

本文引用: 卫华琴, 李 苗. 白果内酯改善环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下及其相关机制的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 624-630.

## 白果内酯改善环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下及其相关机制的研究

卫华琴<sup>1</sup>, 李 苗<sup>2\*</sup>

1. 西北妇女儿童医院药剂科, 陕西 西安 710061; 2. 西北妇女儿童医院检验科, 陕西 西安 710061

**[摘要]** **目的** 探究白果内酯对环磷酰胺(CTX)所致免疫功能低下小鼠的影响。**方法** 将24只C57BL/6J小鼠随机分为正常组、模型组及白果内酯低剂量(10 mg/kg)组和白果内酯高剂量(20 mg/kg)组, 每组6只。除正常组外, 其余各组于实验第1~3天腹腔注射50 mg/kg CTX建立小鼠免疫功能低下模型。正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水, 白果内酯治疗组以低、高剂量的白果内酯灌胃, 每天1次, 连续治疗14 d。实验结束后, 检测小鼠体重、胸腺和脾脏重量, 计算胸腺和脾脏指数; 计数板计数法检测外周血红细胞、白细胞和血小板数量; CCK-8法检测脾脏T淋巴细胞、B淋巴细胞增殖能力及巨噬细胞吞噬指数; 流式细胞术检测脾细胞中CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比例及NK细胞比例; HE染色观察脾脏和胸腺结构变化; Western blot检测脾脏磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)、p-PI3K、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)和p-Akt蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组体重、脾脏指数和胸腺指数降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); 白细胞和血小板数量降低( $P<0.001$ ); 巨噬细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖指数降低( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ); CD4<sup>+</sup>T细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和NK细胞比例降低( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); 胸腺和脾脏病理结构显著损伤; p-PI3K和p-Akt蛋白表达降低( $P<0.001$ )。与模型组比较, 白果内酯低剂量组血小板数量、巨噬细胞和T淋巴细胞增殖指数及CD4<sup>+</sup>T细胞比例、NK细胞比例、p-PI3K和p-Akt蛋白表达均升高( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 白果内酯高剂量组体重( $P<0.05$ )、脾脏指数( $P<0.01$ )、胸腺指数( $P<0.05$ )、白细胞和血小板数量( $P<0.05$ )、巨噬细胞和T淋巴细胞、B淋巴细胞增殖指数( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )及CD4<sup>+</sup>T细胞比例( $P<0.01$ )、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值( $P<0.05$ )、NK细胞比例( $P<0.001$ )、p-PI3K和p-Akt蛋白表达( $P<0.05$ )均升高; 白果内酯高、低剂量组胸腺和脾脏病理损伤改善。与白果内酯低剂量组比较, 白果内酯高剂量组体重、白细胞数量、NK细胞比例均升高( $P<0.05$ )。**结论** 白果内酯可提高CTX诱导的免疫功能低下小鼠的特异性和非特异性免疫功能, 作用机制可能与激活脾脏PI3K/Akt通路有关。

**[关键词]** 免疫功能低下; 白果内酯; 环磷酰胺; 磷脂酰肌醇-3-羟激酶; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.006

## Amelioration of cyclophosphamide-induced immunocompromise in mice by bilobalide and its underlying mechanisms

WEI Huaqin<sup>1</sup>, LI Miao<sup>2\*</sup>

1. Department of Pharmacy, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710061, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of bilobalide on cyclophosphamide (CTX)-induced immunocompromise in mice. **Methods** A total of 24 C57BL/6J mice were randomly divided into a normal group, a model group, a low-dose (10 mg/kg) bilobalide group, and a high-dose (20 mg/kg) bilobalide group, with six mice in each group. Except for the normal group, the other groups were intraperitoneally injected with CTX (50 mg/kg) on the 1st to 3rd day of the experiment to establish an

