

山楂黄酮对小鼠脾淋巴细胞的免疫调节作用

王一伦, 李敬双, 李美莹, 于 洋*

(锦州医科大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121001)

摘要:为研究山楂黄酮对小鼠脾淋巴细胞的免疫调节作用,将小鼠分为空白组、左旋咪唑组和不同浓度山楂黄酮处理组(100、200、400和800 $\mu\text{g/mL}$)。利用MTT法检测山楂黄酮对淋巴细胞增殖的影响,ELISA法检测山楂黄酮对淋巴细胞白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-4(IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)的影响,流式细胞术检测山楂黄酮对淋巴细胞膜表面标志物(CD4^+ 和 CD8^+)的影响。结果表明,山楂黄酮在100~400 $\mu\text{g/mL}$ 对淋巴细胞增殖和淋巴细胞因子的分泌具有浓度依赖性,IL-6和IFN- γ 的分泌极显著高于空白组($P < 0.01$),IL-4的分泌极显著低于空白组($P < 0.01$),且400 $\mu\text{g/mL}$ 处理组与左旋咪唑组无统计学意义($P > 0.05$);对淋巴细胞亚群 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ 具有浓度依赖性的促进作用,且极显著高于空白组、左旋咪唑组($P < 0.01$);对淋巴细胞亚群 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 百分比极显著高于空白组、左旋咪唑组($P < 0.01$),200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 的比值极显著高于其它浓度组($P < 0.01$)。100~400 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮通过诱导淋巴细胞增殖和淋巴细胞因子IL-6、IL-4和IFN- γ 的分泌,提高淋巴细胞亚群 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值,从而发挥免疫调节作用。

关键词:山楂黄酮,淋巴细胞增殖,细胞因子,淋巴细胞膜表面标志,免疫调节

Immunoregulatory Effect of Hawthorn Flavonoids on Spleen Lymphocytes in Mice

WANG Yi-lun, LI Jing-shuang, LI Mei-ying, YU Yang*

(College of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: To study the immunomodulatory effect of hawthorn flavonoids on spleen lymphocytes in mice, mice were divided into blank group, levamisole group and hawthorn flavonoids treatment group (100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g/mL}$). MTT method was used to detect the effect of hawthorn flavonoids on lymphocyte proliferation. ELISA method was used to detect the effect of hawthorn flavonoids on lymphocyte interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ). Flow cytometry was used to detect the effect of hawthorn flavonoids on lymphocyte membrane surface markers (CD4^+ and CD8^+). Results showed that hawthorn flavonoids had concentration dependence on lymphocyte proliferation and lymphocyte factor secretion ranged from 100 to 400 $\mu\text{g/mL}$. The secretion of IL-6 and IFN- γ were higher than that of the blank group extremely significant ($P < 0.01$), and the secretion of IL-4 was lower than that of the blank group extremely significant ($P < 0.01$), and there was no statistical significance between the 400 $\mu\text{g/mL}$ treatment group and levamisole group ($P > 0.05$). The percentage of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ and $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ in lymphocyte subsets had a concentration-dependent promoting effect, which was higher than that in blank group and levamisole group extremely significant ($P < 0.01$). The percentage of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in lymphocyte subsets was higher than that in blank group and levamisole group extremely significant ($P < 0.01$), and the ratio of $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in 200 $\mu\text{g/mL}$ treatment group was higher than that in other concentration groups ($P < 0.01$). Hawthorn flavone could enhance the $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ ratio of lymphocyte subpopulation by inducing lymphocyte proliferation and secretion of lymphocyte factors IL-6, IL-4 and IFN- γ ranged from 100 to 400 $\mu\text{g/mL}$, and it played an immunomodulatory role.

Key words: hawthorn flavonoids; lymphocyte proliferation; cytokines; surface marker of lymphocyte membrane; immunoregulation

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)20-0127-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.021

引文格式: 王一伦, 李敬双, 李美莹, 等. 山楂黄酮对小鼠脾淋巴细胞的免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 127-132, 145.

山楂为蔷薇科植物, 又名山里红 (*Crataegus pinnatifida* var. *major* N.E.Brown), 味酸甘性微温, 其主

收稿日期: 2019-01-28

作者简介: 王一伦 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能因子与健康的相关性, E-mail: w916862892@163.com。

* 通讯作者: 于洋 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能因子与健康的相关性, E-mail: spyuyang@163.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (20170540369, 20170540357); 2018年辽宁省大学生创新创业训练计划项目 (201810160014)。

要成份有金丝桃苷、槲皮素、芦丁等黄酮类成份和柠檬酸、山楂酸、延胡索酸、熊果酸等有机酸类成份,具有消食健胃、行气散瘀功能,用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、疝气疼痛、高脂血症等^[1]。山楂是药源的优质补品,尤其是维生素 C、黄酮类和三萜类化合物。因此,它经常被用作减肥和辅助降血脂的原料^[2]。由于其特殊的保健价值,近年来对山楂的需求量越来越大。山楂主要含有黄酮类、低聚黄烷类、有机酸类、三萜类、甾体类和有机胺类等成分^[3]。研究发现,山楂黄酮具有调节血脂^[4]、扩张血管^[5]、助消化^[6]和抗癌^[7-8]等作用,同时,它具有抗氧化、保护大脑、保护肝脏和保护肾脏等药理作用^[9-10]。常江等^[11]、金治萃等^[12]用 100% 山楂煎剂给小鼠灌胃,证实山楂煎剂对小鼠胸腺和脾重量、T 淋巴细胞转化率、T 淋巴细胞 ANAE (+) (酸性 α -醋酸奈脂酶) 细胞百分率、小鼠红细胞 C3b 受体花环率及红细胞免疫复合物 (IC) 花环率均有明显增高作用,说明对小鼠细胞免疫与红细胞免疫有促进作用。目前,关于山楂黄酮的降脂、抗癌、免疫增强和抗氧化功能的报道越来越多,但其机制尚不十分明确。山楂黄酮毒性低,不良反应少,有望发展成新的中药^[13],为了广泛应用于临床和保健食品,山楂降血脂、抗癌、抗氧化和增强免疫力的研究仍将是未来研究重点,因此,进一步探讨其作用机制对于山楂的深入开发和山楂药用价值的提高具有重要意义。

