

中國1號天仙液 對小鼠非特 異性免疫功能影響的實驗研究

研究單位:FRS生物醫學研究中心

Free Radical Biology & Medical Research Center

聯絡地址:台北市信義區和平東路三段213號4F

聯絡電話:(02)7390550

El Estudio Experimental sobre el Efecto del FRC001 (Líquido Tina Pian China No. 1) sobre la Inmunidad Inespecífica de Ratones

Robert W. Bradford D. Sc.1

Kexiang Ding 2

1. Bradford Research Institute, CA, USA

Professor of Capital University, Washington DC

2. FRC Free Radical Biology & Medical Research Center

ABSTRACTO

Este trabajo investigó el efecto del FRC001 sobre la inmunidad inespecífica de ratones y la reacción injerto versus huésped (GVHR). Los resultados demuestran que el FRC001 tuvo cierto efecto sobre la función fagocítica del macrófago mononuclear, el índice del bazo y el índice del timo, transformación linfocitaria del bazo, formación hemolizante del suero, el coeficiente de la reacción del bazo del huésped y coeficiente de estimulación y el índice de estimulación, por ejemplo FRC001 puede aumentar y ayudar la inmunidad humoral y celular en una base experimental para el uso del FRC001 para regular la inmunidad y prevenir y curar tumores.

Palabra Clave: FRC001 Inmunidad Inespecífica de la reacción injerto versus huésped (GVHR)

HISTORIA

La formación de tumores se relaciona a la deficiencia inmunológica. En los últimos años ha habido muchos reportes de el índice de deficiencia inmunológica la cual se considero ser un índice importante en la selección de agentes antitumorales. El estudio investigo el efecto del FRC001 sobre la inmunidad inespecífica de ratones y GVHR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Medicamento: FRC001.

1.2. Animales Experimentales: Ratonos, especie Kummung, 18~22gm, mitad machos, y mitad hembras, proporcionados por el Experimental Animal Center of Jiangsu Tumor Prophylactico-therapeutic Research Institute.

2. Método

2.1. Función fagocítica de macrófagos mononucleares (prueba de eliminación del carbón)

2.1.1. Principios experimentales

Ratonos experimentales fueron inyectados con tinta India el cual se uso como un cuerpo extraño granular. La tinta India fue fagocitada y eliminada por macrófagos mononucleares después de entrar en circulación. El 90% fue fagocitado por las células hepáticas de Kupffer mientras que el restante fue fagocitado por los macrófagos del bazo. La tasa de eliminación de cuerpos extraños en la circulación refleja la función fagocítica del macrófago mononuclear. Dentro de ciertos alcances, la tasa de eliminación del cuerpo extraño granular tuvo una relación exponencial con respecto a la concentración granular en circulación. Tiene una relación lineal en un sistema de coordenadas en las cuales tiempo es la horizontal y la concentración granular el la vertical. La inclinación K de la línea es la tasa de fagocitosis (tasa de eliminación)

2.1.2. Manipulación

Los ratonos fueron separados al azar en un grupo de control negativo y otro grupo de control positivo y grupos de distintas dosis de FRC001. Fueron alimentados con agua destilada, leche elemental y distintas dosis de FRC001 por 10 días. Cada ratón recibió una inyección de tinta India (diluida 1~5 veces) 0.05ml/1.0Gm de peso por la vena de la cola 30 minutos después de comer. En el primer minuto (t1) y el 5to minuto (t5) después de la inyección, se extrajo 20 ml de sangre de la vena postorbital con un tubo de succión humedecido con solución heparina y diluido en 2ml de solución de bicarbonato de sodio al 0.1%. Se midió la absorción de la solución sanguínea a los 680nm. Para calcular el valor de K se utilizo la siguiente formula $(IGA1-IGA5)/(t5-t1)=(IGA1/A5)/4$

