

荔枝果肉乙酸乙酯粗提物对 Th1/Th2 细胞平衡的影响

杨瑞丽, 唐晓恩, 周杨, 吴青, 孙远明

(广东省食品质量安全重点实验室华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本研究分析荔枝果肉乙酸乙酯部粗提物对小鼠细胞因子分泌的作用, 进而探讨其对 Th1/Th2 细胞平衡的影响。将 30 只 BALB/C 小鼠随机分成对照组 (生理盐水)、乙酸乙酯部粗提物低剂量和高剂量组 (4.6、9.2 mg/kg·bw·d), 连续灌胃 7 d, 观察各组小鼠的胸腺和脾脏指数变化以及脾细胞增殖情况, 用 ELISA 检测小鼠脾细胞以及血清分泌 IFN- γ 和 IL-4 的含量以及 IFN- γ /IL-4 比值。实验结果表明: 乙酸乙酯部粗提物高剂量组小鼠的胸腺指数、脾脏指数显著提高。乙酸乙酯部粗提物低、高剂量都能显著提高小鼠脾细胞和血清 IFN- γ 分泌水平, 同时, 高剂量组小鼠脾细胞和血清 IL-4 的分泌水平也显著提高。低、高剂量的乙酸乙酯部粗提物都能显著提高小鼠脾细胞和血清 IFN- γ /IL-4 的比值。荔枝果肉乙酸乙酯部粗提物诱导 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移, 可能进而诱导机体的炎症性反应。

关键词: 荔枝果肉; 乙酸乙酯部粗提物; Th1/Th2 细胞平衡

文章编号: 1673-9078(2013)7-1467-1470

Effect of Ethyl Acetate Extracts from Litchi Fruit on the Th1/Th2 Cell Balance in Mice

YANG Rui-li, TANG Xiao-en, ZHOU Yang, WU Qing, SUN Yuan-ming

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effect of ethyl acetate extracts (EAE) from litchi fruit on cytokine production of mice was analyzed, and then its effect on the Th1/Th2 cells balance was explored. 30 BALB/C mice were divided into the control group (NC), the low dose group (EL, 4.6mg EAE/kg·bw·d), and the high dose group (EH, 9.2mg EAE/kg·bw·d). After 7 d, the index of spleen and thymus gland, and the spleen cells proliferation were detected. The secretion of IFN- γ and IL-4 in spleen cells and serum were determined by ELISA. The results indicated that high-dose EAE could increase the index of spleen and thymus gland. Compared with NC group, IFN- γ secretion IL-4 of spleen cells and serum in EL and EH groups were significantly increased. Higher secretion of spleen cells and serum in EH groups were found compared with NC group. IFN- γ /IL-4 ratio of spleen cells and serum in both EL and EH groups were also significantly improved compared with NC group. EAE from litchi fruit may possess inflammatory response by shifting the Th1/Th2 balance toward Th1 polarization.

Key words: litchi fruit; ethyl acetate extracts; Th1/Th2 cell balance

Th 细胞, 特别是 Th1 和 Th2 细胞能够反映机体的免疫功能状态, Th1/Th2 细胞的比例是影响细胞免疫及体液免疫的关键环节。Th1 型细胞以表达 IFN- γ 、TNF- α 为主, 均属于促炎细胞因子, 其主要功能主要是促进细胞免疫和抑制体液免疫。Th2 型细胞以分泌

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30900990); 国家荔枝龙眼产业技术体系项目 (CARS-33)

作者简介: 杨瑞丽 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与安全

通讯作者: 孙远明 (1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品质量与安全

IL-4、IL-10 为主, 均属于抑炎细胞因子, 其主要功能促进体液免疫和抑制细胞免疫。Th1/Th2 细胞通过分泌不同的细胞因子, 相互调节、相互制约, 维持着机体免疫系统的正常功能。Th1/Th2 细胞因子网络的失衡, 尤其是 Th1 或 Th2 细胞因子异常表达, 在炎症的发生中、发展中起着重要作用^[1-3]。近年来多项研究发现, 天然活性物质对 Th1/Th2 有一定选择性调节作用。Lin WC 等^[2]研究发现黄连素可促使 Th1/Th2 免疫平衡向 Th2 方向漂移, 具有明显的抗炎效果。Pandey A 等^[3]研究发现卡琪花蒂玛乙酸乙酯部提取物可促进 Th1 细胞因子 TNF- α 、IL-12 的分泌。刘雪芹等^[4]研究发现,

