

枸杞-沙棘-青稞粉复合物对小鼠的免疫调节功效

许佳新¹, 张津瑞¹, 岳芳芳¹, 谢肖夫², 魏冉², 单媛媛^{1*}, 吕欣^{1*}

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 陕西华州医药生物工程有限公司, 西安 710054)

摘要: **目的** 探究枸杞沙棘的提取物与青稞粉复合制成的枸杞-沙棘-青稞粉复合物(wolfberry-sea buckthorn-highland barley powder complex, WSHC)对小鼠的免疫调节活性。**方法** 以斯普拉格-杜勒(Sprague-Dawley, SD)大鼠和昆明种小鼠为研究对象。在对 WSHC 进行安全性毒理学评估的基础上, 考察 WSHC 高、中、低 3 个不同剂量[7.5、5.0、2.5 g/(kg·BW)]对小鼠胸腺脾脏指数(比重法)、细胞免疫[小鼠迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)和 ConA (concanavalin A)诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验、体液免疫(血清溶血素和抗体生成细胞检测)、单核-巨噬细胞功能(小鼠碳廓清试验和小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验)以及自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)功能(乳酸脱氢酶法)]的影响。**结果** 高剂量 WSHC 组处理可以显著提高小鼠的细胞免疫, 其中与阴性对照组比, 淋巴细胞增殖能力提高了 42.74% ($P<0.05$), 且小鼠足跖厚度差值提高了 47.57% ($P<0.01$); 中、高剂量的 WSHC 处理可以显著提高小鼠的体液免疫, 与阴性对照组相比, 中、高剂量 WSHC 处理溶血空斑数含量分别提高了 16.25% ($P<0.05$)和 19.48% ($P<0.01$), 高剂量 WSHC 促进小鼠抗体积数提高 14.41% ($P<0.01$); 但各剂量组对免疫器官、单核-巨噬细胞功能、NK 细胞功能无明显影响。**结论** WSHC 可显著提高小鼠淋巴细胞增殖能力和小鼠体液免疫能力, 是一种具有良好开发前景的免疫调节剂。

关键词: 枸杞; 沙棘; 免疫调节; 体液免疫; 细胞免疫

Immune regulation efficacy of wolfberry-sea buckthorn-highland barley powder complex on mice

XU Jia-Xin¹, ZHANG Jin-Rui¹, YUE Fang-Fang¹, XIE Xiao-Fu², WEI Ran²,
SHAN Yuan-Yuan^{1*}, LV Xin^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Huazhou Pharmaceutical Bioengineering Co., Ltd., Xi'an 710054, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the immunomodulatory activity of the wolfberry-sea buckthorn-highland barley powder complex (WSHC) made from extracts of wolfberry-sea buckthorn and highland barley flour on mice. **Methods** Sprague-dawley (SD) rats and Kunming mice were selected as the research objects. Based on the toxicological safety assessment of WSHC, the effects of high, medium and low doses of WSHC [7.5, 5.0, 2.5 g/(kg·BW)] on thymus spleen index (specific gravity method) and cellular immunity [including delayed type hypersensitivity (DTH) and

*通信作者: 单媛媛, 博士, 副教授, 主要研究方向为动物性食品的营养加工与副产物的综合利用研究及禽蛋营养与人类健康、肠道健康的膳食干预机制研究。E-mail: shanyy2013@163.com

吕欣, 博士, 教授, 主要研究方向为采用现代分子生物学与发酵工程理论和技术解决生产中的基础和应用问题。E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

*Corresponding author: SHAN Yuan-Yuan, Ph.D, Associate Professor, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China. E-mail: shanyy2013@163.com

LV Xin, Ph.D, Professor, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China. E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

concanavalin A (ConA)-induced mouse spleen lymphocyte transformation test, humoral immunity (serum hemolysin and antibody-producing cells detection), monocyte-macrophage function (mouse carbon clearance test and mouse peritoneal macrophage phagocytic chicken red blood cell test), and natural killer cell (NK) function (lactate dehydrogenase method)] of mice were investigated. **Results** The high-dose WSHC treatment could significantly improve the cellular immunity function compared with the negative control group, the lymphocyte proliferation ability increased by 42.74% ($P<0.05$), and the mouse foot plantar thickness difference increased by 47.57% ($P<0.01$); medium and high doses of WSHC treatment could significantly improve the humoral immunity of mice compared with the negative control group, the number of hemolytic plaques in the medium and high doses of WSHC treatment groups increased by 16.25% ($P<0.05$) and 19.48% ($P<0.01$), respectively, high dose WSHC could increase the antibody-producing cells by 14.41% ($P<0.01$), however, there were no significant effects on immune organs, monocyte-macrophage function, and NK cell function in each dose group. **Conclusion** WSHC can significantly improve the proliferation of lymphocyte and humoral immunity of mice, which is an immune modulator with good development prospect.

KEY WORDS: wolfberry; sea buckthorn; immunomodulatory; humoral immunity; cellular immunity

0 引言

近几年,随着癌症免疫疗法在肿瘤治疗中的快速发展,免疫系统的免疫监视、防御和调节作用被广泛关注和研究。免疫抑制是目前癌症治疗中广泛存在的问题,免疫调节剂可以在一定程度上增强免疫反应^[1]。因此,研究和开发新型免疫调节剂是预防和治疗免疫抑制性疾病最有效的方法之一。一些药食两用的天然产物可提高机体免疫力。其中具有代表性的枸杞(*Lycium barbarum*)、沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)和青稞(*Hordeum vulgare* L.)的免疫活性已经被广泛研究^[2-3]。此外,由于枸杞和沙棘的天然活性价值,我国青海确立了“东部沙棘,西部枸杞”的发展思路。作为青海地区的特色天然产物,枸杞、沙棘和青稞的产业化开发可以进一步推动青海“生态立省”和特色天然产物产业快速发展。