2.2. Prueba GHVR.

Dos ratonos de línea pura C57BL JCR hibridizados para dar a luz a ratonos recién nacidos y el padre experimental fueron alimentados con FRC001 por 10 días mientras que el padre control no recibió tratamiento alguno. En el día 11 de vida los padres fueron sacrificados para extraer los bazos. La suspensión (1×10^8 /ml) se preparo con técnica aséptica. Los ratonos recién nacidos fueron divididos en grupos experimental, control y normal. Los ratonos recién nacidos del grupo experimental fueron inoculados con 0.1 ml de una suspensión de células de bazo del padre, los ratonos recién nacidos del grupo control fueron inoculados con 0.1 ml de una suspensión de células de bazo del padre, y el grupo normal no recibió tratamiento alguno. Todos estos ratonos recién nacidos fueron sacrificados al 7mo día después de la inoculación, y sus bazos fueron pesados para calcular el coeficiente de

bazo (mg. de bazo/10mg de peso). Luego se calculó el índice de estimulación del bazo (SI) por la siguiente formula:

$$SI = \frac{\text{Coeficiente del promedio del bazo del experimental o control}}{\text{promedio del coeficiente del bazo del grupo normal}}$$

2.3. El índice del bazo

Prueba del índice del bazo y del timo. Ratones de la especie Kunming (18~22Gm) se dividieron al azar en un grupo control (alimentado con N>S) grupo de control positivo y el grupo FRC001. Fueron alimentados con el alimento respectivo por diez días consecutivos y sacrificados por desangrado orbital al segundo día de la ultima comida. Sus bazos y timos fueron extraídos y pesados exactamente con una balanza de torsión. Los resultados revelaron el índice del órgano(bazo o timo) /peso (mg/10mg de peso corporal).

2.4. Prueba de transformación linfocitaria del ratón (MTT)

Colorimetría del MTT del bazo del ratón. Especies puras del ratón Kunming fueron sacrificados por desangrado orbital y los bazos extraídos para hacer una suspensión celular 5×10^8 /ml de suspensión celular con la solución de Hank y suspensión de células medianas RPC 1640. Se pusieron 100 ml al poro de un plato de cultivo y a cada poro se le agrego 100 ml de PHA; mientras tanto se coloco el poro de control. Fueron cultivados a 37-38.5°C. en un incubador CO2 por 72 horas. A cada poro se le agrego 50 ml de MTT 4-5 horas antes de terminar el cultivo, luego continuar con los cultivos 24, 36 y 48 horas respectivamente. Se pusieron en un refrigerador a 4°C por una noche. Se retiraron 150 m. del supernatante al que se le agregó 150 ml de isopropanol y mezclado hasta tener una solución homogénea. La absorción (A) de cada tubo fue medido a 630 nm del fotómetro ELISA. Para detalles vea la referencia 10.

2.5. Prueba de hemólisis del suero

Ratones de la especie Kunming de 18~22 gm fueron divididos al azar en grupos no-inmunológicos, inmunológicos; y grupos inmunológicos con droga (dosis baja, media y alta). A cada ratón de los últimos dos grupos se les inyectó intraperitonealmente 0.2 ml de glóbulos rojos de oveja (SRBC) lo cual lo diluyó a 3:5 (V/V) con Ratones NS del Grupo de droga a los cuales se les dio la droga antes o después de la inmunización. Cuatro días después de la inmunización, se sacó 1ml para obtener el suero. Para mas detalles vea la referencia 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. El efecto del FRC001 sobre la función fagocitaria de el macrófago mononuclear in Ratones

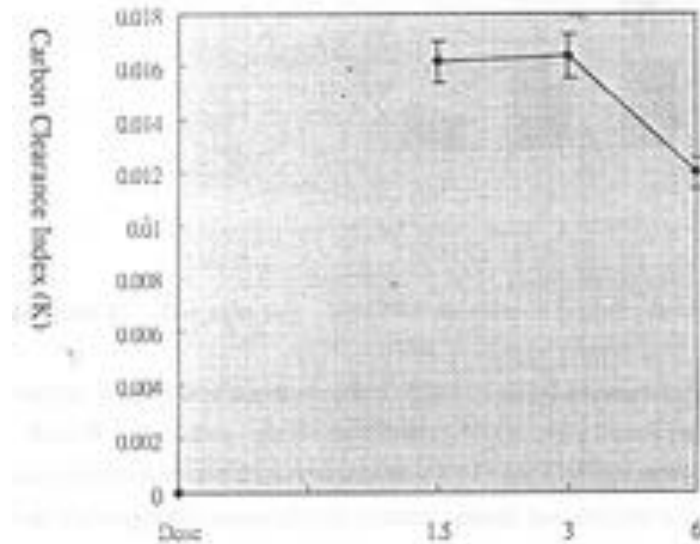


Figura 1.- La curva del efecto de FRC001 sobre la Función Fagocitaria del Macrófago Mononuclear en ratones.