苏木提取物可抑制糖尿病小鼠 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的产生, 促进 Th2 型细胞因子 IL-10 的分泌。

荔枝是我国的岭南佳果, 驰名中外, 但过量食用荔枝易导致体内虚火过旺, 引起发热、牙龈肿痛、口舌生疮、咽喉肿痛等炎症症状, 俗称“上火”。杨瑞丽^[5]、周杨^[6]等人研究表明荔枝果肉乙酸乙酯部粗提物能激活巨噬细胞, 促进 PGE2 及 NO 等炎症介质的分泌。乙酸乙酯部粗提物可能通过影响 Th1/Th2 细胞的平衡, 诱发 Th1 优势状态进而诱导单核巨噬细胞活化并促进其分泌多种炎症介质。本实验旨在研究荔枝果肉乙酸乙酯部粗提物对小鼠 Th1 和 Th2 型细胞因子 (IFN- γ 、IL-4) 分泌水平、IFN- γ /IL-4 比值的影响, 探讨其对 Th1/Th2 细胞平衡的影响, 进而初步揭示荔枝果肉诱导炎症性“上火”反应的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用雄性 BALB/C 小鼠, 7~8 周龄, 体重 18~20 g。购自广东省医学实验动物中心。许可证号: SCXK(粤)2008-0002; 等级: SPF 级。

1.2 材料

荔枝 (品种桂味), 广州市场; 1640 培养基, 美国 GIBCO; 胎牛血清, 浙江天杭生物有限公司; MTT, 健阳生物科技有限公司; 小鼠 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫试剂盒, 上海巧伊生物科技有限公司; 无水乙醇 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂。

1.3 主要仪器设备

高速离心机 LG10-2.4A, 北京医用离心机厂; 电子天平 DJ-300S, 日本 SHINKO 公司; 超净工作台, 苏州净化设备工程有限公司; 超低温冰箱, 美国 Rebecon 公司; CO₂ 恒温培养箱, 日本三洋公司; DK-8D 型电热恒温水槽, 上海医用恒温设备厂。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及灌胃

雄性 BALB/C 小鼠随机分为正常对照组 (生理盐水)、乙酸乙酯部粗提物低剂量组 (4.6 mg/kg·bw·d)、高剂量组 (9.2 mg/kg·bw·d), 每组 10 只, 连续灌胃 7 d。第 7 d 灌胃结束, 眼眶取血, 颈椎脱臼处死小鼠, 无菌取脾, 常规制备脾细胞悬液待用。

1.4.2 小鼠脾细胞悬液制备

颈椎脱臼处死小鼠, 取出脾脏称重, 培养皿中清洗, 研磨, 200 目铜网过滤。37 °C, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入红细胞裂解液 5~10 mL, 混匀, 静置 5 min 后加 PBS 3 mL 终止裂解反应, 4 °C, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 1640 培养基洗两次,

重悬, 计数, 调整脾细胞悬液浓度为 5×10^6 cells/mL。

1.4.3 小鼠免疫脏器指数的测定

颈椎脱臼处死小鼠, 取胸腺和脾脏, 并将周围组织剥离干净后称重, 计算免疫脏器指数。公式为: 胸腺指数=胸腺湿重(g)/大鼠体重(g)×100%。脾脏指数=脾脏湿重(g)/大鼠体重(g)×100%。

1.4.4 脾细胞增殖试验 (MTT 比色法)

将脾细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h。培养结束每孔加入 MTT 液 (5 mg/mL) 20 μ L, 继续培养 4 h, 3000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 每孔加入 DMSO 100 μ L, 混匀 (振荡器 30 s), 酶标仪 570 nm 处检测 OD 值, 计算细胞相对增殖率。公式为: 细胞相对增殖率=实验组 OD 均值/对照组 OD 均值×100%。

