

# 复方蜂胶提取物提高小鼠的免疫力

赵佩佩<sup>1</sup>, 殷欣<sup>1</sup>, 夏雪奎<sup>1</sup>, 张玉<sup>2</sup>, 刘昌衡<sup>1</sup>, 史亚萍<sup>1\*</sup>

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250103)

(2. 济南臻研汇康生物科技有限公司, 山东济南 250100)

**摘要:** 本研究探讨了复方蜂胶提取物对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响。利用氢化可的松(HY)构建小鼠免疫低下模型, 设置阴性对照组、模型组、蜂胶提取物组(0.125 g/kg)、3个复方剂量组(0.125、0.50、1.25 g/kg), 对小鼠连续灌胃30 d, 检测各种免疫功能等指标, 探究复方蜂胶提取物对小鼠免疫功能的影响。实验发现单一蜂胶提取物组和各剂量的复方蜂胶提取物均可以抵制HY对小鼠脾脏、胸腺的损伤, 将脏器指数分别从2.80恢复到3.89、3.81、3.92和4.11( $p<0.01$ ); 各实验组均可显著改善HY导致的小鼠外周血白细胞(PBWC)和淋巴细胞(PBL)水平降低( $p<0.05$ ), 其中高剂量组可将PBWC和PBL水平从 $3.62\times 10^9/L$ 和 $2.83\times 10^9/L$ 升高到 $5.35\times 10^9/L$ 和 $4.96\times 10^9/L$ ( $p<0.01$ ); 中、高剂量组可提高免疫低下小鼠的碳廓清吞噬指数, 将其从4.16提高到5.29和5.16( $p<0.01$ ), 低剂量组和单一蜂胶提取物组效果不明显; 中剂量组可提高免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球的吞噬百分率, 将其从18.70%提高到28.60%( $p<0.01$ ); 中、高剂量组可显著提高抗体生成细胞数( $p<0.05$ ); 从而表明复方蜂胶提取物具有增强免疫低下小鼠免疫力的功效。

**关键词:** 复方蜂胶提取物; 免疫功能; 免疫低下小鼠; 枸杞; 黄芪; 黄精

文章编号: 1673-9078(2021)11-144-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0493

## Enhancing the Immune Function of Mice Using Propolis Extract Mixtures

ZHAO Peipei<sup>1</sup>, YIN Xin<sup>1</sup>, XIA Xuekui<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, LIU Changheng<sup>1</sup>, SHI Yaping<sup>1\*</sup>

(1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

(2. JiNan Pure and Healthy Biotechnology Co. Ltd., Jinan 250100, China)

**Abstract:** To study the effects of propolis extract mixtures on the immune function of immunocompromised mice models constructed using hydrocortisone (HY), experiments were conducted on six groups of mice models, namely, the negative control, model, propolis extract-treated (at a dose of 0.125 g/kg), and three propolis extract mixture-treated groups (at doses of 0.125 g/kg, 0.50 g/kg, and 1.25 g/kg, respectively). Oral administrations were continued for 30 days, and the immune indexes of the mice from the different groups were determined. Results showed that the propolis extract alone and the extract mixtures at different doses can resist HY damage to the spleen and thymus of mice, restoring the organ index from 2.80 to 3.89, 3.81, 3.92, and 4.11, respectively ( $p<0.01$ ). For mice from all the treatment groups, the decrease in the peripheral white blood cell (PBWC) and lymphocyte (PBL) counts induced by HY was significantly improved ( $p<0.05$ ). More specifically, for the high-dose group, the PBWC and PBL counts in the immunosuppressed mice increased from  $3.62\times 10^9/L$  and  $2.83\times 10^9/L$  to  $5.35\times 10^9/L$  and  $4.96\times 10^9/L$ , respectively ( $p<0.01$ ). The carbon clearance indexes of the immunocompromised mice in the medium- and high-dose groups increased from 4.16 to 5.29 and 5.16, respectively ( $p<0.01$ ); however, the effects on the low-dose group and the group treated with propolis extract were not as noticeable. The phagocytosis percentage of fluorescent microspheres by peritoneal macrophages in the medium-dose group increased from 18.70% to 28.60% ( $p<0.01$ ). Furthermore, for the medium- and high-dose groups, the numbers of antibody-producing cells increased ( $p<0.05$ ). These results demonstrate that the propolis extract mixtures can enhance the immunity of immunocompromised mice.

