

构树总黄酮对免疫抑制小鼠免疫功能的影响

黄伟^a, 陈绍红^b, 刘铀^b, 刘艳芬^{a*} (广东海洋大学, a.农学院, b.生化实验中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 目的 探讨构树总黄酮(total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*, TFBP)对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫功能的影响。方法 用环磷酰胺复制免疫抑制模型并随机分为模型组、构树总黄酮高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 以正常小鼠为空白对照组。分别于饲喂构树总黄酮后第 10 天和第 30 天采样, 检测白细胞含量、腹腔巨细胞吞噬功能、T、B 淋巴细胞转化率、血清 IgG 含量及 BSA 抗体水平。结果 与模型组比较, 饲喂 TFBP 的高、中、低剂量组小鼠的白细胞含量、腹腔巨噬细胞吞噬功能、T、B 淋巴细胞转化率、BSA 抗体水平和血清 IgG 均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 随着 TFBP 剂量的增加, 上述免疫指标与空白对照组相近。结论 构树总黄酮能显著改善环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能。

关键词: 构树总黄酮; 免疫抑制; 免疫调节

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)01-0008-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.003

Immunomodulatory Effects of Total Flavonoids of *Broussonetia Papyrifera* on Immunosuppressed Mouse

HUANG Wei^a, CHEN Shaohong^b, LIU You^b, LIU Yanfen^{a*} (*Guangdong Ocean University, a.Agricultural College; b.Biochemistry Center, Zhanjiang 524088, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the immunomodulatory effects of the total flavonoids of *broussonetia papyrifera*(TFBP) on immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide(CTX). **METHODS** SPF Kunming mice were randomly divided into control group, model group, and TFBP high, middle, low dosage groups(200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Except control group, the other groups were administered CTX by peritoneal injection to induce immunosuppression status. After 10 d and 30 d, the blood samples were collected to determine the number of white blood cells, phagocytosis of macrophage cells, serum IgG content, BSA antibody titers and proliferation of T and B lymphocytes. **RESULTS** The number of white blood cells, phagocytosis of macrophage cells, proliferation of T, B lymphocyte, BSA antibody levels and serum IgG content of the mice in TFBP groups were significantly increased($P<0.01$ or $P<0.05$) in a dose-dependent manner than that of model group. Moreover, as the TFBP increased in the diets, the data above were closed to that of normal mice in control group. **CONCLUSION** The immune function of the immunosuppressed mice induced by CTX can be improved significantly by TFBP administration.

KEY WORDS: total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*; immunosuppression; immunomodulatory

构树(*Broussonetia papyrifera*)为桑科构树属的一种落叶乔木,其根、皮、果实均可入药,具有补肾、清肝、明目、利尿等多种功效。现代药物化学研究表明,构树黄酮具有抗菌^[1-2]、抗氧化^[3-4]、抗炎^[4-5]和抗肿瘤^[5-6]等多种生物活性。当机体发生免疫抑制时,容易受到病毒、细菌、真菌等感染,甚至容易发生肿瘤。因此,开发一种具有免疫增强作用的天然药物具有十分重要的意义。近十几年来,黄酮类化合物对免疫功能的影响研究开始引起重视,一些黄酮类化合物对免疫反应涉及的 T、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞和粒细胞调控作用已经被广泛证实^[7-8]。目前有关构树黄酮调节

机体免疫功能的研究尚未见报道,本研究以环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导的免疫抑制昆明小鼠为试验材料,通过检测小鼠白细胞含量、腹腔巨噬细胞吞噬功能、T、B 淋巴细胞转化率、血清 IgG 含量及 BSA 抗体水平等免疫指标,探讨构树总黄酮(total flavonoids of *Broussonetia papyrifera*, TFBP)对免疫抑制小鼠免疫功能的影响,为开发黄酮类免疫增强剂提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

6~8 周龄 SPF 级昆明小鼠 100 只,体质量(20±2)g,♀♂各半,购自南方医科大学实验动物

基金项目:广东省农业厅科技计划项目(0809035)