El aumento del índice de eliminación del carbón (K) refleja las mejoras de la función fagocitaria del macrófago mononuclear y la inmunidad inespecífica. De acuerdo con la Figura 1 dosis bajas, mediana y altas del FRC001 aumentaron el valor de K significativamente ($p < 0.01$). El resultado muestra que el FRC001 puede aumentar la función fagocitaria del macrófago mononuclear y la inmunidad inespecífica.

2. El efecto del FRC001 sobre el índice del bazo y el índice del timo. (Tabla 1)

Table 1 The effect of FRC001 on spleen index (SI) and thymus index (TI)

Group	Number (n)	Dose	X±SD(mg/10g.bw)	
			SI	TI
Control	10	0	69.59±25.59	26.23±9.01
FRC001	10	6.0 × 10(mg/kg × d)	64.92±35.91 *	27.03±13.03 *
Elcmene Milk	10	100 × 10(mg/kg × d)	78.26±22.82 *	16.15±2.60 ***

Compared with control. * $P > 0.05$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$

Tabla 1 El efecto del FRC001 sobre el índice del bazo (SI) y el índice del timo (TI)

El bazo y el timo son órganos inmunológicos importantes. La degeneración y atrofia de ellos influye sobre su función normal. De acuerdo con la Tabla 1, FRC001 tuvo un efecto insignificante sobre SI y TI ($p > 0.05$). el resultado enseñó que Edfrann no tuvo influencia

evidente sobre los órganos inmunológicos. Los autores piensan que se deba a la hora de la inyección.

3. Efecto del FRC001 sobre la transformación linfocítica del bazo en el ratón. (figura 2)

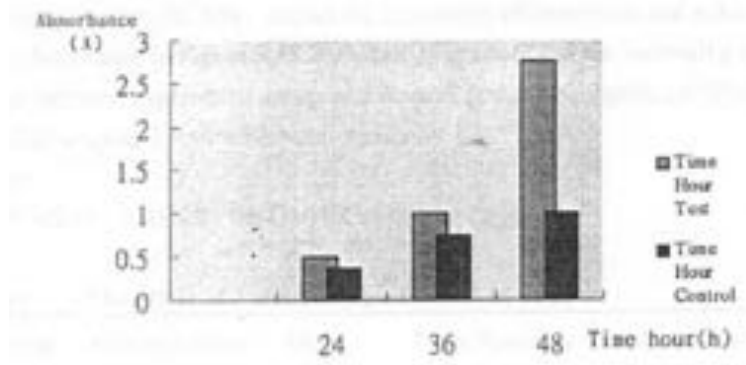


Figura 2. El efecto del FRC001 sobre la transformación linfocítica del bazo en el ratón.

La transformación linfocítica del bazo refleja la función inmunológica celular. La transformación linfocítica aumentó con el tiempo. La amplitud en aumento entre la hora 26 y la 48 fue la mayor. Comparado con el control, la transformación linfocítica a las 24, 36 y 48 horas tuvo un aumento significativo ($P < 0.01$). El resultado mostró que el FRC001 puede aumentar la función inmunológica celular.