**[收稿日期]** 2024-07-04

**[基金项目]** 西北妇女儿童医院基础科研项目(202310045)。

**[通信作者]** \* 李 苗, 女, 硕士, 主管技师, E-mail: 269530254@qq.com。

immunocompromised mouse model. The mice in the normal and the model groups were gavaged with an equal volume of normal saline, while the bilobalide groups received low- or high-dose bilobalide by gavage once daily for 14 consecutive days. After the experiment, the body weight, thymus and spleen weight of mice were measured, and the thymus and spleen indices were calculated. The number of peripheral blood erythrocyte, leukocyte, and platelet counts were assessed using a hemocytometer; the CCK-8 assay was used to evaluate the proliferation of spleen T and B lymphocytes as well as the phagocytic index of macrophages; flow cytometry was performed to analyze the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio, and NK cell ratio in splenocytes. Histopathological changes in the spleen and thymus were observed using HE staining; Western blot was conducted to check the protein expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K, serine/threonine protein kinase (Akt), and p-Akt in the spleen. **Results** Compared with the normal group, the model group exhibited a significant decrease in body weight, spleen index, and thymus index ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); reduced leukocyte and platelet counts ( $P<0.001$ ); decreased proliferation indices of macrophages, T lymphocytes, and B lymphocytes ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ); lower proportions of CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, and NK cell ratio ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ); significant pathological damage to the thymus and spleen; and downregulated expressions of p-PI3K and p-Akt proteins ( $P<0.001$ ). Compared with the model group, the low-dose bilobalide group showed increased platelet count, macrophage and T cell proliferation indices, CD4<sup>+</sup> T cell proportion, NK cell ratio, and expressions of p-PI3K and p-Akt proteins ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the high-dose bilobalide group exhibited significant increase in body weight ( $P<0.05$ ), spleen index ( $P<0.01$ ), thymus index ( $P<0.05$ ), leukocyte and platelet counts ( $P<0.05$ ), proliferation indices of macrophages, T lymphocytes, and B lymphocytes ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), CD4<sup>+</sup> T cell proportion ( $P<0.05$ ), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio ( $P<0.05$ ), NK cell ratio ( $P<0.05$ ), and p-PI3K and p-Akt protein expressions ( $P<0.05$ ). Additionally, both low- and high- dose bilobalide groups showed amelioration in thymus and spleen pathological damage. Compared with the low-dose bilobalide group, the high-dose bilobalide group demonstrated significantly increased body weight, leukocyte count, and NK cell ratio ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Bilobalide can enhance both specific and nonspecific immune functions in CTX-induced immunosuppressed mice, and its mechanism of action may be related to the activation of the spleen PI3K/Akt signaling pathway.

[**Keywords**] immunocompromise; bilobalide; cyclophosphamide; phosphatidylinositol 3-hydroxykinase; serine-threonine protein kinase

化疗药物可快速高效杀灭肿瘤细胞,是目前临床上治疗各种恶性肿瘤的主要方法之一,但化疗药物也会对正常组织细胞产生损伤,其毒副作用使患者生存质量严重降低,因此,降低化疗的毒副作用是恶性肿瘤治疗中的重要环节<sup>[1]</sup>。环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是一种化疗药物,多年来被广泛用于肿瘤治疗,也是常用的免疫抑制动物模型的造模药物<sup>[2]</sup>。然而,在CTX应用过程中,患者容易出现白细胞和中性粒细胞降低,导致免疫功能低下,继而引发严重的感染,甚至危及生命<sup>[3]</sup>。免疫功能低下是指各种原因导致的免疫细胞造血功能降低,中心池和外周池中的各类免疫数量降低<sup>[3]</sup>。白细胞减少症和中性粒细胞减少症等造成患者免疫功能低下,可能引发严重感染,危及生命,也阻碍了化疗过程<sup>[4]</sup>。因此,需寻找合适的方法预防和治疗化疗导致的免疫功能低下。