作者简介:黄伟,男,硕士生 Tel: 15876392599
E-mail: lyf9314@163.com

E-mail: 1005678382@qq.com

*通信作者:刘艳芬,女,硕士,教授 Tel:

中心, 合格证号 No.44002100007614。

1.2 药物和试剂

构树于 2015 年 10 月采收自广东海洋大学校园内, 经广东海洋大学生化中心刘铀教授鉴定为桑科构树属构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 的干燥茎; CTX(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 14040225); 小鼠免疫球蛋白 G(IgG)ELISA 试剂盒(上海常斤生物技术有限公司, 批号: 953737); HRP 标记羊抗小鼠 IgG(Jackson ImmunoResearch 公司, 批号: 117896); 小鼠淋巴细胞分离液(上海源叶生物科技有限公司, 批号: 141222); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司); 卵清白蛋白(OVA, Sigma 公司); 细菌脂多糖(LPS, Sigma 公司); 伴刀豆球蛋白 A(ConA, Sigma 公司); RPMI-1640 固体培养基(Sigma 公司); 胎牛血清(Gibco 公司)。

1.3 仪器

DMI3000B 型荧光倒置显微镜(Leica 公司); Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱(Thermo Scientific 公司); ELX808 型多功能酶标仪(Bio-Tek 公司); BHC-1300II A/B3 型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 TFBP 的提取

取 1~2 年生构树枝条, 50 °C 烘干至恒重后粉碎, 过 60 目筛, 按液料比 40:1(提取液为 pH 11 的氢氧化钠溶液)和提取温度 60 °C 条件下浸提 2 h, 抽滤收集上清液, 用稀盐酸调节 pH 值为 2, 静置 24 h, 6 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集沉淀, 低温真空冷冻干燥后得 TFBP 粉末, 芦丁比色法测定提取物中的黄酮含量。

2.2 小鼠分组及给药处理

100 只 SPF 昆明小鼠随机分为空白对照组、模型组、TFBP 低、中、高剂量组, 每组 20 只。空白对照组参考文献的方法^[8], 除空白对照组外, 各组小鼠连续 3 d 腹腔注射 CTX 50 mg·kg⁻¹, 1 周后重复给药一次, 建立免疫抑制小鼠模型。3 d 后, TFBP 低、中、高剂量组小鼠分别饲喂 50, 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的 TFBP。分别于饲喂 TFBP 后的第 10 天和第 30 天采集血液样品, 检测血液白细胞含量、腹腔巨噬细胞吞噬功能、脾脏 T、B 淋巴细胞转化率、血清 IgG 含量及 BSA 抗体水平。

2.3 TFBP 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

分别在采样的前 3 d, 每组随机取 5 只小鼠, 连续 3 d 腹腔注射 1 mL 的 6%淀粉营养肉汤以刺

激腹腔巨噬细胞的产生, 在最后一次注射 12 h 后, 摘眼球采集抗凝血后断颈处死小鼠, 参考文献^[7]的方法收集、测定腹腔巨噬细胞吞噬功能。

2.4 TFBP 对小鼠外周血白细胞数量的影响

取“2.3”项下收集的抗凝血 100 μL, 检测白细胞数目。

2.5 TFBP 对小鼠血清 IgG 含量的影响

将“2.3”项下收集的抗凝血 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 收集血清, 按小鼠 IgG ELISA 试剂盒说明书测定血清 IgG 含量。

2.6 TFBP 对小鼠特异性免疫应答的影响

在饲喂 TFBP 的第 1 天, 用 BSA 作为抗原, 按每只 100 μg 剂量免疫各组小鼠, 1 周后用相同剂量加强免疫 1 次。分别在饲喂 TFBP 的第 10 天和第 30 天, 每组随机取 5 只小鼠, 摘取眼球采血后断颈处死, 收集血清, 间接 ELISA 法测定血清 BSA 抗体水平。

2.7 TFBP 对小鼠脾脏淋巴细胞转化的影响

将“2.3”项下处死后的小鼠在 75%酒精中浸泡 10 min 后, 无菌采集小鼠脾脏, 制备脾淋巴细胞单细胞悬液。参考文献^[8]的方法分离 T、B 淋巴细胞, MTT 法检测 T、B 淋巴细胞的增殖活性。