1.4.5 脾细胞 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子的检测

将脾细胞悬浮液接种于 96 孔培养板, 每孔加 200 μ L, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 按照小鼠 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫试剂盒测定脾细胞 IFN- γ 、IL-4 的浓度。

1.4.6 血清 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子水平的检测

眼眶取血 0.6~1 mL 左右, 加入 2 mL 离心管 3500 r/min 离心 10 min, 按照 IFN- γ 、IL-4 酶联免疫试剂盒测定血清 IFN- γ 、IL-4 的浓度。

1.5 数据统计与处理

采用 SPSS13.0 软件进行数据处理。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的表示方法, 以 $p < 0.05$ 为有显著性。

2 结果与讨论

2.1 乙酸乙酯部粗提物对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

表 1 小鼠脾脏指数和胸腺指数的变化

Table 1 Changes of spleen index and thymus index in mice

组别	脾脏指数/%	胸腺指数/%
对照组	0.37±0.03	0.20±0.06
低剂量	0.42±0.03	0.27±0.05*
高剂量	0.52±0.12*	0.28±0.05*

注: $\bar{x} \pm s$, n=10, 与正常对照组相比, *为 $p < 0.05$ 。

胸腺与脾脏是机体重要的免疫器官, 胸腺指数与脾脏指数数值高低的变化可以反映机体免疫功能的状况。由表 1 可见, 与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物低剂量组小鼠的胸腺指数显著提高 ($p < 0.05$), 脾脏指数高于正常对照组, 但无显著差异 ($p > 0.05$); 高剂量组小鼠的脾脏指数和胸腺指数显著提高 ($p < 0.05$)。由此说明乙酸乙酯部粗提物能一定程度增强小鼠机体免疫功能的作用。

2.2 乙酸乙酯部粗提物对小鼠脾细胞增殖能力的影响

表 2 乙酸乙酯部粗提物对小鼠脾细胞增殖能力的影响

Table 2 Effects of ethyl acetate extracts on spleen cells

proliferation in mice	
组别	细胞相对增殖率/%
对照组	99.14±4.25
低剂量	98.99±3.26
高剂量	103.92±5.12

注: $\bar{x} \pm s$, n=10, 与正常对照组相比, *为 $p < 0.05$

脾脏是淋巴细胞定居场所, 淋巴细胞增殖能力可以间接反映机体的细胞免疫水平, 因此可作为测定机体免疫功能的指标之一。由表 2 可见, 与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量对小鼠脾细胞的增殖能力无显著影响 ($p > 0.05$), 且存活率高于 95%。结果表明, 乙酸乙酯部粗提物对脾细胞的增殖无明显的促进作用, 也无明显毒性。

2.3 乙酸乙酯部粗提物对小鼠脾细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 的影响

表 3 乙酸乙酯部粗提物对小鼠脾细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 的影响

Table 3 Effect of ethyl acetate extracts on IFN- γ and IL-4

secretion of spleen cells in mice		
组别	IFN- γ 浓度/(pg/mL)	IL-4 浓度/(pg/mL)
对照组	20.32±0.66	14.47±0.64
低剂量	27.49±0.62*	17.38±0.83
高剂量	42.44±0.95*	41.57±2.27*

注: $\bar{x} \pm s$, n=10, 与正常对照组相比, *为 $p < 0.05$

IFN- γ 是 Th1 细胞主要分泌的细胞因子, 促使 Th0 向 Th1 细胞分化, 并抑制 Th2 细胞分化。IL-4 是 Th2 细胞主要分泌的细胞因子, 促使 Th0 向 Th2 细胞分化, 同时也抑制 Th1 细胞增殖。目前将 IFN- γ 和 IL-4 分别作为 Th1 和 Th2 细胞的代表性细胞因子进行研究。由表 3 可见, 与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量都能显著提高小鼠脾细胞 IFN- γ 的分泌水平 ($p < 0.05$)。乙酸乙酯部粗提物低剂量组小鼠脾细胞 IL-4 的分泌水平高于正常对照组, 但无显著差异 ($p > 0.05$)。与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物高剂量能显著提高小鼠脾细胞 IL-4 的分泌水平 ($p < 0.05$)。

