

中图分类号: R392.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2017)02-0148-03

• 实验研究 •

番灵胶囊对小鼠免疫功能的调节作用

程洁¹, 环飞², 李世芬², 胡奇², 靳苏香², 秦珩², 王玉邦²

(1. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166; 2. 江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心)

【摘要】 目的 研究番灵胶囊对 CKF1(BALB/c × KM) 小鼠的免疫调节作用。方法 采用经口灌胃分别给予 80、160 和 480 mg/kg·bw 的番灵胶囊 30 d 后, 观察其体重, 测定其免疫器官指数、脾淋巴细胞增殖能力、小鼠迟发型变态反应, 血清溶血素、自然杀伤细胞(NK 细胞)活性、抗体生成细胞水平及腹腔巨噬细胞吞噬功能的变化。结果 480 mg/kg·bw 组可增强脾淋巴细胞增殖能力、提高抗体生成细胞水平、提高小鼠 NK 细胞和巨噬细胞吞噬活性; 160 和 480 mg/kg·bw 组可增加小鼠血清半数溶血值。结论 在本试验条件下, 番灵胶囊在 480 mg/kg·bw 剂量下有增强小鼠免疫功能的作用。

【关键词】 免疫调节; NK 细胞; 巨噬细胞吞噬功能

DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2017.02.017

番灵胶囊是由灵芝孢子提取物与番茄红素为主要原料制成的保健品。灵芝孢子含有大量的核酸、核苷酸、多糖、蛋白质成分, 具有扶正固本、健脾和胃、养心安神等功效。文献报道, 灵芝孢子具有免疫调节、抑制肿瘤、保肝解毒、调节血脂、降低血糖以及具有抗炎、抗病毒、抗辐射等作用^[1-4]。番茄红素是天然类胡萝卜素, 主要存在于番茄中。但近些年的研究发现番茄红素具有较强的抗氧化作用、清除自由基、并在抗肿瘤、预防心脑血管疾病和增强人体免疫力等方面具有重要意义^[5-12]。番灵胶囊属于无毒级, 且无亚急性毒性作用及遗传毒性作用^[13], 故本课题组研究番灵胶囊对小鼠免疫系统的影响, 旨在为灵芝孢子提取物和番茄红素复方的保健功能进一步的开发利用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 按照卫生部《保健食品功能学评价程序和检验方法》选择清洁级 CKF1 代(BALB/c × KM) 健康雌性小鼠 200 只, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 生产许可证号 SCXK(沪) 2012-0002, 体重为 19.2 ~ 21.9 g。实验动物饲养于南京医科大学卫生分析检测中心屏障系统, 使用许可证号: SYXK(苏) 2012-0041。番灵胶囊由某公司提供, 人体推荐剂量为 0.96 g/d; 培养基(Gibco 公司, 美国); 胰酶(华美生物工程公司); 小牛血清(浦东开发区高桥兽医站); 四甲基偶氮唑(MTT, Amresco 公司, 美国); 刀豆蛋白 A

(Sigma 公司, 美国); 吩噻二甲酯硫酸盐(NP40, Fluka 公司, 美国); 2,4-二硝基氟苯(DNFB, 中国医药集团化学试剂公司); 印度墨汁(walreck GmbH & Co. KG 公司); 无菌脱纤维羊血(SRBC, 江苏博达生物工程有限公司); 鸡红细胞悬液由本实验室自制。

1.2 试验方法 设 80、160 和 480 mg/kg 3 个剂量组(相当于人体推荐量的 5、10、30 倍), 对照组(0 mg/kg) 以无菌蒸馏水代替。小鼠按体重随机分为 I、II、III、IV、V 5 个大组, 每大组 40 只小鼠, 分成 4 个剂量组, 每个剂量组 10 只。其中 I 组小鼠进行 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化、NK 细胞活性试验; II 组小鼠进行二硝基氟苯诱导小鼠 DTH 试验; III 组小鼠进行小鼠抗体生成细胞及半数溶血值(HC₅₀) 试验; IV 组小鼠进行小鼠碳廓清试验; V 组小鼠进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验。每天各剂量组灌胃给予样品, 灌胃量为 10 ml/kg, 连续 30 d 后测定各项增强免疫力功能的指标。