白果内酯是一种倍半萜类三内酯,在银杏叶提

取物中的含量约为2.9%<sup>[5]</sup>。已有研究证明,白果内酯对神经细胞、癌症细胞和脂肪细胞具有抗炎、抗氧化应激和治疗缺氧损伤的作用<sup>[5-6]</sup>。然而,潜在的机制尚未完全阐明。有研究表明,白果内酯通过促进磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinases, Akt)通路抑制Toll样受体4(Toll like receptor, TLR4)-核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路,从而减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人肝细胞癌(human hepatocellular carcinoma, HepG2)细胞氧化应激损伤<sup>[7]</sup>。白果内酯可通过激活PI3K/Akt通路蛋白在神经母细胞瘤细胞系中的表达,减轻过氧化氢诱导的氧化应激和凋亡损伤<sup>[8]</sup>。此外,体内和体外实验研究表明,白果内酯和双叶内酯对脑缺血损伤动物模型具有显著的抗氧化和治疗作用,白果内酯可能通过激活Akt/核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-re-

lated factor 2, Nrf2)通路发挥抗氧化作用<sup>[9]</sup>。

已有各种研究报道了白果内酯的抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用,然而其对免疫功能的影响,尤其是对 CTX 所致的免疫功能低下小鼠的作用和机制未见报道。本研究拟通过建立 CTX 导致的免疫功能低下小鼠模型探究白果内酯对免疫功能的影响。

## 1 材料

### 1.1 动物

24 只雄性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体质量(22±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2018-0001。小鼠饲养在西安医学院药理实验室清洁级动物房,温度(25±2)℃,12 h 明暗循环照明,自由摄取食物和水。所有实验程序均遵循实验动物护理原则,并经西北妇女儿童医院科教科伦理委员会批准(批准号:dwl120240203)。

### 1.2 主要试剂

注射用 CTX(江苏恒瑞公司,批号:22041525);白果内酯(美国 MCE 公司,货号:HY-N0076,分子式 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>);刀豆蛋白 A(concanavalin A, ConA)、LPS(美国 Sigma 公司,货号:C5275、L5293);CCK-8 试剂盒(上海翌圣生物公司,货号:40203ES);PerCP-Cy5.5 标记的抗小鼠 CD4<sup>+</sup>抗体、PE-Cy7 标记的抗小鼠 CD8<sup>+</sup>抗体、PE 标记的抗小鼠 CD3<sup>+</sup>抗体、APC 标记的抗小鼠 NK1.1 抗体(美国 BD 公司,货号:550954、552877、9091617、9011560);AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海圣尔生物公司,货号:SB-Y6002);抗小鼠 PI3K 抗体、抗小鼠 p-PI3K 抗体、抗小鼠 Akt 抗体、抗小鼠 p-Akt 抗体(艾比玛特生物公司,货号:T40115、T40116、T55561、T40067)。

### 1.3 主要仪器

酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:M3);二氧化碳培养箱(新加坡 Esco 公司,型号:CellMate<sup>®</sup>);全自动血细胞分析仪(日本 Sysmex 公司,型号:XN1000);低温高速离心机、流式细胞仪(美国 Beckman 公司,型号:Allegra V-15R、CytoFLEX S);Mini-Chemi 化学发光成像仪(中国赛智 SINSAGE 公司,型号:Champ Gel 6000)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及造模

小鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组及白果内酯低剂量组(10 mg/kg)和白果内酯高剂量组(20 mg/kg)<sup>[10]</sup>,每组 6 只。正常组和模型组小鼠每天灌胃生理盐水 0.2 mL,白果内酯低、高剂量组按照对应的剂量每天灌胃 0.2 mL 治疗,均连续灌胃治疗 14 d,每天 1 次。

第 1~3 天,除正常组腹腔注射生理盐水外,其他组小鼠按照文献方法连续 3 d 腹腔注射 CTX (50 mg/kg)建立小鼠免疫功能低下模型<sup>[11-12]</sup>。模型小鼠流式细胞检测结果表明 CD4<sup>+</sup>比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和 NK 细胞比例相比于正常小鼠显著降低,认为模型建立成功<sup>[12]</sup>。

