870.00 $\pm$ 203.58 *
C1	0.88 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	2.52 $\pm$ 0.49 <sup>A</sup>	38.00 $\pm$ 11.43 *	18.10 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>	4.27 $\pm$ 0.72 <sup>BC</sup>	1349.67 $\pm$ 236.58 *
C2	12 $\pm$ 2.10 <sup>d</sup>	3.95 $\pm$ 0.45 <sup>BCD</sup>	667.33 $\pm$ 214.65 *	10.47 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	5.89 $\pm$ 0.26 <sup>A</sup>	1062.33 $\pm$ 195.15 *
C3	6.27 $\pm$ 1.92 <sup>bc</sup>	4.73 $\pm$ 0.45 <sup>D</sup>	286.67 $\pm$ 55.08	11.63 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	5.25 $\pm$ 0.89 <sup>AB</sup>	825.00 $\pm$ 63.51
C4	7.23 $\pm$ 1.19 <sup>c</sup>	5.75 $\pm$ 0.24 <sup>E</sup>	547.67 $\pm$ 74.65 *	11.67 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	6.31 $\pm$ 0.72 <sup>A</sup>	955.67 $\pm$ 172.26 *

注: \* 表示同列数据中与对照组(A)相比,差异有显著性( $P < 0.05$ ),下同。

Note. \* means significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with the control group (A) in the same row.

异无显著性。

C 组(免疫 OVA 前 3d 注射不同剂量 Cy)与对照组相比,第 7 天,C2 和 C3 两组脾脏指数明显升高,而 C2 组胸腺指数却明显下降,C1 组脾脏和胸腺指数显著降低;第 15 天,C1 和 C4 组脾脏指数明显增高,而胸腺指数明显降低。结果见表 1。

### 2.2 不同处理 Cy 对大鼠血液学指标的影响

B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy 组)与对照组相比,在第 7 天,大鼠外周血白细胞(WBC)和血小板(PLT)数量显著下降,红细胞数量无差异;第 15 天 B3 组白细胞数量显著增多,B1 和 B2 组白细胞数目恢复正常,血小板数目各组明显升高,红细胞数量呈现降低趋势。

C 组(免疫 OVA 前 3d 注射 Cy)与对照组相比,在第 7 天,C2 和 C4 组白细胞数和血小板数量明显升高,各组红细胞数均有升高趋势;第 15 天各组白细胞和红细胞数均恢复正常,血小板数,除 C3 组外均显著高于对照组。结果见表 2。

### 2.3 不同处理 Cy 对大鼠淋巴细胞转化的影响

B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy 组)与对照组相比,在第 7 天,淋巴细胞转化能力无差异;第 15 天,B1 组淋巴细胞转化能力显著低于对照组,而 B2 组淋巴细胞转化能力显著高于对照组。

C 组(免疫 OVA 前 3d 注射 Cy)与对照组相比,在第 7 天,C2 组淋巴细胞转化能力显著升高,其他各组差异不显著;第 15 天,C2 组淋巴细胞转化能力显著下降,C1 和 C3 组淋巴细胞转化能力显著升高。结果见表 3。

### 2.4 不同处理 Cy 对大鼠 NK 细胞活性的影响

B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy 组)与对照组相比,在第 7 天,B1、B2、B3 组 NK 细胞活性均降低,但差异无显著性;在第 15 天,B1、B2、B3 各组 NK 细胞活性均显著升高。C 组(免疫 OVA 前 3d 注射 Cy)与对照组相比,在第 7 天,C3 组的 NK 细胞活性显著高于对照组,然而 C1 组显著低于对照组,在第 15 天,C1 组 NK 细胞活性较对照组升高,C2、

C3 和 C4 组 NK 细胞活性与对照组相比变化不大。结果见表 3。

### 2.5 不同处理 Cy 对大鼠 OVA 抗体生成的影响

与对照组相比,第 7 天,C3 和 C4 两组抗体水平显著高于对照组,其余各处理组差异无显著性;第 15 天,C1 组抗体水平显著低于对照组,其他各组抗体水平虽都低于对照组,但差异无显著性。B 组与对照组无差异,结果见表 3。