1.2.1 体重和免疫器官指数: 小鼠给予受试物 30 d 后称重, 处死, 取脾脏、胸腺称重, 计算免疫器官指数。脾或胸腺指数 = 脾/胸腺(mg) / 体重(g)。

1.2.2 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应(DTH) 和小鼠淋巴细胞增殖试验: 小鼠给予受试物 30 d 后, 用 DNFB 溶液(10 mg/ml) 50 μl 致敏。致敏第 5 天采用 10 mg/ml DNFB 溶液 10 μl 对小鼠右耳进行攻击, 处死, 用打孔器取下直径 8 mm 耳片, 称重, 以左右耳之差表示 DTH 的程度。

小鼠给予受试物 30 d 后, 处死小鼠。无菌取脾, 制备 3 × 10⁶ 个/ml 脾细胞悬液, 将细胞悬液分两孔加入培养板中, 每孔 1 ml, 一孔加 75 μl ConA 液, 另一孔作为对照, 置 37 °C、5% CO₂ 下培养 72 h。采用 MTT

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 程洁, 硕士, 实验师, 研究方向: 药物毒理学与神经毒理学。

通讯作者: 王玉邦, 博士, 副教授, 研究方向: 生殖毒理学。

比色法测定光密度,计算脾淋巴细胞增殖能力。

1.2.3 抗体生成细胞检测和血清溶血素测定:小鼠给予受试物 30 d 后,制备 2% 的 SRBC 悬液,每只小鼠腹腔注射 SRBC 悬液 0.2 ml 进行免疫,4 d 后取血后处死小鼠,取出脾脏。脾脏制成 5×10^6 个/ml 细胞悬液。将培养基与等量 2 倍浓度的 Hank's 液混合,分装小试管,每管 0.5 ml,加入 10% SRBC 50 μ l,脾细胞悬液 20 μ l,倾倒在琼脂糖薄层的玻片上,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 下培养 1.5 h,然后加入补体,继续孵育 1.5 h 后,计数空斑数。离心取血清稀释 200 倍,测定样品管及 SRBC 半数溶血时的光密度值。溶血素的量以半数溶血值 (HC_{50}) 表示。

1.2.4 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验和碳廓清试验:小鼠给予受试物 30 d 后,每只鼠腹腔注射 20% 鸡红细胞悬液 1 ml,30 min 后处死。腹腔注射生理盐水 2 ml,1 min 后吸出腹腔洗液 1 ml,滴片,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,固定,Giemsa 染色后光学显微镜下观察计数巨噬细胞、吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数和被吞噬的鸡红细胞数,并计算吞噬百分率(%) 和吞噬指数。

小鼠经口给予受试物 30 d 后,入 4 倍稀释的印度墨汁(0.1 ml/10 g),注入墨汁后 2 min 及 10 min 分别从眼内眦静脉丛取血 20 μ l,并将其加到 2 ml 0.1% Na_2CO_3 溶液中,用 721 分光光度计在 600 nm 波长处测吸光度(A) 值,并取胸腺、肝、脾,利用光密度值、肝重和脾重计算吞噬指数 a 。

1.2.5 NK 细胞活性测定:小鼠给予给予受试物 30 d 后,处死。无菌取脾,制备脾细胞悬液,裂解红细胞后调整细胞浓度至 2×10^7 个/ml,取 YAC-1 细胞(4×10^5 个/ml) 和脾细胞各 100 μ l(效靶比 50:1) 加入 U 型 96 孔培养板中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 4 h,然后离心 5 min,每孔吸取上清液 100 μ l 置平底 96 孔培养板中,加入 LDH 基质液 100 μ l,反应 10 min 后加入 1 mol/L 的 HCl 30 μ l,在酶标仪 490 nm 处测定 A 值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行方差齐性检验,满足方差齐要求的数据,采用单因素方差分析;对非正态分布或方差不齐的数据资料进行适当的变量转换,待满足正态或方差齐要求后采用单因素方差分析方法中多个试验组与一个对照组间均数的两两比较方法进行统计处理。

2 结果

2.1 番灵胶囊对小鼠体重和免疫器官指数的影响 经口给予小鼠受试物 30 d 后,体重与空白对照组比较

差异无统计学意义;免疫器官指数与空白对照组比较无差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 番灵胶囊对小鼠胸腺、脾脏器官的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