枸杞多糖作为枸杞的主要活性成分,具有提高机体免疫功能的活性^[4-5]。其主要作用途径是激活细胞免疫、诱导细胞因子的释放。有报道称,枸杞多糖 3 (*Lycium ruthenicum* Murr. polysaccharide 3, LRGP3)可增强环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导的免疫抑制小鼠中 T (thymus, T)细胞和 B (bursa of fabricius, B)细胞的增殖反应,以及腹膜巨噬细胞的吞噬作用,并能恢复血清中白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平^[6]。沙棘亦富含多种活性成分,包括脂肪酸奥米茄-7^[7]、黄酮类^[8]、多糖类^[9]等,被普遍应用于食品、医药和保健品等产品。其中,不同的活性组分发挥免疫作用的途径存在差异。研究发现,沙棘提取物可以提高小鼠腹腔巨噬细胞中细胞因子干扰素 γ (interferon-gamma, IFN- γ)、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、TNF- α 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β ,

IL-1 β)水平,促进淋巴增殖,是一种很有前途的平衡 TH1 辅助细胞(Th1)和 TH2 辅助细胞(Th2)的免疫佐剂^[10],并且对 CTX 诱导的免疫抑制巴比赛(Balb/c)小鼠具有免疫调节作用^[11]。从沙棘中分离到一个天然的高甲氧基高半乳糖醛酸(high-methoxyl homogalacturonan, HRWP-A)可以通过激活 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4),促进巨噬细胞释放一氧化氮(nitric oxide, NO)、IL-1 β 和 IL-6^[12]。沙棘提取物除了具有激活免疫的作用外,还对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症小鼠具有抗炎功能,其中起重要作用的成分是沙棘中的黄酮类化合物^[13]。而青稞粉中富含多酚、原花青素、抗氧化酶、黄酮和 β -葡聚糖等多种营养物质^[14],尤其是 β -葡聚糖。大量研究发现, β -葡聚糖具有清肠、调节血脂、降低胆固醇、阻抗肿瘤、提高免疫力等重要的生理活性^[15]。从青稞中提取纯化的一种水溶性多糖能显著提高免疫抑制小鼠的脾脏和胸腺重量指数,小鼠骨髓细胞(bone marrow cells, BMC)和外周血白细胞(white blood cell, WBC)的数量,提高免疫抑制小鼠血清 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 水平,从而改善免疫抑制小鼠的免疫功能^[16]。

虽然大量的研究已经明确了 3 种天然产物的免疫活性价值,并对其活性成分的提取、免疫作用途径进行了详细的研究,但目前尚缺乏对天然产物作为免疫活性功能食品的产业化开发。此外,3 种具有免疫活性的天然产物对机体安全性及免疫作用途径的综合作用效果仍旧未知。因此为了进一步将理论研究转化为实际生产,本研究以枸杞和沙棘的混合提取物为原料(主成分为多糖和黄酮),以青稞粉、白砂糖、植脂末、食用香精(麦香味)为辅料,合理组方制备富含多种营养物质的复方制剂——枸杞-沙棘-青稞粉复合物(wolfberry-sea buckthorn-highland barley powder

complex, WSHC), 在安全性毒理学评估的基础上, 探究其对免疫器官、细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞功能和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)功能的影响, 为WSHC的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞提取物、沙棘提取物(三原华州医药生物工程); 青稞粉(青海省轻工研究所); 白砂糖(中粮糖业辽宁有限公司); 植脂末(上海盾皇食品有限公司); 麦香味食用香精(阳江市阳东食品香料公司)。

6%绵羊红细胞(sheep red blood cells, SRBC)、20%鸡红细胞(上海酶研生物科技有限公司); 小鼠淋巴瘤细胞(mouse lymphoma cells, YAC-1)、洛多维培养液(roswell park memorial institute, RPMI 1640)[赛百慷(上海)生物技术股份有限公司]; Hank's (hanks balanced salt solution, HBSS)液(上海雅吉生物科技有限公司); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)基质液(上海泽叶生物科技有限公司); 噻唑蓝[3-(4,5)-dimethylthiazolium(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazoliumromide, MTT]、NP-40 (nonidet P-40)、ConA (concanavalin A, 货号: CAS 11028-71-0; 纯度 $\geq 98\%$)(北京索莱宝科技有限公司); 吉姆萨染色液 Giemsa (10X)(上海碧云天生物技术有限公司); 2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME)(分析纯, 无锡云萃生物科技有限公司); 补体(豚鼠血清)(上海信帆生物科技有限公司); 氧化型辅酶 I(分析纯, 上海梵态生物科技有限公司)。

SD 大鼠(质量合格证号: 61001700003655、61001700003711)、昆明种小鼠(质量合格证号: 61001700003713、61001700003714), 生产许可证号为: SCXK (陕)2018-001, 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级; 试验动物、动物饲料和垫料均由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.2 仪器与设备

AL104 电子天平(± 0.1 mg, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); WFZ-UV-2102PC 紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); DRP-9082 电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司); 13395H2X 光学显微镜(德国 Leica 公司); HC-3016R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

(1)取白砂糖、枸杞提取物、沙棘提取物、青稞粉过 100 目筛备用;

(2)称取枸杞提取物 5.00 g/100 g、沙棘提取物 2.25 g/100 g、青稞粉 90.00 g/100 g、白砂糖 2.475 g/100 g、植脂末 0.25 g/100 g、食用香精(麦香味)0.025 g/100 g, 混合均匀, 分装(20 g/袋), 检验, 包装, 即得成品。WSHC 成人推荐量为每

日 1 次, 每次 1 袋, 冲服(青稞粉占总样品的 90%, 根据膳食营养均衡要求, 青稞的食用建议控制在 40 g 以下)。

1.3.2 多糖和黄酮类化合物检测

(1)苯酚-硫酸比色法测定粗多糖含量

根据《保健食品功效成分检测方法》检测混合物中的粗多糖含量。以葡萄糖为标准液绘制标准曲线, 将样品依次加入浓硫酸和 6%的苯酚, 剧烈摇动, 待完全反应后, 检测 490 nm 的吸光值。

