

# 王老吉凉茶对应激小鼠免疫功能 及体内过氧化状态的影响

何蓉蓉<sup>1</sup>, 栗原博<sup>2\*</sup>, 宝 丽<sup>1</sup>, 李满妹<sup>2</sup>, 姚新生<sup>1,2\*</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 研究王老吉凉茶对拘束负荷诱发小鼠免疫功能低下及体内过氧化状态的影响。方法: 将雄性 C57BL/6 小鼠分为正常对照组、拘束应激组、王老吉凉茶 125, 500 mg·kg<sup>-1</sup> 给药组, 流式细胞术分析 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤(NK) 细胞比例、NK 细胞杀伤活性, 同时硫代巴比妥酸法及抗氧化能力指数(ORAC) 法分别检测淋巴细胞内氧化状态及抗氧化水平。结果: 与拘束应激组相比, 王老吉凉茶给药可以改善拘束负荷小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群比例, 增加脾脏 NK 细胞数, 提高 NK 细胞杀伤活性。此外, 王老吉凉茶可以明显改善拘束负荷引起的淋巴细胞内脂质过氧化反应的产物丙二醛(MDA) 含量升高、提高细胞内 ORAC 水平。结论: 王老吉凉茶改善拘束负荷诱发小鼠免疫功能低下, 其作用机制可能与缓解免疫细胞内的过氧化状态有关。

[关键词] 王老吉凉茶; 拘束应激; T 淋巴细胞亚群; 自然杀伤细胞活性; 抗氧化能力指数

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0038-05

## Effect of Wanglaoji Liangcha on Immunologic Function and Oxidation in Restrained Mice

HE Rong-rong<sup>1</sup>, KURIHARA Hiroshi<sup>2\*</sup>, BAO Li<sup>1</sup>, LI Man-mei<sup>2</sup>, YAO Xin-sheng<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;  
2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Wanglaoji Liangcha(WLJ) on immune system and the antioxidation in restrained mice. **Methods:** The male C 57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, stress control group, 125 mg·kg<sup>-1</sup> and 500 mg·kg<sup>-1</sup> treated with WLJ. The spleen lymphocyte suspension of each group was prepared. The parameters of spleen T cells subsets, NK cell proportion, and NK cell activity were detected by Flow cytometry. The antioxidation states in immune cells were also detected. **Results:** WLJ regulated T cell subsets, increased the percent of NK cells, and moreover enhanced the cytotoxic activity of NK cell. It also led to significant reduction of the lipid peroxidation MDA and increase of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of splenocyte. **Conclusion:** Wanglaoji Liangcha can enhance immunologic function in restraint mice which is relevant with the amelioration of antioxidation in immune cells.

[Key words] Wanglaoji Liangcha; restraint stress; lymphocyte subsets; NK cell activity; oxygen radical absorbance capacity(ORAC)

[收稿日期] 2007-07-23

[基金项目] 国家科技支撑计划(2006BAI06A20-09)

[通讯作者] \* 栗原博, Tel: (020) 33033306; E-mail: Hiroshi\_Kurihara@163.com

\* 姚新生, Tel: (020) 85225849; E-mail: yaoxinsheng@vip.tom.com

应激是机体受到应激原负荷时出现的防御反应及适应过程,涉及到神经、内分泌及免疫等多方面生理功能。近年来的研究确认限制小鼠自由运动的拘束负荷可诱发动物的烦躁和焦虑来模拟心理应激状态,是目前被广泛采用的一种模拟心理压力的应激模型。同时,人们也发现拘束负荷可以显著升高体内脂质过氧化水平、降低抗氧化能力,抑制机体免疫功能<sup>[1]</sup>。目前国内外对氧化应激与疾病间的关系以及氧化应激的发生机制从多方面进行了探讨,取得了一定的进展和成果。但是关于免疫功能状态与淋巴细胞内抗氧化能力间的研究尚不多见。