为探讨山楂黄酮的免疫调节活性,本研究采用 MTT 法观察山楂黄酮对小鼠脾淋巴细胞增殖,ELISA 法检测 IL-6、IL-4 和 IFN- γ 的表达,流式细胞术观察细胞膜表面标志的作用,为山楂黄酮的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

Balb/c 小鼠 (生产许可证号 SCXK (辽) 2014-0004, SPF 级) 体重 (20 $\pm$ 2) g, 6~8 周龄,锦州医科大学生命科学院;山楂黄酮 纯度 $\geq$ 93%, 山东临沂爱康药业有限公司;新生牛血清 浙江天杭生物科技有限公司产品;甲基噻唑蓝 (MTT)、台盼蓝、RPMI-1640 培养基、二甲基亚砜 (DMSO)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 北京索莱宝科技有限公司;小鼠 IL-4、IL-6、IFN- γ 细胞因子检测试剂盒 上海加科生物科技有限公司;CD4/L3T4-PE、CD8/Lyt-2-FITC 荧光标记抗体 德国美天旎生物技术有限公司。

Varioskan FlashT 多功能酶标仪 Thermo Fisher Scientific;SW-CJ-1F 型超净工作台 苏州净化设备有限公司;CKX41SF 型倒置显微镜 日本 OLYMPUS 公司;TD5A 型低速离心机 湖南赫西仪器装备有限公司;TDL80-2B 型台式离心机 上海安亭;CO₂ 培养箱 日本 SHELLAB;BD FACSCelesta 型流式细胞仪 美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 淋巴细胞悬液制备 参考桑卡娜等^[14]、Li

等^[15]实验方法,小鼠用颈部断髓法处死,75% 酒精浸泡 3 min 消毒,将脾脏放入无菌超洁净工作台,用 PBS 冲洗 2 次,将其置于 RPMI-1640 培养基中,用注射器手柄研磨并通过 200 目筛网过滤。将收集的滤液置于离心管中,4 $^{\circ}$ C 以 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 Tris-NH₄Cl 3 mL 裂解红细胞,静置 5 min,4 $^{\circ}$ C 1500 r/min 离心 5 min 离心弃去上清液,重复操作直至红细胞完全裂解。通过 RPMI-1640 完全培养基沉淀细胞并过滤,经台盼蓝染色检测使细胞活力达 95% 以上。再加入 RPMI-1640 完全培养基,并将细胞密度调节至 5×10^6 个/mL,得到淋巴细胞悬浮液。

1.2.2 实验分组及处理 实验分为空白组、左旋咪唑组 (阳性对照组)、山楂黄酮处理组,每组均设 5 复孔。空白组每孔加入 RPMI-1640 完全培养基,左旋咪唑每孔加入含有左旋咪唑 (5 μ g/mL) 的 RPMI-1640 完全培养基,山楂黄酮处理组每孔加入含不同浓度山楂黄酮 (100、200、400、800 μ g/mL) 的 RPMI-1640 完全培养基。

1.2.3 山楂黄酮对淋巴细胞增殖的影响 参考 Yu 等^[16]实验方法,使用 96 孔细胞培养板,每孔中加入 100 μ L 淋巴细胞悬浮液。按照 1.2.2 实验分组及处理,每孔再加入 100 μ L 相对应的 RPMI-1640 完全培养基。37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养 48 h,每孔加入 20 μ L MTT 液,继续培养 4 h,弃去上清液,加入 150 μ L DMSO,用酶标仪在 570 nm 下测定 OD 值,以增殖指数 (PI) 反映小鼠脾淋巴细胞增殖率。

$$PI(\%) = OD_{\text{实验组}} \times 100 / OD_{\text{对照组}}$$

1.2.4 山楂黄酮对淋巴细胞分泌细胞因子的影响 参考 Li 等^[17]实验方法,使用 24 孔细胞培养板,每孔中加入 1 mL 淋巴细胞悬浮液。按照 1.2.2 实验分组及处理,每孔再加入 1 mL 相对应的 RPMI-1640 完全培养基。37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养 48 h 后,4 $^{\circ}$ C 以 1500 r/min 离心 5 min,收集上清液。通过 ELISA 法检测山楂黄酮对淋巴细胞 IL-4、IL-6 和 IFN- γ 分泌的影响,并根据小鼠细胞因子试剂盒的说明书进行操作。

1.2.5 山楂黄酮对淋巴细胞膜表面 CD4⁺/CD8⁺ 的影响 参考 Matsuzaki 等^[18]实验方法,使用 24 孔细胞培养板,每孔中加入 1 mL 淋巴细胞悬浮液。按照 1.2.2 实验分组及处理,每孔再加入 1 mL 相对应的 RPMI-1640 完全培养基。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。收集细胞于离心管中,4 $^{\circ}$ C 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 2 mL PBS,吹匀,4 $^{\circ}$ C 以 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复 2 次。加入 1 mL 70% 冰乙醇,吹匀后 -20 $^{\circ}$ C 固定细胞 12 h。4 $^{\circ}$ C 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,PBS 洗 2 次,PBS 重悬细胞,加入荧光标记抗体 CD4/L3T4-PE (150 μ g/mL)、CD8a/Lyt-2-FITC (30 μ g/mL),4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min,PBS 洗 1 次,500 μ L PBS 重悬细胞,200 目尼龙膜过滤,流式细胞仪检测 CD4 和 CD8 表达量的变化,每个样品计数 10^4 个细胞,数据分析软件 (ModFit LT) 分析检测结果,结果以 CD4⁺CD8⁻、

