

灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞和脾细胞的影响

雷萍, 陈文娜, 陈殿学, 韩晓伟, 侯殿东, 关洪全*

(辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**探讨灰树花提取物对脾虚小鼠的免疫调节机制。**方法:**健康雄性清洁级昆明小鼠 30 只随机分为 6 组,即空白对照组、脾虚组、阳性对照组(香菇多糖, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、灰树花提取物低剂量组($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、灰树花提取物中剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、灰树花提取物高剂量组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 5 只, 滤菌后 ip 10 d, 第 11 天处死动物。检测小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红、产生一氧化氮(NO)能力(Griess 法), 以及 MTT 法检测淋巴细胞转化率、自然杀伤细胞(NK 细胞)杀伤活性。**结果:**高剂量灰树花提取物可明显提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力($P < 0.05$)和产生 NO 能力($P < 0.01$);高剂量灰树花提取物能明显提高小鼠脾脏 B 细胞增殖能力($P < 0.01$);中、高剂量灰树花提取物能明显提高小鼠脾脏 T 细胞增殖能力($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)灰树花提取物中、高剂量组小鼠脾脏 NK 细胞杀伤能力均明显高于脾虚组($P < 0.01$)。**结论:**灰树花提取物可以通过提高巨噬细胞吞噬能力和产生 NO 能力、以及淋巴细胞转化率、NK 细胞杀伤活性的途径提高脾虚小鼠的免疫功能。

[关键词] 灰树花提取物;脾虚;巨噬细胞;一氧化氮;淋巴细胞转化率;NK 杀伤活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0205-03

Effects of Extract of Grifola Frondosa on Peritoneal Macrophages and Spleen Cells in Mouse with Spleen Deficiency

LEI Ping, CHEN Wen-na, CHEN Dian-xue, HAN Xiao-wei, HOU Dian-dong, GUAN Hong-quan*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunological mechanism of extract of grifola frondosa on spleen deficiency mice. **Method:** Thirty Kunming mice were randomly divided into 6 groups: control group, spleen deficiency group, positive control group and three groups with dosage difference ($5, 10$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). After the establishment of spleen deficiency, the treatment of the extract and the positive drug was lasted for 10 days (ip). Then phagocytosis of peritoneal macrophages was detected by neutral red; NO-producing ability was determined by Griess method; and lymphocyte transformation rate, NK cell activity were tested by MTT method. **Result:** Extract of grifola frondosa could increase the above mentioned ability. **Conclusion:** Extract of grifola frondosa can enhance the ability of macrophages and the production of NO, and the lymphocyte transformation rate, NK cell killing activity to improve immunological ability of spleen deficiency in mice.

[Key words] extract of grifola frondosa; spleen deficiency; macrophage; NO; lymphocyte transformation rate; killing activity of NK cell

脾作为气血生化之源,其功能健旺与否与人体

的生理功能密切相关。张仲景有“四季脾旺不受邪”之说;李东垣在《脾胃论》中云:“百病皆由脾胃衰而生也”。有关研究显示,脾虚的本质与免疫功能低下有密切关系^[1]。灰树花又名栗蘑、贝叶多孔菌,日本称之为“舞茸”。分类学上属担子菌纲,多孔菌科,是一种药食两用的珍稀食用菌。灰树花提取物是从灰树花的子实体中分离得到,主要成分为真菌

[收稿日期] 20101221(012)

[第一作者] 雷萍,讲师,博士在读,主要从事天然产物的免疫调节研究

[通讯作者] *关洪全,教授,博士生导师,主要从事虚证免疫研究, E-mail: hongquanguan@sina.com

多糖,近年的研究表明其具有增强免疫、抑制肿瘤、抗 HIV、稳定血压等广泛的生理活性^[2]。目前,关于灰树花提取物对脾虚证引起免疫低下的调节的报道少见。为此,本研究在细胞水平上观察灰树花提取物对脾虚小鼠免疫细胞的影响。

1 材料

1.1 动物 健康雄性清洁级昆明小鼠 30 只(辽宁中医药大学实验动物中心),体重(20±2)g,动物许可证号 SCXK(辽)2008-0005。

1.2 仪器和试剂 全自动酶标仪(奥地利 Anthos 公司)、二氧化碳培养箱(美国热电公司)、倒置生物显微镜(德国徕卡公司);中性红(国药集团 F20090225)、YAC-1 细胞(实验室冻存)、脂多糖(LPS, Sigma 公司, L2880)、植物血凝素(PHA, 上海伊华医学科技有限公司, 20096003)、噻唑蓝(MTT, Sigma 公司, M2128)、二甲基亚砜(DMSO)、RPMI1640 培养液(Hyclone 公司 NVF0273)、胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限公司 20100402)、一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物技术研究所 S0021)。