### 2.2 体质量及免疫器官指数测定

实验结束后检测各组小鼠体质量,并取出胸腺和脾脏称重。按照以下公式计算:胸腺指数=胸腺重量(mg)/体质量(g)×10;脾脏指数=脾脏重量(mg)/体质量(g)×10。

### 2.3 胸腺和脾组织 HE 染色

将部分胸腺和脾组织放于 4%多聚甲醛中固定 24 h,经脱水、石蜡包埋、切片后行 HE 染色,白光显微镜拍照观察胸腺和脾组织的结构变化。

### 2.4 血常规测定

获得小鼠 EDTA-K2 抗凝血,使用改良牛鲍计数板对红细胞、白细胞、血小板进行计数,离心全血获取细胞沉淀,分别加入红细胞、白细胞和血小板稀释液,进行充池,在白光显微镜下计数并统计。

### 2.5 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖及巨噬细胞吞噬能力测定

小鼠脾细胞铺于 96 孔板中,5 000 个细胞/孔。分别加入 ConA(5 μg/mL)或 LPS(10 μg/mL),刺激 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖,同时设置未刺激的对照孔,加入相应体积的 PBS。于细胞培养箱 37℃、5% CO<sub>2</sub> 作用 72 h 后每孔加入 CCK-8 试剂 20 μL。继续培养 1 h 后在波长 450 nm 处测定 OD 值并计算增殖指数。增殖指数=添加 ConA 或 LPS 孔的 OD 值/未添加 ConA 或 LPS 孔的 OD 值。

实验结束前 48 h,小鼠腹腔注射 10%灭菌过的淀粉溶液 2 mL,终止实验当天小鼠腹壁开孔注入生理盐水反复吹吸并按揉腹部。收集悬液,200 过滤网过滤后离心收集细胞计数,铺于 96 孔板中,5 000 个细胞/孔。培养 6 h 后,弃上清液,每孔加入 200  $\mu$ L 的 0.1%中性红溶液,继续孵育 30 min 后 PBS 洗 1 次,加入 50  $\mu$ L 细胞裂解液(乙醇:乙酸 =1:1),室温放置 2 h,于 550 nm 处测定 OD 值。

## 2.6 脾细胞 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞检测

取  $1 \times 10^5$  个小鼠脾细胞于流式管中,加入 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>荧光标记抗体,避光孵育 15 min;另取  $1 \times 10^5$  个小鼠脾细胞于流式管,加入 CD3<sup>+</sup>和 NK1.1 荧光标记抗体,避光孵育 15 min,PBS 洗细胞 2 次,重悬至 500  $\mu$ L 的 PBS 中。采用流式细胞仪进行检测,使用 FlowJo 10.0 软件进行数据分析。

## 2.7 脾组织 PI3K/Akt 通路检测

取新鲜的小鼠脾脏加入裂解液,12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 7.6 cm)后取上清液,BCA 法测定蛋白浓度后加入上样缓冲液,煮沸 10 min。使用 Western blot 法对制备好的蛋白样品进行检测,将蛋白样品加至 7.5%的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离(100 V,90 min)。将凝胶和 PVDF 膜制成三明治夹心进行电转移(80 V,90 min)。将 PVDF 膜加入 5%的 BSA 中室温摇动封闭 1 h,加入稀释的一抗(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 稀释比例均为 1:1 000)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,以  $\beta$ -actin(稀释比例为 1:100 000)作为上样内参。TBST 洗膜,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。ECL 发光显色拍照,每组 3 个生物学重复,采用 Image J 1.53 软件对条带进行灰度相对定量分析。

## 2.8 统计学分析

所有实验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。采用 Graphpad Prism 9.0 软件统计数据并作图。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 白果内酯对免疫功能低下小鼠体质量及免疫器官的影响