2.8 数据处理

试验数据采用统计软件 SPSS 22.0 进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TFBP 的含量

用最小二乘法经线性回归, 求得吸光度(A)与芦丁浓度(C)的标准曲线方程为 $A=11.4C+0.014 4$ ($R^2=0.998$)。TFBP 的提取率为 1.93 mg·g⁻¹。

3.2 对小鼠外周血白细胞数量的影响

试验期内, 模型组小鼠白细胞数目显著低于空白对照组($P<0.01$); 给予高、中剂量的 TFBP 组小鼠白细胞数显著高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果显示, 给予 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的 TFBP 能显著增加免疫抑制小鼠白细胞数量, 且随着 TFBP 剂量增加及作用时间延长, 免疫抑制小鼠白细胞数量逐渐恢复接近正常水平。结果见图 1。

3.3 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

CTX 导致小鼠巨噬细胞功能受损, 与空白对照组相比, 有统计学差异($P<0.01$)。给予 TFBP 的各组小鼠在试验期内巨噬细胞吞噬指数呈升高趋

势, 给予高剂量 TFBP 的小鼠吞噬指数与空白对照组相仿, 表明 TFBP 能显著改善免疫抑制小鼠巨噬细胞吞噬功能。结果见图 2。

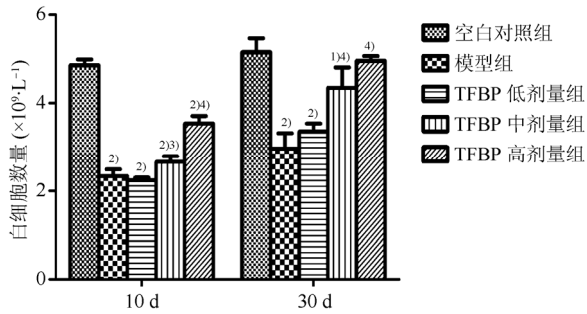


图 1 TFBP 对小鼠外周血白细胞数量的影响($n=5, \bar{x} \pm s$) 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 The effect of TFBP on mouse white blood cell count($n=5, \bar{x} \pm s$) Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

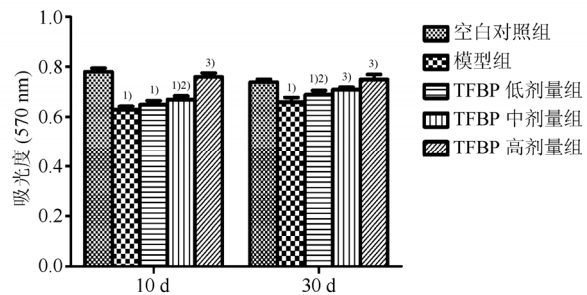


图 2 TFBP 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($n=5, \bar{x} \pm s$) 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 The effect of TFBP on mouse macrophage cell function($n=5, \bar{x} \pm s$) Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

3.4 对小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞转化的影响

小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖随 TFBP 剂量的增加而增加, 第 10 天, 给予高剂量 TFBP 的小鼠 T 淋巴细胞增殖显著高于模型组($P<0.01$); 第 30 天, 给予中、高剂量 TFBP 的小鼠 T 淋巴细胞增殖已接近正常小鼠。结果见图 3。

CTX 诱导的免疫抑制小鼠 B 淋巴细胞增殖显著降低($P<0.01$), 第 10 天时, 模型组、低剂量组小鼠 B 淋巴细胞转化率显著低于空白对照组($P<0.01$), TFBP 中、高剂量组小鼠则显著高于模型组, 与空白对照组相近; 第 30 天时, TFBP 组小鼠淋巴细胞增殖水平与空白对照组相仿。上述结果表明, TFBP 改善免疫抑制小鼠 B 淋巴细胞功能与其剂量和作用时间有关。结果见图 4。