引文格式:

赵佩佩, 殷欣, 夏雪奎, 等. 复方蜂胶提取物提高小鼠的免疫力[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 144-150

ZHAO Peipei, YIN Xin, XIA Xuekui, et al. Enhancing the immune function of mice using propolis extract mixtures [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 144-150

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: 山东省科学院青年基金项目(2018QN0029)

作者简介: 赵佩佩(1989-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 510563936@qq.com

通讯作者: 史亚萍(1987-), 女, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: shiyp@sas.org

**Key words:** propolis extract mixture; immune function; immunocompromised mice; *Lycium chinense*; *Astragalus sibiricum*

蜂胶是工蜂从树干上或植物嫩芽上采集的树脂或其他分泌物,通过与自己上颚腺分泌的一类物质混合形成的胶状固体物质<sup>[1]</sup>,是我国的古典名药,在民间具有很长的食用历史。蜂胶具有多种生物学功能,如抗氧化、抗菌、抗炎、抗溃疡、抗癌和免疫调节性质等,而这些特性与其类黄酮、酚酸和萜类化合物有关,其中主要取决于其类黄酮含量<sup>[2-6]</sup>。此外,蜂胶还可能与提高机体的免疫力有关,施子棣等<sup>[7]</sup>发现蜂胶水煎液可以促进小白鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能;薛云浩等<sup>[8]</sup>发现蜂胶软胶囊可提高小鼠的免疫功能,进而增强机体免疫力。

陈丽芳等<sup>[9]</sup>发现灵芝孢子粉蜂胶复合物可增强小鼠免疫功能,提示了蜂胶复合物可能有较好的增强免疫力的功能。已有报道黄芪多糖<sup>[10]</sup>、黄芪水煎剂<sup>[11]</sup>、黄精粗多糖<sup>[12]</sup>和枸杞发酵液<sup>[13]</sup>均具有增加小鼠的免疫功能的功效,如对T淋巴细胞的功能有一定的促进作用和促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用等。此外,王建东等<sup>[14]</sup>比较了蜂胶多糖、枸杞多糖和黄芪多糖对小鼠免疫功能的影响,发现3种多糖对小鼠血液中白细胞、淋巴细胞和红细胞都具有一定的影响,但对小鼠的胸腺指数和脾脏指数的影响差异不显著。因此蜂胶提取物搭配传统的补益中药或植物提取物可能具有比单一蜂胶提取物更为优越的提高免疫力功效。

氢化可的松(HY)是一种免疫抑制剂,它可以抑制巨噬细胞吞噬作用,能够破坏淋巴细胞等,因此对机体的细胞免疫和体液免疫均有抑制作用<sup>[15]</sup>。其免疫抑制机制可能是能够结合免疫细胞上的受体,诱导细胞内多种抑制因子的转录、翻译,从而抑制机体的免疫功能<sup>[16]</sup>。本文在构建氢化可的松致免疫低下小鼠模型基础上,探究蜂胶、枸杞、黄芪和黄精复方提取物对小鼠非特异性免疫和特异性免疫功能的影响,可为生产具有提高免疫功能的保健食品提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蜂胶为低温冷冻干燥获取冻干粉,来源于西安四季生物科技有限公司,经本实验室乙醇超声提取获得粗黄酮。枸杞、黄精和黄芪来源于市售,经本实验室进行水提醇沉获取的粗多糖,复方按蜂胶提取物:枸杞提取物:黄芪提取物:黄精提取物(m:m:m:m)=3:4:5:5的比例混合所得干粉,混合干粉中黄酮为13.35%,植

物粗多糖为78.63%,其他可溶性物质含有粗蛋白和膳食纤维。该复方是通过正交t值法进行筛选获得的主要有效成分。

氢化可的松(HY)、RPMI 1640培养液、D-hank's液、PBS液、小牛血清、WST-1、青/链霉素、刀豆蛋白A(ConA)、荧光试剂均购自碧云天生物科技公司;冰醋酸、异丙醇、氯化钠等购自国药集团。

实验小鼠为SPF级BALB/c雄性小鼠,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,生产许可证号SCXK-(京)2014-0004。饲料购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号:SCXK-(沪)2014-0001。动物房环境条件:屏障系统,温度:22℃~25℃,相对湿度:55%~70%。小鼠的采食量为4g/d,饮水量4mL/d。

### 1.2 仪器与设备

FT-11超净工作台、HS-799离心机,无锡瑞江生物科技公司;二氧化碳培养箱,南京建成生物公司;M5酶标仪、流式细胞仪、倒置显微镜,美国BIOTECK等;细胞培养板(圆形、U型)、玻璃皿、75μm细胞筛网、计时器、载玻片等,上海生工。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 造模及分组

设6个分组:阴性对照组、模型组、单一蜂胶提取物组(0.125g/kg)和三个不同剂量复方组:低剂量(0.125g/kg)、中剂量(0.50g/kg)和高剂量组(1.25g/kg)。每只小鼠灌胃0.2mL,每天灌胃一次,连续灌胃30d。模型组和剂量组在实验的第22d、24d、26d、28d和30d进行40mg/kg氢化可的松肌内注射造模处理。阴性对照组给予等剂量的生理盐水,第31d进行各指标测试<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.2 复方蜂胶提取物对小鼠体重、脏器指数的影响