与正常组比较,模型组体质量、胸腺指数和脾脏指数降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ , $P < 0.001$ );与模型组

比较,白果内酯高剂量组体质量、胸腺指数和脾脏指数升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );与白果内酯低剂量组比较,白果内酯高剂量组体质量升高( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 各组小鼠体质量、脾脏指数、胸腺指数比较( $n=6$ , $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the body weight, spleen index, and thymus index of mice among different groups ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	体质量/g	脾脏指数	胸腺指数
正常组	23.81 $\pm$ 2.49	36.67 $\pm$ 3.42	20.97 $\pm$ 1.82
模型组	14.72 $\pm$ 2.21***	27.47 $\pm$ 2.54**	17.88 $\pm$ 1.76*
白果内酯低剂量组	17.68 $\pm$ 2.51	31.47 $\pm$ 4.21	19.79 $\pm$ 1.91
白果内酯高剂量组	20.01 $\pm$ 2.48**	33.30 $\pm$ 3.84**	20.12 $\pm$ 1.84*

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与白果内酯低剂量组比较,\* $P < 0.05$ 。

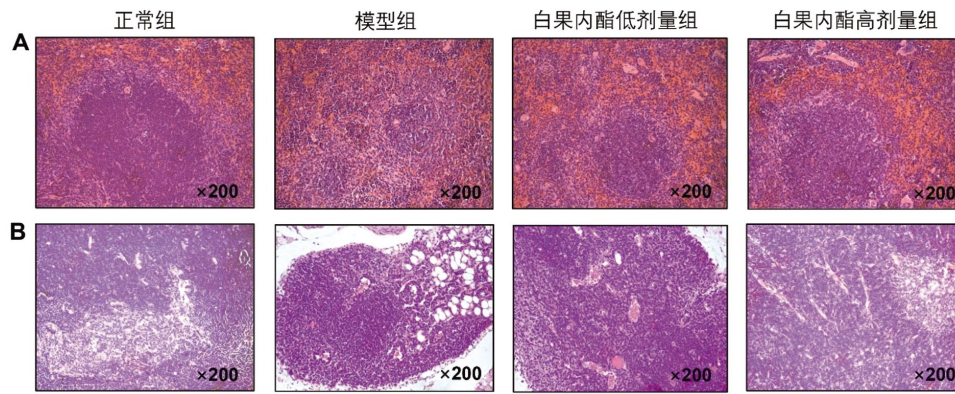
正常组小鼠的脾脏组织形态完整,红髓、白髓正常,清楚可辨,边缘界限清晰,脾小结发育正常;胸腺皮质和髓质结构清晰,皮质染色深且面积较大,可观察到排列紧密的淋巴细胞。模型组脾脏红髓、白髓边缘界限不清晰,脾小结严重缩小甚至无法辨认;胸腺皮质和髓质分界不清,可观察到皮质和髓质面积均显著减小且出现空泡,淋巴细胞数量显著减少。白果内酯低、高剂量组脾脏红髓、白髓可辨,边缘界限稍清晰,脾小结发育基本正常,且白果内酯高剂量组效果更显著;胸腺皮质面积增加,皮质、髓质交界较为清晰,淋巴细胞数量较模型组显著增多,且白果内酯高剂量组效果更显著。详见图 1。

## 3.2 白果内酯对免疫功能低下小鼠外周血细胞数量的影响

与正常组比较,模型组白细胞和血小板数量降低( $P < 0.001$ );与模型组比较,白果内酯低剂量组血小板数量升高( $P < 0.05$ ),白果内酯高剂量组白细胞和血小板数量升高( $P < 0.05$ );与白果内酯低剂量组比较,白果内酯高剂量组白细胞数量升高( $P < 0.05$ )。详见表 2。

## 3.3 白果内酯对免疫功能低下小鼠 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖及巨噬细胞吞噬的影响

与正常组比较,模型组巨噬细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖指数降低( $P < 0.05$ , $P < 0.001$ );与