4. El efecto del FRC001 sobre la hemolisina de suero (Fig. 3)

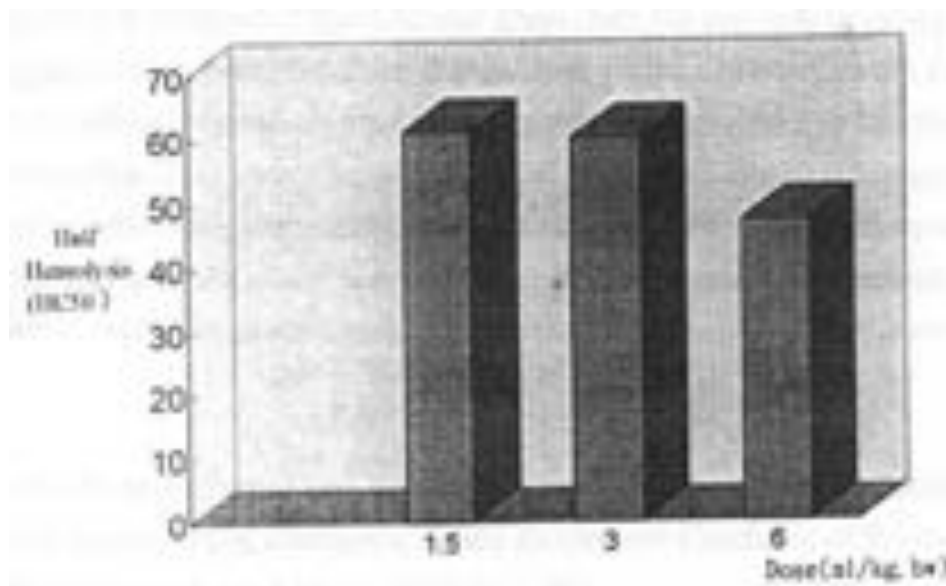


Figura 3. La curva de efecto del FRC001 sobre la formación de hemolisina en suero.

La hemolisina (IgM) refleja la inmunidad humoral. El aumento de tiempo medio de la absorción de hemolisina (HC50) muestra el aumento de la hemolisina y el aumento de la inmunidad humoral. De acuerdo a la Fig. 3 el HC50 aumento gradualmente con el aumento en FRC001. La diferencia entre los grupos experimental y control fue significativa (P<0.01). El resultado mostró que Edfrann aumento la inmunidad humoral.

5. Efecto del FRC001 sobre el GVHR en ratones (Tabla2)

(Table 2) The effect of FRC001 on GVHR in mice

Group	Number	Administration way	Dose (mg/kg × d)	Host Reaction Index(mg spleen/g.w)	Stimulu Index (SI)
Normal	8	ig	0	7.76±1.14***	-
Control	8	ig	6.0 × 10	9.82±1.36**	1.22
FRC001	8	ig	6.0 × 10	12.96±1.88	1.96

Tabla 2. El efecto del FRC001 sobre GVHR en ratones.

GVHR refleja la función inmunológica celular por el índice de la reacción del huésped y también el índice de estimulación. De acuerdo con la Tabla 2, el índice de reacción del huésped y el índice del estímulo del grupo FRC001 fue obviamente mayor al grupo normal (sin tratamiento) y el grupo control (alimentado solo con agua destilada) (P<0.05 o P<0.01). Los resultados muestran que Edfrann puede aumentar y mejorar la función inmunológica celular. FRC001 tiene alguna influencia en la inmunidad inespecífica de los ratones experimentales. La función reguladora del FRC001 sobre la inmunidad puede estar relacionado a sus componentes. Se ha reportado que las medicinas Chinas que tienen la función de fortalecer el Ki, calentamiento de la sangre y del Yang, etc. Contienen muchos componentes bioactivos que pueden mejorar la función del sistema reticuloendotelial, la formación de anticuerpos, inmunidad específica e inespecífica. Además, la eliminación de radicales libres por los componentes de la medicina china tiene una función colaboradora para proteger los órganos inmunológicos, regulan la inmunidad, favorecen factores inmunológicos, etc. FRC001 tiene componentes que pueden fortalecer el Ki y la sangre, calentar la sangre y eliminar radicales libres. Los componentes que desempeñan un papel para regular la inmunidad y su intensidad de acción y sus mejores efectos biológicos deberán ser estudiados mas en el futuro.