(2)总黄酮含量测定

方法参照肖香兰等^[17]的方法测定样品中总黄酮含量。

1.3.3 WSHC 复合产品安全评估

(1)大鼠急性毒性试验

参照《保健食品检验与评价技术规范》(卫生部 2003 年版), 急性毒性试验进行实验设计, 体重 180~220 g SD 大鼠 20 只, 雌雄各半。剂量设计: 试验按最大耐受剂量法(maximum tolerated dose, MTD)设 20.0 g/(kg·BW)为灌胃剂量(相当于人体推荐量的 400 倍)。试验时称取受试样品 100 g 加蒸馏水至 100 mL, 制成 100.0%的混悬液, 混匀备用。灌胃前动物禁食 16 h, 不限饮水, 观察 14 d 内动物的中毒症状及死亡情况, 试验第 1、7、14 d 称体重后处死动物。

(2)潜在毒性检测

参照《保健食品检验与评价技术规范》(卫生部 2003 年版), 30 d 经口毒性试验进行实验设计, 试验设 5.00、2.50、1.25 g/(kg·BW) 3 个剂量组(分别相当于人体推荐用量 100、50、25 倍), 另设溶剂对照组(蒸馏水), 每组 20 只大鼠, 雌雄各半。试验时分别取 50.0、25.0、12.5 g 样品加蒸馏水至 100 mL。灌胃体积按 10 mL/(kg·BW)每日灌胃 1 次, 连续灌胃 30 d, 试验期间动物自由进食、饮水。试验结束称禁食 16 h 后的空腹体重, 处死后称肝、肾、脾、睾丸重, 计算其脏器比。

1.3.4 WSHC 复合产品的免疫功能检测

(1)试验分组及受试物给予方式

200 只雌性小鼠随机分成 5 组, 分别用于 5 个独立的试验。每个试验 40 只, 10 只/组, 分别给予高、中、低 3 个剂量组及阴性对照组(蒸馏水)灌胃干预。试验设 9.99、6.66、3.33 g/(kg·BW)高、中、低 3 个剂量组(分别相当于人体推荐用量 30、20、10 倍), 灌胃体积为 20 mL/(kg·BW)。每天灌 1 次胃, 连续 30 d。第 1 组小鼠用来进行 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验^[18]和 NK 细胞活性测定^[19], 第 2 组小鼠用于迟发型变态反应试验和脏器/体重比值试验指标检测^[20], 第 3 组小鼠用于抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)和血清溶血素的测定^[21], 第 4 组小鼠用于小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法)指标检测^[22], 第 5 组小鼠用于小鼠碳廓清试验指标检测^[23]。

(2)ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验(MTT 法)

无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液平皿中, 用镊子轻轻将脾磨碎, 制成单个样品细胞悬液。经 200 目筛网过滤, 用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10 min (1000 r/min)。

然后将细胞悬浮于 1 mL 的完全培养液中,用台酚兰染色计数活细胞数(应在 95%以上),用 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。采用 MTT 法,具体试验参照 LIANG 等^[18]的方法进行,在 570 nm 波长处测定其光吸收值(optical density, OD),可间接反映活淋巴细胞数量。

(3)NK 细胞活性测定

试验前 24 h 将靶细胞(YAC-1 细胞)进行传代培养。用前以 Hank's 液洗 3 次,用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。无菌取脾,研磨制成单个脾细胞悬液(效应细胞)。经 200 目筛网过滤后用 Hank's 液洗 2 次,用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 2×10^7 个/mL。NK 细胞活性试验具体操作参照 ZHANG 等^[19]的方法进行,取靶细胞和效应细胞各 100 μ L (效靶比 50:1) ($n=3$),培养箱中培养 4 h。然后将离心取上清 100 μ L,加入 LDH 基质液 100 μ L,反应 8 min,加入 30 μ L 1 mol/L 盐酸溶液,测定 OD_{490 nm}。按公式(1)计算 NK 细胞活性。

$$\text{NK 细胞活性}/\% = \frac{\text{反应孔OD}-\text{自然释放孔OD}}{\text{最大释放孔OD}-\text{自然释放孔OD}} \times 100\% \quad (1)$$

(4)迟发型变态反应试验和脏器/体重比值

小鼠灌胃干预于 26 d 时,每只鼠腹腔注射 2% (V:V) SRBC (0.2 mL/只)进行致敏,于免疫后第 4 d,每鼠左后足跖部皮下注射 20% (V:V) SRBC (20 μ L/只),进行攻击,并于攻击前和攻击后 24 h 分别测量每鼠左后足跖同一部位厚度($n=3$),计算攻击前后的足跖厚度差值。处死小鼠后,收集胸腺、脾脏称重,计算胸腺指数和脾脏指数^[20]。

(5)抗体生成细胞检测和血清溶血素的测定

抗体生成细胞检测采用 Jerne 改良玻片法^[21],致敏试验同 1.3.4 (4),4 d 后处死小鼠,制备脾细胞悬液,细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL。将 1%琼脂糖与等量 2 倍浓度 pH 7.2~7.4 的 Hank's 液混合,取 0.5 mL 混合液与 50 μ L 10% SRBC、20 μ L 脾细胞悬液,倾倒在刷有琼脂糖薄层的玻片上,待琼脂凝固后,37 $^{\circ}$ C 温育 1.5 h 后加入补体,继续温育 1.5 h,计数溶血空斑数。以空斑数/ 10^6 脾细胞表示抗体生成细胞数。眼球取血,倍比稀释,取 100 μ L 不同稀释度的血清置于微量血凝板内,加入 100 μ L 0.5% SRBC,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h,观察血球凝集程度,进行血清溶血素测定,计算抗体水平。

(6)小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法)和小鼠碳廓清试验

小鼠的吞噬作用采用 WEI 等^[22]的方法,并稍加修饰。各组小鼠均腹腔注射 20%鸡红细胞,30 min 后颈椎脱臼处

死小鼠,取每只小鼠腹腔液 1 mL 作为巨噬细胞悬液,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。漂洗、晾干、固定、4% Giemsa-磷酸缓冲液染色、再漂洗晾干、镜检,计算吞噬率、吞噬指数。