2.4 乙酸乙酯部粗提物对小鼠血清 IFN- γ 和 IL-4 的影响

由表 4 可见, 与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量都能显著提高小鼠血清 IFN- γ 的分泌水平 ($p < 0.05$)。乙酸乙酯部粗提物低剂量组小鼠血清

IL-4 的分泌水平高于正常对照组, 但无显著差异 ($p > 0.05$)。与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物高剂量能显著提高小鼠血清的 IL-4 分泌水平 ($p < 0.05$)。这表明, 乙酸乙酯部粗提物能一定程度提高小鼠细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的分泌水平, 可能进而影响机体的免疫状态。

表 4 乙酸乙酯部粗提物对小鼠血清分泌 IFN- γ 和 IL-4 的影响

Table 4 Effect of ethyl acetate extracts on IFN- γ and IL-4

secretion of serum in mice		
组别	IFN- γ 浓度/(pg/mL)	IL-4 浓度/(pg/mL)
对照组	26.38±1.13	15.33±0.56
低剂量	42.44±1.75*	19.09±1.10
高剂量	52.45±2.85*	24.91±2.51*

注: $\bar{x} \pm s$, n=10, 与正常对照组相比, *为 $p < 0.05$

2.6 乙酸乙酯部粗提物对小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响

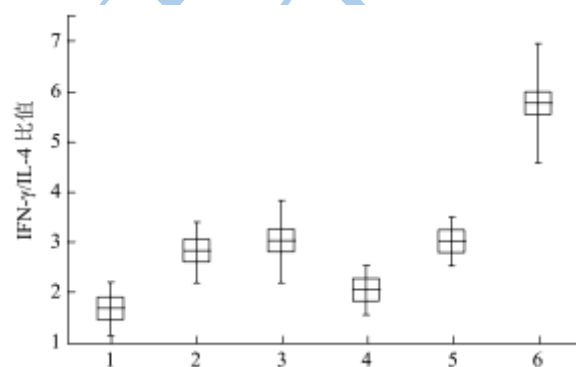


图 1 乙酸乙酯部粗提物对小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响

Fig.1 Effect of ethyl acetate extracts on the Th1/Th2 cell balance in mice

注: 1. 对照组脾细胞, 2. 低剂量组脾细胞, 3. 高剂量组脾细胞, 4. 对照组血清, 5. 低剂量组血清, 6. 高剂量组血清。

由于至今尚未找到可明确区分 Th1/Th2 细胞的膜表面特异性分子标记物, 所以只能根据 Th 细胞亚群分泌特征性细胞因子的不同, 间接检测 Th1 和 Th2 细胞的功能和数量。检测细胞内细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 的功能定义法仍是区分 Th1/Th2 细胞的金标准。因此, 我们选择 Th1 细胞的标志性细胞因子 IFN- γ 和 Th2 细胞的标志性细胞因子 IL-4 作为检测指标, 研究乙酸乙酯部粗提物对 Th1/Th2 细胞平衡的影响。由图 1 可见, 与正常对照组相比, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量能显著提高小鼠脾细胞和血清 IFN- γ /IL-4 的比值 ($p < 0.05$)。这初步表明乙酸乙酯部粗提物诱导 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向漂移, 可能进而诱导机体的炎症性反应。

3 结论

3.1 胸腺指数和脾脏指数是衡量机体免疫功能的初步指标^[1]。本研究结果表明, 乙酸乙酯部粗提物高剂量组小鼠的脾脏指数、胸腺指数显著提高 ($p<0.05$), 低剂量组小鼠的胸腺指数显著提高 ($p<0.05$)。

3.2 淋巴细胞增殖能力的高低可以反映机体的细胞免疫水平, 因此可作为测定机体免疫功能的指标之一。本研究结果表明, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量对小鼠脾细胞的增殖能力无显著影响 ($p>0.05$), 且存活率高于 95%。因此乙酸乙酯部粗提物在一定浓度范围内对脾细胞无明显毒性。

