

拐枣多糖对环磷酰胺诱导免疫低下小鼠免疫功能的影响

叶文斌¹, 樊亮¹, 王昱¹, 赵庆芳², 郭守军³, 袁汉伯⁴

(1. 陇南师范高等专科学校农林技术学院, 甘肃成县 742500)(2. 西北师范大学生命科学院, 甘肃兰州 730030)
(3. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041)(4. 中国科学院寒区旱区工程研究所, 甘肃兰州 730000)

摘要: 本文旨在研究拐枣多糖(*Hovenia acerba* Lindl. polysaccharide, HAP)对环磷酰胺(CTX)诱导免疫低下小鼠免疫功能的影响。除空白对照组用生理盐水(NS, 0.1 mL/10 g)灌胃外, 其它各组小鼠于给药的第1、3、5、7、9 d腹腔注射CTX(30 mg/kg)造模。将建模成功体重相近的小鼠随机分为模型组、HAP高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg bw)处理组, 另设正常对照组。连续灌胃给药28 d, 研究HAP对模型小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾淋巴细胞增殖、廓清指数、吞噬指数、半数溶血值、血清中IL-2、IL-4、IFN- γ 生成水平和足趾厚度差等指标的影响。结果显示, HAP各剂量均能显著提高模型小鼠脾脏指数、脾淋巴细胞增殖作用、廓清指数、吞噬指数、半数溶血值及足趾厚度差($p < 0.05$); HAP低、中、高剂量促使IL-2、IL-4、IFN- γ 生成水平均明显提高($P < 0.05$)。研究结果表明, 拐枣多糖对环磷酰胺致免疫低下小鼠的非特异性免疫和特异性免疫具有增强作用。

关键词: 拐枣多糖; 免疫抑制; 免疫功能; 小鼠

文章编号: 1673-9078(2016)07-26-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.005

Effect of the Polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl. on Immune Activity in Cyclophosphamide-Induced Immunodepressed Mice

YE Wen-bin¹, FAN Liang¹, WANG Yu¹, ZHAO Qing-fang², GUO Shou-jun³, YUN Han-bo⁴

(1. School of Agriculture and Forestry Technology, Longnan Teachers College, Chenxian 742500, China) (2. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730030, China) (3. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China) (4. Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The impact of *Hovenia acerba* Lindl. (HAP) polysaccharides on immune activity in cyclophosphamide (CTX)-induced immunodepressed mice was studied. Except for the control group, mouse models for all other groups were constructed by intraperitoneal injection with CTX (30 mg/kg) on days 1, 3, 5, 7, and 9, respectively, and the control group was administrated normal saline (NS, 0.1 mL/10 g) by gavage. After the mouse model was established, mice with similar weight were randomly divided into five groups: normal control group, immunodepression model group, and HAP-treated groups (low-, medium-, and high-dose). The intragastric administration of HAP was performed continuously for four weeks, and the effects of HAP on the thymus and spleen indices, spleen lymphocyte proliferation, clearance index, phagocytic index, the concentration causing 50% hemolysis (HC₅₀), the levels of serum interleukin (IL)-2, IL-4, and interferon gamma (IFN- γ), and the difference in toe thickness in CTX-induced immunodepressed mice were assessed. Compared to the CTX group, the spleen index, clearance index, phagocytic index, spleen lymphocyte proliferation, HC₅₀, and the difference in toe thickness were enhanced significantly ($p < 0.05$) in the HAP groups (with all doses). Levels of serum IL-2, IL-4, and IFN- γ were significantly increased in the low-, medium- and high-dose HAP groups ($p < 0.05$) in CTX-induced immunodepressed mice. These results suggested that HAP could improve non-specific and specific immunological activities in immunodepressed mice.