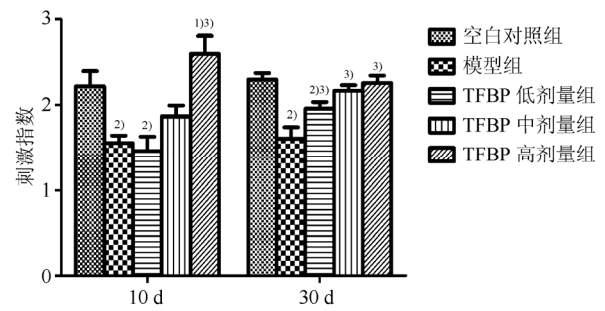


图 3 TFBP 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 The effect of TFBP on T lymphocyte proliferation ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.01$ 。

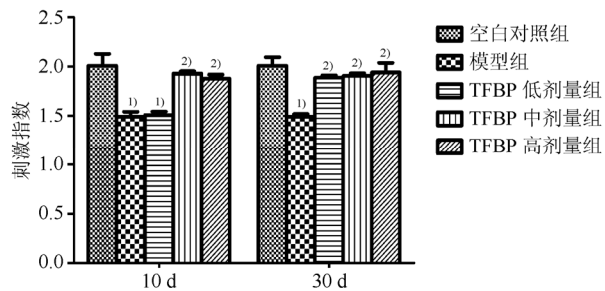


图 4 TFBP 对小鼠脾脏 B 淋巴细胞增殖的影响($n=5, \bar{x} \pm s$) 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 The effect of TFBP on B lymphocyte proliferation ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$ 。

3.5 对小鼠血清中 BSA 抗体水平的影响

试验期内, 模型组小鼠血清 BSA 抗体水平显著低于空白对照组($P<0.01$), 给予 TFBP 的各组小鼠 BSA 抗体水平呈上升趋势。第 10 天时, TFBP 中、高剂量组小鼠 BSA 抗体水平显著高于模型组($P<0.01$); 第 30 天时, TFBP 各剂量组小鼠 BSA 抗体水平显著高于模型组($P<0.01$)。说明 TFBP 能改善免疫抑制小鼠的特异性免疫应答, 且随着剂量增加, TFBP 促进特异性免疫应答的作用越强。结果见图 5。

3.6 对小鼠血清 IgG 含量的影响

试验期内, TFBP 各剂量组小鼠血清 IgG 含量呈剂量依赖性, 并且显著高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。TFBP 高剂量组小鼠血清 IgG 水平与空白对照组差异不显著。表明 TFBP 能显著改善免疫抑制小鼠 IgG 合成和分泌, 并且 TFBP 的作用具有剂量依赖性。结果见图 6。

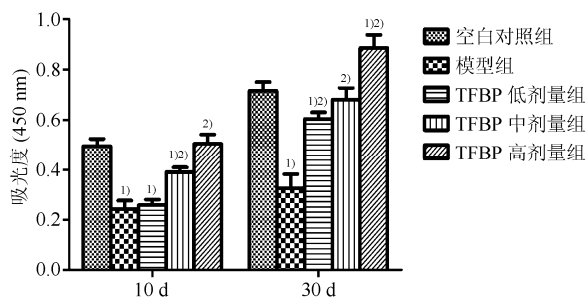


图5 TFBP对血清中BSA抗体水平的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 The effect of TFBP on specific immune response ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

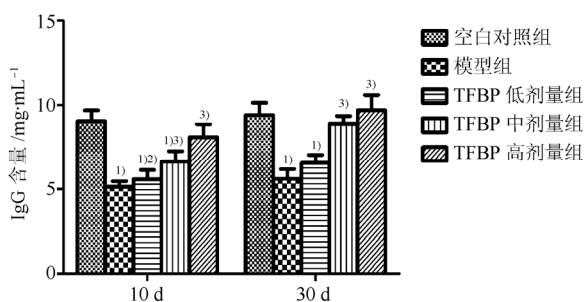


图6 TFBP对小鼠血清IgG含量的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 The effect of TFBP on mouse serum IgG($n=5, \bar{x} \pm s$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