CD4⁺CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺百分率表示山楂黄酮对小鼠淋巴细胞亚群的影响。

$$CD4^+/CD8^+(\%) = CD4^+CD8^- \times 100 / CD4^+CD8^+$$

1.3 数据处理

每组数据表示为平均数 ± 标准差。使用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行统计分析,数值以 ($\bar{X} \pm S$) 表示,单因素方差分析用于组间比较,以 LSD 法进行显著性检验,检验水准 $P = 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 山楂黄酮对淋巴细胞增殖的影响

由图 1 可以看出,左旋咪唑组的淋巴细胞增殖指数极显著高于空白组 ($P < 0.01$);与空白组相比,山楂黄酮处理组淋巴细胞增殖指数极显著升高 ($P < 0.01$),浓度范围为 100~400 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞增殖指数随山楂黄酮浓度的升高而升高,呈良好的剂量-效应关系;将山楂黄酮浓度升高至 800 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞增殖指数反而极显著下降 ($P < 0.01$);表明山楂黄酮能促进淋巴细胞增殖,且呈低浓度 (100~400 $\mu\text{g/mL}$) 促进、高浓度 (800 $\mu\text{g/mL}$) 抑制的双向调节作用。这可能是因为山楂黄酮在动物体的细胞膜功能和酶促反应中起重要作用,并且适量补充了山楂黄酮,它可以增强淋巴细胞膜的功能及相关酶的活性^[19],从而加速细胞分裂,增加细胞增殖率。山楂黄酮可以诱导细胞分裂和增殖相关基因的 RNA 转录,增加 RNA 含量,促进相关蛋白的表达,进而诱导脾脏淋巴细胞的增殖^[20]。与左旋咪唑组相比,浓度为 100、200 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 的山楂黄酮淋巴细胞增殖指数显著降低 ($P < 0.01$),山楂黄酮的浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的淋巴细胞增殖指数无统计学意义 ($P > 0.05$)。

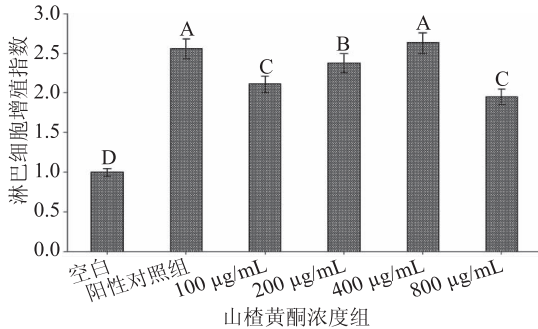


图 1 山楂黄酮对淋巴细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of hawthorn flavone on lymphocyte proliferation

注:图中大写字母表示组间差异极显著, $P < 0.01$;图 2~图 4 同。

2.2 山楂黄酮对淋巴细胞分泌的细胞因子的影响

2.2.1 山楂黄酮对淋巴细胞 IL-6 分泌的影响 由图 2 可以看出,左旋咪唑组的淋巴细胞分泌 IL-6 的影响极显著高于空白组 ($P < 0.01$);与空白组相比,山楂黄酮处理组淋巴细胞 IL-6 分泌量极显著升高 ($P < 0.01$),浓度范围为 100~400 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞 IL-6 分泌量随山楂黄酮浓度的升高而升高,呈良好的剂量-效应关系,继续升高山楂黄酮浓度至 800 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞 IL-6 分泌量反而下降;表明山楂黄酮能促进淋巴细胞 IL-6 的分泌,且呈低浓度

(100~400 $\mu\text{g/mL}$) 促进、高浓度 (800 $\mu\text{g/mL}$) 抑制的双向调节作用。这可能是因为 IL-6 是免疫调节细胞因子家族的成员,是 Th2 细胞分泌的细胞因子,属于先天性免疫系统的细胞因子,在组织修复、调控 B 细胞、参与炎症反应、活化自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 中起着重要的作用,是一类参与 T 细胞反应,具有治疗潜力的多功能因子^[21]。与左旋咪唑组相比,400 $\mu\text{g/mL}$ 组山楂黄酮中淋巴细胞 IL-6 的分泌量无统计学意义 ($P > 0.05$),其余各浓度组均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

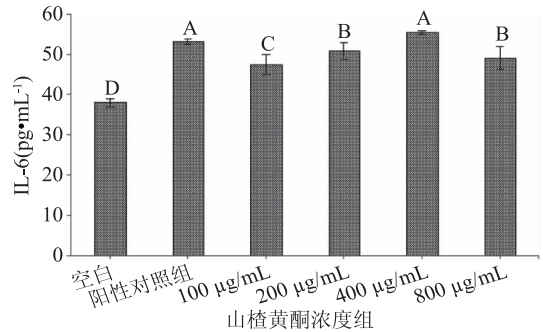


图 2 山楂黄酮对淋巴细胞 IL-6 分泌的影响

Fig.2 Effect of hawthorn flavone on secretion of IL-6 in lymphocytes

2.2.2 山楂黄酮对淋巴细胞 IL-4 分泌的影响 由图 3 可以看出,左旋咪唑组的淋巴细胞分泌 IL-4 的影响极显著低于空白组 ($P < 0.01$);与空白组相比,山楂黄酮处理组淋巴细胞 IL-4 分泌量显著降低 ($P < 0.01$),浓度范围为 100~400 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞 IL-4 分泌量随山楂黄酮浓度的升高而降低,呈良好的剂量-效应关系,继续升高山楂黄酮浓度至 800 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞 IL-4 分泌量反而升高;表明山楂黄酮能抑制淋巴细胞 IL-4 的分泌,且呈低浓度 (100~400 $\mu\text{g/mL}$) 降低、高浓度 (800 $\mu\text{g/mL}$) 升高的双向调节作用。这可能是因为 IL-4 可以诱导 Th0 细胞分化为 Th2 细胞,促进活化的 B 细胞和 T 细胞增殖,是体液免疫和获得性免疫关键的调节因子^[22]。与左旋咪唑组相比,400 $\mu\text{g/mL}$ 组山楂黄酮中淋巴细胞 IL-4 的分泌量无统计学意义 ($P > 0.05$),其余各浓度组均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