The Experimental Study on the Effect of FRC001 (China No.1 Tian Xian Liquid) on Nonspecific Immunity of Mice

Robert W. Bradford D.Sc.¹ · Kexiang Ding²

1. Bradford Research Institute, CA,USA

Professor of Capital University, Washington DC

2. FRC Free Radical Biology & Medical Research Center

ABSTRACT

This paper investigated the effect of FRC001 on nonspecific immunity of mice and graft versus host reaction (GVHR). The results shows that FRC001 had some effect on phagocytic function of mononuclear macrophage, spleen index and thymus index, splenic lymphocyte transformation, serum hemolysis formation, host spleen reaction coefficient and stimulate coefficient and stimulus index. i.e FRC001 can increase and enhance humoral immunity and cellular immunity of experimental basis for the use of FRC001 in regulating immunity and preventing and curing tumor.

Key Word: FRC001 Nonspecific immunity graft versus host reaction(GVHR)

BACKGROUND

Tumor formation is related to immunologic inadequacy. in recent year, there are many report on immunologic inadequacy index which was regarded as an important index in the screening of antineoplastic. The study investigated the effect of FRC001 on nonspecific immunity of mice and GVHR.

MATERIALS AND METHODS

1 Materials

1.1 Subject: FRC001 provided by *Chino-Japan Trade Union Co., LTD.*

1.2 Experimental Animal: Mouse, Kunming species, 18-22g, half male and half female, provided by Experimental Animal Center of Jiangsu Tumor Prophylactico-therapeutic Research Institute.

2 Method:

2.1 Phagocytic function of mononuclear macrophage (mouse carbon clearance test)

2.1.1 Experimental principle:

Experimental mouse was injected with Indian ink which was used as granular foreign body. The Indian ink was phagocytized and cleared by mononuclear macrophage after it went into circulation. Ninety percent of it was phagocytized by liver Kupffer cell while the rest was

phagocytized by spleen macrophage. The clearance rate of granular foreign body in circulation reflected the phagocytic function of mononuclear macrophage. Within given scope, the clearance rate of granular foreign body had exponential function relation with granular dose, i.e. phagocytosis rate had direct proportion relation with granular concentration in circulation. They have linear relation in system of coordinates with the time as the abscissa and granular concentration as the vertical ordinate. The slope K of the line is the phagocytosis rate (or clearance rate).

2.1.2 Manipulation

Mice were randomly divided into negative control group, positive control group and different dose of FRC001 groups. They were fed with distilled water, element milk and different dose of FRC001 for successive 10 days. Each mouse was injected Indian ink (diluted to 1-5 times) 0.05ml/10g bw from mouse tail vein at 30 minutes after the last feeding. In the first minute (1) and 5th minute (5) after injection, 20 μ l blood was drawn from postorbital vein with suction tube in which was moistened with heparin solution and diluted in 2ml 0.1% sodium carbonate solution. Then absorbance (A) of blood solution was assayed at 680nm. To calculate the value of K by following formula:

$$(lgA1 - lgA5) / (5 - 1) = (lgA1 / A5) / 4$$

2.2 GVHR test

Two pure line mice: ♂ C57BL, ♀ ICR hybridized to give birth to newborn mouse. Beginning at the first day of the birth of the newborn mouse, experimental male parent were fed with FRC001 for 10 days while control male parent were not given any treatment. On the 11th day after the birth of newborn mouse, male parent mice were killed by dislocation to take out spleens. Spleen cell suspension (1×10^6 /ml) was prepared by aseptic technique. The newborn mice were divided into experimental group, control group and normal group. The experimental newborn mice were inoculated 0.1ml spleen cell suspension of experimental male parent, the control newborn mice were inoculated 0.1ml spleen cell suspension of control male parent, and the normal group were not given any treatment. All these newborn mice were killed at seventh day after inoculation, and their spleens were weighed to calculate spleen coefficient (mg spleen/10g bw). Then calculation spleen stimulus index (SI) by following formula:

$$SI = (\text{Average Spleen Coefficient of Experimental or Control}) / \text{Average Spleen Coefficient of Normal Group}$$