### 2.6 不同处理 Cy 对大鼠 IL-6 生成的影响

B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy 组)与对照组相比,在第 7 天,各组大鼠血清 IL-6 的含量降低,B1、B2 组差异有显著性;第 15 天时,各组虽仍低于对照组,但有恢复趋势,B2 组差异有显著性。

C 组(免疫 OVA 前 3d 注射 Cy)与对照组相比,第 7 天,C1 组 IL-6 含量显著低于对照组;第 15 天,B2 组显著降低,其余各组 IL-6 含量差异均不显著。结果见表 4。

表 3 不同 Cy 处理对大鼠免疫功能的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	免疫后第 7 天 7 d after immunization			免疫后 15 天 15 d after immunization		
	淋巴细胞( $A_{450}$ ) Lymphocyte proliferation	NK 细胞/% Activity of the NK cells	抗体 IgG/ng/mL Levels of IgG antibody	淋巴细胞(A450) Lymphocyte proliferation	NK 细胞/% Activity of the NK cells	抗体 IgG/ng/mL Levels of IgG antibody
A	0.20 ± 0.018 <sup>AB</sup>	31.58 ± 0.78 <sup>bc</sup>	429.25 ± 13.78	0.23 ± 0.004 <sup>C</sup>	35.10 ± 2.01 <sup>ab</sup>	301.43 ± 7.07
B1	0.18 ± 0.049 <sup>A</sup>	26.71 ± 0.58 <sup>ab</sup>	509.00 ± 7.07	0.19 ± 0.014 <sup>AB</sup>	50.72 ± 8.93 <sup>cd</sup>	279.52 ± 13.09
B2	0.19 ± 0.005 <sup>AB</sup>	28.08 ± 1.28 <sup>b</sup>	526.17 ± 7.25	0.30 ± 0.023 <sup>D</sup>	48.38 ± 9.11 <sup>cd</sup>	268.93 ± 29.80
B3	0.18 ± 0.008 <sup>A</sup>	26.93 ± 0.96 <sup>ab</sup>	429.83 ± 154.07	0.21 ± 0.020 <sup>BC</sup>	52.19 ± 3.32 <sup>d</sup>	264.46 ± 19.95
C1	0.16 ± 0.061 <sup>A</sup>	21.02 ± 3.12 <sup>a</sup>	543.83 ± 67.78	0.45 ± 0.039 <sup>F</sup>	53.96 ± 6.04 <sup>d</sup>	249.05 ± 33.60 <sup>*</sup>
C2	0.28 ± 0.008 <sup>C</sup>	37.44 ± 6.61 <sup>cd</sup>	491.17 ± 39.03	0.15 ± 0.030 <sup>A</sup>	26.27 ± 6.45 <sup>a</sup>	260.60 ± 16.54
C3	0.20 ± 0.004 <sup>AB</sup>	39.59 ± 1.42 <sup>d</sup>	616.75 ± 85.21 <sup>*</sup>	0.34 ± 0.038 <sup>E</sup>	28.62 ± 1.82 <sup>a</sup>	257.62 ± 21.45
C4	0.23 ± 0.01 <sup>B</sup>	37.05 ± 4.56 <sup>cd</sup>	593.33 ± 39.12 <sup>*</sup>	0.25 ± 0.046 <sup>C</sup>	39.80 ± 0.68 <sup>bc</sup>	284.88 ± 13.77