Key words: polysaccharides from *Hovenia acerba* Lindl.; immunodepression; immune activity; mice

收稿日期: 2015-09-11

基金项目: 国家“863”计划项目(2006EA780088); 广东省科技厅科技计划项目(2007B080701046); 甘肃省自然科学基金项目(1107RJZK243); 冻土工程国家重点实验室自主基金项目(SKLFSE-ZY-05); 甘肃省教育厅项目(2015B-148); 陇南师范高等专科学校重点项目(2014LSZK01001)

作者简介: 叶文斌(1982-), 男, 讲师, 研究方向为天然产物化学与功能食品

免疫是由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成的免疫系统识别抗原的过程,免疫系统在维持机体生理平衡和稳定性起到重要的保护作用,免疫失调会对机体产生有害反应,继而引发超敏反应和自身免疫性疾病^[1-2]。植物多糖类物质具有众多的生物活性而使其成为研究热点,近年来研究表明,多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗辐射、降血糖、血脂等作用^[3-9],植物多糖对免疫功能的调节是多糖活性研究的重点^[2,10],植物多糖的免疫调节是通过激活免疫系统和免疫细胞,提高机体的特异性或非特异性免疫功能而实现的^[11-14]。有些多糖通过对免疫细胞的活性诱导,从而增强NK细胞的功能,提高免疫系统对肿瘤的监测作用,还可促进IL-2的产生,使血单核细胞的免疫活力升高^[2,13-14]。

拐枣(*Hovenia acerba Lindl.*)因其果梗肉质膨大扭曲,肉质肥厚形似鸡爪,味甘甜如枣,故名拐枣。其营养丰富,清凉利尿,解酒醉不醒,可治风湿,有清热利尿、止渴降火和解毒之功效^[15],在甘肃省陇南市徽成盆地广为栽培,产量很高。拐枣多糖(*Hovenia acerba Lindl. Polysaccharides, HAP*)系其主要有效成分,治腋下狐臭和痔疮^[16],同其它植物多糖一样具有复杂的生物活性与功能,而拐枣多糖在免疫功能的作用方面的研究较少。为此,本文采用腹腔注射环磷酰胺(CTX)诱导建立小鼠免疫低下模型,来研究HAP对模型小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾淋巴细胞增殖、廓清指数、吞噬指数、半数溶血值、血清中IL-2、IL-4、IFN- γ 生成水平和足趾厚度差等指标的影响,旨在探讨拐枣多糖对小鼠免疫功能的影响,以探究其对免疫低下小鼠的保护作用,为开发拐枣免疫增强剂提供理论依据,使拐枣的价值得到充分利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料与动物

拐枣采自甘肃省陇南市成县支旗镇梁旗村;昆明小鼠SPF级(Kunming mice, KM小鼠,雌雄各半),动物合格证号:甘医动字第14-005号,体重18~22g,实验动物和饲料均购自兰州大学医学院实验动物中心,实验动物生产许可证:SCXK(甘)2009-0004。

1.1.2 实验药品

注射用环磷酰胺,百特国际有限公司(批号:2J676A);印度墨汁,北京笃信精细制剂厂;绵羊红细胞(SRBC)郑州百基生物科技有限公司;刀豆蛋白(ConA),华美生物工程公司;噻唑蓝(MTT),

韩国Biosharp公司;IL-2、IL-4、IFN- γ ELISA试剂盒,上海酶联免疫公司等。

1.1.3 主要仪器

RE52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HH-6 数显恒温水浴锅,上海千载科技有限公司;TGL-16G 高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂;UV759 紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;二氧化碳培养箱 美国 Thermo Forma 公司;96孔培养板 赛业生物科技有限公司;多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 拐枣多糖的提取

将拐枣在50℃烘干后粉碎,用无水乙醇回流脱脂,50℃烘干。取100g拐枣烘干物加入1000mL的蒸馏水,40℃溶解2h,真空抽滤得上清液经减压浓缩得后,与Sevag试剂(氯仿:正丁醇体积比4:1)按体积比5:1混合,振荡,离心弃去变性蛋白,重复4次。合并水层,用95%的乙醇沉淀(体积比3:1),5000r/min离心10min,沉淀物溶于40℃水中,搅拌并慢慢加入斐林试剂,析出铜络合物,静置1h,倾出上清液,水洗3次,离心分离得络合物,向络合物中加4℃蒸馏水,再滴加0.5mol/L HCl使之全部溶解,用95%的乙醇沉淀(体积比3:1),离心,所得絮状物分别用乙醇、丙酮、乙醚洗涤,冷冻干燥得洁白拐枣多糖粉末^[16-17]。多糖含量的测定:试验采用苯酚-硫酸法测定总的拐枣多糖含量,多糖的提取率=样品中多糖的质量/样品总质量 $\times 100\%$;多糖HPLC-GPC色谱检测有没有裂峰的出现,面积归一化计算纯度,在260nm和280nm波长处紫外光谱检测有无特征吸收峰。液相色谱条件:色谱柱:Shodex SUGAR SP-G 0810糖分析柱;流动相:纯H₂O;流速:0.6mL/min;检测器:Shodex RI-10A示差折光检测器;柱温:75℃;进样量:25 μ L。

