

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610124225.3

[51] Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1994338A

[22] 申请日 2006.12.14

[21] 申请号 200610124225.3

[71] 申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道  
西 601 号

[72] 发明人 栗原博 何蓉蓉 姚新生

[74] 专利代理机构 广州创颖专利事务所

代理人 曹可芬

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

草珊瑚水提物的新用途

[57] 摘要

草珊瑚水提取物的新用途，涉及医药领域，具体是天然植物草珊瑚提取物的应用。草珊瑚水提取物可用于制备治疗或改善应激负荷起因的免疫低下的药物、健康食品、食品添加剂的应用。草珊瑚水提取物可以有效调节因应激导致的免疫器官萎缩；脾脏细胞数目减少；淋巴细胞增殖能力下降；淋巴细胞中 T 细胞亚群的比例紊乱；增强 NK 细胞杀伤活性。草珊瑚水提取物是一种安全性高，可通过提高机体免疫系统，从而达到改善和治疗应激引起的免疫低下、慢性疲劳综合症、感染症。草珊瑚水提取物干品在药物或健康食品或食品添加剂的各种制剂成品中占 0.001 ~ 100% 的重量比。

1、草珊瑚水提取物用于制备治疗或改善应激负荷起因的免疫低下的药物或健康食品或、食品添加剂的应用，所说的草珊瑚水提取物在药物或健康食品或食品添加剂各种成品中以干品重量计占 0.001~100% 的重量比。

2、根据权利要求 1 所述的草珊瑚水提取物用于制备治疗或改善由于免疫低下引起的慢性疲劳综合症的药物或健康食品或食品添加剂的应用。

3、根据权利要求 1 所说的草珊瑚水提取物用于制备治疗或改善由于免疫低下引起的感染症的药物或健康食品或食品添加剂的应用。

4、根据权利要求 1~3 所述草珊瑚水提取物用于制备治疗或改善应激负荷引起 NK 细胞活性低下引起的免疫低下的药物或健康食品或食品添加剂的应用。

## 草珊瑚水提取物的新用途

### 技术领域

本发明涉及医药领域，具体是天然植物草珊瑚提取物的应用。

### 背景技术

草珊瑚是指金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai，又称九节茶、九节风、肿节风、接骨茶等，为多年生常绿草本或亚灌木，生长于丛林阴湿处，分布于华东、中南、西南，资源丰富，民间供药用，历史悠久，《中华人民共和国药典》（2005年版（一部））收载其作为法定药材使用。临床上，草珊瑚对扁桃体炎、中耳炎、喉炎、肺炎、胃肠炎、阑尾炎、甲沟炎、脓疱等多种急慢性炎症有较好的疗效（<http://www.usetm.com/y12/>）。此外，草珊瑚对胰腺癌、鼻咽癌、膀胱癌、甲状腺癌、胃癌、直肠癌及食管癌也显示一定效果，也用于治疗风湿痹痛、类风湿性关节炎等疾病（*新医学* 1977 8(7):320）。

近年来的药理研究证明，草珊瑚具有广谱抗菌作用，其中对金黄色葡萄球菌、志贺氏痢疾杆菌I型为极敏，对金葡耐药株、鲍氏痢疾杆菌C-2型、伤寒杆菌H<sub>901</sub>、副伤寒甲型为高敏，对弗氏痢疾杆菌III型、大肠杆菌、绿脓杆菌、也有一定抑制作用（*中草药通讯* 1972（6）：61）。一些研究证明草珊瑚对巴豆油及交叉菜胶所致的小鼠炎症有显著的抑制作（*广西中医学院学报* 2000 17(1)：50-52）。

目前已开发的草珊瑚产品有：清热消炎宁、复方草珊瑚含片、草珊瑚牙膏、肿节风片、草珊瑚口香糖、草珊瑚漱口液，草珊瑚袋泡茶等。其中“清热消炎宁”为中药单方制剂，是草珊瑚用水提取物制成，临床上用于流行性感冒，咽喉炎，肺炎，菌痢，急性胃肠炎，阑尾炎，烧伤，疮疡脓肿，蜂窝织炎，多年来深受医患者的青睐，占有广泛的市场。