表 4 不同处理环磷酰胺对大鼠血清细胞因子含量的影响( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别 Groups	免疫后第 7 天 7 d after immunization		免疫后 15 天 15 d after immunization	
	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
A	521.5 ± 30.69 <sup>ab</sup>	31.6 ± 2.14 <sup>AB</sup>	560.33 ± 26.90 <sup>a</sup>	17.39 ± 2.17 <sup>A</sup>
B1	410.67 ± 38.11 <sup>c</sup>	32.05 ± 1.24 <sup>A</sup>	461.7 ± 27.86 <sup>ab</sup>	15.19 ± 1.08 <sup>A</sup>
B2	387.30 ± 15.41 <sup>c</sup>	28.29 ± 5.35 <sup>AB</sup>	435.4 ± 16.40 <sup>b</sup>	16.57 ± 1.43 <sup>A</sup>
B3	454.00 ± 17.25 <sup>bc</sup>	28.07 ± 0.56 <sup>AB</sup>	492.2 ± 37.05 <sup>ab</sup>	19.43 ± 0.33 <sup>AB</sup>
C1	388.00 ± 22.34 <sup>c</sup>	26.07 ± 3.33 <sup>AB</sup>	488.9 ± 12.87 <sup>ab</sup>	16.05 ± 5.39 <sup>A</sup>
C2	586.80 ± 34.51 <sup>a</sup>	36.21 ± 2.32 <sup>B</sup>	538.8 ± 66.19 <sup>ab</sup>	23.64 ± 2.32 <sup>B</sup>
C3	518.50 ± 60.10 <sup>ab</sup>	29.57 ± 2.93 <sup>AB</sup>	546.8 ± 70.71 <sup>ab</sup>	37.79 ± 1.92 <sup>C</sup>
C4	521.10 ± 64.63 <sup>ab</sup>	30.11 ± 2.58 <sup>AB</sup>	511.9 ± 61.52 <sup>ab</sup>	35.43 ± 0.61 <sup>C</sup>

### 2.7 不同处理 Cy 对大鼠 TNF- $\alpha$ 生成的影响

与对照组相比,在第 7 天各组 TNF- $\alpha$  的含量差异无显著性。第 15 天,B 组(免疫 OVA 后当天注射不同剂量 Cy 组)与对照组相比差异均无显著性,C 组

(免疫 OVA 前 3 d 注射 Cy)与对照组相比,C2、C3、C4 组均显著升高,C1 组差异无显著性。结果见表 4。

### 2.8 各组免疫指标综合得分

各实验组免疫指标得分见表 5。B1、B2 和 B3

组免疫指标综合得分,7 d 分别为 -4、-4、-4,15 d 分别为 1、1、2; C1、C2、C3 和 C4 组免疫指标综合得分,7 d 分别为 -4、3、5、4,15 d 分别为 2、1、2、2。

表 5 不同处理 Cy 组大鼠各免疫指标综合得分

Tab.5 The composite scores of all immune indexes in the rats treated by different doses of cyclophosphamide

组别 Groups	脾脏指数 Spleen index		胸腺指数 Thymus index		WBC		PLT		RBC	
	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d
B1	-1	1	0	0	-1	0	-1	1	0	-1
B2	-1	1	0	0	-1	0	-1	1	0	0
B3	-1	1	0	0	-1	1	-1	1	0	-1
C1	-1	1	-1	-1	0	0	1	1	-1	0
C2	1	0	-1	0	1	0	1	1	0	0
C3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
C4	0	1	0	-1	1	0	1	1	1	0

  

组别 Groups	淋巴细胞增殖 Lymphocyte proliferation		NK 细胞活性 Activity of the NK cells		IgG		IL-6		TNF-α	
	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d	7 d	15 d
B <sub>1</sub>	0	-1	0	1	0	0	-1	0	0	0
B <sub>2</sub>	0	0	0	1	0	0	-1	-1	0	0
B <sub>3</sub>	0	-1	0	1	0	0	-1	0	0	0
C <sub>1</sub>	0	1	-1	1	0	-1	-1	0	0	0
C <sub>2</sub>	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	1
C <sub>3</sub>	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
C <sub>4</sub>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

