

文章编号: 1004-4353(2015)01-0085-04

平贝母醇提物对小鼠免疫功能的影响

于晓龙¹, 杨建玲¹, 朱乐¹, 朴美善¹, 郭建鹏^{1,2*}

(1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002;
2. 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室(延边大学), 吉林 延吉 133002)

摘要: 应用流式细胞术测定平贝母醇提物对小鼠免疫功能的影响. 结果显示, 平贝母醇提物对小鼠外周血 T 淋巴细胞 CD69⁺/CD3⁺ 比值、腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球吞噬百分率具有显著性影响 ($P<0.05$), 对脾脏 NK 细胞 CD69⁺/NKG2D⁺ 比值具有极显著性影响 ($P<0.01$). 这表明平贝母醇提物具有增强小鼠免疫功能的作用.

关键词: 平贝母; 免疫功能; 流式细胞术

中图分类号: R285 **文献标识码:** A

The effect of the ethanol extract of *Fritillaria ussuriensis* Maxim on mice immune function

YU Xiaolong¹, YANG Jianling¹, ZHU Le¹, PIAO Meishan¹, GUO Jianpeng^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: We measure the effect of *Fritillaria ussuriensis* Maxim ethanol extract on mice immune function based on the flow cytometry. The experimental results show that the ethanol extract of *Fritillaria ussuriensis* Maxim have a significant effect on the ratio of T lymphocytes CD69⁺/CD3⁺ in mice peripheral blood and phagocytic index for fluospheres in mice peritoneal macrophages ($P<0.05$), and have a very significant effect on the ratio of NK cell CD69⁺/NKG2D⁺ in mice spleen ($P<0.01$). The *Fritillaria ussuriensis* Maxim ethanol extract can enhance the immune function of mice.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim; immune function; flow cytometry

平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim)为百合科贝母属多年生草本植物,主产于我国东北地区的长白山脉和小兴安岭南部山区,其味苦、甘、微寒,临床用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、咳痰带血等^[1]. 研究表明,平贝母中含有生物碱类、生物碱苷类及核苷类成分,其提取物具有镇咳、祛痰、平喘、抗溃疡、抗炎等作用^[2-4]. 免疫功能是机体自身的防御机制,是识别和消灭外来侵入的异物,处理衰老、损伤、死亡、变性的自身细胞以及识别和处理体内突变细胞和病毒感染细胞的能力,

免疫功能的强弱与遗传和环境因素有关. 本研究采用流式细胞术,以细胞免疫功能、单核/巨噬细胞功能、NK 细胞活性测定结果为评价指标^[5-6],初步考察平贝母醇提物对小鼠免疫功能的影响,为平贝母的进一步开发利用提供依据.

1 实验材料

1.1 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)昆明种雄性小鼠 90 只(体重 18~22 g),豚鼠 5 只

(体重 250~300 g),均由延边大学实验动物中心提供(实验动物生产许可证号 SCXK(吉)2011-0007)。饲料由延边大学实验动物中心提供。实验室为 SPF 级动物实验室,室温为 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度为 50%~60%。

1.2 实验药材

平贝母采收于吉林省敦化市平贝母栽培基地,并经延边大学药学院吕惠子副教授鉴定。

1.3 实验仪器

实验仪器有流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),数码倒置显微镜(XDS-100D),冷冻干燥机(VIRTIS-BT2K)。

1.4 实验试剂

小鼠 CD69 异硫氰酸荧光素(FITC)标记(Cat:1715-02)、CD3 藻红色素(PE)标记(Cat:553067)、NKG2D 藻红色素(PE)标记(Cat:E008303)单克隆抗体、溶血素均为美国 BD PharMingen 公司产品;荧光微球(F-20880)为美国 Molecular Probes 公司产品;Hank's 液(H1020)为 Solarbio 公司产品;牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)为美国 Ameresco 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)为美国 Gibco 公司产品;绵羊红细胞液(SRBC)与磷酸盐缓冲液(PBS)为本实验室自行制备,其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 平贝母醇提物的制备

将平贝母除去杂质后粉碎,得粗颗粒;加 10 倍量 80%(体积比)乙醇超声(240 W,40 kHz)提取 2 次,每次 30 min,过滤,合并滤液;滤液浓缩,冷冻干燥,得平贝母醇提物粉末,备用。

2.2 给药方式^[6]