由于草珊瑚水提取物具有较好的安全性，急性毒性试验结果属实际无毒，小鼠精子畸形试验、骨髓细胞微核试验、Ames试验均为阴性，未发现引起哺乳动物体细胞和生殖细胞畸变及细菌基因突变的作用（*贵阳医学院学报*，1998 23（1）：43-44）。因而认为草珊瑚作为食用，在致突变作用方面比较安全，因此有必要开发水提取物的新用途草珊瑚无急性毒性。

随着科技的进步和生活节奏的加快，人们为了适应社会的日益强烈的竞争，

需要承受来自不同方面的种种压力,使人们常常处于应激状态,由应激而引起的问题也随之而来。

抗应激药物能减弱应激对机体的作用,降低机体对应激的反应性,通常有安定止痛剂(氯丙嗪、哌哌嗪、三氟拉嗪、氟哌啶醇)、安定剂(氯二氢甲基苯基苯并二氮杂卓酮、溴氯苯基二氢苯并二氮杂卓酮)和镇静剂(苯纳嗪、溴化钠、盐酸地巴唑)这些药物多数具有副作用在临床使用剂量上受到一定限制、在效果上也多局限于暂时性的缓解,而不能从根本上达到治疗目的。为此我们开发新的抗应激药物。

### **发明内容**

本发明的目的在于提供草珊瑚水提取物为原料,用于制备治疗或改善应激负荷起因的免疫低下的药物、健康食品、食品添加剂的应用。

草珊瑚水提取物是采用制药工业常规的工艺制得,提取时,草珊瑚与水溶剂的比率没有特定限制,但一般草珊瑚与水的重量比以1:5~30范围为宜。本发明对提取温度没有特定限制,从室温到溶剂沸点范围都可适用。提取时间从10秒到24小时范围都可以。

本发明提供的草珊瑚水提取物的使用量一般以干品重量计,在药物或健康食品或食品添加剂的各种成品中占0.001~100%的重量比。当制备饮料时所添加浓度一般在0.01%至50%(W/W)范围较为适宜。在这个浓度范围内,草珊瑚提取物适于直接服用,容易被消费者接受。当草珊瑚当提取物随着加入量的增大,可能会出现苦涩感觉。其解决办法可以根据市场需要及消费者的要求改换剂型,如用片剂、颗粒剂、胶囊剂等剂型。低浓度草珊瑚提取物溶液可以作为日常饮料提供给消费者。

草珊瑚水提取物也可以添加常用的赋形剂等医药用载体后制成制剂。必要时也可以添加一些防腐剂、抗氧化剂(antioxidant)、着色剂、甜味剂等制剂添加物。比较适宜的赋形剂,可考虑用乳糖、白糖、D-甘露醇、淀粉、结晶纤维素等。润滑剂可用硬脂酸镁、硬脂酸钙、滑石粉等。溶剂可用精制水、乙醇、丙二醇等。防腐剂可用氯丁醇、苜醇、二羟基乙酸等。抗氧化剂通常以亚硫酸盐、抗坏血酸等比较适宜。

草珊瑚水提取物,可以取其浸膏状的提取物或粉末状干品添加到制品中用于口服。草珊瑚水提取物也可与制成饮料,如草珊瑚饮料、碳酸饮料、果汁饮料、乳酸菌饮料、运动饮料、豆乳等。草珊瑚提取物食品还可以考虑制成饼干、巧克力类、糖果类、口香糖类、快餐点心类、果冻点心类、面包、豆腐、酸奶

酪等日常食品。本发明所说的草珊瑚水提取物，也可以制成皮肤外用剂。如气雾剂、液体制剂、乳剂、软膏剂、半流体制剂、擦剂、洗剂等剂型。

本发明所说的草珊瑚水提取物，可以多种口服剂型如药物、健康食品、食品添加剂用于治疗和改善应激负荷引起的免疫低下的各种临床症状。

动物试验结果表明，直接作用于机体的刺激能造成免疫机能的抑制。使用大鼠或小鼠所进行的强拘性应激试验表明，在强拘 24 h 后出现胸腺和脾脏萎缩，与绵羊红细胞结合成玫瑰花环的细胞数减少，NK 细胞活性及吞噬细胞活性低下(《动物医学进展》，1999 20 (3)：32—34)。应激引起免疫系统变化的指标主要有两类：一是数量型指标，指的是白血球数量的变化，主要是自然杀伤细胞、淋巴 T 细胞、B 细胞数量的变化。二是功能型指标，包括细胞免疫功能指标和体液免疫功能指标。前者指免疫细胞的活性及增殖能力的变化，后者指免疫细胞的生成物（如抗体）的产生及变化。主要的细胞免疫功能指标为 NK 细胞的活性、T 细胞、B 细胞的增殖能力等 (<http://www.psychcn.com/>)。其中，应激引起的免疫抑制所致最主要表现为 NK 细胞与 T 细胞的数量和质量的变化。因此，研究改善及提高 NK 细胞与机能的活性物无疑有益于机体抗应激作用。