1.2.2 免疫低下小鼠模型的建立与给药

250只昆明小鼠在光-暗周期12h、温度22 \pm 4℃的环境下饲养一周后,随机分为正常对照组、模型组及拐枣多糖高、中、低剂量组,每组50只,除正常对照组外,其余各组动物于第1、3、5、7、9d腹腔注射环磷酰胺(CTX)30mg/kg bw造模,模型建立后第2d起,拐枣多糖高、中、低剂量组分别用400、200、100mg/kg bw拐枣多糖进行灌胃,每天灌胃1次,连续28d,正常对照组和模型组每天灌胃等体积的生理盐水。

1.2.3 小鼠免疫脏器指数和脾脏淋巴细胞活性

的测定

末次灌胃给药后 1 h, 每组各取 10 只小鼠, 迅速取出胸腺、脾脏, 冲洗, 滤纸吸干表面水分, 称量质量, 计算胸腺指数及脾脏指数^[8]。将计算脾脏指数后的脾脏进行匀浆后, 过 200 目网筛, 离心后加入红细胞裂解液 3 mL 重悬细胞, 轻摇 30 s 后静置 5 min, 待离心管底部稍透明说明红细胞已裂解完, 加入 6 mL PBS 终止反应, 再次 4000 r/min 离心 8 min, 进行活细胞计数, 调整细胞浓度到 2×10^6 个/mL。在 96 孔细胞培养板上加入 100 μ L/孔上述脾脏淋巴细胞悬液, 每组设 3 个重复, 并设 ConA (终质量浓度为 5 mg/L) 对照孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 44 h 后, 加入 MTT 溶液 20 μ L/孔, 继续培养 4 h 后, 加入三联液 (称取十二烷基硫酸钠 10 g、取异丁醇 5 mL、10 mol/L 盐酸 0.1 mL, 加蒸馏水定容至 100 mL, 临用前提前放置室温) 100 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 12 h 后, 以酶标仪测各孔 D_{570} 值^[9]。

1.2.4 小鼠廓清指数和吞噬指数测定

于末次灌胃给药后 1 h, 每组各取 10 只小鼠, 尾静注射 20% 印度墨汁 10 mL/kg bw, 于 1 min (t_1) 和 5 min (t_5) 后, 从眼眶静脉取血 20 μ L, 加入 2 mL 0.1% Na_2CO_3 溶液中摇匀, 用紫外分光光度法在 680 nm 处测定 t_1 和 t_5 的吸光度值 (A_1 , A_5), 计算廓清指数 K 。之后, 将小鼠处死, 取肝脏及脾脏称质量, 计算吞噬指数 α 。廓清指数 $K = (\log A_1 - \log A_5) / (t_5 - t_1) = \log(A_1/A_5) / 4$, 吞噬指数 $\alpha = \text{体质量} / (\text{肝重} + \text{脾重}) \times K^{1/3}$ ^[8]。

1.2.5 小鼠血清溶血素和小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的测定

于末次灌胃给药后 1 h, 每组各取 10 只小鼠, 小鼠眼眶取血, 低温离心后分离血清备用。将备用血清稀释 500 倍后取血清 1 mL, 依次加入 5% SRBC 0.5 mL、10% 补体 1 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温, 8 min 后移至冰浴中, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 加入都氏试剂 3 mL, 摇匀, 放置 15 min 后用分光光度计测 $D(\lambda)_{540}$; 另取 5% SRBC 0.25 mL, 加都氏试剂 4 mL, 作为空白对照管。计算半数溶血值 (HC_{50}) $= [D(\lambda)_{\text{样品}} / D(\lambda)_{\text{SRBC 半数溶血}}] \times \text{稀释倍数}$ ^[2]。另取备用血清, 采用小鼠 IL-2、IL-4、IFN- γ ELISA 试剂盒检测, 所有操作均严格按照说明书进行。检测结果经酶标仪 450 nm 下测定 D_{450} 值, 并根据标准品绘制标准曲线, 计算其含量^[10]。