图 1 各组小鼠免疫器官 HE 染色图( $\times 200$ )Fig.1 HE staining images of immune organs in each group of mice ( $\times 200$ )

注:A.脾脏组织;B.胸腺组织。

表 2 各组小鼠外周血细胞数量比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Comparison of peripheral blood cells counts of mice among different groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	红细胞数量( $\times 10^{12}$ )	白细胞数量( $\times 10^9$ )	血小板数量( $\times 10^9$ )
正常组	9.52 $\pm$ 1.50	8.37 $\pm$ 1.68	13.84 $\pm$ 1.01
模型组	8.51 $\pm$ 1.30	5.15 $\pm$ 0.88***	9.40 $\pm$ 0.90***
白果内酯低剂量组	9.11 $\pm$ 0.93	6.69 $\pm$ 1.25	12.05 $\pm$ 2.20 <sup>#</sup>
白果内酯高剂量组	9.71 $\pm$ 1.08	7.22 $\pm$ 1.37 <sup>##</sup>	11.97 $\pm$ 1.70 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与白果内酯低剂量组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

模型组比较,白果内酯低剂量组巨噬细胞和 T 淋巴细胞增殖指数升高( $P < 0.05$ ),白果内酯高剂量组巨噬细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖指数升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。详见表 3。

表 3 各组小鼠巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖指数比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Comparison of macrophage, T lymphocyte, and B lymphocyte proliferation index of mice among different groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	巨噬细胞	T 淋巴细胞	B 淋巴细胞
正常组	0.78 $\pm$ 0.08	1.84 $\pm$ 0.27	1.78 $\pm$ 0.16
模型组	0.41 $\pm$ 0.05***	1.35 $\pm$ 0.25*	1.45 $\pm$ 0.16*
白果内酯低剂量组	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	1.79 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>	1.59 $\pm$ 0.19
白果内酯高剂量组	0.57 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup>	1.78 $\pm$ 0.32 <sup>#</sup>	1.68 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.4 白果内酯对免疫功能低下小鼠 CD4<sup>+</sup>T 比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和 NK 细胞比例的影响

与正常组比较,模型组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和 NK 细胞比例降低( $P < 0.01, P < 0.001$ );与模型组比较,白果内酯低剂量组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例

和 NK 细胞比例升高( $P < 0.05$ ),白果内酯高剂量组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和 NK 细胞比例升高( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ );与白果内酯低剂量组比较,白果内酯高剂量组 NK 细胞比例升高( $P < 0.05$ )。详见表 4。

表 4 各组小鼠 CD4<sup>+</sup>比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值和 NK 细胞比例比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )Table 4 Comparison of CD4<sup>+</sup> proportion, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, and NK cells ratios of mice among different groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> T 细胞比例	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 比值	NK 细胞比例
正常	15.50 $\pm$ 1.08	1.94 $\pm$ 0.12	8.95 $\pm$ 0.45
模型组	12.03 $\pm$ 1.27**	1.59 $\pm$ 0.12***	4.83 $\pm$ 0.74***
白果内酯低剂量组	14.75 $\pm$ 1.46 <sup>#</sup>	1.66 $\pm$ 0.14	6.10 $\pm$ 0.45 <sup>#</sup>
白果内酯高剂量组	15.12 $\pm$ 1.48 <sup>##</sup>	1.81 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>	7.22 $\pm$ 0.84 <sup>###</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与白果内酯低剂量组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.5 白果内酯对免疫功能低下小鼠脾脏 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达降低( $P < 0.01, P < 0.001$ );与模型组比较,白果内