饲养结束后称小鼠体重,处死小鼠,取胸腺和脾脏,去尽筋膜,吸干脏器表面的血污,称其重量,计算胸腺/体重比值以及脾脏/体重比值。

#### 1.3.3 外周血白细胞数计数

将小鼠摘眼球取血,至抗凝管中,震荡以防血凝。取全血约1mL,用全血细胞分析仪对外周血白细胞(PWBC)和淋巴细胞(PBL)计数<sup>[18]</sup>。

#### 1.3.4 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验(WST-1法)

实验第 31 d 处死动物, 无菌取脾, 制成单细胞悬液, 细胞浓度为  $2 \times 10^6$  cells/mL。取 100  $\mu$ L 上述细胞悬液加入到 96 孔板中, 模型组和剂量组加入 50  $\mu$ L ConA 液 (溶液终浓度为 5  $\mu$ g/mL), 对照组加入等体积的培养液, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 48 h。培养结束后每孔加入 10  $\mu$ L WST-1 (5 mg/mL), 继续孵育 2 h。培养结束后, 用 M5 酶标仪于 450 nm 波长下测 OD 值<sup>[19]</sup>。

$$\text{增值率}/\% = \left( \frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.3.5 小鼠碳廓清实验

实验第 31 d, 以 0.01 g/mL 体重向小鼠尾静脉注入稀释后的印度墨汁。2 min、10 min 后, 各于内眦静脉丛取血 20  $\mu$ L, 立即加入 0.1% 的 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中。M5 酶标仪于 600 nm 波长下测 OD 值。处死小鼠, 取肝脏和脾脏, 除去筋膜和表面血污, 称重。按以下公式计算吞噬指数<sup>[17]</sup>。

$$\text{碳廓清指数: } K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

$$\text{吞噬指数: } \alpha = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times \sqrt[3]{K} \quad (3)$$

### 1.3.6 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球实验

实验第 25 d, 每只小鼠腹腔注射 2% 的 0.2 mL 绵羊红细胞 (SRBC), 使其激活巨噬细胞, 4 h 后, 脱颈椎处死小鼠, 每只腹腔注射 3 mL D-Hank's 液 (含 10% 小牛血清), 轻揉腹部 1 min, 取 2 mL 腹腔洗液, 过滤, 调整细胞浓度为  $6 \times 10^5$  cells/mL。使用 6 孔培养板, 吸 1 mL 腹腔洗液于其中, 加入预调过的荧光微球 ( $1 \times 10^7$  cells/孔), 二氧化碳细胞培养箱避光孵育 2 h (37  $^{\circ}$ C), 去掉上清, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 离心去上清, 加入 0.3 mL PBS 缓冲液, 胰酶消化细胞 1 min, 吹打均匀, 过滤后用流式细胞仪分析, 计算吞噬百分率 (公式 4) 和吞噬指数 (公式 5)<sup>[17]</sup>。

$$P(\%) = \frac{\text{吞噬荧光微球的巨噬细胞数}}{\text{计数的吞噬细胞数}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\alpha = \frac{\text{被吞噬的荧光微球总数}}{\text{计数的荧光微球总数}} \quad (5)$$

### 1.3.7 抗体生成细胞检测 (改良法)

实验第 26 d, 腹腔注射 2% 0.2 mL SRBC 悬液, 免疫 4 d 后的小鼠颈椎处死, 制取脾淋巴单细胞悬液。取 50  $\mu$ L 用生理盐水配制的 2% SRBC 和 200  $\mu$ L 脾淋巴细胞悬液先后加入到 0.5 mL 的顶层试管中, 混匀后倒入 6 孔板中, 每个样本做 3 个平行孔。二氧化碳细胞培养箱中孵育 1 h (37  $^{\circ}$ C), 然后每孔加入 500  $\mu$ L 以完全培养基稀释的补体 (V/V, 1:10), 继续孵育 2 h,

自动图象分析仪读取溶血空斑数, 溶血空斑数值为空斑数/ $10^6$  脾细胞<sup>[20]</sup>。

### 1.3.8 数据分析

应用 SPSS 20.2 软件处理各组数据, 各组数据均为平均值 $\pm$ 标准差, 采用 One-Way ANOVA 法分析各组实验数据之间的差异显著关系。 $p < 0.05$  表示差异显著,  $p < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 体重、脏器/体重比值测定