2.3 Spleen index and thymus index test

Kunming species mice (18-22g) were randomly divided into negative control group (fed with N>S⁺) positive control group and FRC001 group. They were fed with respective subject for successive 10 days, and killed by orbital bleeding on the second day after the last feeding. Their spleen and thymuses were stripped out and weighed accurately with torsion balance. The results

showed with organ index-weight of spleen or thymus(mg)/10g bw

2.4 Mouse lymphocyte transformation test-co;orimetry of mouse splenic MTT

Pure species kunning mouse was killed by orbital bleeding and its spleen was stripped out to make 5×10^8 /ml cell suspension with Hank's solution and RPM 1640 medium cell suspension 100μ l was added to pore of culture dish,and every pore was added PHA 100μ l and experimental drugs.in the meantime ,control pore was set up.They were cultured in $37-38^\circ\text{C}$ 5% CO_2 incubator for 72hrs Every pore was added 50μ l MTT 4-5hrs before the ending of culture,then continue to culture 24h,36h,48h, respectively They were put into 4°C refrigerator for one night. Supernate 150μ l was sucked, added 150μ l acid isopropanol and blown to homogeneous solution Absorbance (A) of every tube was assayed at 630nm of ELISA photometer.To see detail in reference[10]

2.5 Serum hemolysis test

1) Mice (Kunning species, 18-22g) were randomly divided into nonimmunologic group,immunologic group immunology and drug(low,middle and high dose) group.Every mouse of the last two groups was injected intropet itoneally 0.2ml sheep red blood cell(SRBC)which diluted to 3:5(V/V) with N.S Mice of drug group were given drug before or after immunization. Four days after immuization. 1 ml blood was taken to get serum. To see the detail in reference[8].

Result and Discussion

1. The effect of FRC001 on phagocytic function of mononuclearmacrophage in mice (Figure 1)

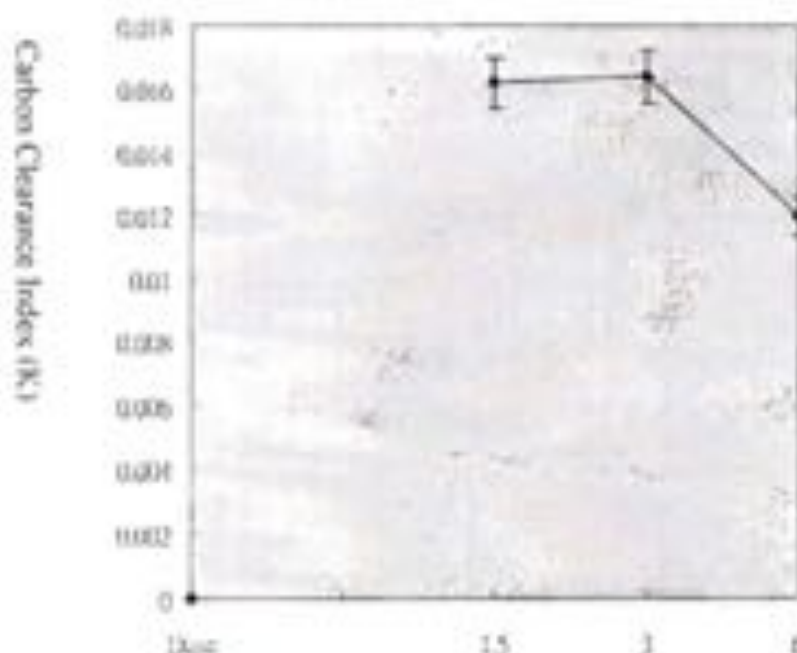


Figure 1 The effect curve of FRC001 on Phagocytic Function of Mononuclearmacrophage in

The increase of carbon clearance index (K) reflects the enhancement of phagocytic function of mononuclear macrophage and nonspecific immunity. According to Figure 1, low, middle and high dose of FRC001 increased K value significantly ($P < 0.01$). The result showed FRC001 can enhance the phagocytic function of mononuclear macrophage and nonspecific immunity.