### 3 讨论

#### 3.1 Cy 对大鼠免疫器官的影响

免疫器官是淋巴细胞和其他免疫细胞发生、分化、成熟、定居和增殖以及产生免疫应答的场所,其中胸腺是机体的中枢免疫器官,是 T 细胞分化成熟的场所。脾脏是最大的外周免疫器官,受抗原刺激后,参与机体细胞和体液免疫的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞大量增生,致脾滤泡增大,脾体积增大;而受到免疫抑制影响时,淋巴组织萎缩,致脾体积缩小。因此免疫器官指数说明了免疫器官的发育状况,间接体现了机体的免疫状态。本实验结果表明免疫后当天注射不同剂量 Cy 或者多次小剂量注射 Cy (B 组),以及免疫前 3 d 超大剂量注射 Cy (C1 组)在免疫后第 7 天,均能显著抑制大鼠脾脏指数,但其抑制作用,在 15 d 时消失,脾脏指数出现代偿性增高。免疫前 3 d 注射适当剂量(80、20 mg/kg) Cy (C2、C3 组)时均能引起大鼠脾脏指数的升高,但维持时间较短,在免疫后两周基本上消失,进入机体的代偿期。对于胸腺指数,除了免疫前 3 d 超大剂量注射 Cy (C1 组)在 7、15 d 能显著影响胸腺指数外,其他各组差异不大。

#### 3.2 Cy 对大鼠淋巴细胞的影响

淋巴细胞根据表型和功能的不同可以分为很多

群体,包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、LAK 细胞等等。其中 T 淋巴细胞在体外经 PHA 或 ConA 刺激后,可转化为淋巴母细胞,其转化情况,可反应机体的细胞免疫水平<sup>[12]</sup>。NK 细胞介导天然的免疫应答,它无需抗原或有丝分裂原刺激,也无需抗体或补体参与,即可杀伤肿瘤细胞或溶解被病毒和胞内寄生菌感染的细胞,在抗肿瘤和早期抗感染过程中起重要作用。

本实验结果表明,免疫 OVA 后当天注射不同剂量的 Cy 或者免疫前 3 d 超大剂量注射 Cy 第 7 天对 T 淋巴细胞的转化无影响,但大鼠 NK 细胞活性有下降趋势而且在第 15 天 NK 细胞活性明显增强;而免疫前 3 d 一次注射 80 mg/kg Cy 第 7 天能促进淋巴细胞增殖,一次注射 20 mg/kg Cy 第 7 天能促进 NK 细胞活性。说明 Cy 对大鼠淋巴细胞的活性有影响,但其影响作用与 Cy 剂量和作用时间相关。

#### 3.3 Cy 对大鼠体液免疫的影响

体液免疫是机体特异性免疫的一个重要组成部分,血清抗体的高低在一定程度上反映机体对疾病的抵抗能力,也即抗体效价的高低一定程度上能反映机体免疫状态。已有文献报道 Cy 对体液免疫呈现小剂量促进和大剂量抑制的双向作用<sup>[4]</sup>。本实验结果显示 Cy 大剂量(总剂量在 100 ~ 125 mg/kg)对大鼠抗体生成的影响在 15d 内不明显;225 mg/kg

在 15 d 时可抑制抗体产生;注射较低剂量的 Cy(总剂量 15、20 mg/kg)对抗体生成在第 7 天时有一定的促进作用。说明 Cy 对体液免疫确实有双向调节作用,其作用与剂量密切相关,但作用持续时间不长。

### 3.4 Cy 对大鼠 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 的影响

多种淋巴细胞如 T 细胞、B 细胞、单核细胞和某些非淋巴细胞如成纤维细胞、内皮细胞等均能产生细胞因子 IL-6,IL-6 对多种细胞的生长和分化都有调节作用,可促进 T 淋巴细胞活化和增生,辅助 B 淋巴细胞促使抗体合成和分泌,参与体液免疫过程。TNF- $\alpha$  主要是由巨噬细胞和 T 细胞产生的促炎因子,在许多生理的免疫应答中有重要作用。研究表明促炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  与一些自身免疫性疾病的发生和转归密切相关,例如类风湿性关节炎病人可在滑膜和血清中检测到高水平表达的 IL-6<sup>[13]</sup>,银屑病病损局部和血清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平均见升高<sup>[14]</sup>。本实验结果表明大剂量注射 Cy(总剂量 100~225 mg/kg)能显著抑制大鼠血清 IL-6 的含量,但作用时间有限,而免疫前 3 d 注射 Cy(总剂量在 15、20 或者 80 mg/kg)能显著提高 TNF- $\alpha$  的含量。