在正常情况下, 各脏器与动物体重的比值保持相对恒定, 而当动物健康状况发生变化时, 脏器重量可能随之发生改变, 从而引起脏器/体重比值的变化。胸腺是中枢免疫器官, 是 T 淋巴细胞发育、分化、成熟并向外周输出的场所。脾脏是最大的外周淋巴器官, 是发生免疫应答的主要场所。从表 1 可见, 阴性对照组的胸腺/体重和脾脏/体重比值分别为 4.01 和 5.16, 而 HY 模型组的相应比值分别为 2.80 和 4.33, 两组差异极显著 ( $p < 0.01$ ), 表明造模成功。各实验组与 HY 模型组比, 单一蜂胶提取物组和复方蜂胶提取物三个剂量组小鼠脏器指数都有明显升高, 差异极显著 ( $p < 0.01$ ), 说明各剂量的复方蜂胶提取物均可以抵制 HY 对小鼠脾脏、胸腺的损伤, 使脏器指数恢复到正常。

表 1 复方蜂胶提取物对小鼠免疫器官/体重的影响

Table 1 The effect of compound propolis extract on mice's immune organ/bodyweight ratio

组别	胸腺/体重(mg/g)	脾脏/体重(mg/g)
阴性对照组	4.01 $\pm$ 0.51	5.16 $\pm$ 0.12
模型组	2.80 $\pm$ 0.20 <sup>###</sup>	4.33 $\pm$ 0.82 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	3.82 $\pm$ 0.53 <sup>**</sup>	5.27 $\pm$ 0.28 <sup>**</sup>
低剂量组	3.81 $\pm$ 0.12 <sup>**</sup>	5.38 $\pm$ 1.31 <sup>**</sup>
中剂量组	3.92 $\pm$ 0.31 <sup>**</sup>	5.58 $\pm$ 0.94 <sup>**</sup>
高剂量组	4.11 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>	5.46 $\pm$ 1.41 <sup>**</sup>

注: 模型组与阴性对照组比较, <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>###</sup> $p < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ,  $n = 8$ 。

### 2.2 复方蜂胶提取物对小鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响

白细胞来源于骨髓中的造血干细胞, 使机体免受病原体和异物的侵入, 淋巴细胞是体积最小的一种白细胞, 是机体免疫应答的重要细胞。机体处于正常状态时, 骨髓细胞的增殖、分化、成熟释放与外周血中

白细胞的衰老、排出处于相对恒定的状态,而 HY 可破坏这种平衡,抑制骨髓细胞的功能,致使白细胞数目减少<sup>[21]</sup>。从表 2 看出,相比于阴性对照组的  $6.45 \times 10^9$  cells/L (外周血白细胞 (PBWC) 数) 与  $6.03 \times 10^9$  cells/L (淋巴细胞 (PBL) 数), HY 模型组的 PBWC 和 PBL 的数目明显下降 ( $p < 0.01$ ), 说明造模成功。单一蜂胶提取物组和复方蜂胶提取物低剂量组的外周血指标分别提高到  $4.21 \times 10^9$ 、 $3.42 \times 10^9$ 、 $4.06 \times 10^9$ 、 $3.28 \times 10^9$  cells/L, 与 HY 模型组差异显著 ( $p < 0.05$ ); 而中、高剂量组中小鼠的外周血指标分别达到了  $4.89 \times 10^9$ 、 $4.32 \times 10^9$ 、 $5.35 \times 10^9$ 、 $4.96 \times 10^9$  cells/L, 均极显著高于 HY 模型组 ( $p < 0.01$ ), 表明单一蜂胶提取物和复方蜂胶提取物能够显著改善 HY 导致的 PBWC 和 PBL 水平降低, 从而促进免疫抑制小鼠 PBWC 和 PBL 水平的恢复, 提高机体的免疫功能, 并且单一蜂胶提取物组略高于复方蜂胶提取物低剂量组, 复方蜂胶提取物中、高剂量组高于单一蜂胶提取物组, 推测该实验中蜂胶提取物中的黄酮类物质发挥了主要功效, 其他三种提取物中的多糖成分发挥了协同作用, 并且复方蜂胶提取物低剂量组中的各组分协同作用, 功效接近单一蜂胶提取物组。王建东等<sup>[14]</sup>发现枸杞多糖、黄芪多糖和蜂胶多糖可促进 PBL 的增殖, 陈丽芳等<sup>[9]</sup>发现灵芝孢子粉蜂胶复合物可提高 PBL 的增殖能力, 本结果与其研究结果具有一致性, 并且也进一步证明枸杞多糖和黄芪多糖可协同蜂胶提取物发挥作用。