给药方式采取灌胃法,平贝母醇提物混悬于水中,每日灌喂 1 次,空白对照组以等量生理盐水灌胃。给药期间动物自由饮水、摄食,各受试组小鼠连续灌胃 30 d 后,测定各项指标。

2.3 平贝母醇提物对小鼠外周血及脾脏 T 淋巴细胞表面活化抗原的影响

小鼠连续灌胃 30 d 后,脱颈椎处死,参照文献^[7]方法测定。小鼠无菌取脾,制成浓度为 5×10^5 的单细胞悬液,然后与 $1\mu\text{L}$ 小鼠 CD69 异硫氰酸荧光素(FITC)标记单克隆抗体和 $5\mu\text{L}$ 小鼠

CD3 藻红色素(PE)标记单克隆抗体混合,室温下避光孵育 30 min;用 0.5 mL 溶血素准确裂解红细胞 10 min,在 1 300 r/min 条件下离心 5 min 获取有核细胞,用 PBS 洗涤 2 次后上流式细胞仪分析。

2.4 平贝母醇提物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

小鼠连续灌胃 30 d 后,脱颈椎处死,参照文献^[8-10]方法测定。荧光微球预调理:用 PBS 配制体积浓度为 1%的 BSA 溶液,按 1:100 稀释微球储存液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后,超声处理 5 min。小鼠腹腔巨噬细胞分离:实验 4 d 前腹腔注射 0.2 mL 2%(体积比)SRBC 激活巨噬细胞,实验当天将小鼠颈椎脱臼处死,暴露腹膜,经腹腔注射 7 mL Hank's 液(含 5%FBS);将小鼠腹部向上置于摇床上摇晃 3 min,剪开腹部,吸取腹腔洗液于 15 mL 离心管中,冰浴。细胞计数:取 6×10^5 个细胞至 1.5 mL 试管中,每个试管加入 220 μL 预调理过的荧光微球悬液。吞噬作用:室温避光孵育 30 min 后,以 2 mL PBS 轻柔洗涤 2 次(洗除多余未消化的荧光微球),然后用细胞刮刮下尚未脱壁的巨噬细胞,收集细胞悬液,75 μm 过滤器过滤,根据细胞密度用 0.2 mL PBS 定容后上流式细胞仪分析。

2.5 平贝母醇提物对小鼠外周血及脾脏 NK 细胞表面活化抗原的影响

小鼠连续灌胃 30 d 后,参照文献^[7]方法测定。采小鼠眼球血,肝素抗凝;取 50 μL 全血与 $1\mu\text{L}$ 小鼠 CD69 异硫氰酸荧光素(FITC)标记单克隆抗体和 5 μL 小鼠 NKG2D 藻红色素(PE)标记单克隆抗体混合,室温下避光孵育 30 min;用 0.5 mL 溶血素准确裂解红细胞 10 min,在 1 300 r/min 条件下离心 5 min 获取有核细胞,用 PBS 液洗涤 2 次后上流式细胞仪分析。

2.6 流式细胞仪分析

标记的细胞经前向散射(FSC)和纵向散射(SSC)在二维 Dot-Plot 图中划出巨噬细胞区,然后对巨噬细胞作 FITC 荧光强度检测,485 nm 处作为激发波长,530 nm 处作为发射波长,数据显示于 FL1-FSC 二维散点图和 FL1 直方图中。每组分析 10 例动物样本,每例样本获取 10 000 个巨噬细胞,用 Cell-Quest 软件分析吞噬不同荧光微球的巨噬细胞的比例。

2.7 统计分析结果

所有数据均采用SPSS19.0统计软件进行方差分析.首先进行方差齐性检验,方差齐,计算 F 值. $F \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$ 表明各组间呈显著性差异.