2 方法

2.1 动物模型制备 小鼠 30 只随机分为 6 组,即空白对照组、脾虚组、阳性对照组(香菇多糖, 2 mg·kg⁻¹)、灰树花提取物低、中、高剂量组(5, 10, 20 mg·kg⁻¹),每组 5 只。

采用文献[3]番泻叶-劳倦过度复合因素造模法,每只小鼠每日 ig 100% 番泻叶水煎剂 0.5 mL,并游泳;以身体下沉为度。14 d 后,造模小鼠出现体重下降,粪便不正常(时软,时溏,时干),食少纳呆,毛色枯槁,蜷缩聚堆、反应迟钝甚至胆怯状态等表现,说明脾虚造模成功。之后阳性组给予香菇多糖,实验各组按不同剂量灰树花提取物滤菌后 ip 10 d,第 11 天处死动物。

2.2 灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的影响 参照文献[4]方法培养小鼠腹腔巨噬细胞,将细胞接种于 96 孔板,贴壁后孵育 24 h,弃上清,加入 0.75 g·L⁻¹ 中性红溶液 200 μL/孔,置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养 20 min 后弃去上清,温 PBS 液 200 μL/孔洗板 3 次以除去细胞外中性红,加细胞裂解液(1 mol·L⁻¹ 醋酸与等体积无水乙醇的混合液)200 μL/孔,室温置摇床上低速振荡 2~3 h,待细胞完全溶解,在酶标仪上测波长 540 nm 处的 A,以

空白对照孔调零。

2.3 灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 能力的影响 将小鼠腹腔巨噬细胞接种于 96 孔板,贴壁后孵育 24 h,取上清,按 NO 试剂盒说明书操作。

2.4 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 T 细胞和 B 细胞增殖能力的影响 按文献[4]方法提取小鼠脾脏细胞,按照设计的顺序,每孔加入 50 μL 各实验组脾细胞悬液,每组 3 个复孔。向反应孔脾细胞悬液中加入 50 μL 含 LPS 或 PHA [注:T 细胞增殖加 PHA (100 U·mL⁻¹), B 细胞增殖加 LPS (10 mg·L⁻¹)] 的 1640 培养液,对照孔细胞中加入 50 μL RPMI1640 培养液。同时以不加细胞的 1640 培养液做为空白对照孔(调零孔)。置 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 48 h 后,MTT 法测细胞存活率。

刺激指数 SI = (实验组反应孔 A - 对照孔 A) / 对照孔 A × 100%

2.5 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响 获得小鼠脾脏单细胞悬液后,参考文献[5]方法,以实验组小鼠脾细胞(1×10⁷/mL)为效应细胞,以经传代培养的 YAC-1 细胞(5×10⁵/mL)为靶细胞,按 20:1 的效靶比分别加入脾细胞和 YAC-1 细胞各 50 μL 于 96 孔培养板中,同时设效应细胞对照孔、靶细胞对照孔和空白对照孔。每个样本做 3 复孔。置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 4 h,MTT 法测细胞存活率。

NK 细胞杀伤活性 = [靶细胞对照 A - (实验组 A - 效应细胞对照孔 A)] / 靶细胞 A × 100%

2.6 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 17.0 统计软件单因素方差分析进行统计学处理,组间采用两两比较 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞的影响 由表 1 可见,脾虚组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力和产生 NO 能力均降低,高剂量灰树花提取物可明显提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力(*P* < 0.05)和产生 NO 能力(*P* < 0.01)。并且高剂量灰树花提取物对增强小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 能力也明显高于空白对照组(*P* < 0.01)。

3.2 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 B 细胞、T 细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性的影响 由表 2 可见,脾虚组小鼠脾脏 B 细胞增殖能力比空白对照组明显下降(*P* < 0.01),高剂量灰树花提取物能明显提高脾虚小鼠脾脏 B 细胞增殖能力(*P* < 0.01)。

表1 灰树花提取物对脾虚小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红和产生 NO 能力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	吞噬中性红(A)	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白		0.47 ± 0.11	23.30 ± 3.94
脾虚		0.32 ± 0.07	17.60 ± 0.18
香菇多糖	2	0.53 ± 0.12	30.57 ± 7.15 ²⁾
灰树花	5	0.51 ± 0.09	23.74 ± 1.31
	10	0.54 ± 0.18	25.61 ± 1.79
	20	0.60 ± 0.15 ¹⁾	36.83 ± 1.05 ^{2,4)}