表 2 复方蜂胶提取物对小鼠外周血白细胞和淋巴细胞的影响

Table 2 The effect of compound propolis extract on mice's PBWC and PBL

组别	PBWC/( $\times 10^9$ cells/L)	PBL/( $\times 10^9$ cells/L)
阴性对照组	6.45±1.78	6.03±0.27
模型组	3.62±0.12 <sup>###</sup>	2.83±0.38 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	4.21±0.58*	3.42±0.57*
低剂量组	4.06±0.21*	3.28±1.23*
中剂量组	4.89±0.13**	4.32±0.19**
高剂量组	5.35±0.36**	4.96±1.34**

注: 模型组与阴性对照组比较, <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>###</sup> $p < 0.01$ ; 与模型组比较, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 8$ 。

### 2.3 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

ConA 是作用于人和小鼠 T 细胞的重要非抗原性促有丝分裂原, 可诱导 T 淋巴细胞增殖, 用于检测机体免疫系统的功能状态。在 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的实验中, 经统计学分析, 灌胃给予受试物 30 d, HY 模型组小鼠的增殖指数显著降低 ( $p < 0.01$ ), 免疫低下模型构建成功。从表 3 可知, 阴性对照组、

HY 模型组、单一蜂胶提取物组及复方蜂胶提取物各剂量组的脾淋巴细胞增殖指数分别为 1.00、0.62、1.44、1.30、1.42、1.56, 单一蜂胶提取物组和复方蜂胶提取物各剂量组均可以促进小鼠脾淋巴细胞的增殖 ( $p < 0.01$ ), 说明单一蜂胶提取物和复方蜂胶提取物可以恢复 HY 导致的脾淋巴细胞增殖减少, 对细胞免疫功能具有促进作用, 这与之前文献报道蜂胶可显著增强小鼠脾淋巴细胞的增殖能力相一致<sup>[5,8]</sup>。灵芝孢子粉蜂胶复合物及枸杞发酵液也均可提高小鼠的脾淋巴细胞增殖<sup>[9,13]</sup>, 说明蜂胶提取物可与其他功效成分共同发挥细胞免疫促进作用, 并且本实验中复方蜂胶提取物对细胞免疫功能的促进作用具有剂量效应。

表 3 复方蜂胶提取物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

Table 3 The effect of compound propolis extract proliferation of splenic lymphocyte induced by ConA in mice

组别	脾淋巴细胞增殖指数
阴性对照组	1.00±0.05
模型组	0.62±0.03 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	1.44±0.25**
低剂量组	1.30±0.07**
中剂量组	1.42±0.07**
高剂量组	1.56±0.08**

注: 模型组与阴性对照组比较, <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>###</sup> $p < 0.01$ ; 与模型组比较, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 8$ 。

### 2.4 小鼠碳廓清实验

巨噬细胞是非特异性免疫细胞, 具有加工和呈递抗原、吞噬异物等功能, 其吞噬功能可用吞噬指数来判定, 吞噬指数越高, 吞噬功能越强。小鼠碳廓清实验是将印度墨汁随小鼠血液循环到达肝脏、脾脏等处, 被巨噬细胞清除, 以吞噬指数指示其碳廓清能力。本实验中, 与阴性对照组 (5.32) 相比, HY 模型组小鼠的吞噬指数 (4.16) 极显著降低 (表 4)。与 HY 模型组小鼠相比, 单一蜂胶提取物组和复方蜂胶提取物低剂量组的吞噬指数 (4.71、4.68) 差异不显著, 中、高剂量组吞噬指数 (5.29、5.16) 均显著增加 ( $p < 0.01$ ), 但中、高剂量之间差异不显著。陈丽芳等实验中灵芝孢子粉蜂胶复合物对单核-巨噬细胞的碳廓清能力无明显的增强作用<sup>[9]</sup>。而孙小英等实验中黑蜂蜂胶醇提取物可促进移植瘤小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清功能, 从而提高小鼠的免疫活性<sup>[6]</sup>。本实验中复方蜂胶提取物中剂量组中蜂胶含量略低于黑蜂蜂胶醇提取物的低剂量组, 但高于灵芝孢子粉蜂胶复合物, 单一蜂胶提取物的蜂胶含量高于黑蜂蜂胶醇提取物的低剂量组, 而复方

蜂胶提取物中剂量组的吞噬指数明显高于单一蜂胶提取物,说明复方中的其他成分对于蜂胶提高小鼠免疫活性的功效起到了一定的协同作用。

表4 复方蜂胶提取物对小鼠碳廓清实验的影响

Table 4 The effect of compound propolis extract on carbon

granular clearance test in mice	
组别	碳廓清指数
阴性对照组	5.32±0.25
模型组	4.16±0.27 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	4.71±0.31
低剂量组	4.68±0.22
中剂量组	5.29±0.22 <sup>**</sup>
高剂量组	5.16±0.24 <sup>**</sup>