小鼠碳廓清试验参照文献^[23]进行。

1.4 数据处理

试验结果均为计量资料,试验数据以均数 \pm 标准偏差表示,采用 GraphPad Prism 6.02 统计软件进行单因素方差分析,* $P < 0.05$ 为具有统计学差异,** $P < 0.01$ 为具有显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 多糖和黄酮类化合物含量

枸杞和沙棘中的多糖和黄酮是其主要的活性物质,因此本研究对 100 g 产品中的多糖和黄酮进行含量测定。由表 1 可见,3 个不同批号的多糖含量均大于 2 g/100 g,总黄酮含量大于 1 g/100 g。由于每 100 g 样品中的枸杞添加量为 5 g,沙棘添加量为 2.25 g,因此该提取物的提取效率较高,可以进行下一步活性测定。

表 1 多糖和黄酮类化合物含量
Table 1 Polysaccharide and flavonoids content

检验项目	样品批号		
	1	2	3
粗多糖(以葡萄糖计)/(g/100 g)	2.48	2.51	2.45
总黄酮(以芦丁计)/(g/100 g)	1.04	1.02	1.03

2.2 WSHC 安全评估

2.2.1 WSHC 对大鼠急性毒性影响

由表 2 可见,以 20.0 g/(kg·BW)剂量的受试样品给予灌胃后,未见动物体重受到影响,未见有明显中毒和死亡。结果表明,该样品对雌、雄大鼠急性经口毒性 MTD 均大于 20.0 g/(kg·BW),根据《保健食品检验与评价技术规范》(卫生部 2003 年版)中急性毒性分级标准,WSHC 大鼠急性经口毒性属无毒级。

2.2.2 对大鼠 30 d 喂养的潜在毒性检测

由表 3 可见,各剂量组肝、肾、脾、睾丸与体重比值与溶剂对照组比较,差异均无显著性($P > 0.05$)。证明低中高剂量的 WSHC 干预不会影响小鼠的脏器重量和脏器指数,即 WSHC 不具有潜在毒性。

表 2 WSHC 对大鼠急性毒性
Table 2 Acute toxicity of WSHC in rats

性别	剂量(MTD)/[g/(kg·BW)]	初始体重/g	第 7 d 体重/g	第 14 d 体重/g	出现中毒症状动物数/只	死亡数/只
雌	20	198.5 \pm 11.7	238.6 \pm 11.5	272.3 \pm 15.1	0	0
雄	20	205.4 \pm 8.9	253.9 \pm 11.5	297.6 \pm 14.9	0	0

表 3 WSHC 对大鼠脏器比值的影响
Table 3 Effects of WSHC on the rat's viscera-body ratios

性别	剂量 /[g/(kg·BW)]	肝脏湿重/g	肝/体比值/%	脾脏湿重/g	脾/体比值/%	肾脏湿重/g	肾/体比值/%	睾丸湿重/g	睾/体比值/%
雌	5.00	5.38±0.53	2.85±0.34	0.45±0.08	0.24±0.04	1.51±0.11	0.80±0.09	—	—
	2.50	5.44±0.51	2.93±0.31	0.48±0.07	0.26±0.03	1.46±0.10	0.79±0.08	—	—
	1.25	5.46±0.50	2.90±0.36	0.48±0.07	0.25±0.04	1.47±0.10	0.78±0.06	—	—
	溶剂对照组	5.53±0.46	3.02±0.43	0.46±0.07	0.25±0.04	1.46±0.09	0.80±0.10	—	—
雄	5.00	8.59±0.82	3.13±0.38	0.58±0.09	0.21±0.04	2.26±0.26	0.83±0.14	2.66±0.15	0.97±0.10
	2.50	8.87±0.45	3.29±0.32	0.57±0.09	0.21±0.03	2.32±0.22	0.86±0.09	2.70±0.20	1.00±0.06
	1.25	8.62±0.51	3.24±0.30	0.60±0.07	0.23±0.04	2.40±0.22	0.90±0.09	2.70±0.16	1.02±0.11
	溶剂对照组	8.68±0.46	3.29±0.34	0.62±0.08	0.23±0.03	2.30±0.23	0.87±0.12	2.73±0.20	1.03±0.10

注: —表示无此项。

2.3 WSHC 对免疫活性影响

2.3.1 WSHC 对小鼠体重影响

如表 4 所示, 各剂量组小鼠在前期、中期和后期的体重及增重与阴性对照组比较差异均无显著性($P>0.05$)。小鼠体重是衡量其健康程度的一个主要指标, 通过检测整个试验周期的小鼠体重, 证明 WSHC 不会导致小鼠体重的显著变化。

2.3.2 WSHC 对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

淋巴细胞转化试验是体外检测药物过敏的诊断工具之一^[24], 在 T 淋巴细胞^[25]受到抗原刺激时发生形态的改变, 体积较大的 T 细胞可以进行分裂增殖, 是检测免疫功能的

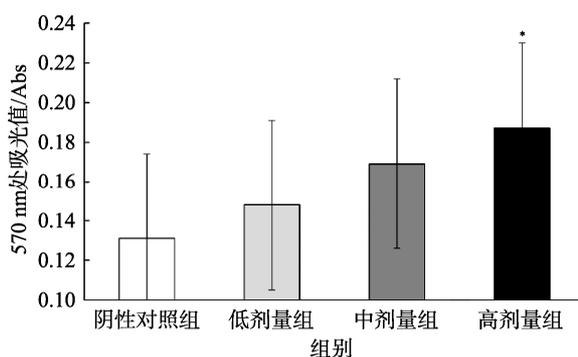
经典研究方法。由图 1 所示, 由于小鼠的个体差异性, 10 只中存在 3~4 只小鼠的值偏大或偏小, 导致整体误差较大。但整体趋势显示, 随着 WSHC 剂量的增加, 淋巴细胞的增殖能力逐渐增强, 且高剂量组对 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖能力具有显著促进作用, 且与阴性对照组淋巴细胞增殖能力提高了 42.74%, 差异具有显著性($P<0.05$)。而任立焕等^[26]的研究发现灵芝沙棘雪莲片能增强迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)、提高抗体生成细胞数量、血清溶血素水平($P<0.05$)和巨噬细胞吞噬能力, 但对小鼠脾淋巴细胞增殖能力没有影响。因此本研究推测 WSHC 能够促进淋巴细胞增殖。