注:与脾虚组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与空白组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

表2 灰树花提取物对脾虚小鼠脾脏 B 细胞、T 细胞增殖和 NK 细胞杀伤能力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	B 细胞增殖率/%	T 细胞增殖率/%	NK 细胞杀伤活性/%
空白	-	24.40 ± 6.15 ²⁾	8.60 ± 0.54	70.38 ± 19.56 ²⁾
脾虚	-	7.08 ± 0.88 ⁴⁾	5.75 ± 1.77	19.68 ± 4.01 ⁴⁾
香菇多糖	2	28.04 ± 6.15 ²⁾	8.37 ± 0.21 ²⁾	49.67 ± 5.17 ^{2,3)}
灰树花	5	10.34 ± 3.33 ⁴⁾	8.20 ± 1.21	28.48 ± 11.92 ⁴⁾
	10	15.77 ± 5.65	9.19 ± 0.53 ¹⁾	53.44 ± 5.43 ²⁾
	20	37.72 ± 0.35 ^{2,4)}	14.50 ± 1.42 ^{2,3)}	70.95 ± 11.23 ²⁾

4 讨论

巨噬细胞是重要的免疫调节和效应细胞,通过吞噬杀伤微生物、抗原提呈和分泌细胞因子等作用进行免疫调控。脾虚时巨噬细胞功能受到抑制^[6]。灰树花提取物的有效成分主要是多糖,植物多糖的免疫调节作用与巨噬细胞的活化密切相关。巨噬细胞活化可表现为吞噬功能增强,以及一些细胞因子的合成和分泌增加。国内外大量研究表明,巨噬细胞抗肿瘤、抗病毒、抑制胞内病原体增殖等作用主要通过 NO 的释放完成,因而 NO 水平也是巨噬细胞活化的一个重要指标。^[7]本研究结果提示灰树花提取物可以通过提高巨噬细胞的吞噬能力和通过 NO 途径增加 NO 的产生量来活化巨噬细胞。

脾虚时,淋巴细胞分化能力下降甚至处于抑制状态^[6]。本研究结果表明,灰树花提取物可以通过增强脾脏淋巴细胞的增殖能力来提高脾虚小鼠的免疫功能。NK 细胞无需抗原预先致敏,即可直接杀伤某些肿瘤细胞和病毒感染细胞,故在机体抗肿瘤、早期抗病毒或胞内寄生菌感染的免疫应答中起重要作用,是机体维持免疫监视功能的主要细胞。脾虚小鼠 NK 细胞杀伤功能明显降低,自身稳定遭受严重破坏,因此临床上常见脾虚病人患各种系统疾病。

脾虚组小鼠脾脏 T 细胞增殖能力比空白对照组降低,中剂量灰树花提取物能明显提高小鼠脾脏 T 细胞增殖能力($P < 0.05$);高剂量组灰树花提取物能明显提高小鼠脾脏 T 细胞增殖能力,差异有极显著意义($P < 0.01$);并且高剂量灰树花提取物对小鼠脾脏 T 细胞增殖能力也强于空白对照组($P < 0.05$)。

脾虚组小鼠脾脏 NK 细胞杀伤能力比空白对照组明显降低($P < 0.01$),灰树花提取物中、高剂量组小鼠脾脏 NK 细胞杀伤能力均明显高于脾虚组($P < 0.01$)。

本研究提示灰树花提取物还可以通过提高 NK 细胞的杀伤活性来提高脾虚小鼠的免疫功能。

综上,灰树花提取物作为一种天然产物,在临床上可以用于脾虚证的免疫调节。

[参考文献]

- [1] 杨舒,钱会南. 中医脾虚证的免疫机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(9):1433.
- [2] 李海花. 灰树花多糖的免疫作用实验研究[J]. 中华中医药学刊,2007,25(2):365.
- [3] 曲长江,刘劲,林庶如,等. 不同造模方法脾虚小鼠免疫学改变的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志,1999,5(4):46.
- [4] 杜晓菲. 红参酸性多糖和匹多莫德的免疫调节协同作用研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009:31.
- [5] 陈向涛. 复方中药玉屏风多糖的免疫调节作用及其机理的研究[D]. 安徽:安徽医科大学,2006:72.
- [6] 刘永琦. 脾虚证的免疫学本质及中医药防治脾虚的免疫机制研究[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(10):5.
- [7] 程安玮. 甘草多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调节[D]. 无锡:江南大学博士论文,2008:85.

[责任编辑 聂淑琴]