1.2.6 小鼠迟发型变态反应的测定

于灌胃给药第 24 d 后, 每组各取 10 只小鼠, 除正常对照组外, 每鼠均腹腔注射 2% (V/V) SRBC 0.2 mL 致敏, 致敏后 4 d, 测量左后足趾厚度, 再在测量

部位每鼠皮下注射 20% 的 SRBC 20 μ L, 于 24 h 后, 测量左后足趾厚度, 减去攻击前足趾厚度即为足趾厚度差, 重复测定 3 次^[7]。

1.3 统计分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析采用 SPSS17.0 软件进行 t 检验统计处理, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 拐枣多糖纯度检测

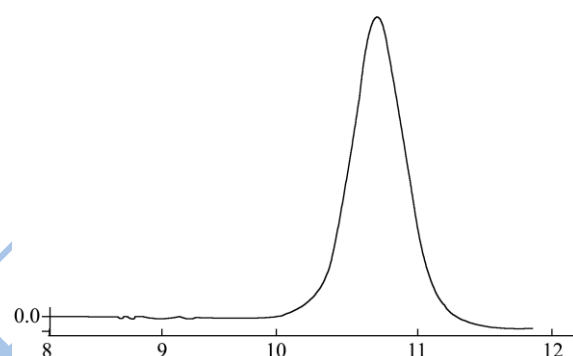


图 1 拐枣多糖的 HPLC-GPC 色谱图

Fig.1 HPLC profile of polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl

拐枣多糖溶液的紫外光谱在 260 nm 和 280 nm 波长处未见蛋白质和核酸的特征吸收。拐枣多糖的 HPLC-GPC 色谱图见图 1, 只出现一个峰, 保留时间为 10.791 min, 所检测到的峰没有裂峰的出现, 说明分离和纯化的拐枣多糖是由一种多糖组成的, 面积归一化计算纯度为 99.95%, 拐枣多糖的提取率为 17.79%。

2.2 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠免疫脏器指数的影响

环磷酰胺 (CTX) 属烷化剂类, 是一种常用的细胞毒性化疗剂, 同时又是一种效果良好的免疫抑制剂, 显著抑制小鼠的免疫功能, 可用于长期免疫低下模型的建立, 用不同剂量的拐枣多糖对免疫功能低下小鼠主要的免疫脏器进行口服治疗。免疫器官的脏器指数是衡量机体免疫功能的初步指标, 胸腺和脾脏是机体主要的免疫器官, 胸腺、脾脏指数的高低可以客观地反映机体非特异性免疫能力的一个指标^[10]。拐枣多糖对建模成功的免疫功能低下小鼠免疫脏器指数的影响结果如表 1 所示, 模型组小鼠胸腺指数和脾脏指数分

别为 0.125 和 0.263 g/100 g, 与正常组比较均成极显著降低 ($p < 0.01$), 说明 CTX 诱导造模成功。拐枣多糖低剂量组小鼠胸腺指数和脾脏指数与模型组比较均成显著降低 ($p < 0.05$), 拐枣多糖中、高剂量处理下小鼠胸腺指数和脾脏指数与模型组比较均成极显著降低 ($p < 0.01$); 拐枣多糖中、高剂量组与正常对照组比

较胸腺指数、脾脏指数成极显著升高 ($p < 0.01$), 而低剂量组处理下与正常组相比胸腺指数和脾脏指数均成显著升高 ($p < 0.05$)。综上, 连续灌胃给予多糖 28 d, 对免疫功能低下小鼠免疫脏器指数有明显的提升作用, 提示对破坏的免疫脏器细胞与组织可能有修复作用。