注:模型组与阴性对照组比较,<sup>#</sup> $p<0.05$ ,<sup>###</sup> $p<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $p<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $p<0.01$ , $n=8$ 。

## 2.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球实验

表5 复方蜂胶提取物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

Table 5 The effect of compound propolis extract on phagocytic

function of macrophage in mice			
组别	吞噬百分率/%	吞噬百分率转换值	吞噬指数
阴性对照组	27.00±8.02	0.56±0.11	0.41±0.21
模型组	18.70±4.04 <sup>###</sup>	0.44±0.07 <sup>###</sup>	0.24±0.08 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	26.57±4.86	0.55±0.04	0.38±0.09
低剂量组	24.60±4.06	0.53±0.05	0.34±0.05
中剂量组	28.60±5.05 <sup>**</sup>	0.57±0.05 <sup>**</sup>	0.41±0.10 <sup>**</sup>
高剂量组	20.30±5.02	0.48±0.06	0.27±0.08

注:与阴性对照组比较,<sup>#</sup> $p<0.05$ ,<sup>###</sup> $p<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $p<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $p<0.01$ , $n=8$ 。

巨噬细胞吞噬荧光微球后,利用流式细胞仪迅速检测荧光信号,具有荧光信号的巨噬细胞与计数的巨噬细胞相比即为其吞噬百分率,被吞噬的荧光微球总数与计数的荧光微球总数比即为吞噬指数。从表3可知,阴性对照组吞噬百分率和吞噬指数分别为27.00和0.41, HY模型组的相应指标下降到18.70和0.24,与阴性对照差异极显著( $p<0.01$ );与HY模型组比,中剂量组可以极显著提高免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞对荧光微球的吞噬百分率( $p<0.01$ )和吞噬指数( $p<0.01$ ),高剂量组的效果并不显著( $p>0.05$ ),推测可能是因为高浓度的药物会对细胞产生一定抑制作用(表5)。

## 2.6 小鼠抗体生成细胞检测(改良法)

小鼠经SRBC免疫后的溶血素水平是反映其体液免疫功能的重要指标,体液免疫是B淋巴细胞在受到

外界抗原刺激后形成效应B细胞,分泌抗体参与机体免疫机制<sup>[20]</sup>。与阴性对照组相比, HY模型组抗体生成细胞数显著降低( $p<0.01$ ),免疫低下小鼠模型构建成功(表6)。中、高剂量组与HY模型组比,显著提高了抗体生成细胞数( $p<0.05$ )。喻建辉等<sup>[5]</sup>发现蜂胶能明显提高小鼠半数溶血值和抗体生成细胞数,薛云浩等<sup>[8]</sup>发现蜂胶软胶囊可显著增强小鼠产生抗体生成细胞的能力和血清溶血素水平,具有促进机体体液免疫的功能。本实验中,随着复方蜂胶提取物浓度的升高,促进小鼠产生抗体生成细胞的效果越好,而单一蜂胶提取物效果不明显。不同来源的蜂胶中所具有的活性物质成分和含量不同,不同提取方式也会影响最终蜂胶提取物中的活性物质,从而导致结果的差异性,蜂胶对体液免疫的影响总体呈现了剂量依赖型,随着浓度的增高而效果越明显。

表6 蜂胶复方制剂对抗体生成细胞的影响

Table 6 The effect of compound propolis extract on

ant-body-producing cells in mice	
组别	溶血素空斑数值
阴性对照组	0.36±0.01
模型组	0.24±0.07 <sup>###</sup>
蜂胶提取物组	0.26±0.06
低剂量组	0.27±0.05
中剂量组	0.37±0.05 <sup>*</sup>
高剂量组	0.41±0.06 <sup>**</sup>

注:模型组与阴性对照组比较,<sup>###</sup> $p<0.01$ ,剂量组与模型组比较,<sup>\*</sup> $p<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $p<0.01$ , $n=8$ 。

## 3 结论

3.1 免疫器官的脏器指数是基本的免疫指标之一,单一蜂胶提取物和复方蜂胶提取物均可以抵制氢化可的松的小鼠脏器损伤。在非特异性免疫中,腹腔巨噬细胞、单核-巨噬细胞可以抵抗或者清除外来异物或抗原,其吞噬指数可以反映其吞噬功能。本研究发现复方蜂胶提取物可以部分恢复单核-巨噬细胞的吞噬功能至正常水平,较高剂量组并没有表现出显著的增强效应,可能是因为高浓度的药物对细胞抑制作用。但在腹腔巨噬细胞的吞噬作用中,可以发现该复方的中剂量组就可以使吞噬功能恢复到正常水平。