表 4 WSHC 对小鼠体重的影响
Table 4 Effects of WSHC on body weights of mice

组别	剂量/[g/(kg·BW)]	动物数/只	体重/g			增重/g	
			始重	中期重	终重		
第一组	高剂量组	9.99	10	20.30±1.40	31.55±1.57	39.65±2.47	19.35±2.46
	中剂量组	6.66	10	19.70±1.14	31.65±1.76	40.05±1.72	20.35±2.36
	低剂量组	3.33	10	19.75±1.25	32.60±1.41	40.00±1.90	20.25±2.16
	阴性对照组	0	10	20.45±0.90	32.00±1.39	39.50±1.63	19.05±1.55
第二组	高剂量组	9.99	10	19.95±1.38	30.80±1.40	40.50±2.04	20.55±2.21
	中剂量组	6.66	10	20.20±1.40	30.50±1.22	39.05±1.98	18.85±2.92
	低剂量组	3.33	10	20.55±1.17	31.00±1.83	40.65±2.46	20.10±2.21
	阴性对照组	0	10	20.50±1.03	30.65±2.00	40.40±2.59	19.90±2.64
第三组	高剂量组	9.99	10	20.25±1.03	31.20±1.77	41.40±2.08	21.15±1.76
	中剂量组	6.66	10	19.95±1.09	30.40±2.16	40.90±3.03	20.95±3.44
	低剂量组	3.33	10	20.05±1.21	30.35±2.38	39.45±2.40	19.40±2.53
	阴性对照组	0	10	20.20±1.21	31.25±2.11	40.14±2.16	19.95±2.27

表 4(续)

组别	剂量/[g/(kg·BW)]	动物数/只	体重/g			增重/g	
			始重	中期重	终重		
第四组	高剂量组	9.99	10	20.05±1.19	30.70±2.29	40.15±2.43	20.10±2.37
	中剂量组	6.66	10	20.10±1.24	30.70±2.02	39.20±2.74	19.10±3.49
	低剂量组	3.33	10	20.40±0.66	31.00±2.37	41.00±1.78	20.60±1.98
	阴性对照组	0	10	20.15±1.03	30.30±2.18	40.65±2.22	20.50±2.22
第五组	高剂量组	9.99	10	20.00±0.94	29.75±2.47	40.05±2.09	20.05±2.09
	中剂量组	6.66	10	20.20±1.00	30.20±2.18	40.60±2.05	20.40±1.66
	低剂量组	3.33	10	20.15±1.27	30.55±1.40	39.30±1.72	19.15±1.27
	阴性对照组	0	10	19.95±1.21	30.50±2.05	40.25±2.73	20.30±2.53



注: *表示与阴性对照组相比有统计学差异, $P < 0.05$, 下同。

图 1 WSHC 对淋巴细胞增殖能力影响($n=10$)Fig.1 Effects of WSHC on the proliferation abilities of lymphocytes ($n=10$)

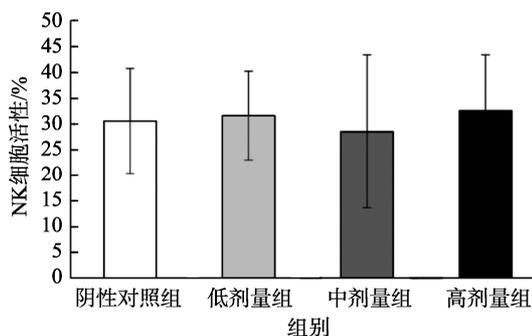
2.3.3 WSHC 对 NK 细胞活性的影响

NK 细胞在免疫细胞中独一无二的特性, 不仅可以增强抗体和 T 细胞活性提高免疫功能外, 还有可以直接杀死发生癌变的相邻细胞^[27], 因此 NK 细胞有望成为癌症免疫疗法的关键组成部分^[28]。如图 2 所示, 各剂量组 WSHC 均不能明显增强小鼠 NK 细胞活性, 与阴性对照组比较差异均无显著性($P > 0.05$)。此外, 目前还没有研究过 3 种物质的复合物对 NK 细胞的作用, 但有研究表明单独的枸杞多糖无法促进 NK 细胞的增殖^[29], 且有关沙棘和青稞免疫活性研究上, 其免疫调节作用主要是影响细胞因子和单核巨噬细胞活性^[12,30]。因此 WSHC 可能无法通过影响 NK 细胞活性提高小鼠免疫能力。

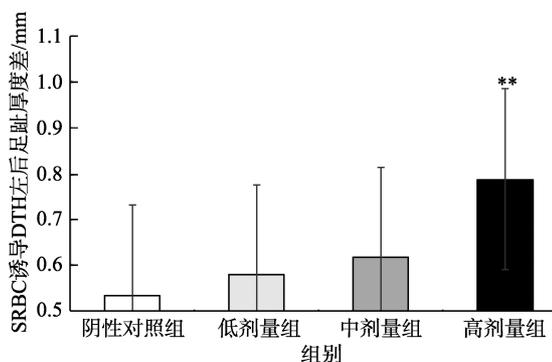
2.3.4 WSHC 对免疫功能和脏器指数的影响

用 SRBC 诱导 DTH 左右足趾厚度差表示 WSHC 对小鼠免疫功能的影响。如图 3 所示, 与阴性对照组相比, 高剂量组小鼠足趾厚度差值提高了 47.57%, 差异有极显著性($P < 0.01$)。此外, 部分研究用左右耳重量之差表示 DTH 的程度。例如, 邱涵等^[31]研究发现, 石斛枸杞颗粒低剂量组能增加耳廓肿胀度, 且与阴性对照组比, 中, 低剂量组小鼠的左右耳质量差分别提高了 22%和 23%。本研究通过对