王老吉凉茶由岗梅根 308 g (*Ilex asprella*), 木蝴蝶 1g (*Oroxylum indicum*), 火炭母 46 g (*Polygonum chinense*), 金钱草 27 g (*Desmodium styracifolium*), 布渣叶 18 g (*Microcos paniculata*), 淡竹叶 18 g (*Lophatherum gracile*), 金沙藤 104 g (*Lygodium japonicum*), 五指柑 59 g (*Vitex negundo*), 山芝麻 43 g (*Helicteres angustifolia*), 金樱根 106 g (*Rosa laevigata*) 10 味草药组成,具有清热解暑、祛湿生津等功能,在岭南地区作为泄火良药使用已有近 200 年的历史。研究证明王老吉凉茶具有抗菌消炎、利尿、促进小肠蠕动等功能<sup>[2]</sup>,组成王老吉凉茶成分的草药具有提高免疫力及平衡人体机能等作用。本实验通过拘束负荷小鼠对王老吉凉茶进行研究,旨在揭示王老吉凉茶对人体健康调节作用的部分科学内涵。

## 1 材料

**1.1 药品及化学试剂** 王老吉凉茶浸膏(WLJ, 国药标准: WS3-B3548982003, 规格 1 g 每袋, 成人口服每天 1 袋), 由王老吉药业股份有限公司提供, 批号: 0605125; 处方组成药材岗梅、山芝麻、五指柑、淡竹叶、木蝴蝶、布渣叶、火炭母、金沙藤、金钱草、金樱根均由广州王老吉药业股份有限公司送样, 广州市药品检验所高级工程师张永耀、江英桥鉴定; PE 标记抗小鼠 CD3 单克隆抗体, FITC 标记抗小鼠 CD4 单克隆抗体, FITC 标记抗小鼠 CD8 单克隆抗体购自美国 Biolegend; FITC 标记抗小鼠 NK1.1 单克隆抗体购自美国 eBscience; DiOC18<sub>(3)</sub> (DiO, 3, 3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate), PI (propidium iodide) 购自美国 Sigma 公司; Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), AAPH (2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), 及荧光素钠 (disodium fluorescein) 购自日本和光纯药株式会

社; 丙二醛(MDA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 实验动物及细胞株** 7 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 购自南方医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(粤) 2004-0011, 饲养温度(23 ± 2) °C, 饲养 1 周后进行实验。YAC-1 淋巴瘤细胞由日本 Suntory Ltd. research center 提供, 体外传代培养。

**1.3 分析仪器** Coulter XL 流式细胞仪(Beckman, USA), MK3 型酶标仪(Labsystem, Finland), GENios 荧光酶标仪(Tecan, Switzerland), ULTRA-TURRAX T8 型组织匀浆机(IKA Labortechnik, Germany), 3-18K 型台式高速冷冻离心机(Sartorius, Germany), BS210S 电子分析天平(Sartorius, Germany), WH-861 型漩涡混合器(太仓市科教器材厂), 及 pH S-25 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 将小鼠随机分为正常对照组, 拘束应激组, 125 mg·kg<sup>-1</sup> 及 500 mg·kg<sup>-1</sup> 王老吉凉茶浸膏给药组, 每组 7 只。实验组每天给药 1 次连续给药 5 d 后测定相关实验指标, 正常对照组与拘束应激组给予等容量空白水。除正常对照组外, 其余各组给药第 2 天拘束应激 12 h<sup>[3]</sup>。

**2.2 免疫器官指数的测定** 小鼠称重拉颈处死, 取出脾、胸腺称重, 计算免疫器官指数。

**2.3 小鼠脾细胞悬液制备** 置脾于玻璃匀浆器中, 添加 PBS 溶液研磨, 200 目网过滤, 取样细胞计数。4 °C 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液, 加入红细胞裂解液 1 mL, 混匀, 静置 2 min 后加 PBS 溶液 3 mL 终止裂解反应, 4 °C 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 溶液洗两次后, 加 0.5 mL PBS 溶液混匀, 取 250 μL 细胞悬液-20 °C 保存, 用于抗氧化指标测定。将剩余细胞悬液用 1 mL PBS 溶液重悬, 4 °C 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, PBS 溶液调整脾淋巴细胞悬液浓度。

**2.4 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞分析** 调整脾淋巴细胞浓度为 5 × 10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>, 取流式细胞分析专用管, 每管加入细胞悬液 100 μL。每个样本制备 3 管, 进行 FITC, PE 双色荧光抗体标记, 第 1 管加入 2 μL PE 标记抗 CD3 抗体和 1 μL FITC 标记抗 CD4 抗体; 第 2 管加 2 μL PE 标记抗 CD3 抗体和 3 μL PE 标记抗 CD8 抗体; 第 3 管加 2 μL PE 标记抗 CD3 抗体和 2 μL PE 标记抗 NK1.1 抗体, 室温闭光孵育 20 min