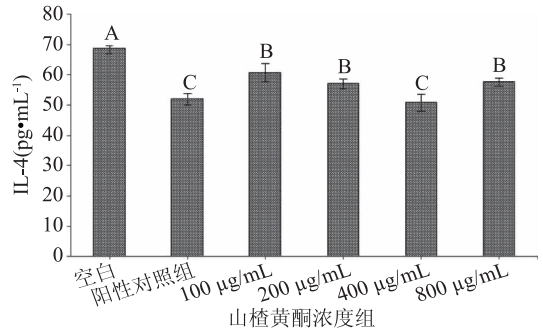


图 3 山楂黄酮对淋巴细胞 IL-4 分泌的影响

Fig.3 Effect of hawthorn flavone on secretion of IL-4 in lymphocytes

2.2.3 山楂黄酮对淋巴细胞 IFN- γ 分泌的影响 由

图4可以看出,左旋咪唑组的淋巴细胞分泌IFN- γ 的影响极显著高于空白组($P < 0.01$);与空白组相比,山楂黄酮处理组淋巴细胞IFN- γ 分泌量极显著升高($P < 0.01$)。浓度范围为100~400 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞IFN- γ 分泌量随山楂黄酮浓度的升高而升高,呈良好的剂量-效应关系,继续升高山楂黄酮浓度至800 $\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞IFN- γ 分泌量反而下降;表明山楂黄酮能促进淋巴细胞IFN- γ 的分泌,且呈低浓度(100~400 $\mu\text{g/mL}$)促进、高浓度(800 $\mu\text{g/mL}$)抑制的双向调节作用,这可能是因为IFN- γ 可以增强NK细胞、Tc和其他细胞的免疫活性,激活巨噬细胞并促进其功能,激活中性粒细胞功能和NK细胞杀伤力等作用^[23],主要由T细胞、自然杀伤细胞等淋巴细胞分泌产生,并可在Th1型细胞中诱导免疫应答,具有免疫调节作用^[24-25]。与左旋咪唑组相比,400 $\mu\text{g/mL}$ 组山楂黄酮中淋巴细胞IFN- γ 的分泌量无统计学意义($P > 0.05$),其余各浓度组均有统计学意义($P < 0.01$)。Th细胞是机体重要的免疫调节细胞,可分为Th1、Th2、Th0三种,分别产生不同的细胞因子调节细胞和体液免疫。Th1和Th2细胞功能的正常和相互间保持平衡,是维持正常免疫功能和身体健康的基础。

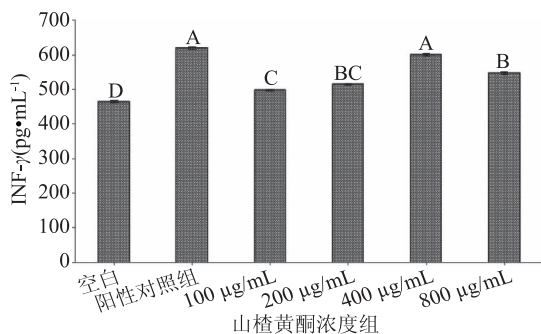


图4 山楂黄酮对淋巴细胞IFN- γ 分泌的影响

Fig.4 Effect of hawthorn flavone

on secretion of IFN- γ in lymphocytes

2.3 山楂黄酮对淋巴细胞膜表面标志的影响

山楂黄酮对淋巴细胞膜表面标志的影响见表1和图5。

2.3.1 山楂黄酮对淋巴细胞亚群CD4⁺CD8⁻百分比的影响 由表1可以看出,左旋咪唑组淋巴细胞亚群CD4⁺CD8⁻百分比极显著高于空白组($P < 0.01$);与空白组和左旋咪唑相比,山楂黄酮各浓度组淋巴

细胞亚群CD4⁺CD8⁻百分比均极显著升高($P < 0.01$);CD4⁺T是辅助性T细胞表面标志,是免疫反应的中心细胞,它通过分泌多种淋巴因子激活其他T、B细胞亚群及参与免疫反应的其他细胞,使其增殖和分化^[26]。山楂黄酮各浓度组之间比较,山楂黄酮为400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组淋巴细胞亚群CD4⁺CD8⁻百分比均极显著($P < 0.01$)高于其它浓度组。

2.3.2 山楂黄酮对淋巴细胞亚群CD4⁻CD8⁺百分比的影响 由表1可以看出,左旋咪唑组淋巴细胞亚群CD4⁻CD8⁺百分比显著高于空白组($P < 0.01$);与空白组和左旋咪唑相比,山楂黄酮各浓度组淋巴细胞亚群CD4⁻CD8⁺百分比均极显著升高($P < 0.01$);CD8⁺T是杀伤性T细胞(CTL)和抑制性T细胞(Ts)表面标志,是免疫反应的效应细胞^[27]。山楂黄酮各浓度组之间比较,山楂黄酮为400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组淋巴细胞亚群CD4⁻CD8⁺百分比均极显著($P < 0.01$)高于其它浓度组。