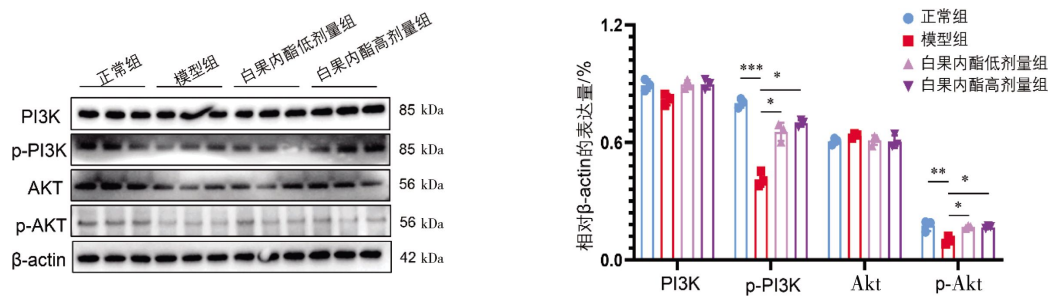


图2 各组小鼠脾脏 PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.2 Comparison of protein expression levels of PI3K, Akt, p-PI3K, and p-Akt in spleen of mice among different groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

酯低、高剂量组 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。详见图 2。

#### 4 讨论

CTX 是临床上常用的抗代谢和抗 DNA 合成的化疗药,通常用于治疗血液系统肿瘤和慢性自身免疫病,其作用范围广泛,作用效果显著<sup>[13]</sup>。但是由于长期使用和药物剂量问题,CTX 会造成免疫功能低下,即显著的骨髓造血功能抑制,最终发生感染危及患者生命<sup>[14]</sup>。因此,CTX 导致的免疫功能低下需要引起重视。在目前的研究中,诱导免疫功能低下的模型方式很多,且各种药物的剂量、时间、用药方式各不相同,缺乏统一的标准。本研究结果表明,使用 50 mg/kg 的 CTX 连续腹腔注射 3 d 制备的免疫功能低下小鼠模型的免疫器官胸腺和脾脏基本生理结构被破坏,同时脾脏淋巴细胞的流式细胞分析结果也表明,CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞比例较正常组显著降低,提示模型成功建立。

本研究探究银杏叶提取物白果内酯,通过免疫器官指数,外周血细胞数量,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖和巨噬细胞吞噬功能,脾淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值,NK 细胞比例的检测,表明其可以显著提高 CTX 导致的免疫功能低下小鼠的免疫功能,且在提高体质量、白细胞数量和 NK 细胞比例上高剂量效果更佳。中药复方和中药活性成分具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤的功效<sup>[15]</sup>。银杏提取物可通过调节肠黏膜 Th17/Treg 平衡改善大鼠溃疡性结肠炎<sup>[16]</sup>。

一项研究报道,含有银杏活性成分的银杏蜜环口服液在缓解患者冠心病的同时,可以提高外周血中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例,表明其具有提高免疫功能的功效,与本研究报告的结果一致<sup>[17]</sup>。

此外,本研究还对相关作用机制做了初步探究。PI3K/Akt 信号通路在恶性肿瘤发展过程中起着重要作用,该通路能调节肿瘤细胞的增殖和分化等,是参与恶性肿瘤增殖和转移的重要分子机制之一<sup>[18]</sup>。PI3K 是由 p110 催化亚基和 p85 调节亚基组成的异源二聚体,在各种细胞生理活动中发挥关键作用<sup>[19]</sup>。Akt 有 3 种亚型(Akt1、Akt2 和 Akt3),可响应上游 PI3K 而被激活<sup>[20]</sup>。Akt 参与调节受体介导的信号转导,因此,靶向 PI3K/Akt 成为治疗化疗药导致的免疫功能低下的新策略。

本研究使用 Western blot 检测小鼠脾脏淋巴细胞中 PI3K/Akt 通路蛋白的表达,结果表明免疫功能低下小鼠的 PI3K/Akt 通路的活性显著被抑制,表明免疫细胞的增殖降低,体外实验证明模型组 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖降低,使用低剂量或高剂量白果内酯治疗后 PI3K/Akt 通路相对于模型组显著被激活,同时 T 淋巴细胞增殖指数也显著升高,说明白果内酯提高免疫功能的作用可能是通过激活脾脏免疫细胞 PI3K/Akt 通路促进免疫细胞增殖实现的。