对应激负荷的机体所出现的是疲劳反应，其最主要的表现形式为慢性疲劳综合症(chronic fatigue syndrome CFS)。慢性疲劳综合症是一种以长期疲劳为主要表现的全身性疾病，是以疲劳、低热、注意力不易集中、记忆力下降、睡眠障碍和抑郁等非特异性表现为主的综合症。慢性疲劳综合症患者存在免疫系统功能的紊乱。因此，有人也将慢性疲劳综合症称为“慢性疲劳免疫功能障碍综合症”。

慢性疲劳综合症主要表现为细胞免疫功能低下，NK 细胞数目或活性的降低，这提示慢性疲劳综合症病人的非特异免疫功能低下。此外，慢性疲劳综合症还存在 T 细胞功能、淋巴细胞增殖功能、单核细胞吞噬抗原能力下降及 T 细胞亚群数目与比值的改变。上述细胞免疫功能的下降，可导致机体的清除能力和应答外来抗原的能力下降，从而使病毒可长期潜伏体内或外来抗原不能被清除。T 细胞亚群数目及比值变化还可引起细胞因子改变，进而导致细胞免疫和体液免疫功能的改变。

抗感染 (anti-infectious immunity) 是机体抵抗病原生物及其有害产物，维持机体内环境稳定的功能。抗感染能力的强弱，也取决于机体的免疫功能。NK 细胞构成抗病原微生物阶段的第一道免疫杀伤防线。NK 细胞不仅具有抗肿瘤、抗病毒及抗微生物作用，而且通过释放一些细胞因子，在炎症及免疫应

答过程中起重要作用。提高NK细胞的活力是抗感染药物的重要指标之一。

根据以下实施例以拘束应激诱发小鼠免疫机能低下的动物模型的药理实验,可评价草珊瑚抗应激作用及免疫赋活作用效果。从实验可以证明口服途径给药,草珊瑚水提取物可以有效调节因应激导致的免疫器官萎缩;脾脏细胞数目减少;淋巴细胞增殖能力下降;淋巴细胞中 T 细胞亚群的比例紊乱;增强 NK 细胞杀伤活性。因此草珊瑚水提取物可用于制备治疗或改善由于免疫低下引起的慢性疲劳综合症和感染症的药物或健康食品或食品添加剂;主要是用于制备治疗或改善应激负荷引起 NK 细胞活性低下引起的免疫低下的药物或健康食品或食品添加剂。

草珊瑚水提取物是一种安全性高,可通过提高机体免疫系统,从而达到预防、改善和治疗应激、疲劳、感染、免疫低下用于制备可以长期服用的、安全无毒副作用的药物、食品添加剂、健康食品及其组成物。草珊瑚水提取物在投药剂量达到 125 mg/kg 以上时,即显示出有效的改善因应激负荷引起的各种免疫力低下症状。本发明中草珊瑚水提取物的投药量,根据应用者的健康状况、年龄、性别及体重等条件可以调节。成人平均体重如以 60Kg 计算,草珊瑚及草珊瑚提取物日口服量一般可以考虑在 0.5 g 至 10 g 范围内,分次服用。当然 10 g 以上也不存在副作用等问题。

本发明可以通过以下实施例证明草珊瑚水提物的新用途,但并不仅仅局限于以下实施例。

## **具体实施方式**

### **实施例 1 草珊瑚提取物的制备**

干燥的草珊瑚药材 100g,使用粉碎机粉碎,加水 1200ml 在 100℃煮 60 分钟,滤过,取提取液,滤渣加 800ml 水,在 100℃煮 30 分钟,滤过,取提取液,合并二次的提取液经纱布滤过后,经 1000rpm 离心 5 分钟,分离后取上清液浓缩,冷冻干燥成干浸膏即得草珊瑚水提物 20g。该草珊瑚水提产品用于本发明的实施例 2~5。

### **实施例 2 草珊瑚水提取物促进拘束应激起因的小鼠免疫器官指数低下的恢复作用**

实验动物:购入 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,饲养温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 800 Lux 照明强度照明 12h/d (7:00-19:00),饲养一周后用于实验。

试验样品:实施例 1 所得草珊瑚水提物干浸膏 500mg 溶于蒸馏水 10ml

应激模型:拘束应激组小鼠固定在打有透气孔的 50mL 圆锥管中进行拘束

应激 12h, 以下实施例都是用此相同的应激模型

试验方法: 小鼠随机分 4 组, 每组 5 只, 分别为对照组, 拘束应激模型组, 给药低计量组: 每天一次经口灌胃给药  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚水提取物, 给药高计量组: 每天一次灌胃给药  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚水提取物。除对照组外, 其余各组进行拘束应激, 且从拘束前一天开始, 模型组和对照组给同容量水溶液, 连续给药 5 天后, 将小鼠脱椎处死并取出脾脏称重。

试验结果 (表 1):

| 组别                           | 脾脏指数 (%)             |
|------------------------------|----------------------|
| 正常对照                         | $0.37 \pm 0.03$      |
| 模型对照                         | $0.3 \pm 0.02$       |
| $125 \text{ mg} / \text{kg}$ | $0.41 \pm 0.03^*$    |
| $500 \text{ mg} / \text{kg}$ | $0.44 \pm 0.04^{**}$ |

注: \*表示  $p < 0.05$ , \*\*表示  $p < 0.01$  和应激对照组比有统计学差异

结论: 经口给药  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物显示出可以减轻拘束应激引起的脾脏指数减小, 证明草珊瑚水提取物可改善应激对免疫器官的损伤作用。

**实施例 3** 草珊瑚水提取物促进拘束应激起因的小鼠脾脏细胞低下的恢复作用

试验动物: 5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 饲养温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 800 Lux 照明强度照明 12h/d (7:00-19:00), 饲养一周后用于实验。

试验样品: 实施例 1 所得草珊瑚水提取物干浸膏 500mg 溶于蒸馏水 10ml

试验方法: 小鼠随机分为对照组, 拘束应激模型组,  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物给药组, 每组 5 只小鼠, 共分 4 组。除对照组外, 其余各组拘束应激 12h, 且从拘束前一天开始, 实验组每天一次分别灌胃给药、模型组和对照组给同容量无菌水, 连续 4 天后, 将小鼠脱椎处死并取出脾脏, 用组织研磨器在 PBS 溶液中分离单细胞, 经 200 目铜网过滤, PBS 定容到 10mL 后细胞计数。

试验结果 (表 2):

| 组别                           | 脾脏总细胞数 ( $\times 10^7$ ) |
|------------------------------|--------------------------|
| 正常对照                         | $11.7 \pm 0.7$           |
| 模型对照                         | $10.3 \pm 0.3$           |
| $125 \text{ mg} / \text{kg}$ | $12.5 \pm 0.5^*$         |
| $500 \text{ mg} / \text{kg}$ | $12.2 \pm 0.2^*$         |

注： \*表示  $p<0.05$ ，和应激对照组比有统计学差异

结论：经口给药  $125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  及  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物显示出可以在一定程度上减轻拘束应激引起的（小鼠）脾脏细胞数减少。证明草珊瑚水提取物可改善拘束应激起因的脾脏细胞低下作用，说明草珊瑚有改善免疫低下作用，从而改善免疫低下易引起疲劳、各种感染症和感染继发症等。

**实施例 4 草珊瑚水提取物促进拘束应激起因的小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力低下的恢复作用**

实验动物：5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠，饲养温度  $23\pm2^{\circ}\text{C}$ ，800 Lux 照明 12h/d（7：00-19：00），饲养一周后用于实验。

试验样品：实施例 1 所得草珊瑚水提物干浸膏 500mg 溶于蒸馏水 10ml

试验方法：小鼠随机分为对照组，拘束应激模型组， $125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  及  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物给药组，每组 5 只小鼠，共分 4 组。除对照组外，其余各组拘束应激 12h，且从拘束前一天开始，实验组每天一次分别灌胃给药、模型组和对照组给同容量水溶液，连续 4 天后，将小鼠脱椎处死并取出脾脏，用组织研磨器在 PBS 溶液中分离单细胞，经 200 目铜网过滤， $1500\text{ rpm}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min，弃上清液。加入 3mL Tris-HCl（pH7.65）缓冲溶液低张处理红细胞，静置 2 min 后加 PBS 液 5 mL 终止红细胞裂解反应。 $1500\text{rpm}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液，用 PBS 液换洗两次后，添加 10%FCS-RPMI1640 培养液调整细胞浓度至  $5\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每个检样淋巴细胞悬液（ $5\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）分别取 100  $\mu\text{L}$  加入到流式细胞分析管内进行，加入 5  $\mu\text{L}$  抗 CD3—FITC 抗体标记。室温闭光孵育 20 min 后加入 500  $\mu\text{L}$  PBS，振荡混匀  $1500\text{rpm}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液，后用 500  $\mu\text{L}$  PBS 振荡混匀用于检测每  $5\times10^6$  个细胞中的 CD3<sup>+</sup> 细胞百分含量，计算整个脾脏的 T 淋巴细胞（CD3<sup>+</sup>）数目。

试验结果（表 3）：

| 组别       | 脾脏 T 淋巴细胞数（ $\times 10^7$ ） |
|----------|-----------------------------|
| 正常对照     | $3.30\pm0.21$               |
| 模型对照     | $3.01\pm3.2$                |
| 125mg/kg | $3.80\pm2.6^*$              |
| 500mg/kg | $3.84\pm2.8^*$              |

注：表中 \*表示  $p<0.05$ ，和应激对照组比有统计学差异

结论：经口给药  $125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  及  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物显示可以在减轻拘束应激引起的脾脏 T 淋巴细胞数减少，证明草珊瑚水提取物可改善拘束应激起因的免疫抑制作用，改善免疫抑制起因的疲劳、各种感染症和感染继发

症等。

### 实施例 5 草珊瑚水提取物对拘束应激起因的小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群比例紊乱的恢复作用

实验动物：5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠，饲养温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，800 Lux 照明 12h/d (7:00-19:00)，饲养一周后用于实验。

实验样品：实施例 1 所得草珊瑚水提物干浸膏 500mg 溶于蒸馏水 10ml

试验方法：小鼠随机分为对照组，拘束应激模型组， $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物给药组，每组 5 只小鼠，共分 4 组。除对照组外，其余各组拘束应激 12h，且从拘束前一天开始，实验组每天一次分别灌胃给药、模型组和对对照组给同容量水溶液，连续 4 天后，将小鼠脱椎处死并取出脾脏，用组织研磨器在 PBS 溶液中分离单细胞，经 200 目铜网过滤， $1500 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min，弃上清液。加入 3mL Tris-HCl (pH7.65) 缓冲溶液低张处理红细胞，静置 2 min 后加 PBS 液 5 mL 终止红细胞裂解反应。 $1500 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液，用 PBS 液换洗两次后，添加 10%FCS-RPMI1640 培养液调整细胞浓度至  $5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每个检样淋巴细胞悬液 ( $5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 分别取 100  $\mu\text{L}$  加入到两个流式细胞分析管内进行 FITC, PE 双色荧光抗体标记。其中一管加入 5  $\mu\text{L}$  抗 CD3 抗体和 3  $\mu\text{L}$  CD4 抗体；第二管加入 5  $\mu\text{L}$  抗 CD3 抗体和 3  $\mu\text{L}$  抗 CD8 抗体。室温闭光孵育 20 min 后加入 500  $\mu\text{L}$  PBS，振荡混匀  $1500 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液，后用 500  $\mu\text{L}$  PBS 振荡混匀用于检测每  $5 \times 10^6$  个细胞中的  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  细胞和  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  细胞百分，并计算  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  细胞%及  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  细胞%比值。T 细胞是不均一的细胞群体，依据其表面标志及功能特征，又可将其分为不同亚群， $\text{CD4}^+$  细胞 (Th) 和  $\text{CD8}^+$  细胞 (Ts) 两个主要亚群， $\text{CD4}^+$  细胞具有辅助和诱导功能， $\text{CD8}^+$  细胞具有免疫抑制作用和细胞毒功能，它们既相互协作，又有各自的功能特点，需要共同完成免疫应答才发挥免疫调节功能，所以维持 T 淋巴细胞亚群的稳定对人体免疫功能起了重要的调节作用。

试验结果 (表 4):

| 组别       | CD4/CD8              |
|----------|----------------------|
| 正常对照     | $1.85 \pm 0.2$       |
| 模型对照     | $2.28 \pm 0.19^{**}$ |
| 125mg/kg | $1.80 \pm 0.26$      |
| 500mg/kg | $1.95 \pm 0.14$      |

注：表中 \*\*表示  $p < 0.01$ ，应激和对照组比有统计学差异

结论：拘束应激造成  $CD3^+CD4^+$  细胞比例增加， $CD3^+CD8^+$  细胞比例下降的一种免疫异常状态，经口给药  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物显示出可以调节拘束应激引起的脾脏 T 淋巴细胞亚群紊乱。证明草珊瑚水提取物可以改善拘束应激起因的免疫紊乱作用，从而改善因免疫紊乱引起的疲劳、各种感染症和感染继发证等。

**实施例 6** 草珊瑚水提取物对小鼠自然杀伤性细胞 (natural killer: NK) 的赋活作用

实验动物：5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠，饲养温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，照明时间 12h/d (7:00-19:00)，饲养一周后用于实验。

样品：实施例 1 所得草珊瑚水提物干浸膏 500mg 溶于蒸馏水 10ml

方法：小鼠随机分为对照组，拘束应激模型组， $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  草珊瑚提取物给药组，每组 5 只小鼠，共分 4 组。除对照组外，其余各组拘束应激 12h，且从拘束前一天开始，实验组每天一次分别灌胃给药、模型组和对照组给同容量水溶液，连续 4 天后，将小鼠脱椎处死并取出脾脏，用组织研磨器在 PBS 溶液中分离单细胞，经 200 目铜网过滤， $1500 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min，弃上清液。加入 3mL Tris-HCl (pH7.65) 缓冲溶液低张处理红细胞，静置 2 min 后加 PBS 液 5 mL 终止红细胞裂解反应。 $1500 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后弃上清液，用 PBS 液换洗两次后，添加 10%FCS-RPMI1640 培养液调整细胞浓度至  $2 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验采用 DiO 标记的靶细胞被杀伤破损时，染料 PI 进入细胞标记细胞核，根据效靶细胞大小和 DiO 染色差异，可在 FL1 / FS 图中区分靶细胞群，进而研究靶细胞死亡情况，算出 NK 杀伤活性。具体实验为，10%FCS-RPMI1640 培养液将脾淋巴细胞悬液调至  $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^5$  及  $1.25 \times 10^5 \text{ cells} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$  浓度后，以  $100 \mu\text{L} \cdot \text{well}^{-1}$  分别添加到 96 孔圆底培养板中作为 NK 杀伤效应细胞。10%FCS-RPMI1640 培养液调整 YAC-1 细胞浓度至  $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ，添加 DiO ( $10 \mu\text{L} \cdot 1 \text{ mL}^{-1} \text{ cells}$ )，在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 15 min 后，用培养液洗涤两次，过 300 目尼龙网，用上述培养液调整细胞浓度至  $10^4 \text{ cells} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$  作为 NK 靶细胞以  $100 \mu\text{L} \cdot \text{well}^{-1}$  添加到效应细胞中(效：靶细胞比分别为 100:1, 50:1, 25:1 及 12.5:1)。YAC-1 靶细胞自然死亡率为  $10^4 \text{ cells} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$  靶细胞内添加  $100 \mu\text{L}$  培养液作为对照组。 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养 3 小时后，每孔加入  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PI  $8 \mu\text{L}$ ，继续孵育一小时后取出，将培养板置于冰上终止杀伤反应，避光保存用于流式细胞仪检测。将培养板中各孔

细胞轻轻吹起并将待测细胞悬液转入流式分析管后添加 500 μL PBS，用流式细胞仪对每个样本中的 1000 个靶细胞作 NK 杀伤活性的检测分析。NK 杀伤活性用 NK 细胞对 YAC-1 靶细胞的细胞毒性来表示，并通过以下公式计算：

$$\text{细胞毒性(\%)} = \frac{\text{NK 诱发靶细胞死亡率} - \text{靶细胞自发死亡率}}{100 - \text{靶细胞自发死亡率}} \times 100\%$$