2.3.3 山楂黄酮对淋巴细胞亚群CD4⁺/CD8⁺比值的影响 由表1可以看出,左旋咪唑组淋巴细胞亚群CD4⁺/CD8⁺比值极显著高于空白组($P < 0.01$);与空白组和左旋咪唑相比,山楂黄酮各浓度组淋巴细胞亚群CD4⁺/CD8⁺百分比均极显著升高($P < 0.01$);CD4⁺/CD8⁺的比例反映了体内T淋巴细胞亚群的比例,可以更好地反映机体的免疫状态,它是监测细胞免疫功能和反映机体免疫状态的重要指标^[28-29]。山楂黄酮各浓度组之间比较,山楂黄酮为200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组淋巴细胞亚群CD4⁺/CD8⁺比值均极显著($P < 0.01$)高于其它浓度组。

3 讨论

3.1 山楂黄酮对淋巴细胞增殖的影响

本研究表明,在体外培养时,添加100~800 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮可以显著提高脾脏淋巴细胞增殖率,当添加量为400 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮时,可以显著促进淋巴细胞的增殖。脾脏是动物机体重要的外周淋巴器官,它也是免疫反应的主要部位,体内大部分体液和细胞免疫都是在脾脏中完成的^[30]。脾脏免疫功能的正常发挥与其生长发育和组织结构密切相关,而脾脏则是由大量的淋巴细胞组成的,因此,可以说脾脏生长发育的优劣取决于脾脏内淋巴细胞的增殖和凋亡。辛欢欢等^[31]通过白花蛇舌草黄酮注射液对小鼠脾淋巴细胞的免疫增强作用的研究,结果发现,白花蛇舌草黄酮能够极显著促进小鼠脾脏淋巴细胞的增

表1 山楂黄酮对脾淋巴细胞CD4⁺/CD8⁺表达的影响

Table 1 Effect of hawthorn flavonoids on CD4⁺/CD8⁺ expression in spleen lymphocytes

组别	CD4 ⁺ CD8 ⁻ (%)	CD4 ⁻ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)
空白组	0.312 ± 0.175 ^E	0.857 ± 0.359 ^F	0.364 ± 0.377 ^F
左旋咪唑组	0.810 ± 0.076 ^D	1.257 ± 0.146 ^E	0.644 ± 0.115 ^E
100 $\mu\text{g/mL}$ 实验组	1.364 ± 0.329 ^C	1.319 ± 0.167 ^D	1.034 ± 0.802 ^B
200 $\mu\text{g/mL}$ 实验组	1.923 ± 0.236 ^B	1.557 ± 0.135 ^C	1.235 ± 2.083 ^A
400 $\mu\text{g/mL}$ 实验组	2.983 ± 0.138 ^A	2.993 ± 0.107 ^A	0.997 ± 1.067 ^C
800 $\mu\text{g/mL}$ 实验组	1.370 ± 0.123 ^C	2.087 ± 0.226 ^B	0.656 ± 0.087 ^D