### 3.5 Cy 对大鼠免疫功能调节作用的剂量与时效

有文献报道用低剂量(20、80 mg/kg)多次腹腔注射的方式建立免疫抑制模型<sup>[8,15-16]</sup>,我们在前期预实验时(分别以 125、100 mg/kg 的剂量腹腔一次注射,以每日 80、40 mg/kg 剂量连续 3 d 腹腔注射)发现,以每日 80 mg/kg 的剂量连续 3 d 腹腔注射大鼠,从免疫后第 12 天开始大鼠出现不同程度的死亡,可能由于抑制作用过强超出了大鼠自身的调节范围。

本实验结果显示,Cy 不同剂量、使用次数对机体的免疫功能会有影响,且其影响持续时间有限,在使用 Cy 建立免疫抑制或免疫亢进模型时,应综合考虑各项免疫指标和其作用时效。免疫抑制模型可选用 B1、B2 模型,即注射 OVA 后 6 h 腹腔一次性注射 Cy(125 mg/kg 或 100 mg/kg),两组模型免疫指标综合得分一样。免疫亢进模型,实验周期 7 d 以内,C3、C4 模型均可(即免疫 OVA 前 3 d 腹腔一次性注射 Cy 剂量 20 mg/kg 或每日 5 mg/kg,连续 3 d),C3 要更好些;实验周期大于 7 d 小于 15 d,C3 组模型更合适(即 Cy 剂量 20 mg/kg)。

### 参 考 文 献

[1] Mei YX, Chen HX, Zhang J, et al. Protective effect of chitooli-

gosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62: 330-335.

- [2] El-Abasy M, Motobu M, Nakamura K, et al. Preventive and therapeutic effects of sugar cane extract on cyclophosphamide-induced immunosuppression in chickens [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 983-990.
- [3] Huyan XH, Lin YP, Gao T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 1293-1297.
- [4] 王兴旺,陈敏珠,徐叔云. 环磷酰胺的免疫药理作用[J]. *中国病理生理杂志*, 1991, 7(6): 664-665.
- [5] Salva S, Marranzino G, Villena J, et al. Probiotic Lactobacillus strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22: 209-221.
- [6] 王萌,方笋,赵晓娟,等. 芍药苷对小鼠体液免疫的调节作用[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(10): 842-846.
- [7] 赵弋清,罗霞,陈东辉,等. 不同剂量环磷酰胺诱导正常小鼠免疫抑制的对比研究[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(3): 122-124.
- [8] Wang H, Wang M, Chen J, et al. A polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 1946-1953.
- [9] Fan Y, Lu Y, Wang D, et al. Effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone immunopotentiator on immunosuppression induced by cyclophosphamide in chickens [J]. *Cell Immunol*, 2013, 281: 37-43.
- [10] 苗明三. 薏苡仁多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. *中医药学报*, 2002, 30(5): 49-50.
- [11] 杨颖,蔡玫,黄志彪,等. 环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(5): 581-583.
- [12] Fan Y, Hu Y, Wang D, et al. Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically stimulate lymphocyte proliferation in vitro and enhance the immune responses to ND vaccine in chickens [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47: 87-92.
- [13] Guirado A, Lopez Sanchez JI, Ruiz-Alcaraz AJ, et al. Synthesis and biological evaluation of 4-alkoxy-6,9-dichloro[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines as inhibitors of TNF-alpha and IL-6 [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 54: 87-94.
- [14] 刘元林,徐文,鲁祖清. 银屑病患者外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的变化及意义[J]. *海军总医院学报*, 2007, 20(4): 222-224.
- [15] Chen X, Nie W, Fan S, et al. A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 1114-1119.
- [16] Guo L, Liu J, Hu Y, et al. Astragalus polysaccharide and sulfated epimedium polysaccharide synergistically resist the immunosuppression [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 1055-1060.

[收稿日期] 2015-02-12