表 1 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠免疫脏器指数的影响

Table 1 Effects of HAP on immune organ index in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	胸腺指数/(g/100 g)	脾脏指数/(g/100 g)
正常对照组	-	10	0.223 ± 0.071 ^{###}	0.392 ± 0.105 ^{###}
模型组	-	10	0.125 ± 0.053 ^{**}	0.263 ± 0.078 ^{**}
低剂量组	100	10	0.134 ± 0.062 ^{**#}	0.242 ± 0.057 ^{**#}
中剂量组	200	10	0.165 ± 0.077 ^{***#}	0.278 ± 0.077 ^{***#}
高剂量组	400	10	0.188 ± 0.069 ^{***#}	0.321 ± 0.089 ^{***#}

注: 与正常对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ 。

2.3 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠脾淋巴细胞

增殖能力的影响

表 2 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

Table 2 Effects of HAP on spleen lymphocyte proliferation in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	脾淋巴细胞增殖
正常对照组	-	10	0.343 ± 0.024 ^{###}
模型组	-	10	0.202 ± 0.032 ^{**}
低剂量组	100	10	0.236 ± 0.063 ^{*#}
中剂量组	200	10	0.332 ± 0.012 ^{***#}
高剂量组	400	10	0.356 ± 0.082 ^{***#}

注: 与正常对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ 。

脾淋巴细胞在小鼠机体的免疫应答中具有重要的作用^[3,7,14]。拐枣多糖对免疫功能低下小鼠脾淋巴细胞增殖的影响结果如表 2 所示, 模型组与正常小鼠脾淋巴细胞增殖相比成极显著降低 ($p < 0.01$), 拐枣多糖低剂量组治疗 28 d 后小鼠脾淋巴细胞增殖与模型小鼠相比均成显著升高 ($p < 0.05$), 拐枣多糖中、高剂量治疗下小鼠的脾淋巴细胞增殖与模型小鼠相比均存在极显著升高 ($p < 0.01$); 而拐枣多糖低剂量组与正常组相比成显著差异, 中、高剂量组与正常组相比均成极显著差异。这说明拐枣多糖对免疫功能低下小鼠脾淋巴细胞增殖有明显的促进功能, 能促进脾脏 T 淋巴细胞的免疫效应或免疫功能。

2.4 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠碳廓清指

数和吞噬指数的影响

表 3 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠碳廓清指数和吞噬指数的影响

Table 3 Effects of HAP on clearance index and phagocytic index in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	廓清指数(K)	吞噬指数(α)
正常对照组	-	10	0.0607 ± 0.0121 ^{###}	6.352 ± 0.152 ^{###}
模型组	-	10	0.0775 ± 0.0532 [*]	7.123 ± 0.708 [*]
低剂量组	100	10	0.0689 ± 0.0119 ^{*#}	6.942 ± 0.057 ^{*#}
中剂量组	200	10	0.0615 ± 0.0772 ^{**#}	6.678 ± 0.017 ^{**#}
高剂量组	400	10	0.0609 ± 0.0011 ^{###}	6.137 ± 0.029 ^{###}

注: 与正常对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与模型组比较, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ 。

动物体内的吞噬细胞是重要的免疫细胞, 它的免疫功能是吞噬和杀伤病菌, 因此吞噬细胞是机体免疫的第一道防线^[2], 拐枣多糖对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠非特异性免疫功能的影响结果如表 3 所示, 模型组小鼠的廓清指数、吞噬指数与正常对照组比较均

极显著升高 ($p < 0.01$); 拐枣多糖低、中剂量组治疗后廓清指数和吞噬指数与正常对照组相比明显升高 ($p < 0.05$), 拐枣多糖高剂量组治疗后小鼠廓清指数、吞噬指数与正常对照组相比无显变化 ($p > 0.05$)。拐枣多糖低剂量组治疗小鼠廓清指数、吞噬指数与模型

组比较均显著升高 ($p<0.05$), 中剂量组治疗小鼠廓清指数与模型组比较成极显著降低 ($p<0.01$), 而吞噬指数与模型组比较成显著降低 ($p<0.05$), 拐枣多糖高剂量组治疗后的小鼠廓清指数和吞噬指数与模型组比较均成极显著降低 ($p<0.01$), 综上说明拐枣多糖可提高大鼠吞噬细胞数量, 增强吞噬细胞的吞噬能力, 同时具有促进机体免疫和加强小鼠的非特异性免疫的功能。