剂量 (mg/kg)	胸腺/体重 mg/g	P 值	脾脏/体重 mg/g	P 值
0	2.07 $\pm$ 0.33		3.74 $\pm$ 0.29	
80	2.10 $\pm$ 0.54	0.997	3.84 $\pm$ 0.37	0.915
160	2.33 $\pm$ 0.44	0.381	3.94 $\pm$ 0.59	0.595
480	2.38 $\pm$ 0.41	0.269	3.93 $\pm$ 0.40	0.652

2.2 番灵胶囊对小鼠细胞免疫(淋巴细胞增殖能力及耳肿胀度)、体液免疫(抗体生成细胞水平及半数溶血值)的影响 结果显示,随剂量增加小鼠淋巴细胞增殖能力增加,其中 480 mg/kg 组有显著增加($P < 0.01$);480 mg/kg 组对小鼠抗体生成细胞(溶血空斑数)有显著增加($P < 0.05$);480 mg/kg 组 HC_{50} 显著高于对照组($P < 0.01$),160 mg/kg 组 HC_{50} 亦显著高于对照组($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 番灵胶囊对脾淋巴细胞增殖能力、耳肿胀度、抗体生成细胞水平和半数溶血值的影响($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	加 ConA 孔与不加 ConA 孔吸光度的差值	耳壳增重 (mg)	溶血空斑数 (个/ 10^6 脾细胞)	HC_{50}
0	0.010 $\pm$ 0.003	10.9 $\pm$ 4.5	21 $\pm$ 7	56 $\pm$ 17
80	0.012 $\pm$ 0.004	12.1 $\pm$ 3.2	30 $\pm$ 21	59 $\pm$ 32
160	0.013 $\pm$ 0.006	12.1 $\pm$ 4.4	38 $\pm$ 21	84 $\pm$ 23*
480	0.015 $\pm$ 0.005**	12.5 $\pm$ 3.2	51 $\pm$ 30*	90 $\pm$ 21**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; $n = 10$ 。

2.3 番灵胶囊对小鼠非特异性免疫(吞噬细胞吞噬能力及 NK 细胞活性)的影响 结果显示,小鼠碳廓清试验各剂量组吞噬指数 a 与阴性对照组比较差异无统计学意义;小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率与吞噬指数与阴性对照组比较均有增加趋势,仅 480 mg/kg 组吞噬指数差异有统计学意义($P < 0.05$);480 mg/kg 组 NK 细胞活性显著高于对照组($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 番灵胶囊对小鼠吞噬细胞吞噬能力及 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	吞噬指数 a	吞噬百分率 (%)	吞噬指数	NK 细胞活性 (%)
0	6.12 $\pm$ 0.80	21.3 $\pm$ 6.6	0.23 $\pm$ 0.07	21.5 $\pm$ 9.5
80	6.17 $\pm$ 0.49	23.2 $\pm$ 4.0	0.28 $\pm$ 0.04	28.0 $\pm$ 7.8
160	6.27 $\pm$ 0.93	23.2 $\pm$ 5.5	0.29 $\pm$ 0.06	29.5 $\pm$ 10.5
480	6.31 $\pm$ 0.65	28.9 $\pm$ 9.0	0.35 $\pm$ 0.12*	31.9 $\pm$ 6.6*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$; $n = 10$ 。

3 讨论

从实验结果可见,番灵胶囊 480 mg/kg·bw 组可增

(下转第 154 页)

统和运动影响的研究 [J]. 厦门: 厦门大学, 2014.

- [25] Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, et al. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants [J]. Toxicol Sci, 2006, 92(1): 157-173.
- [26] Fernie KJ, Marteinson SC, Bird DM, et al. Reproductive changes in American kestrels (*Falco sparverius*) in relation to exposure to technical hexabromocyclododecane flame retardant [J]. Environ Toxicol Chem, 2011, 30(11): 2570-2575.
- [27] Marteinson SC, Kimmins S, Letcher RJ, et al. Diet exposure to technical hexabromocyclododecane (HBCD) affects testes and circulating testosterone and thyroxine

levels in American kestrels (*Falco sparverius*) [J]. Environ Res, 2011, 111(8): 1116-1123.