后各管加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 溶液, 振荡混匀后上机分析, 记录各管  $\text{CD3}^+$  %,  $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$  %,  $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$  %,  $\text{NK1.1}^+$  %,  $\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^-$  % 及  $\text{NK1.1}^+ \text{CD3}^+$  %。

### 2.5 DiO/PI 双染色法检测小鼠脾脏 NK 杀伤活性<sup>[4]</sup>

实验采用 DiO 标记的靶细胞被杀伤破损时, 染料 PI 进入细胞标记细胞核, 根据效靶细胞大小和 DiO 染色差异, 可在 FL1/FS 图中区分靶细胞群, 进而研究靶细胞死亡情况, 算出 NK 杀伤活性。用 10% FCS-RPMI1640 培养液将脾淋巴细胞调整至  $(1 \times 10^6, 5 \times 10^5, 2.5 \times 10^5, 1.25 \times 10^5)$   $100 \mu\text{L}^{-1}$  浓度后, 以  $100 \mu\text{L} \cdot \text{well}^{-1}$  分别添加到 96 孔圆底培养板中作为 NK 杀伤效应细胞。10% FCS-RPMI1640 培养液调整 YAC-1 细胞浓度至  $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 添加 DiO ( $10 \mu\text{L} \cdot 1 \text{mL}^{-1}$ ), 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 15 min 后, 用培养液洗涤两次, 用上述培养液调整细胞浓度至  $10^4 \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$  作为 NK 靶细胞, 以  $100 \mu\text{L} \cdot \text{well}^{-1}$  添加到效应细胞中(效: 靶细胞比分别为 100: 1, 50: 1, 25: 1 及 12.5: 1)。YAC-1 靶细胞自然死亡率以  $10^4 \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$  靶细胞内添加  $100 \mu\text{L}$  培养液作为对照组。  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 3 h 后, 每孔加入  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PI  $8 \mu\text{L}$ , 继续孵育 1 h 后取出, 将培养板置于冰上终止杀伤反应, 避光保存用于流式细胞仪检测。将培养板中各孔细胞轻轻吹起并将待测细胞悬液转入流式分析管后添加  $500 \mu\text{L}$  PBS 溶液, 用流式细胞仪对每个样本中的 1 000 个靶细胞作 NK 杀伤活性的检测分析。NK 杀伤活性用 NK 细胞对 YAC-1 靶细胞的细胞毒性来表示, 并通过以下公式计算:

细胞毒性(%) =

$$\frac{\text{NK 诱发靶细胞死亡率} - \text{靶细胞自发死亡率}}{100 - \text{靶细胞自发死亡率}} \times 100\%$$

本实验算出 10% 细胞毒性时的 NK 的杀伤活性:  $\text{LU}_{10}$  (细胞毒性为 10% 时所需要的效应细胞数目) 所需要的脾脏细胞数为单位来定量表示。

此外, 本实验还计算了  $10^6$  脾脏细胞具有的 NK 细胞杀伤活性( $\text{LU}_{10} \cdot 10^6 \text{ cells}^{-1}$ ), 和整个脾脏全部细胞所具有的 NK 细胞杀伤活性( $\text{LU}_{10} \cdot \text{spleen}^{-1}$ )

$$\text{LU}_{10} \cdot 10^6 \text{ cells}^{-1} = \frac{\text{No. of 1 LU}_{10} \text{ cells}}{10^6 \text{ 脾脏细胞}}$$

$$\text{LU}_{10} \cdot \text{spleen}^{-1} = \frac{\text{No. of 1 LU}_{10} \text{ cells}}{\text{脾脏细胞总数}}$$

2.6 测定脾脏淋巴细胞内 MDA 含量 按 2.3 制得的脾脏淋巴细胞悬液, PBS 溶液调整细胞浓度为  $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  匀浆,  $9\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$   $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 15 min, 离心

上清液硫代巴比妥酸法测定脾脏淋巴细胞内 MDA 含量。

2.7 抗氧化能力指数(ORAC)的测定<sup>[5]</sup> 按 2.3 制得的脾脏淋巴细胞悬液, PBS 溶液调整细胞浓度为  $2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  匀浆,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$   $9\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 离心上清液测定脾脏细胞内的 ORAC 水平。

2.8 数据统计与分析 实验数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用 SPSS 软件, 利用 ANOVA 检验进行统计学处理,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