3.3 Th 细胞亚群水平是评价机体免疫能力的一个综合指标, 机体在正常情况下, Th1/Th2 处于动态平衡状态, 当 Th1/Th2 的平衡发生偏移, 机体就会出现病变或其他异常的免疫应答^[8-9]。Th1 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 等细胞因子, 通过激活效应细胞介导细胞免疫应答; Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 和 IL-6 等细胞因子, 能辅助抗体生成, 主要介导体液免疫应答。研究结果表明, 乙酸乙酯部粗提物低、高剂量都能显著提高小鼠脾细胞和血清 IFN- γ 的分泌水平 ($p<0.05$), 同时, 高剂量组小鼠脾细胞和血清 IL-4 的分泌水平也显著提高 ($p<0.05$)。乙酸乙酯部粗提物低、高剂量组小鼠脾细胞和血清的 IFN- γ /IL-4 比值明显高于正常对照组 ($p<0.05$)。

3.4 综上所述, 荔枝果肉乙酸乙酯部粗提物的 Th1 细胞亚群的反应占优势, 可能进而打破敏感人群免疫平衡状态, 使其免疫平衡向 Th1 方向漂移, 诱导机体炎症性反应。但乙酸乙酯部粗提物刺激 Th1 细胞优势状态的具体物质及其作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chueh W H, Lin J Y. Protective effect of isoquinoline alkaloid berberine on spontaneous inflammation in the spleen, liver and kidney of non-obese diabetic mice through downregulating gene expression ratios of pro-/anti-inflammatory and Th1/Th2 cytokines [J]. FOOD CHEMISTRY, 2012, 131(4): 1263-1271
- [2] Lin W C, Lin J Y. Berberine down-regulates the Th1/Th2 cytokine gene expression ratio in mouse primary splenocytes in the absence or presence of lipopolysaccharide in a preventive manner [J]. INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, 2011, 11(12): 1984-1990
- [3] Pandey A, Bani S, Sang wan P, et al. Selective Th1 up regulation by ethyl acetate fraction of *Labisia pumila* [J]. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 2010, 132(1): 309-315
- [4] 刘雪芹, 于湄, 白凤楼. 苏木提取物对 NOD 小鼠 1 型糖尿病的免疫干预作用研究 [J]. 医药导报, 2009, 4: 433-436
Liu X Q, Yu M, Bai F L. The Immunologic Intervention of Type 1 Diabetes in NOD Mice with Extracts of *Caesalpinia Sappan* L [J]. Herald of Medicine, 2009, 4: 433-436
- [5] 杨瑞丽, 高虹, 黄卉, 等. 荔枝果肉乙酸乙酯提取物对巨噬细胞分泌促炎递质前列腺素 E2 和一氧化氮的影响 [J]. 营养学报, 2011, 33(3): 261-269
Yang R L, Gao H, Huang H, et al. Effect of ethyl acetate extract of Litchi fruit on secretion of inflammatory cellular factor prostaglandin E2 and nitrogen oxide of J774 murine macrophages [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2011, 33(3): 261-269
- [6] Yang Zhou, Hong Wang, Ruili Yang, et al. Effects of Litchi Chinese fruit isolates on prostaglandin E2 and nitric oxide production in J774 murine macrophage cells [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012, 12(12): 13180-13188
- [7] 克里斯, 郭建状, 杨景云, 等. 马齿苋多糖对衰老小鼠免疫调节作用的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2012, 2: 27-29
Ke L S, Guo J K, Yang J Y. The immunomodulatory effect of the Polysaccharides of *Portulaca Oleracea* on senescence mice [J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2012, 2: 27-29
- [8] Lin S, Chin L W, Chao P C, et al. In Vivo Th1 and Th2 Cytokine Modulation Effects of *Rhodiola rosea* Standardised Solution and its Major Constituent, Salidroside [J]. PHYTOTHERAPY RESEARCH, 2011, 25(11): 1604-1611
- [9] 钟有添, 王小丽, 孙湘婷, 等. 赣南野生枫香树叶对小鼠免疫功能调节作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 1: 124-126
Zhong Y T, Wang X L, Sun X T, et al. The study of extract from leaves of *Liquidambar Formosan* a Hance on immune-regulatory effects in mice [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2012, 1: 124-126