2.5 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠血清溶血素的影响

羊红细胞免疫小鼠可使淋巴细胞产生特异性抗体并释放至外周血中, 同可反映机体体液免疫功能的强弱^[8], 对正常小鼠血清溶血素的影响由表 4 可知, 模型组的 HC₅₀ 与正常对照组相比存在极显著降低 ($p>0.01$)。拐枣多糖低、中剂量组灌胃治疗 28 d 后, HC₅₀ 与正常对照组相比较低 ($p<0.05$), 但却是逐渐升高的, 拐枣多糖高剂量组治疗后 HC₅₀ 与对照相比无显著性差异 ($p>0.05$); 拐枣多糖低、中剂量组灌

胃治疗 28 d 后与模型组相比, 均可显著促进小鼠机体溶血素抗体的生成 ($p<0.05$), 拐枣多糖高剂量组可极显著促进小鼠溶血素抗体的生成 ($p<0.01$)。说明拐枣多糖可促进小鼠机体溶血素抗体的生成, 提高小鼠体液免疫的功能。

表 4 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠血清溶血素的影响

Table 4 Effects of HAP on HC₅₀ in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	HC ₅₀
正常对照组	-	10	226±42 ^{##}
模型组	-	10	157±32 ^{**}
低剂量组	100	10	184±63 ^{*#}
中剂量组	200	10	198±72 ^{*#}
高剂量组	400	10	217±82 ^{##}

注: 与正常对照组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$; 与模型组比较, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ 。

2.6 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 生产水平的影响

表 5 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的影响

Table 5 Effects of HAP on IL-2, IL-4, and IFN- γ in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	IL-2(ng/L)	IL-4(ng/L)	IFN- γ (ng/L)
正常对照组	-	10	30.643±1.674 ^{##}	39.103±1.594 ^{##}	40.571±2.244 ^{##}
模型组	-	10	24.214±1.92 ^{**}	30.261±2.862 ^{**}	32.094±2.102 ^{**}
低剂量组	100	10	27.866±2.13 ^{*#}	34.249±2.575 ^{*#}	36.276±2.241 ^{*#}
中剂量组	200	10	32.762±2.43 ^{##}	36.176±2.943 ^{##}	39.372±2.945 ^{##}
高剂量组	400	10	34.254±2.32 ^{*##}	42.204±3.392 ^{*##}	43.832±3.621 ^{*##}

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

细胞因子是指主要由机体免疫细胞分泌的、具有免疫调节作用的蛋白质和小分子多肽^[1-3]。这些由免疫细胞合成和分泌的微量多肽类因子, 是机体免疫系统的中心调节因子。IL-2 在增强细胞免疫和调节免疫应答类型中发挥重要作用, IL-4 是由活化的 Th2 细胞分泌的, 可以促进 B 细胞增殖与活化。IFN- γ 由 Th1 细胞分泌, 诱导参与和增强机体的细胞免疫。Th1 和 Th2 淋巴细胞亚群比例的相对恒定, 对维持免疫功能的稳定至关重要, 检测血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 细胞因子水平可以分别反映 Th1 和 Th2 细胞的功能, 反映体液和细胞免疫的状态^[2-3]。拐枣多糖对免疫功能低下小鼠血清中细胞因子生成水平的影响见表 5。模型组与拐枣多糖正常对照组小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的含量相比均成极显著差异, 拐枣多糖低剂量组治疗 28 d 后, 小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的含量与模型组相比均成显著差异 ($P<0.05$), 拐枣多糖中、高剂

量治疗组与模型组相比都成极显著的升高 ($P<0.01$); 拐枣多糖不同剂量治疗组小鼠血清中细胞因子的含量在逐渐升高, 拐枣多糖高剂量治疗组的 IL-2、IL-4、IFN- γ 与正常对照组相比都成显著升高 ($P<0.05$)。这种结果提示拐枣多糖可以提高受损伤免疫细胞的修复, 提高免疫活性细胞释放细胞因子的能力。