4 讨论

黄酮类化合物是药用植物中主要的生物活性成分之一。大量研究证实, 黄酮化合物能调节动物免疫功能。徐璐等^[9]研究报道, 黄芪总黄酮可显著提高小鼠巨噬细胞吞噬功能、血清溶血素水平和促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 增强小鼠的免疫功能。王宇翎等^[10]研究报道, 白花蛇舌草总黄酮能提高CTX致免疫抑制小鼠的白细胞含量, 并提高小鼠血清IL-2、IFN- γ 和IgM抗体的含量, 从而改善小鼠的体液免疫和细胞免疫功能。张磊等^[11]研究报道, 山香圆总黄酮能够通过调节巨噬细胞的吞噬功能, 提高CD4⁺、CD8⁺细胞数, 使CD4⁺/CD8⁺细胞比值上升, 改善CTX诱导免疫功能低下小鼠的细胞免疫功能。Han等^[12]研究报道, 沙苑子总黄酮能够通过促进IFN- γ 的分泌和增强自然杀伤细胞(NK细胞)活化因子CD25和CD69的表达, 来促进NK-92细胞的增殖和细胞毒活性。进一步的研究发现, 沙苑子总黄酮能够上调NK-92细胞膜上特异受体的mRNA和蛋白表达水平, 从

而增强NK细胞杀伤靶细胞的活性。

本研究结果显示, TFBP能显著提高CTX诱导的免疫抑制小鼠白细胞含量、腹腔巨噬细胞吞噬功能、丝裂原刺激的T、B淋巴细胞增殖、血清IgG水平和特异性免疫应答, 并呈明显量效关系, 即随着TFBP添加剂量的增加, 上述免疫指标也随之增加, 当TFBP剂量达到200 mg·kg⁻¹·d⁻¹时, 上述免疫指标与正常小鼠相仿, 提示给予TFBP的免疫抑制小鼠体液免疫和细胞免疫功能基本恢复。因此, TFBP有望成为一种天然的动物免疫增强剂。

REFERENCES

- [1] LIU X J, LIU Y, CHEN S H, et al. Preliminary observation of antibacterial activity of *Broussonetia papyrifera* leaf extracts [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(19): 283-286.
- [2] SOHN H Y, KWON C S, SON K H. Fungicidal effect of prenylated flavonol, papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) vent. against *Candida albicans* [J]. Microbiol Biotechnol, 2010, 20(10): 1397-402.
- [3] XIONG Y F, ZHAO Y H, YANG Y N, et al. Extraction of the flavone from *Broussonetia papyrifera* Vent roots and its anti-oxidation *in vitro* [J]. J Forestry Eng(林业科技开发), 2009, 23(1): 42-45.
- [4] WU W T. Evaluation of anti-inflammatory effects of *Broussonetia papyrifera* stem bark [J]. Indian J Pharmacol, 2012, 44(1): 26-30.
- [5] WANG L, SON H J, XU M L, et al. Anti-inflammatory and anticancer properties of dichloromethane and butanol fractions from the stem bark of *Broussonetia papyrifera* [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2010, 53(3): 297-303.
- [6] CHEN S H, CHEN X G, HE J L, et al. Preliminary observation of the HepG2 cell apoptosis induced by *Broussonetia papyrifera* flavonoids [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2015, 43(29): 32-34.
- [7] 田维毅, 王文佳, 李海峰, 等. 中性红法检测巨噬细胞吞噬功能的实验条件的优化[J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(2): 23-26.
- [8] YANG Q C. Isolation and purification of polysaccharide from *enteromorpha prolifera* and its regulatory effects on immune function in mice [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015.
- [9] XU L, LI Y M, LIU Q T, et al. Effect of total flavones astragalus on immune function in mice [J]. Prog Veter Med(动物医学进展), 2013, 34(11): 36-39.
- [10] WANG Y L, ZHANG Y, FANG M, et al. Immunomodulatory effects of total flavones of *Oldenlandia diffusa* Willd [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2005, 21(3):348-350
- [11] ZHANG L, LI J, YU S C, et al. The effects of total flavonoids of turpiniaargutaseen on the immune function of immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide [J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2006, 41(5): 539-543.
- [12] HAN R, WU W Q, WU X P, et al. Effect of total flavonoids from the seeds of *Astragali complanati* on natural killer cell function [J]. J Ethnopharmacol, 2015(173): 157-165.

收稿日期: 2016-05-28