2. The effect of FRC001 on spleen index and thymus index (Table 1)

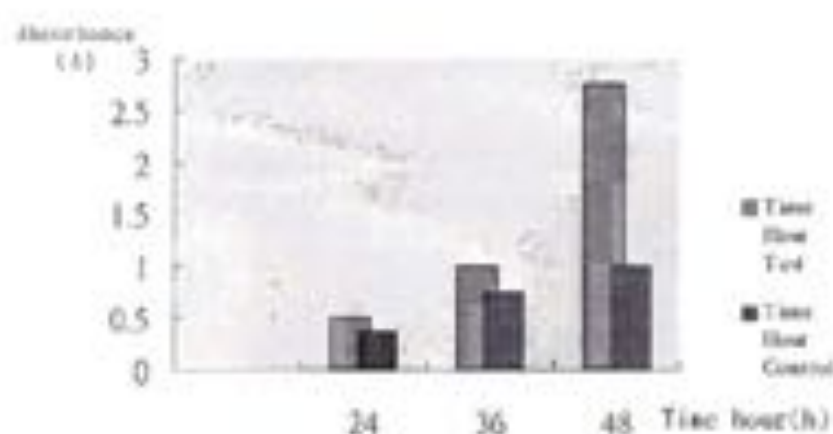
Table 1 The effect of FRC001 on spleen index (SI) and thymus index (TI)

Group	Number (n)	Dose	X±SD(mg/10g.bw)	
			SI	TI
Control	10	0	69.59±25.59	26.23±9.01
FRC001	10	6.0 × 10(mg/kg × d)	64.92±35.91 *	27.03±13.03 *
Edmone Milk	10	100 × 10(mg/kg × d)	78.26±22.82 *	16.15±2.60 ***

Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

Spleen and thymus are important immunologic organs. The degeneration and atrophy of them will influence their normal function. According to Table 1, FRC001 had no significant effect on SI and TI ($P > 0.05$). The result showed Edmone had no evident influence on immunologic organs. The authors thought it may be related to the shot time.

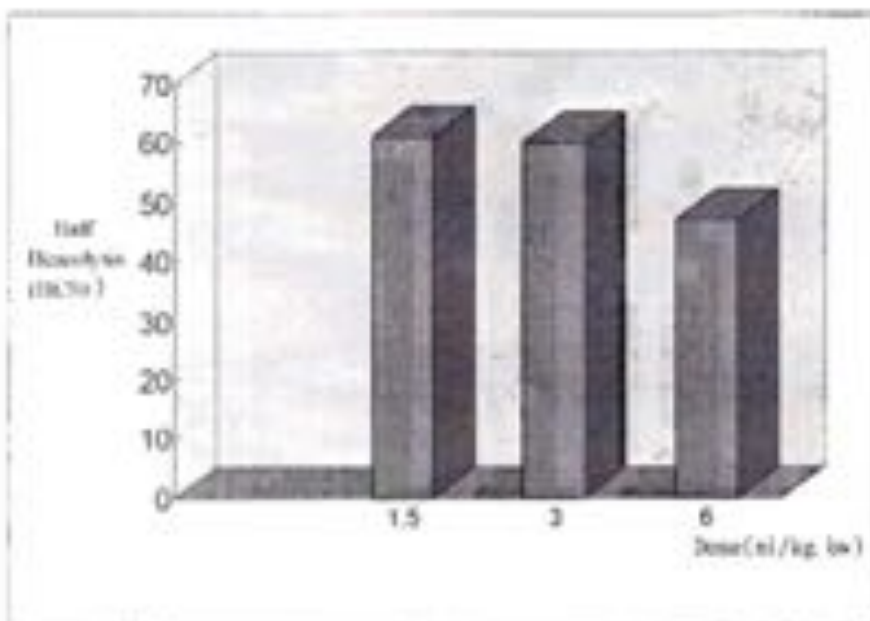
3. The effect of FRC001 on splenic lymphocyte transformation in mouse (Figure 2)



(Figure 2) The effect of FRC001 on splenic lymphocyte transformation in mouse

Splenic lymphocyte transformation reflects cellular immunologic function. From Figure 2, FRC001 had evident influence on splenic lymphocyte transformation. Splenic lymphocyte transformation went up as the increasing of time. The increasing amplitude between 26h and 48h was the biggest. Compared with control, splenic lymphocyte transformation at 24h, 36h, and 48h increased significantly ($P < 0.01$). The result showed FRC001 can enhance cellular immunologic function.