综上所述,本研究发现白果内酯能治疗 CTX 引起的小鼠免疫功能低下,且高剂量的治疗效果更

佳,其作用机制可能与上调 PI3K/Akt 信号通路有关。本研究探究了白果内酯辅助化疗对免疫功能低下小鼠的作用,以期对相关药物的临床应用提供实验依据。

## 参考文献

- [1] 邱云,戎宽,杨惠,等. 生血增白汤对环磷酰胺致血虚小鼠 RBC、Hb、WBC、Plt 含量的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(12): 1323-1325.
- [2] 史晶晶,时博,苗明三. 黄芪多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中医学报, 2016, 31(2): 243-246.
- [3] CHEN L, JIANG Q, YAO S, et al. Sciadonic acid ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression by modulating the immune response and altering the gut microbiota[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 104(7): 3902-3912.
- [4] LOGAN C, KOURA D, TAPLITZ R. Updates in infection risk and management in acute leukemia[J]. *Hematology American Society of Hematology Education Program*, 2020, 2020 (1): 135-139.
- [5] LU J, XIE L, LIU K, et al. Bilobalide: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, and safety[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(11): 6114-6130.
- [6] FENG Z L, SUN Q, CHEN W, et al. The neuroprotective mechanisms of ginkgolides and bilobalide in cerebral ischemic injury: A literature review[J]. *Molecular Medicine*, 2019, 25(1): 57.
- [7] MAO S M, YAO J P, ZHANG T, et al. Bilobalide attenuates lipopolysaccharide-induced HepG2 cell injury by inhibiting TLR4-NF- $\kappa$ B signaling via the PI3K/Akt pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2023, 27(1): 24.
- [8] SHI C, WU F M, YEW D T, et al. Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(6): 715-727.
- [9] LIU Q, JIN Z Q, XU Z L, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2019, 24(2): 441-452.
- [10] QIN Y, HU C, JIN J, et al. Bilobalide ameliorates osteoporosis by influencing the SIRT3/NF- $\kappa$ B axis in osteoclasts and promoting M2 polarization in macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 281(4): 136504.
- [11] 王雨,晏群,田艳,等. 五红汤对环磷酰胺所致免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中医学报, 2023, 51(3): 30-34.
- [12] 田艳,刘青青,田海霞,等. 益生菌缓解环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(15): 1805-1808.
- [13] VAN DEN BOSCH L, LUPPI F, FERRARA G, et al. Immunomodulatory treatment of interstitial lung disease[J]. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2022, 16: 1-16.
- [14] LEI Y Y, YE Y H, LIU Y, et al. Achyranthes bidentata polysaccharides improve cyclophosphamide-induced adverse reactions by regulating the balance of cytokines in helper T cells[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 265: 130736.
- [15] LUAN X, ZHANG L J, LI X Q, et al. Compound-based Chinese medicine formula: From discovery to compatibility mechanism[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 254: 112687.
- [16] 卢群,吴云峰,吴旭. 银杏提取物对 UC 大鼠肠黏膜屏障功能的改善作用及对 Th17/Treg 细胞免疫稳态的影响[J]. 中药材, 2024, 47(2): 465-469.
- [17] 苏雯雯,蒋健刚. 银杏蜜环口服溶液治疗冠心病合并抑郁的临床效果及对免疫功能的影响[J]. 中国现代医生, 2024, 62(16): 90-93, 97.
- [18] 陈雪珍,朱蓉,杨满英,等. 基于 PI3K/Akt 信号轴探究补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 232-239.
- [19] 张格松,蒋士卿. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨中医药治疗肺癌研究进展[J]. 中医学报, 2024, 39(1): 77-83.
- [20] TSAI P J, LAI Y H, MANNE R K, et al. Akt: A key transducer in cancer[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29(1): 76.

(本文编辑 周旦)