3.1 对应激小鼠胸腺指数、脾脏指数和脾脏淋巴细胞总数的影响 各组小鼠初始体重和结束体重并无明显差异。与正常对照组相比, 拘束应激组胸腺指数、脾脏指数和脾脏淋巴细胞总数下降; 与拘束应激组相比, 王老吉凉茶  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组均使小鼠胸腺指数、脾脏指数和脾脏淋巴细胞总数增高 ( $P < 0.05$ ), 结果见表 1。

表 1 王老吉凉茶对应激小鼠免疫器官指数和脾脏细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	胸腺指数	脾脏指数	脾脏细胞数 ( $\times 10^7$ )
正常对照组	$0.34 \pm 0.04^{2)}$	$0.55 \pm 0.05^{2)}$	$18.8 \pm 2.6^{1)}$
拘束应激组	$0.19 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.04$	$14.4 \pm 1.5$
WLJ $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.24 \pm 0.02^{1)}$	$0.44 \pm 0.04^{1)}$	$17.6 \pm 3.0^{1)}$
WLJ $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.25 \pm 0.04^{1)}$	$0.54 \pm 0.05^{2)}$	$24.0 \pm 3.1^{2)}$

注: 与拘束应激组相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (下同)

3.2 对应激小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响 如表 2 所示, 与正常对照组相比, 拘束应激组小鼠脾脏淋巴细胞中总 T 淋巴细胞 ( $\text{CD3}^+$ ) 比率变化不大, 但是  $\text{Th}(\text{CD3}^+ \text{CD4}^+)$  淋巴细胞的比例由 20.2% 明显地下降到 8.3% ( $P < 0.01$ ), 而  $\text{Ts}(\text{CD3}^+ \text{CD8}^+)$  淋巴细胞的比例由 10.7% 明显地上升到 27.4% ( $P < 0.01$ ), 可见拘束应激完全破坏了 T 淋巴细胞亚群的比例。与拘束应激组相比,  $125, 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  王老吉凉茶组可明显升高小鼠脾脏 T 淋巴细胞中的  $\text{Th}/\text{Ts}$  比值 ( $P < 0.01$ ), 使应激小鼠的细胞免疫平衡趋向正常状态, 且其活性呈一定的剂量依赖性倾向。此外, 结合脾脏淋巴细胞总数来看,  $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  及  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  WLJ 组增加脾脏 T 淋巴细胞 ( $\text{CD3}^+$ ) 总数。

3.3 对应激小鼠脾脏 NK 细胞和 NKT 细胞比率及数目的影响 如表 3 所示, 应激负荷使小鼠脾脏淋巴细胞中  $\text{NK}(\text{CD3}^- \text{NK1.1}^+)$  细胞的比率略有上升, 使  $\text{NKT}(\text{CD3}^+ \text{NK1.1}^+)$  细胞比率显著下降 ( $P <$

表 2 王老吉凉茶对应激小鼠脾脏 T 淋巴  
细胞亚群的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7, \%$ )

组别	T(CD3 <sup>+</sup> )	Th(CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )	Ts(CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )
正常对照组	39.6 ± 5.1	20.2 ± 4.2 <sup>2)</sup>	10.7 ± 2.0 <sup>2)</sup>
拘束应激组	44.5 ± 4.0	8.3 ± 3.2	27.4 ± 3.0
WLJ 125 mg·kg <sup>-1</sup>	39.9 ± 5.8	17.0 ± 3.8 <sup>2)</sup>	14.2 ± 2.3 <sup>2)</sup>
WLJ 500 mg·kg <sup>-1</sup>	41.4 ± 6.0	21.7 ± 6.2 <sup>2)</sup>	12.6 ± 1.3 <sup>2)</sup>

0.01)。与拘束应激组相比,口服给药王老吉凉茶使 NK 和 NKT 细胞比率均上升,其中 500 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组使应激负荷小鼠脾脏 NK 细胞比率显著高于正常对照组,且使降低的 NKT 细胞比率恢复到正常水平。综合考虑脾脏淋巴细胞总数,应激负荷使小鼠脾脏淋巴细胞中 NK 细胞总数减少( $P < 0.05$ ),使 NKT 细胞比率显著下降( $P < 0.01$ )。与拘束应激组相比,口服给药王老吉凉茶使 NK 和 NKT 细胞总数均显著增加( $P < 0.01$ )。