比, 可以发现高剂量的 WSHC 粉末对 DTH 影响程度(47.57%)远高于石斛枸杞颗粒(23%)。由此可见, WSHC 对细胞免疫具有显著影响。

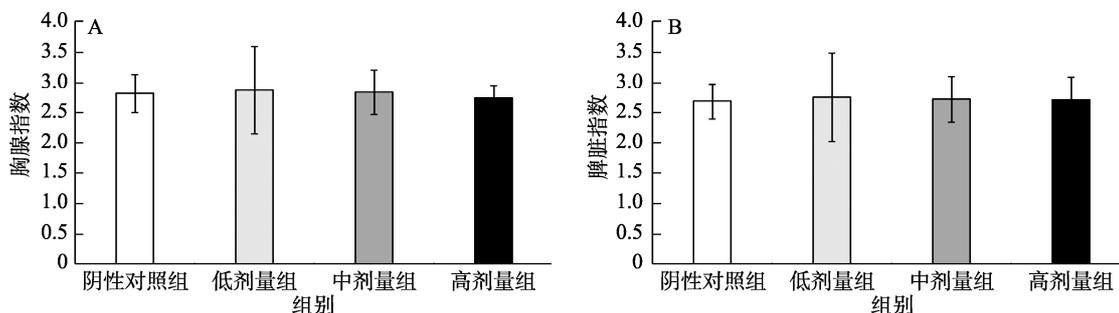
图 2 WSHC 对 NK 细胞活性影响($n=10$)Fig.2 Effects of WSHC on the activities of NK cells ($n=10$)

胸腺和脾脏指数常用来衡量淋巴细胞增殖的程度, 可粗略估计免疫功能的强弱。由图 4 可知, WSHC 对小鼠胸腺指数(图 4A)和脾脏指数(图 4B)无明显影响, 且各剂量组与阴性对照组比较差异均无显著性($P > 0.05$)。这也表示 WSHC 干预可以影响小鼠的细胞免疫, 对小鼠的免疫器官没有明显影响。



注: **表示与阴性对照组相比有显著统计学差异, $P < 0.01$, 下同。

图 3 WSHC 对 SRBC 诱导的小鼠 DTH 反应的影响($n=10$)Fig.3 Effects of WSHC on the DTH response of mice induced by SRBC ($n=10$)



注: A 为 WSHC 各组对小鼠胸腺指数的影响; B 为 WSHC 各组对小鼠脾脏指数的影响。

图 4 WSHC 对小鼠脏器指数的影响(n=10)

Fig.4 Effects of WSHC on the organ indexes of mice (n=10)

2.3.5 WSHC 对小鼠体液免疫影响

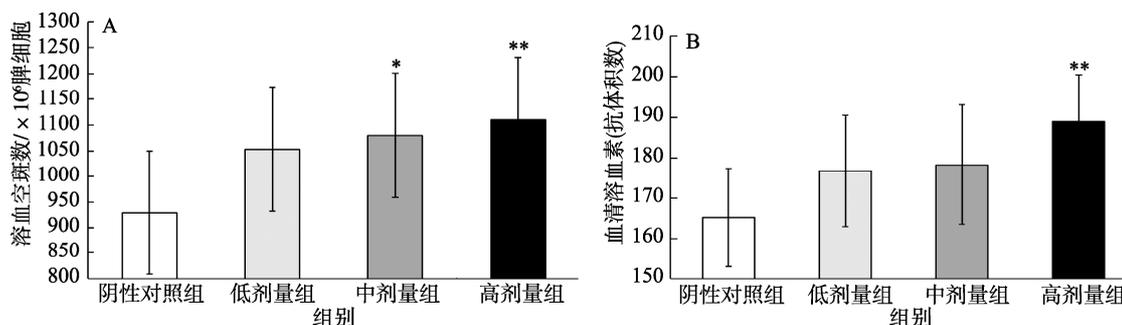
由图 5 所示, 中、高剂量组的 WSHC 造成小鼠抗体生成细胞功能均显著高于阴性对照组, 与阴性对照组比, 中、高剂量的 WSHC 处理溶血空斑数含量(图 5A)分别提高了 16.25% ($P<0.05$)和 19.48% ($P<0.01$).而陈垚等^[32]的研究发现, 茯苓、枸杞等提取物的混合物在低、中剂量时对小鼠抗体生成细胞功能没有影响, 而在高剂量时差异有统计学意义($P<0.05$).对比发现, 该 WSHC 具有显著免疫作用的剂量远低于茯苓和枸杞提取物的作用剂量。

此外, 与阴性对照组相比, 高剂量 WSHC 可以显著提高小鼠的血清溶血素水平(图 5B), 小鼠抗体积数提高 14.41% ($P<0.01$), 且差异具有极显著性。虽然包桂兰等^[33]的研究同样发现最高剂量的五味沙棘散可以显著提高小鼠

的血清溶血素水平($P<0.05$), 但与其与阴性对照组比, 抗体积数仅提高了 6.23%, 远低于 WSHC (14.41%)。以上结果表明, WSHC 可以显著提高小鼠的体液免疫, 且比目前研究的沙棘或青稞单独的免疫效果更显著。