本发明计算出 10% cytolysis 时的 NK 的杀伤活性：LU<sub>10</sub>(细胞毒性为 10%时所需要的效应细胞数目)所需要的脾脏细胞数为单位来定量表示。

此外，本发明还计算了 10<sup>6</sup> cells 脾脏细胞具有的 NK 细胞杀伤活性 (LU10 • 10<sup>6</sup> cells<sup>-1</sup>)，和整个脾脏全部细胞所具有的 NK 细胞杀伤活性 (LU10 • spleen cells<sup>-1</sup>)

$$\begin{aligned} \text{LU}_{10} \cdot 10^6 \text{ cells}^{-1} &= \frac{\text{No. of 1 LU}_{10} \text{ cells}}{10^6 \text{ 脾脏细胞}} \\ \text{LU}_{10} \cdot \text{spleen cells}^{-1} &= \frac{\text{No. of 1 LU}_{10} \text{ cells}}{\text{脾脏细胞总数}} \end{aligned}$$

试验结果（表 5）：

|          | LU10 • 10 <sup>6</sup> cells <sup>-1</sup> | LU10 • spleen cells <sup>-1</sup> |
|----------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| 正常对照     | 0.18                                       | 21.33                             |
| 模型对照     | 0.19                                       | 19.86                             |
| 125mg/kg | 0.21                                       | 25.72                             |
| 250mg/kg | 0.20                                       | 24.26                             |

结论：从试验结果表示，和正常组比较，拘束应激使 LU10 • spleen cells<sup>-1</sup> 下降，即拘束应激使 NK 细胞活性下降。经口给药 125 mg • kg<sup>-1</sup> 及 500 mg • kg<sup>-1</sup> 草珊瑚水提取物显示出促进脾细胞恢复的同时，也在一定程度上赋活 NK 细胞活性，证明草珊瑚水提取物可以改善由于应激造成的 NK 细胞活性下降，具有一定的免疫赋活作用。NK 细胞活性下降会引起机体免疫力下降，疲劳和容易感染，故草珊瑚可以用改善疲劳、增强抗感染症和感染继发症等的作用。

**实施例 6** 草珊瑚水提物在制备药物或健康食品或食品添加剂的各种实施例。

- 1. 草珊瑚口服滴丸：草珊瑚药材 3125g，水煎煮 2 次，每次 1.5 小时，煎液虑过合并，浓缩到适量，喷雾干燥，加入一定量的滴丸基质聚乙二醇 6000，制成 1000 份服用量的草珊瑚口服滴丸。
- 2. 草珊瑚片的制备：取草珊瑚药材 3125g，水煎煮 3 次，每次 1 小时，煎液虑过合并，浓缩到适量，喷雾干燥，加适量辅料，制成颗粒干燥，压制成

10000 片，包糖衣，即得。

3. 复方草珊瑚健肤水：然后依次加入草珊瑚水提取干品 0.001g、薄荷脑 0.08g、硼砂 0.5g，用蒸馏水加热到 60℃使它们溶解，冷却至 38-45℃，然后再加入甘油 0.1ml、植物香精 2 滴，冷却至 25-30℃，再加入乙醇搅拌均匀，过滤而得。

4. 草珊瑚硬糖：草珊瑚水提取物干品 5 g, 优质白砂糖 65 g, 甲级葡萄糖 28g, 加水适量制成草珊瑚硬糖 10 粒。

5. 草珊瑚系列蜜饯：草珊瑚水提取物干品 1g, 薄荷脑 0.08g, 酸枣果酱 89g, 白糖 5g 及奶粉 4g 或花生 4 g 或芝麻 4 g, 制成多种香型的草珊瑚酸枣糕。

6. 草珊瑚保健饮料的制备：0.4g 草珊瑚水提干浸膏，1.6g 由天然中草药植物绞股蓝植物提取的皂甙，和 0.1g 叶绿素混合，加天然矿泉水 100ml，加适量蔗糖配制而成。

7. 草珊瑚口胶的制备：150g 草珊瑚水提干浸膏，薄荷油 10ml 或薄荷脑 4g, 1000g, 食用胶姆 800g, 制成 1000 片。