3.2 在细胞免疫反应中, ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖实验中,单一蜂胶提取物组和复方蜂胶提取物剂量组对 ConA 刺激的脾淋巴细胞具有增殖作用,使免疫低下小鼠的淋巴细胞的增殖水平高于正常水平。在体液免疫反应(抗体生成细胞实验)中,发现中剂量组可以使抗体细胞生成数恢复至正常水平,随着浓度升

高, 促进效果就越好, 呈剂量依赖型, 而单一蜂胶提取物组效果不明显。

3.3 在免疫低下模型成立条件下, 外周血白细胞总数、NK 细胞活性测定、细胞免疫、体液免疫和单核-巨噬细胞功能测定, 任两个实验测定结果为阳性, 则说明样品对免疫低下模型具有提高免疫功能的作用。本实验中, 单核-巨噬细胞的功能测定, 复方蜂胶提取物对小鼠碳廓清实验以及腹腔巨噬细胞吞噬实验均为阳性反应; 在外周血白细胞总数、体液免疫、细胞免疫的实验的结果均为阳性反应。所以复方蜂胶提取物具有增强免疫低下小鼠的免疫的功能。

### 参考文献

- [1] Osés S M, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño M A, et al. Bioactive properties of honey with propolis [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 1215-1223
- [2] 王馨, 徐响, 高丽苗, 等. 蜂胶分级提取物的神经保护功效及成分研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 26-34  
WANG Xin, XU Xiang, GAO Limiao, et al. The neuroprotective effect and the effective components of ethanol extracts of propolis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 26-34
- [3] Patel S. Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents [J]. Journal of Dietary Supplements, 2016, 13(3): 245-268
- [4] 姚静, 孙建国, 吴亮, 等. 蜂胶化学成分的 LC-IT-TOF-MS 鉴别[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 178-183  
YAO Jing, SUN Jianguo, WU Liang, et al. Identification of major constituents from propolis by LC-IT-TOF-MS [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2017, 48(2): 178-183
- [5] 喻建辉, 周明良, 余春涛, 等. 蜂胶对调节小鼠免疫功能的影响[J]. 农产品加工, 2020, 10: 22-26  
YU Jianhui, ZHOU Mingliang, YU Chuntao, et al. Effect of propolis on immune regulation function in mice [J]. Farm Products Processing, 2020, 10: 22-26
- [6] 孙小英, 邹玉, 王涛, 等. 黑蜂蜂胶免疫活性和体内抗肿瘤研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(9): 127-128, 159  
SUN Xiaoying, ZOU Yu, WANG Tao, et al. Study on immune activity and antitumor activity of *Apis mellifera* propolis [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(9): 127-128, 159
- [7] 施子棣, 何季芬. 金钗石斛水煎液对小白鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能影响的实验观察[J]. 河南中医, 1989, 2: 35-36  
SHI Zidi, HE Jifen. Experimental observation on the effect of *Dendrobium nobile* decoction on the phagocytic function of peritoneal macrophages in mice [J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 1989, 2: 35-36
- [8] 薛云浩, 李娜娜, 王雯颖. 蜂胶软胶囊对小鼠免疫调节功能的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(13): 1568-1570, 1588  
XUE Yunhao, LI Nana, WANG Wenying. Effect of propolis soft capsule on immune regulation function in mice [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(13): 1568-1570, 1588
- [9] 陈丽芳, 王会宾, 叶克难. 灵芝孢子粉蜂胶复合物对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 294-297, 302  
CHEN Lifang, WANG Huibin, YE Kenan. Effect of *Ganoderma lucidum* spores and propolis complex on immune function in mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 294-297, 302
- [10] 范文彤. 黄芪多糖对小鼠免疫功能的药理学实验研究[J]. 中国当代医药, 2018, 25(3): 10-14  
FAN Wentong. Experimental research on the pharmacological effects of *Astragalus* polysaccharide on immune function in mice [J]. China Modern Medicine, 2018, 25(3): 10-14
- [11] 宁康健, 阮祥春, 吕锦芳, 等. 黄芪对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1670-1672  
NING Kangjian, RUAN Xiangchun, LYU Jinfang, et al. Effect of *Astragalus* on phagocytic activity of peritoneal macrophages in mice [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(21): 1670-1672
- [12] 于思文, 张妍, 田海玲, 等. 黄精粗多糖对体外培养小鼠脾淋巴细胞及巨噬细胞免疫活性的影响[J]. 延边大学医学学报, 2019, 42(2): 107-110  
YU Siwen, ZHANG Yan, TIAN Hailing, et al. Effects of crude polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* on the immune activity of mouse spleen lymphocytes and macrophages cultured *in vitro* [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2019, 42(2): 107-110
- [13] 张瑞雪, 崔欣悦, 马勇, 等. 枸杞发酵液抗氧化和免疫调节作用研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(10): 55-60  
ZHANG Ruixue, CUI Xinyue, MA Yong, et al. Effects of *Lycium chinense* mill fermentation liquid on antioxidant activity and immunoregulation [J]. Food Research and Development, 2019, 40(10): 55-60
- [14] 王建东, 李毓华, 马学礼, 等. 枸杞多糖、黄芪多糖和蜂胶多糖对小鼠免疫效果的对比试验[J]. 动物医学进展, 2020, 41(12): 80-84  
WANG Jiandong, LI Yuhua, MA Xueli, et al. Comparative