注:表中同列不同大写字母表示组间差异极显著($P < 0.01$)。

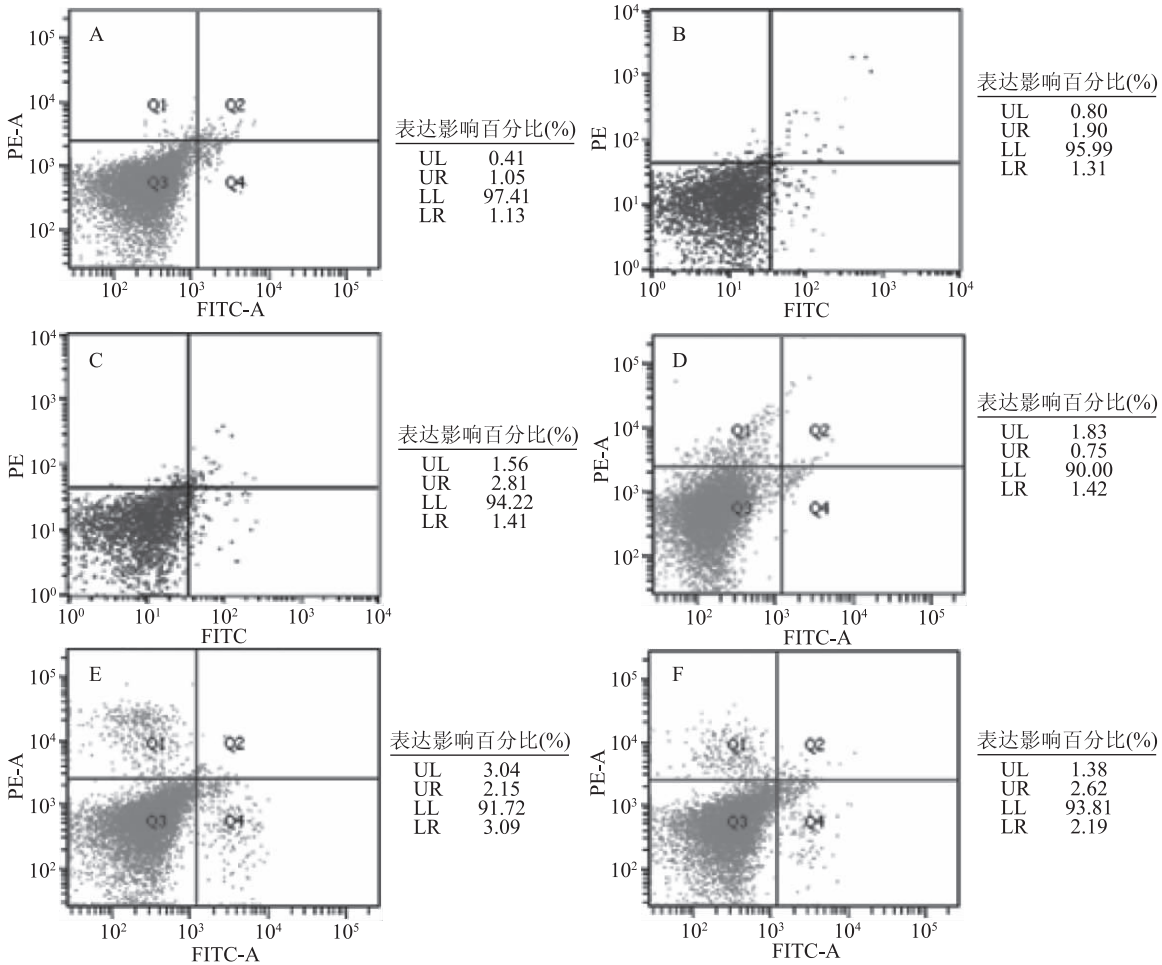


图5 山楂黄酮对淋巴细胞膜表面标志的影响

Fig.5 Effect of hawthorn flavonoids on lymphocyte membrane surface markers

注:A:空白对照组;B:左旋咪唑组;C:100 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮浓度组;D:200 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮浓度组;

E:400 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮浓度组;F:800 $\mu\text{g/mL}$ 山楂黄酮浓度组;纵坐标:CD4⁺;横坐标:CD8⁺;

UL:CD4⁺ 单阳;UR:CD4⁺ 和 CD8⁺ 双阳;LL:CD4⁺ 和 CD8⁺ 双阴;LR:CD8⁺ 单阳。

殖,并呈剂量依赖关系,随着剂量增加,增殖作用逐渐增强。

3.2 山楂黄酮对淋巴细胞分泌细胞因子的影响

机体的免疫细胞可以通过分泌细胞因子来发挥免疫作用,本研究主要测定了淋巴细胞几个重要细胞因子 IL-6、IL-4 和 IFN- γ 的分泌。研究表明,山楂黄酮可浓度依赖性增加淋巴细胞中细胞因子 IL-6 浓度。IL-6 是由 Th2 产生的主要正性免疫调节因子,其促进 B 细胞增殖、分化和抗体的产生,其主要免疫学功能是加强其它细胞因子的效果。山楂黄酮可使淋巴细胞分泌细胞因子 IL-4 水平呈浓度依赖性降低,IL-4 和 IFN- γ 处于拮抗状态,IFN- γ 阻止 IgE 和 IgG 的生成;IFN- γ 抑制 IL-4R 的表达,并影响 IL-4、IL-5 的产生^[32]。山楂黄酮可使淋巴细胞分泌细胞因子 IFN- γ 水平呈浓度依赖性升高,其机制是诱导多种抗原提呈细胞表达 MHC-I/II 分子,活化单核和巨噬细胞,促进 Th1 细胞发育和抑制 Th2 细胞活化和增殖,并刺激 B 细胞产生的抗体转变为调理作用。刘小雨等^[33]通过淫羊藿总黄酮对衰老大鼠脾淋巴细胞 Th1、Th2 细胞因子调节作用的研究。结果发现,淫羊藿总黄酮可校正老龄大鼠 Th1、Th2

细胞因子的失衡,从而有效调控免疫衰老。黄伟宽等^[34]利用沙冬青种子总黄酮对免疫抑制小鼠的免疫功能进行研究,结果发现,不同剂量的沙冬青种子总黄酮能不同程度提高免疫抑制小鼠胸腺和脾指数、碳粒廓清指数、吞噬指数以及血清 IL-2 和 IL-4 含量。曹柏营等^[35]通过藤本豆豆荚总黄酮对正常小鼠免疫功能及体内抗氧化活性影响的研究,结果发现,藤本豆豆荚总黄酮可显著提高小鼠血清中干扰素- γ (IFN- γ) mRNA 的表达,诱导 Th1/Th2 平衡。

3.3 山楂黄酮对淋巴细胞膜表面标志的影响

T 淋巴细胞亚群具有细胞免疫效应和免疫调节功能,在机体的细胞免疫反应中占有非常重要的地位,CD4 和 CD8 是 T 细胞重要的表面抗原标志,广泛用作评估细胞免疫功能变化的标准。本研究表明,山楂黄酮可以增加淋巴细胞中 CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺ 表型的淋巴细胞亚群的百分比,增加 CD4⁺/CD8⁺ 比例,山楂黄酮在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时的作用优于其它浓度组,增加淋巴细胞亚群的 CD4⁺/CD8⁺ 比例,表明山楂黄酮可通过增加单阳性淋巴细胞亚群的数量来发挥免疫调节作用。刘丽等^[36]在大豆异黄酮对辐射小鼠 T 淋巴细胞亚群影响的研究中,发现辐射可

降低小鼠外周血 CD4 和 CD8 百分比,CD8 的变化具有统计学意义;胸腺和脾脏中 CD4 百分比增加、CD8 百分比降低,CD4 的显著增加($P < 0.05$),补充大豆异黄酮可以增加血液中 CD4 比例,但对辐射引起的 CD8 变化没有明显作用。结果表明,大豆异黄酮可以对辐射小鼠的 T 淋巴细胞亚群起辐射防护作用。

4 结论

山楂黄酮在 100~400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,对小鼠脾淋巴细胞体外增殖均有促进作用;山楂黄酮也能调节 Th1 细胞因子($\text{IFN-}\gamma$)以及 Th2 细胞因子(IL-6、IL-4)分泌,浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时效果最为明显,且与阳性对照组差异不显著($P > 0.05$);同时,山楂黄酮还能提高淋巴细胞亚群 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比例,提高淋巴细胞进入 DNA 合成期的百分比,浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时效果最为明显;山楂黄酮具有显著的免疫增强作用。