3 结果

3.1 平贝母醇提取物对小鼠外周血及脾脏 T 淋巴细胞表面活化抗原的影响

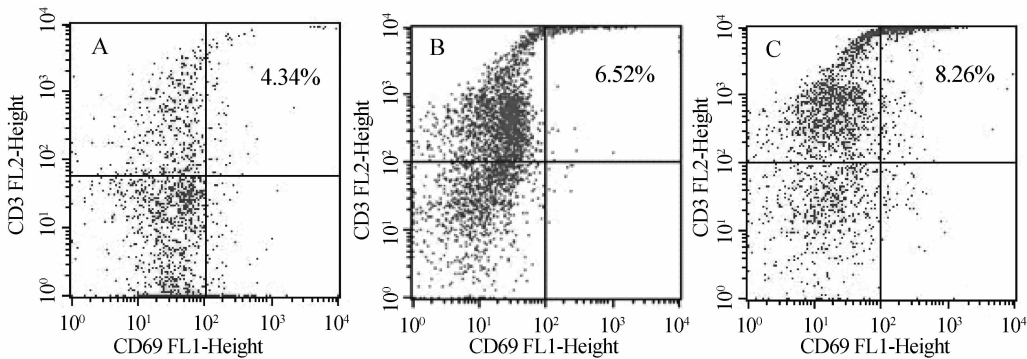
结果如图 1、表 1 所示:与对照组相比,高剂量组小鼠外周血 T 淋巴细胞 $CD69^{+}/CD3^{+}$ 比值明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$);中、高剂量组小鼠脾脏 T 细胞 $CD69^{+}/CD3^{+}$ 比值略有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$).

3.2 平贝母醇提取物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球的影响

结果如图 2、图 3 和表 2 所示:与对照组相比,中剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球吞噬百分率明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$);高剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球吞噬百分率略有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$).

3.3 平贝母醇提取物对小鼠外周血及脾脏 NK 细胞表面活化抗原的影响

结果如图 4、表 3 所示:与对照组相比,中剂量组小鼠脾脏 NK 细胞 $CD69^{+}/NKG2D^{+}$ 比值明显增高,差异具有统计学意义($P<0.01$);中、高剂量组小鼠外周血 NK 细胞 $CD69^{+}/NKG2D^{+}$ 比值略有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$).



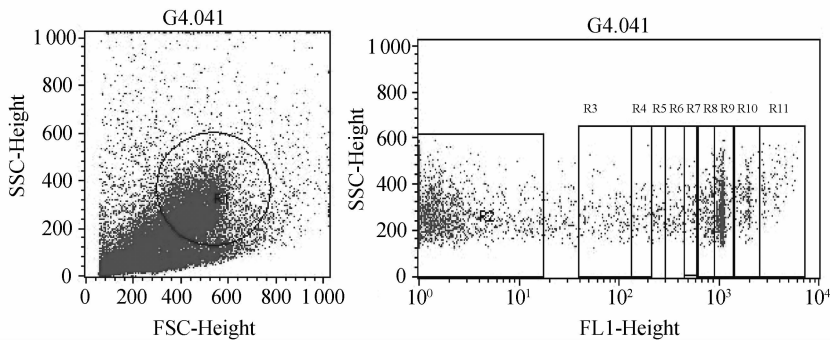
A: 空白对照组 B: 中剂量组 C: 高剂量组 (右上限为 $CD69^{+}/CD3^{+}$ 比值)

图 1 平贝母醇提取物对小鼠外周血 T 淋巴细胞 $CD69^{+}/CD3^{+}$ 比值的影响

表 1 平贝母醇提取物对小鼠外周血及脾脏 T 淋巴细胞表面活化抗原的影响

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	外周血 T 淋巴细胞($CD69^{+}/CD3^{+}$)/%	脾脏 T 淋巴细胞($CD69^{+}/CD3^{+}$)/%
对照组	0.0	3.89±2.49	1.92±1.95
中剂量组	0.14	5.45±1.84	4.60±4.79
高剂量组	0.42	8.39±5.48*	4.25±4.06

注: * 表示与对照组比较具有显著性差异($P<0.05$).



R1:总巨噬细胞群 R2:未吞噬荧光微球的巨噬细胞群 R9:吞噬 1 个荧光微球的巨噬细胞群
R10:吞噬 2 个荧光微球的巨噬细胞群 R11:吞噬 3 个荧光微球的巨噬细胞群