- study on immune effects of *Lycium barbarum* polysaccharides, *Astragalus* polysaccharides and propolis polysaccharides in mice [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(12): 80-84
- [15] WANG Jinxu, TONG Xin, LI Peibo, et al. Immuno-enhancement effects of Shenqi Fuzheng injection on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 139(3): 788-795
- [16] Al-Harhi L, Voris J, Patterson B K, et al. Evaluation of the impact of highly active antiretroviral therapy on immune recovery in antiretroviral naive patients [J]. HIV Med, 2004, 5(1): 55-65
- [17] 吕颖坚,黄俊明,蔡玟,等.氢化可的松对小鼠免疫功能低下模型的建立及其验证[J].毒理学杂志,2013,27(3):194-196
- LYU Yingjian, HUANG Junming, CAI Wen, et al. Establishment and validation of hydrocortisone model for immunodeficiency in mice [J]. Journal of Toxicology, 2013, 27(3): 194-196
- [18] 罗慧玲,黄民权.石斛多糖增强脐带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究[J].癌症,2000,19(12):1124-1126
- LUO Huiling, HUANG Minquan. Enhancement of *Dendrobium candidum* polysaccharide on killing effect of LAK cells of umbilical cord blood and peripheral blood of cancer patients *in vitro* [J]. Chinese Journal of Cancer, 2000, 19(12): 1124-1126
- [19] 朱科学,聂少平,李文娟,等.黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J].食品科学,2010,31(19):351-354
- ZHU Kexue, NIE Shaoping, LI Wenjuan, et al. Effect of polysaccharides from *Ganoderma atrum* on spleen lymphocyte proliferation and induction of cytokine in mice [J]. Food Science, 2010, 31(19): 351-354
- [20] 胡帅尔,黄俊明,李文立,等.溶血空斑分析仪在抗体形成细胞检测中的应用[J].毒理学杂志,2010,24(6):468-470
- HU Shuaier, HUANG Junming, LI Wenli, et al. Application of hemolytic plaque analyzer in detection of antibody-forming cells [J]. Journal of Toxicology, 2010, 24(6): 468-470
- [21] Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients [J]. International Journal of Cancer, 1998, 77(1): 7-12

---

(上接第 194 页)

- [23] 牛早柱,陈展,赵艳卓,等.15 个不同葡萄品种果实香气成分的 GC-MS 分析[J].华北农学报,2019,34(S1):85-91
- NIU Zaozhu, CHEN Zhan, ZHAO Yanzhuo, et al. Analysis of aromatic components from the berries of fifteen grape varieties by GC-MS [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2019, 34(S1): 85-91
- [24] 王茜.基于热诱导的烘焙咖啡豆贮藏期风味品质变化规律研究[D].南京:南京师范大学,2019
- WANG Qian. Study on the regular of flavor quality of roasted coffee beans during storage based on accelerated induction [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019
- [25] 薛友林,董立超,张鹏,等.电子鼻结合 GC-MS 分析不同处理蓝莓货架期间果实的挥发性成分[J].食品工业科技,2020, 41(19):297-303,320
- XUE Youlin, DONG Lichao, ZHANG Peng, et al. Analysis of the volatile components of blueberry fruits with different treatments during shelf life by GC-MS combined with electronic nose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(19): 297-303, 320
- [26] 蔡炳彪,张凤梅,牛云蔚.桂花精油特征香气成分研究[J].食品工业,2019,40(7):301-303
- CAI Bingbiao, ZHANG Fengmei, NIU Yunwei, et al. Study on the aroma active components of *Osmanthus essential oil* [J]. Food Industry, 2019, 40(7): 301-303
- [27] 邓凤莹,梁世弦,陈彦蓓,等.3 个鲜食葡萄冬果挥发性香气成分分析[J].南方农业学报,2020,51(5):1145-1151
- DENG Fengying, LIANG Shixuan, CHEN Yanbei, et al. Volatile aroma components of winter fruits for three table grape varieties in two-crops-a-year cultivation [J]. Journal of Southern Agricultural, 2020, 51(5): 1145-1151