参考文献

- [1] 薛洁,夏昌隆.山楂药理研究进展[J].新疆中医药,2002(4):69-72.
- [2] 孟庆杰,王光全,张丽.山楂功能因子及其保健食品的开发利用[J].食品科学,2006,27(12):873-877.
- [3] 刘家兰,徐晓玉.山楂的药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(S1):63-66.
- [4] 王玲,吴军林,吴清平,等.山楂降血脂作用和机理研究进展[J].食品科学,2015,36(15):245-248.
- [5] 楼陆军,罗洁霞,高云.山楂的化学成分和药理作用研究概述[J].中国药业,2014,23(3):92-94.
- [6] 张翠利,付丽娜,杨小云,等.山楂黄酮的提取及咀嚼片的研制[J].食品研究与开发,2018,39(9):33-39.
- [7] 董贺,张太平,李俊,等.山楂中谷固醇抑制肿瘤细胞的研究[J].中国生化药物杂志,2009,30(4):270-272.
- [8] 林科,张太平,朱顺,等.山楂熊果酸的制备及对小鼠免疫功能 and 肝癌细胞凋亡的影响[J].中国生化药物杂志,2007(5):308-311.
- [9] 胡琦,王海燕,陈泊宇,等.山楂黄酮对微波辐射大鼠肾脏损伤的治疗作用[J].吉林医药学院学报,2016,37(3):175-177.
- [10] 罗军,伍胶,毛青花,等.山楂黄酮对微波辐射所致 Wistar 大鼠脑损伤的治疗作用[J].吉林大学学报:医学版,2013,39(2):291-293,429.
- [11] 常江,金治革,高光,等.山楂煎剂对小鼠细胞免疫的影响[J].包头医学院学报,1996(4):10-11.
- [12] 金治革,贾彦彬,王晓立,等.山楂、枸杞煎剂对红细胞免疫功能的影响[J].包头医学院学报,1997(1):8-9.
- [13] 于蓓蓓,闫雪生,孙丹丹.山楂药理作用及其机制研究进展[J].中南药学,2015,13(7):745-748.
- [14] 桑卡娜,高艳艳,周德刚.五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响[J].中国兽药杂志,2017,51(3):44-47.
- [15] Li H, Hong T, Jiang H, et al. The effects of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on immune function of mice[C]//2015 7th International Conference on Information Technology in Medicine and Education(ITME),2015:286-288.
- [16] Yu J, Cong L, Wang C, et al. Immunomodulatory effect of *Schisandra* polysaccharides in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice[J]. Experimental and Therapeutic Medicine,2018,15(6):4755-4762.
- [17] Li C, Yan Q, Tang S, et al. Alteration of mevalonate pathway in rat splenic lymphocytes: Possible role in cytokines secretion regulated by L-theanine[J]. Bio Med Research International, 2018,2018(10):1-8.
- [18] Matsuzaki J, Tsuji T, Chodon T, et al. A rare population of tumor antigen-specific $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ double-positive $\alpha\beta$ T lymphocytes uniquely provide CD8-independent TCR genes for engineering therapeutic T cells[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer,2019,7(1):7.
- [19] Naghii M R, Samman S. The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects[J]. Biological Trace Element Research, 1997,56(3):273-286.
- [20] Boyacioglu S O, Korkmaz M, Kahraman E, et al. Biological effects of tolerable level chronic boron intake on transcription factors[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016,39:30-35.
- [21] Polansky J K, Bahri R, Divivier M, et al. High dose CD11c-driven IL15 is sufficient to drive NK cell maturation and anti-tumor activity in a trans-presentation independent manner[J]. Sci Rep,2016,6:19699.
- [22] 马玉芳,郑小香,郑乃珍,等.金线莲多糖协同 ConA 对小鼠脾淋巴细胞分泌 Th1、Th2 型细胞因子及其 mRNA 表达量的影响[J].中国食品学报,2018,18(4):72-78.
- [23] 单增天,田岳凤,李雷勇,等.不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(11):83-86.
- [24] Inoue S I, Niikura M, Mineo S, et al. Roles of $\text{IFN-}\gamma$ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria[J]. Frontiers in Immunology,2013,4:258.
- [25] Habijan J, Berovic M, Boh B, et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17[J]. New Biotechnology,2015,32(1):85-95.
- [26] 刘吉勇,卢芳国,朱惠斌,等.应用环孢菌素 A 制备小鼠免疫缺陷动物模型[J].实用预防医学,2008(5):1376-1378.
- [27] 陈业强,潘宇政,陈永斌,等.脾虚证病人免疫功能的测定[J].广西医科大学学报,1998(3):88-89.
- [28] Li G, Li S, Wang B, et al. The effect of electroacupuncture on postoperative immunoinflammatory response in patients undergoing supratentorial craniotomy[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(3):699-702.
- [29] 张建查,王研,郭远波,等.电针足三里穴对大鼠手术后 T 淋巴细胞免疫功能的影响[J].南方医科大学学报,2018,38(11):1384-1388.
- [30] 裴亚琼,张倩,胡倩倩,等.硼对大鼠脾脏淋巴细胞的毒

(下转第 145 页)

腥物质含量。

3 结论

实验表明,紫苏液、白醋、香芹液均有不同程度的脱腥能力,且随浓度的提高以及浸泡时间的延长,脱腥效果有明显的提升。工艺经优化后,得出最佳复合脱腥工艺为紫苏液 7%、白醋 5%、香芹液 70%、时间 60 min,脱腥效果稳定;脱腥剂均为天然来源,处理条件相对温和,可较大程度保留罗非鱼原有风味。采用 GC-MS 分析罗非鱼加工副产物脱腥处理前后挥发性物质含量变化以评价脱腥工艺效果,结果表明,原料中的主体腥物质醛类、醇类、酮类的峰面积均大幅减少或不再检出,标志性物质己醛与 1-辛烯-3-醇含量明显降低,表明复合脱腥剂脱腥效果良好。此工艺工序较为简单,脱腥剂来源广泛,适用于产业化生产,为罗非鱼加工副产物高值化改革提供新思路。

参考文献

[1]农业部渔政渔业管理局.中国渔业统计年鉴.2018[M].北京:中国农业出版社,2018.