表 3 王老吉凉茶对应激小鼠脾脏 NK 细胞  
比例和数目的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	NK 比例 (%)	NKT 比例 (%)	NK 细胞数 ( $\times 10^7$ )	NKT 细胞数 ( $\times 10^6$ )
正常对照组	10.1 ± 2.0	0.9 ± 0.4 <sup>2)</sup>	1.90 ± 0.09 <sup>1)</sup>	1.13 ± 0.12 <sup>2)</sup>
拘束应激组	12.0 ± 1.8	0.5 ± 0.3	1.74 ± 0.08	7.22 ± 0.40
WLJ 125 mg·kg <sup>-1</sup>	12.9 ± 1.1	0.7 ± 0.3 <sup>1)</sup>	2.26 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.23 ± 0.15 <sup>2)</sup>
WLJ 500 mg·kg <sup>-1</sup>	13.8 ± 2.1 <sup>2)</sup>	0.9 ± 0.5 <sup>2)</sup>	3.31 ± 0.12 <sup>2)</sup>	2.11 ± 0.20 <sup>2)</sup>

**3.4 对应激小鼠脾脏 NK 细胞毒活性的影响** 如表 4 所示,以 DiO/PI 双染色法检测 10<sup>6</sup> 脾细胞 NK 杀伤活性 LU<sub>10</sub>·10<sup>6</sup> cells<sup>-1</sup> 结果表明,与正常对照组相比,拘束应激组 NK 活性稍有增强。与拘束应激组相比,125 mg·kg<sup>-1</sup> 及 500 mg·kg<sup>-1</sup> WLJ 组 NK 活性分别增强 30.8% 和 46.2%。以 DiO/PI 双染色法检测整个脾脏细胞 NK 杀伤活性 LU<sub>10</sub>·spleen<sup>-1</sup> 结果表明,拘束应激使小鼠脾脏 NK 细胞活性下降( $P < 0.05$ )。与拘束应激组相比,125 mg·kg<sup>-1</sup> 及 500 mg·kg<sup>-1</sup> WLJ 组 NK 活性均明显提高( $P < 0.01$ )。

**3.5 对拘束负荷小鼠脾脏细胞内过氧化状态及抗氧化能力的影响** 如表 4 所示拘束应激显著增加小鼠脾脏细胞中的脂质过氧化产物 MDA ( $P < 0.01$ ),且显著降低小鼠脾脏细胞中的 ORAC 水平( $P < 0.01$ );与拘束应激组相比,王老吉给药组明显减少拘束负荷小鼠脾脏细胞中的脂质过氧化产物 MDA 含量( $P < 0.01$ ),且明显升高拘束负荷小鼠脾脏细胞中的 ORAC 水平( $P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

本实验室前期研究结果表明,小鼠拘束负荷后

表 4 王老吉凉茶对应激小鼠脾脏 NK 细胞活性  
及脾细胞内氧化状态的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	LU <sub>10</sub> ·10 <sup>6</sup> cells <sup>-1</sup>	LU <sub>10</sub> ·spleen <sup>-1</sup>	MDA ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	ORAC ( $\mu\text{mL}^{-1}$ )
正常对照组	0.11 ± 0.01	20.73 ± 1.95 <sup>1)</sup>	2.30 ± 0.37 <sup>2)</sup>	743.0 ± 40.5 <sup>2)</sup>
拘束应激组	0.13 ± 0.03	18.07 ± 1.50	3.63 ± 0.50	395.4 ± 35.3
WLJ 125 mg·kg <sup>-1</sup>	0.17 ± 0.04 <sup>2)</sup>	30.04 ± 2.55 <sup>2)</sup>	1.86 ± 0.32 <sup>2)</sup>	888.7 ± 45.2 <sup>2)</sup>
WLJ 500 mg·kg <sup>-1</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>2)</sup>	46.76 ± 4.22 <sup>2)</sup>	1.57 ± 0.29 <sup>2)</sup>	844.8 ± 38.7 <sup>2)</sup>

第 3 天时,脾脏淋巴细胞数和 NK 细胞活性下降到最低值,因此本实验采用拘束应激 12 h 恢复 3 d 时的免疫状态为指标评价王老吉凉茶的免疫复活作用<sup>[3]</sup>。