图 2 吞噬荧光微球后的小鼠腹腔巨噬细胞 FSC-SSC 和 FL1-SSC 二维散点图

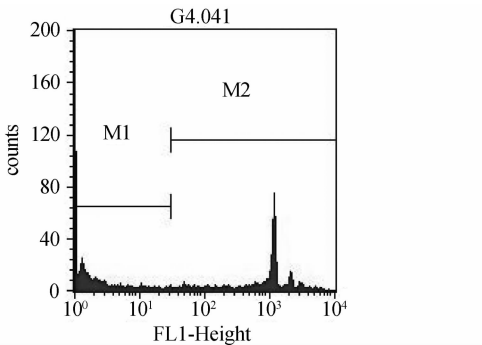
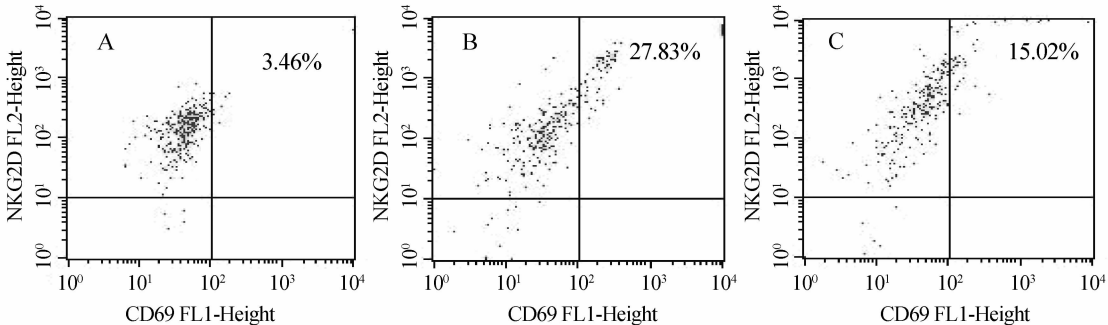


图 3 吞噬荧光微球后的小鼠腹腔巨噬细胞 FL1 直方图

表 2 平贝母醇提物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬
荧光微球的影响

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	吞噬指数/%	P 值
对照组	0.0	9.29±2.94	—
中剂量组	0.14	13.55±1.47*	0.047
高剂量组	0.42	14.94±2.93	0.132

注：* 表示与对照组比较具有显著性差异($P<0.05$)。



A: 空白对照组 B: 中剂量组 C: 高剂量组 (右上限为 CD69⁺/NKG2D⁺ 比值)

图 4 平贝母醇提物对小鼠脾脏 NK 细胞 CD69⁺/NKG2D⁺ 比值的影响

表 3 平贝母醇提物对小鼠外周血及脾脏 NK 细胞表面活化抗原的影响

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	外周血 NK 细胞(CD69 ⁺ /NKG2D ⁺)/%	脾脏 NK 细胞(CD69 ⁺ /NKG2D ⁺)/%
对照组	0.0	3.70±2.74	3.40±2.31
中剂量组	0.14	5.54±3.43	34.55±28.27**
高剂量组	0.42	5.39±4.64	4.77±6.08

注：** 表示与对照组比较具有极显著性差异($P<0.01$)。

4 结论

实验结果显示,平贝母醇提物能显著提高小鼠外周血 T 淋巴细胞 CD69⁺/CD3⁺ 比值($P<0.05$)和小鼠脾脏 NK 细胞 CD69⁺/NKG2D⁺ 比值($P<0.01$),表明其具有促进免疫细胞活化的作用.另外,平贝母醇提物还能增加小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球吞噬百分率($P<0.05$),表明其具有提高单核/巨噬细胞吞噬能力的作用,有利于增强机体非特异性免疫功能.以上结果表明平贝母醇提物有助于增强小鼠的免疫功能,具备进一步开发为保健食品的潜力.

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010:65.
[2] 李兴斌,高燕飞,李吉良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展[J]. 中医药信息,2004,21(4):28-29.
[3] 王艳红,鲍建材,张崇禧,等. 中药平贝母的研究进

展[J]. 人参研究,2004(3):13-17.
[4] 黄丽晶,高文远,李霞,等. 平贝母水提物抗炎作用研究[J]. 天津中医药,2009,26(6):495-496.
[5] 杨杏芬,黄琼,黄俊明,等. 流式细胞术在保健食品功能评价中的应用[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(5):335-341.
[6] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京:中国标准出版社,2003:697.
[7] Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69⁺ and regulation of the immune function[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999,21(3):565-582.
[8] 李煜,齐丽娟,迈一冰,等. 比较流式细胞术和鸡红细胞法检测小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能[J]. 毒理学杂志,2012,26(2):133-135.
[9] 黄琼,李志,杨杏芬,等. 应用流式细胞术研究大蒜粉对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 华南预防医学,2006,32(3):19-22.
[10] Mitsuyuki Ichinose, Nobumasa Hara, Masashi Sawada, et al. A flow cytometric assay reveals an enhancement of phagocytosis by platelet activating factor in murine peritoneal macrophages[J]. Cellular Immunology, 1994,156(2):508-518.