2.7 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应的影响

小鼠迟发型变态反应, 属于细胞免疫, 是由 T 淋巴细胞介导的超敏反应, 也是常见的一种免疫反应^[7]。由于在 CTX 诱导作用下形成致敏淋巴细胞, 表现出一种迟缓和细胞变性坏死为特征的局部变态反应性炎症, 而造成脂质和过氧化物长期积蓄可损害生物膜, 导致细胞发生退行性变化, 加速小鼠机体器官的老化

反应等症状。拐枣多糖对 CTX 致免疫功能低下小鼠迟发型变态反应的影响结果如表 6 所示, 正常对照组小鼠足趾厚度与模型组小鼠比较, 存在极显著降低 ($p<0.01$), 拐枣多糖低、中剂量组灌胃治疗 28 d 后, 虽然足趾厚度与正常对照组相比较低 ($p<0.05$), 但却是逐渐减小的, 而多糖高剂量组灌胃治疗后足趾厚度与正常对照组相比已无显著性差异 ($p>0.05$); 与模型组比较, 拐枣多糖多糖低、中、高剂量组治疗小鼠足趾厚度均极显著降低 ($p<0.01$)。说明拐枣多糖多糖对小鼠细胞变性坏死和变态反应性炎症具有明显治疗作用。

表 6 拐枣多糖对免疫功能低下小鼠迟发型变态反应的影响

Table 6 Effects of HAP on delayed hypersensitivity in CTX-induced immunodepressed mice

组别	剂量/(mg/kg bw)	动物数(n)	足趾厚度/mm
正常对照组	-	10	0.513±0.124 ^{##}
模型组	-	10	0.732±0.102 ^{**}
低剂量组	100	10	0.446±0.163 ^{*##}
中剂量组	200	10	0.492±0.072 ^{*##}
高剂量组	400	10	0.509±0.132 ^{##}

注: 与正常对照组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$; 与模型组比较, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ 。

3 结论

近年来, 研究发现大枣多糖能够刺激免疫功能, 提高抗氧化活性^[18], 而且大枣多糖能够显著提高脾脏指数, 降低血清 MDA 含量, 改善 T、B 淋巴细胞的转化能力, 治疗慢性疲劳综合症有很好的疗效^[19]。本文研究拐枣多糖对环磷酰胺诱导免疫低下小鼠免疫功能的影响。以腹腔注射 CTX 建立小鼠免疫低下模型, 研究 HAP 对模型小鼠胸腺指数、脾脏指数、脾淋巴细胞增殖、廓清指数、吞噬指数、半数溶血值、血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 生成水平和足趾厚度差等指标的影响。用 CTX 诱导建立小鼠免疫低下模型使主要免疫器官胸腺和脾脏细胞受到损伤, 导致模型组小鼠的胸腺指数、脾脏指数明显低于正常对照组, 用不同剂量的拐枣多糖对免疫功能低下小鼠主要的免疫脏器进行口服治疗 28 d 后, 小鼠胸腺指数和脾脏指数升高效果显著; 拐枣多糖治疗后小鼠廓清指数降低, 吞噬指数升高, 增强吞噬细胞的吞噬能力, 促进机体免疫功能; 免疫功能低下小鼠口服拐枣多糖经过治疗后可明显促进小鼠机体溶血素抗体的生成, 提高小鼠体液免疫的能力, 促使小鼠足趾厚度降低, 对小鼠细胞变性坏死和变态反应性炎症具有明显治疗作用; 脾淋巴细胞在小鼠机体的免疫应答中具有非常重要的作用,

通过治疗后发现拐枣多糖对免疫功能低下小鼠脾淋巴细胞的增殖有明显的促进功能, 能促进脾脏 T 淋巴细胞的免疫效应或免疫功能。拐枣多糖治疗后小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的含量与模型组相比显著升高, 不同剂量多糖治疗组小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 的含量在逐渐升高, 拐枣多糖高剂量治疗组与正常对照组相比也明显升高, 这种结果提示拐枣多糖可以提高受损免疫细胞的修复, 提高免疫活性细胞释放细胞因子的能力。综上所述, 拐枣多糖在适当剂量下可提高免疫低下小鼠的非特异性和特异性免疫功能, 表明多糖对免疫低下小鼠免疫功能具有一定的增强作用, 本研究可为拐枣免疫增强剂的开发提供理论依据, 使拐枣的价值得到充分利用。