- [28] 高永飞. 氯化石蜡(CPs)和六溴环十二烷(HBCD)暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应研究 [J]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [29] 邓军, 杨丽华, 周炳升. 六溴环十二烷(HBCD)对斑马鱼发育早期能量代谢及软骨、肌肉和鱼鳍发育的影响 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 722-730.
- [30] 王玲, 郑明刚, 全艳丽, 等. 六溴环十二烷(HBCD)暴露对生长阶段文昌鱼的毒性及其几种重要酶活性的影响 [J]. 环境科学学报, 2011, 31(5): 1086-1091.

(收稿日期: 2016-05-27)

(上接第 149 页)

强脾淋巴细胞增殖能力,提示该受试物有激活淋巴细胞并增强细胞免疫的功能; 番灵胶囊 160 和 480 mg/kg·bw 组的小鼠血清半数溶血值与对照组比较有显著增加, 480 mg/kg·bw 组抗体生成细胞水平与对照组比较有显著增加, 提示其具有增强小鼠体液免疫功能, 即增强小鼠的特异性免疫功能; 而单核巨噬细胞的吞噬能力和 NK 细胞活性是衡量机体非特异性免疫功能的重要标准, 本实验中 480 mg/kg 组吞噬指数有显著增高, 480 mg/kg 组 NK 细胞活性显著高于对照组。全国辉等^[14]研究表明 1800 mg/kg 剂量组灵芝孢子粉可提高免疫调节指标小鼠单核巨噬细胞的吞噬能力、脾脏抗体生成细胞数、血清中抗绵羊红细胞抗体效价、迟发型变态反应和 NK 细胞活性等, 并表现出统计学差异; 有研究表明番茄红素能增强 ALI 大鼠 PAM 吞噬功能, 随着番茄红素剂量增加, 肺泡巨噬细胞吞噬功能逐渐增强^[12]。因此本研究结果提示小鼠在给予番灵胶囊后所表现出的高活性免疫能力可能与番灵胶囊中灵芝孢子提取物中含有的丰富的肽多糖和高含量的维生素 E 及番灵胶囊中番茄红素有关, 有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 王瑛, 金捷, 金祖汉, 等. 灵芝孢子粉增强免疫功能的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 544-546.
- [2] 王卫霄, 吕艳茹, 姚苗苗, 等. 灵芝孢子粉抗肿瘤活性的研究进展 [J]. 河北医药, 2015, 37(1): 105-108.
- [3] 葛振丹, 黄厚今, 何亮, 等. 灵芝孢子粉对长期镉暴露大鼠 DNA 甲基转移酶和基因 p16 表达的影响 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(1): 59-62.
- [4] 叶鹏飞, 张美萍, 王康宇, 等. 灵芝主要成分及其药理作用的研究进展综述 [J]. 食药用菌, 2013, 21(3): 158-161.
- [5] 武春喜. 灵芝孢子粉对恶性肿瘤放化疗的减毒作用 [J]. 中国民间疗法, 2013, 21(8): 41-415.
- [6] 李永明, 李艳君, 陈立强. 高频电磁辐射对大鼠血脑屏障的影响及参力胶囊防护作用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35(6): 781-783.
- [7] Hsu YM, Lai CH, Chang CY, et al. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(3): 677-685.
- [8] 吴丽君, 郭新明, 张俊峰. 番茄红素及运动对人体血清自由基代谢的影响 [J]. 体育科学, 2008, 28(2): 47-53.
- [9] 罗连响, 李晓玲, 鲍波. 番茄红素生物学活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 388-391.
- [10] 许晓丽, 朱密, 胡敏予. 番茄红素对高脂血症大鼠血细胞和纤活活性的影响 [J]. 卫生研究, 2011, 40(5): 620-623.
- [11] 郑书国, 赵梦秋, 杨解人. 番茄红素对高脂饮食合并烟碱诱导的家兔动脉粥样硬化的影响 [J]. 医学信息, 2015, 28(25): 91-92.
- [12] 李百花, 张秋香, 董殿军, 等. 番茄红素对急性肺损伤大鼠免疫细胞和炎性细胞因子的影响 [J]. 北京大学学报(医学版), 2007, 39(1): 77-82.
- [13] 环飞, 李世芬, 胡奇, 等. 番灵胶囊的安全性评价研究 [J]. 毒理学杂志, 2013, 27(5): 406-407.
- [14] 全国辉, 马玲, 王红梅, 等. 灵芝孢子粉的免疫调节和辐射防护作用研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(2): 132-134.

(收稿日期: 2016-08-16)