4. The effect of FRC001 on serum hemolysis (Figure 3)



(Figure 3) The effect Curve of FRC001 on serum hemolysis Formation.

Hemolysis(IgM) reflects humoral immunity. Increasing of absorbance at the time half hemolysis takes place(HC50) shows the increasing of hemolysis and enhancement of humoral immunity. According to Figure 3, HC50 went up gradually as the increasing of FRC001. The difference between experiment group and control group was significant ($P < 0.01$). The result showed Edfram had enhance humoral immunity.

5. The effect of FRC001 on GVHR in mice (Table 2)

(Table 2) The effect of FRC001 on GVHR in mice

Group	Number	Administration way	Dose (mg/kg × d)	Host Reaction Index(mg spleen/g.w)	Stimulu Index (SI)
Normal	8	ig	0	7.76±1.14***	-
Control	8	ig	6.0 × 10	9.82±1.36**	1.22
FRC001	8	ig	6.0 × 10	12.96±1.88	1.96

Compared with FRC001 group, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

GVHR reflects cellular immunologic function by host reaction index and stimulus index. According to Table e, host reaction index and stimulus index of FRC001 group was obviously higher than normal group(without any treatment) and control group (fed with distilled water only)($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The result shows Edfram can increase and enhance cellular immunologic function.

All of these results shows FRC001 had some influence on nonspecific immunity of experimental mice. The regulation function of FRC001 to immunity may be related to its components. It is reported that Chinese drugs with the function of invigorating Qi, blood and warming Yang, etc contain many bioactive components which can enhance the function of reticuloendothelial system, antibody formation, specific and nonspecific immunity. In addition, free radical scavengers in Chinese drugs have cooperative function in protecting immunologic organs, regulating immunity, enhancing immunologic factors, etc. FRC001 contains components which can invigorate Qi and blood, warm blood and scavenge free radicals. Then the components which play roles in regulating immunity and their action intensity, best bioeffect are waiting for future study.

REFERENCES

- [1] Yu He, et al. Tumor and Immunity, Shanghai Science and Technology Press, 1982, 114
- [2] Cai Limian, Tang Zhangyou, Study on Growth Condition of Primary Carcinoma of Liver and Host Macrophage Activity, 1989, 8(4) 264
- [3] Yang Guizheng, Xu Yiping, Lymphocyte Function Test, Clinical Immunologic Technology, Shanghai Science and Technology Press, 1982, 314
- [4] Wang Yixian, et al. The Study on Antitumor Science and Technology Press, Beijing, 1996, 337-378
- [5] Zhou Junfang, et al. The Effect of Stress on Tumor Metastasis and the Immunologic Mechanism, Cancer 1992, 11(2) 107-110
- [6] Cheng Qin, Antiaging Research Experimental Methods, Chinese Medical Science and Technology Press, Beijing, 1996, 337-378
- [7] Tao Yixian, et al. Clinical Immunologic Test, Shanghai Science and Technology Press, 1983, 105
- [8] Xu Xueying, et al. An Improved Humoral Immunity Test-Hemolysin Assay, Pharmaceutical Acta 1979, 14(7) 443
- [9] Xu Shikai et al. Antiaging Materia Medica, 1st edition Chinese Medical Science and Technology Press, Beijing, 1995, 164-165
- [10] Li Denghua, Tian Zhigang, Zhang Jie, et al. Rapid Determination of Cytotoxicity of Drugs on Suspended Tumor Cell, 1991, 10(3) 226-228
- [11] Ader R. Psychoneuro immunology. New York, Academic Press Inc, 1981, 37
- [12] Tsutomu Okimura, et al. Effect of Restraint stress on Delay Type-1-sens-activity and Phagocytosis in Mice, J Pharmacol, 1986, 41, 229
- [13] Brown RE et al. Fatty Acids and Inhibition of Mitogen-Induced Lymphocyte Transformation by leukemic serum. J Immunol, 1983, 131, 101