与对照组相比,小鼠拘束应激后胸腺及脾脏指数分别下降,同时脾脏淋巴细胞总数明显减少。与应激负荷组相比,连续 5 d 给王老吉凉茶使小鼠的胸腺指数、脾脏指数及脾细胞数均明显增加,表明王老吉凉茶可以改善应激负荷诱发的免疫细胞损伤作用。

王老吉凉茶可以明显提高应激小鼠脾脏 T 淋巴细胞中的 Th/Ts 比值( $P < 0.01$ ),使应激小鼠的细胞免疫细胞亚群比值趋向正常状态,且其活性呈一定的剂量依赖性关系。王老吉凉茶影响 T 淋巴细胞亚群比值可看作是改善应激负荷诱发的免疫细胞损伤或促进小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖的结果。

研究证明 NK 细胞参与机体的抗肿瘤、抗感染等生理过程,是机体重要的免疫细胞。本实验使用 NK 细胞及 NKT 淋巴细胞共同表达的 NK1.1 抗原用于分析 NK 细胞总数。由于 NKT 细胞是一种既表达 T 细胞 CD3 又带有 NK 细胞的 NK1.1 表面抗原的免疫细胞群,因此我们采用流式 NK1.1-FITC 和 CD3-PE 双标法排除 NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> 细胞,准确分析 NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> 细胞的比例。实验中我们发现,拘束负荷 12 h 小鼠在恢复 3 d 后,在相对增加脾脏中 NK 细胞比例的同时,却显著减少了整个脾脏中的 NK 细胞总数量。与拘束应激组相比,王老吉凉茶给药不仅可以明显提高拘束应激负荷小鼠脾脏中 NK 细胞比例,同时也显著增加了脾脏中的 NK 细胞总数量。

我们在探讨拘束负荷影响 NK 细胞对 YAC-1 靶细胞杀伤活性时确认,拘束负荷 12 h 小鼠恢复 3 d 后以 LU<sub>10</sub>·10<sup>6</sup> cells<sup>-1</sup> 为单位的非特异性 NK 杀伤活性显示一定的上升趋势,这可能与 NK 细胞的相对应激耐受性较强有关。但我们也注意到,与对照组相比,拘束负荷显著地抑制了以脾脏为单位表示的 NK 杀伤活性(LU<sub>10</sub>·spleen<sup>-1</sup>),这种结果与 NK 细胞数目的变化相一致。与应激负荷组比,王老吉凉茶显著提高拘束负荷小鼠单位脾细胞的 NK 杀伤活性

的同时,缓解因应激负荷减少的脾脏为单位的NK细胞杀伤活性。

近年来人们发现应激负荷诱发机体氧化应激状态直接影响免疫机能,Nakamura 等人的研究证明自由基可以抑制自然杀伤细胞及T细胞等免疫细胞活性,降低机体的免疫功能<sup>[1,6]</sup>。我们以MDA含量作为间接反映淋巴细胞损伤程度的指标,以ORAC值反映细胞内抗氧化能力水平。实验结果显示,王老吉凉茶不仅降低淋巴细胞中MDA含量,同时显著提高免疫细胞内的ORAC水平。王老吉凉茶缓解应激诱发免疫细胞内的氧化应激状态可能有利于改善脾脏细胞中Th/Ts比值及提高NK细胞杀伤活性,但其作用机理尚有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Nakamura K, Matsunaga K. Susceptibility of natural killer (NK) cells to reactive oxygen species (ROS) and their restoration by the minics of superoxide dismutase (SOD)[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1998, 13(4): 275- 290.

[2] 叶木荣,廖慧芳,廖雪珍,等. 王老吉冲服凉茶的药理

研究[J]. 中成药, 1993, (1): 29-31.

[3] Kurihara H, Koda H, Asami S. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress[J]. Life Science, 2002, 70: 2509-2520.

[4] Piriou L, Chilmonczyk S, Genetet N, *et al.* Design of a Flow Cytometric Assay for the Determination of Natural Killer and Cytotoxic T-Lymphocyte Activity in Human and in Different Animal Species[J]. Cytometry, 2000, 41: 289-297.

[5] Kurihara H, Fukami H, Asami S. Effects of Oolong Tea on Plasma Antioxidative Capacity in Mice Loaded with Restraint Stress Assessed Using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay [J]. Biological Pharmacology Bulletin, 2004, 27(7): 1093-1098.

[6] Gelderman K. A, Hultqvist M, Holmberg J, *et al.* T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility[R]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(34): 12831-12836.