[2]粮农组织渔业及水产养殖部.2018 世界渔业和水产养殖状况[M].北京:联合国粮食及农业组织,2018.

[3]赵志霞,吴燕燕,李来好,等.我国罗非鱼加工研究现状[J].食品工业科技,2017,38(9):363-367,373.

[4]Lee Chi H, Singla Anuj, Lee Yuyung. Biomedical applications of collagen[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221(1-2):1-22.

[5]Olsen Ragnar L, Toppe Jogeir, Karunasagar Iddya. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish[J]. Trends in Food Science and Technology, 2014, 36(2):144-151.

[6]吴燕燕,朱小静.鱼肉腥味物质的来源及控制方法研究进展[J].中国渔业质量与标准,2016,6(2):14-19.

[7]杨凯,张森,胡乐,等.脱腥剂在我国鱼类脱腥处理中的研究进展[J].食品工业,2018,39(8):223-226.

[8]刘建,姜永江.紫贻贝脱腥工艺条件的优化及其腥物质分析[J].食品工业科技,2017,(17):199-207.

[9]张海燕,吴燕燕,李来好,等.响应面法优化海鲈鱼片脱腥工艺[J].食品与发酵工业,2019,45(11):143-149.

[10]吴燕燕,朱小静,林婉玲,等.香菜和香茅对鲜鲈鱼片的脱腥、抑菌效果[J].中国食品学报,2018,18(12):188-194.

[11]任兴晨.带鱼鱼糜制品的腥物质及脱腥方法[D].杭州:浙江大学,2017.

[12]丁莫,林婉玲,李来好,等.紫苏叶水提物对调理脆肉鲩鱼片冷藏过程中品质的影响[J].食品工业科技,2017(23):250-255.

[13]郑元平,廖飞宝.罗非鱼片脱腥技术比较研究[J].食品工业科技,2011,32(2):217-219,222.

[14]Hao S, Wei Y, Li L, et al. The effects of different extraction methods on composition and storage stability of sturgeon oil[J]. Food Chemistry, 2015, 173:274-282.

[15]冯倩倩,胡飞,李平凡.SPME-GC-MS 分析罗非鱼体中挥发性风味成分[J].食品工业科技,2012,33(6):67-70.

[16]雷跃磊,郑小宁,卢素芳,等.养殖鳊鱼肉紫苏汁脱腥工艺的优化研究[J].食品工业科技,2015,36(7):228-231.

[17]黄名正,李鑫.SDE-GC-MS 分析紫苏挥发性成分[J].安徽农业科学,2018,46(12):182-185.

[18]赫美,许鑫,杨春瑜.食醋对鱼骨中钙溶出的影响[J].现代食品科技,2011(1):87-89.

[19]焦梅,李蓓蓓,聂小华,等.醋渍处理对养殖鲈鱼理化性质的影响[J].食品与发酵工业,2007(11):79-81.

[20]陈奇,张安,何新益.淡水鲢鱼脱腥效果的比较研究[J].食品工业科技,2007(2):146-148.

[21]张玲希,邴帅,董莹莹,等.不同品种芹菜叶中精油的提取及其功效测定[J].天然产物研究与开发,2016,27(7):1194-1198.

[22]徐永霞,姜程程,刘滢,等.带鱼脱腥工艺及脱腥前后的理化性质[J].食品与发酵工业,2013,39(12):68-72.

[23]卢江长美,张超,马越,等.干燥温度对紫苏挥发性物质组成的影响[J].食品科学,2016,37(10):134-138.

[24]Feng Qian, Fei H U, Ping L I. Analysis of volatile compounds of tilapia by solid phase microextraction and GC-MS[J]. Science & Technology of Food Industry, 2012, 33(6):67-70.

[25]康翠翠,施文正,方林,等.不同冻结方式对草鱼肉挥发性成分的影响[J].食品科学,2018,39(14):229-235.

[26]吴靖娜,刘智禹,许永安,等.养殖大黄鱼脱腥工艺研究[J].渔业现代化,2013,40(6):40-45.

(上接第 132 页)

性作用及增殖和凋亡的影响[J].安徽科技学院学报,2018,32(2):7-13.

[31]辛欢欢,李春玲,王贵平.白花蛇舌草黄酮注射液对小鼠脾淋巴细胞的免疫增强作用[J].中国兽医科学,2010,40(7):752-757.

[32]周智东.T 细胞亚群研究进展[J].九江学院学报:自然科学版,2005(1):104-108.

[33]刘小雨,沈自尹,王琦,等.淫羊藿总黄酮(EF)对老龄大鼠 Th1、Th2、Th3 细胞的调节作用[J].中国免疫学杂志,2005

(11):43-46,50.

[34]黄伟宽,刘瑞菊,贾宁,等.沙冬青种子总黄酮对免疫抑制小鼠免疫功能及胸腺和脾超微结构的影响[J].畜牧兽医学报,2018,49(8):1752-1760.

[35]曹柏萱,姜秀娟,戚颖欣,等.藤本豆蔻总黄酮对小鼠免疫功能的影响[J].食品与机械,2017,33(1):158-162.

[36]刘丽,金宏,王先远,等.大豆异黄酮对电离辐射小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J].氨基酸和生物资源,2008(3):66-69.

传播科研知识,共享科技成果