参考文献

- [1] YU Zhan-hai, YIN Li-hua, YANG Qian, et al. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(1): 115-118
- [2] Wong Ka Hing, Lai Connie K M, Cheung Peter C K. Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 150-158
- [3] YANG Li-chan, LU Ting-jang, HSIEH Chang chi, et al. Characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides derived from *Dendrobium tosaense* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 856-863
- [4] BAI Lu, ZHU Li-yiing, YANG Bao-shan, et al. Antitumor and activity of a polysaccharide from *Sophora flavescens* Ait [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 705-709
- [5] SHAO Ping, CHEN Xia -xiao, SUN Pei-long. Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 260-269
- [6] XING Xiao-hui, CUI Steve W, NIE Shao-ping, et al. A review of isolation process, structural characteristics, and bioactivities of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium plants* [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(2): 131-147
- [7] MA Jiang-wei, QIAO Zeng-yong, XIANG Xia. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(3): 1061-1068

- [8] REN Zhe, HE Cheng-hua, FAN Yan-hong. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Cyrtomium macrophyllum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 590-595
- [9] BAO Xiao-li, YEAN Hui-hui, WANG Cheng-zhong, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1):1236-1243
- [10] 邹慧, 劳雪芬, 王程凯, 等. 富硒女贞子粗多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(2):283-286
- ZOU Hui, LAO Xue-fen, WANG Chen-kai, et al. Effect of polysaccharides from Se-enriched *Ligustrum lucidum* fruit on immunologic function in mice [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(2):283-286
- [11] 蔡远榛, 朱慧民, 陈琪, 等. 红豆杉多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(2):58-60
- CAI Yuan-zhen, ZHU Hui-min, CHEN Qi, et al. Effects of taxus polysaccharide on immunity of mice [J]. Acta Universitatis Traditionis Medicinalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2015, 29(2): 58-60
- [12] ZHENG Wei, ZHAO Ting, FENG Wei-wei, et al. Purification, characterization and immunomodulating activity of a polysaccharide from flowers of *Abelmoschus esculentus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106: 335-342
- [13] ZHANG Xiao-rui, LI Ying-jie, CHENG Jun-ping, et al. Immune activities comparison of polysaccharide and polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 35(65): 441-445
- [14] CHO Chang-won, HAN Chun-ji, RHEE Young-kyoung, et al. Immunostimulatory effects of polysaccharides isolated from makgeolli (traditional Korean rice wine) [J]. Molecules, 2014, 19(4): 5266-5277
- [15] 李时珍. 本草纲目(第2版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1971
- LI Shi-zheng. Compendium of Materia Medica (the Second Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1971
- [16] 朱炯波, 赵虹桥, 董爱文, 等. 拐枣中多糖的提取与含量测定[J]. 林产化工通讯, 2005, 39(1):27-30
- ZHU Jiong-bo, ZHAO Hong-qiao, DONG Ai-wen, et al. isolation and assaying of polysaccharide in *hovenia acerba* Lindl [J]. Journal of Chemical Industry of Forest Products, 2005, 39(1): 27-30
- [17] 金鑫, 赖凤英. 仙人掌多糖的提取、分离纯化及 GPC 法测定其分子量[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2):138-140
- JIN Xin, LAI Feng-ying. Extraction, isolation and purification of polysaccharides in *Opuntia* and determination of its molecular weight by GPC method [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 138-140
- [18] WANG BING. Chemical characterization and Ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48:386-391
- [19] 王超, 王一民, 郭飞, 等. 大枣多糖对 CFS 大鼠的免疫调节作用[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2015, 45(1):73-78
- WANG Chao, WANG Yi-min, GUO Fei, et al. Immune function of *Ziziphus Jujube* polysaccharides on chronic fatigue syndrome rats [J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2015, 45(1): 73-78