2.3.6 WSHC 对巨噬细胞吞噬能力的影响

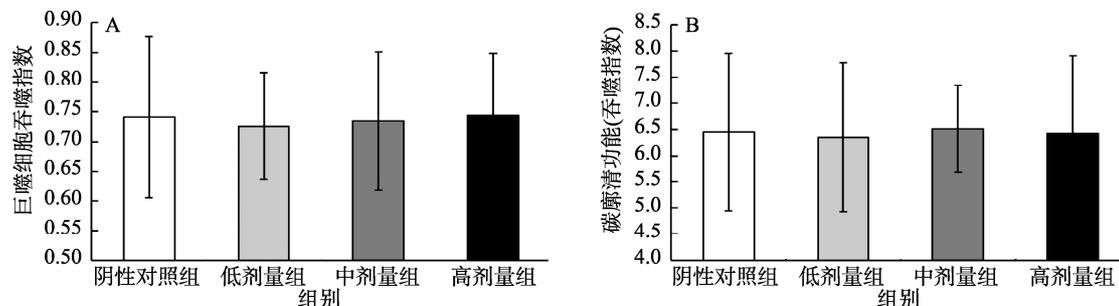
巨噬细胞是控制非特异性免疫的关键靶点, 在抗感染、抗肿瘤和免疫调节等方面发挥着重要作用。在异物入侵时, 巨噬细胞可以通过吞噬异物增强机体免疫力^[34]。此外, 巨噬细胞还可以释放不同的细胞因子, 增强吞噬作用, 激活不同类型的免疫细胞, 维持免疫系统稳态^[35]。如图 6 所示, 各剂量组小鼠对鸡血红细胞的吞噬指数(图 6A)和碳廓清吞噬指数(图 6B)与阴性对照组比较, 差异均无显著性($P>0.05$)。表明 WSHC 不影响小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力。



注: A 为 WSHC 各组对小鼠溶血空斑数的影响; B 为 WSHC 各组对小鼠血清溶血素的影响。

图 5 WSHC 对小鼠体液免疫的影响(n=10)

Fig.5 Effects of WSHC on mice humoral immunity (n=10)



注: A 为 WSHC 各组对小鼠巨噬细胞吞噬指数的影响; B 为 WSHC 各组对小鼠碳廓清功能的影响。

图 6 WSHC 对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响(n=10)

Fig.6 Effects of WSHC on the phagocytic abilities of mice macrophages (n=10)

3 结 论

以枸杞、沙棘和青稞为原料开发的复合物 WSHC 没有潜在毒性,具有免疫调节功能,可以增强机体免疫力,是一种具有良好开发前景的免疫调节剂。相比于其他天然活性产物组成的混合物的免疫调节作用,WSHC 表现出更强的促淋巴细胞增殖能力和抗体释放能力。由于淋巴细胞是病毒感染和肿瘤细胞的效应细胞,因此淋巴细胞增殖和抗体释放可以用来抵抗肿瘤细胞。这也表明 WSHC 具有潜在的抗病毒和抗肿瘤能力。综上,本研究进一步实现枸杞、沙棘和青稞的实际应用价值,为促进其工业化生产奠定基础,但因为本研究只关注了复合物的免疫调节作用,忽视了青稞作为一种重要的膳食纤维,可以调节肠道菌群,对人体的健康同样具有重要的作用。因此未来可进一步深入研究 WSHC 对肠道健康、肿瘤免疫的影响。

参考文献

- [1] 刘雪梅. 沙棘果油对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2020, 35(4): 5.
LIU XM. Antitumor effect of sea buckthorn fruit oil on H22 liver cancer mice [J]. J Inner Mongolia Univ Nat: Nat Sci Ed, 2020, 35(4): 5.
- [2] VIDAL K, BENYACOB J, SANCHEZ-GARCIA J, *et al*. Intake of a milk-based wolfberry formulation enhances the immune response of young-adult and aged mice [J]. Rejuven Res, 2010, 13(1): 47–53.
- [3] 王蓉, 李胜男, 陈春, 等. 沙棘多糖对巨噬细胞和免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究[J]. 中南药学, 2020, 17(3): 54–58.
WANG R, LI SN, CHEN C, *et al*. The immunomodulatory effects of *Hippophae rhamnoides* Linn. polysaccharides on macrophages and immunosuppressive mice [J]. Center South Pharm, 2020, 17(3): 54–58.
- [4] 李静静. 枸杞红素在慢性乙肝合并非酒精性脂肪肝小鼠模型中的保护作用研究[D]. 广州: 暨南大学, 2017.
LI JJ. *Lycium barbarum* red pigment injury induced by superimposed chronic hepatitis B and non-alcoholic steatohepatitis in non-obese mice [D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [5] 李亚萍. 枸杞多糖对 COPD 患者缺氧诱导因子 1 α 抑制作用的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2017.
LI YP. The inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on hypoxia inducible factor-1 α in peripheral mononuclear cells of patients with COPD [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2017.
- [6] GONG Y, WU J, LI ST. Immuno-enhancement effects of *Lycium ruthenicum* Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20631–20637.
- [7] OLAS B, SKALSKI B, ULANOWSKA K. The anticancer activity of sea buckthorn [*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson] [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 232.
- [8] REN QC, LI XH, LI QY, *et al*. Total flavonoids from sea buckthorn ameliorates lipopolysaccharide/cigarette smoke-induced airway inflammation [J]. Phytother Res, 2019, 33(8): 2102–2117.
- [9] 马志新, 赵鲁杭. 多糖激活巨噬细胞的信号转导通路[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(5): 567–572.
MA ZX, ZHAO LH. Polysaccharides activate the signal transduction pathway of macrophages [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2011, 40(5): 567–572.
- [10] JAYASHANKAR B, SINGH D, TANWAR H, *et al*. Augmentation of humoral and cellular immunity in response to tetanus and diphtheria toxoids by supercritical carbon dioxide extracts of *Hippophae rhamnoides* L. leaves [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 44: 123–136.
- [11] ZHANG J, ZHOU HC, HE SB, *et al*. The immunoenhancement effects of sea buckthorn pulp oil in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. Food Funct, 2021. DOI: 10.1039/D1FO01257F
- [12] WANG H, BI H, GAO T, *et al*. A homogalacturonan from *Hippophaerhamnoides* L. Berries enhance immunomodulatory activity through TLR4/MyD88 pathway mediated activation of macrophages [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107(Pt A): 1039–1045.
- [13] JIANG F, GUAN HN, LIU DY, *et al*. Flavonoids from sea buckthorn inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through the MAPK and NF-kappa B pathways [J]. Food Funct, 2017, 8(3): 1313–1322.
- [14] GUO TL, HORVATH C, CHEN L, *et al*. Understanding the nutrient composition and nutritional functions of highland barley (Qingke): A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 103: 109–117.
- [15] KHAN MA, AMIR RM, AMEER K, *et al*. Characterization of oat bran beta-glucan with special reference to efficacy study to elucidate its health claims for diabetic patients [J]. Food Sci Technol, 2021, 41(1): 105–112.
- [16] HAN LR, MENG M, GUO MZ, *et al*. Immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide obtained from highland barley on immunosuppressive mice models [J]. Food Funct, 2019, 10(1): 304–314.
- [17] 肖香兰, 罗仁才, 张楠. 保健食品中总黄酮的测定方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 2.
XIAO XL, LUO RC, ZHANG N. Determination of total flavonoids in health food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(6): 2.
- [18] LIANG ZD, ZENG YY, HUANG XY, *et al*. Effect of apigenin on proliferation, cell cycle and apoptosis of mouse T cells *in vitro* [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2008, 24(4): 337–340.
- [19] ZHANG W, WANG Y, HOU Y. Effects of Chinese medicinal fungus water extract on tumor metastasis and some parameters of immune function [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(3): 461–468.
- [20] 雷志明, 薛彬. 单个动物多项免疫功能检测研究[J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(5): 399–401.
LEI ZM, XUE B. Study on multiple immune function detection in single animal [J]. J Peking Univ Health Sci, 1991, 23(5): 399–401.
- [21] 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.
WANG Y, JIN J, JIN ZH, *et al*. Study on immune-enhancing effects of *Ganoderma lucidum* spore powder [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 33(5): 544–546.
- [22] WEI H, XU Y, CHENG B, *et al*. Synergistic effects of *Lactobacillus rhamnosus* ZDY114 and bovine colostrum on the immunological function of mouse *in vivo* and *in vitro* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(2): 427–434.
- [23] CHEN SJ, LI JY, ZHANG JM. Extraction of yellow pear residue polysaccharides and effects on immune function and antioxidant activity of immunosuppressed mice [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126:

- 1273-1281.
- [24] SACHS B, FATANGARE A, SICKMANN A, *et al.* Lymphocyte transformation test: History and current approaches [J]. *J Immunol Methods*, 2021, 493: 113036.
- [25] 史翠珍, 史大祝, 姜坤. 枸杞多糖对胃癌模型大鼠免疫功能的影响[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2018, 61(2): 120-123.
SHI CZ, SHI DZ, JIANG K. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on the immune function of rats with gastric cancer [J]. *J Hunan Norm Univ (Med Ed)*, 2018, 61(2): 120-123.
- [26] 任立焕, 刘磊, 王鹤, 等. 灵芝沙棘雪莲片增强小鼠免疫力功能研究[J]. *现代中药与研究*, 2020, (4): 26-29.
REN LH, LIU L, WANG H, *et al.* Study on ganoderma and seabuckthorn snow lotus tablets in enhancement of immunity in mice [J]. *Res Pract Chin Med*, 2020, (4): 26-29.
- [27] CALIGIURI MA. Human natural killer cells [J]. *Blood*, 2008, 112(3): 461-469.
- [28] ZHANG JH, LYE SJ. The immune potential of decidua-resident CD16(+)/CD56(+) NK cells in human pregnancy [J]. *Hum Immunol*, 2021, 82(5): 332-339.
- [29] AMAGASE H, SUN B. Immunomodulation, general effects and safety of a standardized *Lyceum barbarum* (Goji) juice, GoChiTM shown in a randomized, double-blind, placebo on trolled clinical study [J]. *FASEB J*, 2008, 22(S2): 776.
- [30] CHOI KC, HWANG JM, BANG SJ, *et al.* Methanol extract of the aerial parts of barley (*Hordeum vulgare*) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pharmaceutical Biol*, 2013. DOI: 10.3109/13880209.2013.768274
- [31] 邱涵, 吕晓君. 石斛枸杞颗粒对小鼠免疫功能的影响[J]. *安徽医药*, 2019, 23(3): 458-462.
QIU H, LV XJ. Effects of dendrobium wolfberry granules on immune function in mice [J]. *Anhui Med*, 2019, 23(3): 458-462.
- [32] 陈垚. 茯苓、枸杞、黄芪提取物和海参冻干粉配伍增强免疫力作用的实验研究[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(1): 1-5.
CHEN Y. Experimental study of the compatibility of *Poria cocos*, *Lycium barbarum*, *Astragalus membranaceus* extract and sea cucumber freeze-dried powder to enhance immunity [J]. *Clin J Chin Med*, 2021, 13(1): 1-5.
- [33] 包桂兰, 白月辉, 汤文莉, 等. 五味沙棘散的抗感染及免疫调节作用[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(14): 3399-3400.
BAO GL, BAI YH, TANG WL, *et al.* Anti-infection and immunomodulatory effects of five-flavored sea buckthorn powder [J]. *Chin J Gerontol*, 2017, 37(14): 3399-3400.
- [34] 吴岩, 哈斯格日. 沙棘油对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. *内蒙古医科大学学报*, 1993, 15(1): 30-32.
WU Y, HASI GR. The effect of sea buckthorn oil on the function of mouse peritoneal macrophages [J]. *J Inner Mongolia Med Univ*, 1993, 15(1): 30-32.
- [35] 高翔. 枸杞多糖对小鼠巨噬细胞免疫功能的影响研究[J]. *中国现代药物应用*, 2013, 7(12): 237-238.
GAO X. Study on the effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the immune function of mouse macrophages [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2013, 7(12): 237-238.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



许佳新, 主要研究方向为食品营养。
E-mail: 1276297219@qq.com



单媛媛, 博士, 副教授, 主要研究方向为动物性食品的营养加工与副产物的综合利用研究及禽蛋营养与人类健康、肠道健康的膳食干预机制研究。
E-mail: shanyy2013@163.com



吕欣, 博士, 教授, 主要研究方向为采用现代分子生物学与发酵工程理论和技术解决生产中的基础和应用问题。
E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn