

莲房原花青素对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤及其免疫功能影响的研究

张海晖¹, 段玉清^{1,2}, 邓乾春², 杨尔宁², 谢笔钧²

(1. 江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013

2. 华中农业大学食品科技学院天然产物化学研究室, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 目的: 探讨莲房原花青素(LSPC)对 S₁₈₀ 肉瘤小鼠及免疫功能的影响。方法: 采用称重方法来讨论 LSPC 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用; 采用小鼠碳廓清单核巨噬细胞吞噬功能测定法、迟发型超敏反应及血清溶血素测定方法, 研究 LSPC 对荷 S₁₈₀ 肉瘤小鼠免疫功能的影响; 结果: LSPC 可抑制小鼠 S₁₈₀ 肉瘤生长、提高免疫器官的增长指数; 能显著增强荷瘤小鼠巨噬细胞的吞噬功能、DNFB 所致迟发型超敏反应以及抗体生成的能力。结论: 初步证明 LSPC 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用与其增强荷瘤小鼠免疫功能有关。

关键词: 莲房原花青素; 免疫; 抑制作用; S₁₈₀ 肉瘤

Effect of LSPC on S₁₈₀ Sarcoma and Immune Function in Mice

ZHANG Hai-hui¹, DUAN Yu-qing^{1,2}, DENG Qian-chun², YANG Er-ning², XIE Bi-jun²

(1. School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Natural Product Chemistry Research Laboratory, Food Science Department of Huazhong Agricultural, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective: To discuss the effects of proanthocyanidins from Lotus seedpod (LSPC) on S₁₈₀ sarcoma and the immune function in mice. Methods: The inhibitory function of LSPC to S₁₈₀ sarcoma was studied by weighing method, and the effect of LSPC on the immune function in mice was studied through determining carbon granule clearance ability, delayed type hypersensitivity (DTH) induced by DNFB and hemolysin production level. Results: LSPC could inhibit the growth of S₁₈₀ sarcoma in mice, increase the growth index of immune organs, significantly enhance the phagocytosis function of peritoneal macrophage (PMΦ), intensify DTH caused by DNFB, and increase production of antibody. Conclusion: It was primarily proved that LSPC could intensify the immune function in S₁₈₀ sarcoma-bearing mice and inhibit the mice S₁₈₀ sarcoma.

Key words: Lotus seedpod procyanidins(LSPC); immune; inhibitory; S₁₈₀ sarcoma

中图分类号 TS201.4

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0220-04

莲房是莲科植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的成熟花托(又名莲蓬壳, Seedpod of the Lotus, 简称LS), 莲房原花青素(LSPC)是本实验室首次从中分离鉴定, 并证明其是莲房的主要活性成分之一。1996年Cheshier等人研究了葡萄籽原花青素对喂食甲醇或感染鼠逆转录病毒引起的小鼠免疫功能不全的作用, 得到葡萄籽原花青素对小鼠的免疫功能具有动态调节的作用。同时证明原花青素还可以增强自然杀伤细胞的细胞毒性^[1]。1998年, Liu等人曾报道葡萄籽原花青素对老化小鼠(SAM)

免疫和造血功能不全的作用。并证明了其有明显提高T淋巴细胞、B淋巴细胞的功能^[2]。而莲房原花青素作为新的原花青素试验材料, 已证明有抗氧化^[3,4]、清除自由基^[5]、降血压^[6]、保护心血管系统^[7]的功能。而关于其对荷S₁₈₀肉瘤小鼠及其免疫功能的影响尚未见到报, 为此本文初步探讨了莲房原花青素对小鼠S₁₈₀肉瘤及其免疫功能的影响, 为开发新型的增强免疫功能的营养保健食品及医药品奠定理论基础, 为莲房资源的开发拓宽思路。

收稿日期: 2004-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(30270938)

作者简介: 张海晖(1975-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物化学与功能食品开发。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

印度墨汁 华中农业大学王大菊老师惠赠 肝素钠 中国医药上海化学试剂公司; 二硝基氟苯(DNFB) 中国医药上海化学试剂公司; 2, 4, 6- 三硝基酚 广东台山化工厂; 麻油 福达食用油调料有限公司; 环磷酰胺(CY) 上海第十二制药厂产品; Na_2CO_3 、 Na_2S 、 NaCl 、丙酮、乙醇等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

电子天平、微量取样器、恒温水浴锅、离心机、打孔器、分光光度计。

1.1.3 实验动物

昆明种小白鼠, 雄性, 体重 18~22g, 购于湖北省医学实验动物中心, 普通级饲养, 批准号: SCXK(鄂)2003-0005。S₁₈₀ 荷瘤动物为昆明种小鼠, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供。豚鼠、绵羊红细胞均购于湖北省医学实验动物中心。

1.1.4 样品制备

莲房原花青素(LSPC): 莲房采自洪湖蓝田种植区, 品种名称为武植2号。将莲房(去籽)清洁干净, 用沸水密封浸提, 浸提液用200目砂滤机过滤, 将滤液过树脂吸附柱, 用水洗下不被吸附的杂质, 用含75%的乙醇冲洗树脂吸附柱, 得到乙醇洗脱液, 在40℃减压除去浸提液中乙醇, 采用喷雾干燥, 得到原花青素产品, 为浅黄色粉末, 得率15%, Porter s法检测, 原花青素含量大于纯度98%, 经质谱鉴定(如图1), 其低聚原花青素含量为85.0%。产品, 为浅黄色粉末, 得率15%, Porter s法检测, 原花青素含量大于纯度98%, 经质谱鉴定(如图1), 其低聚原花青素含量为85.0%。

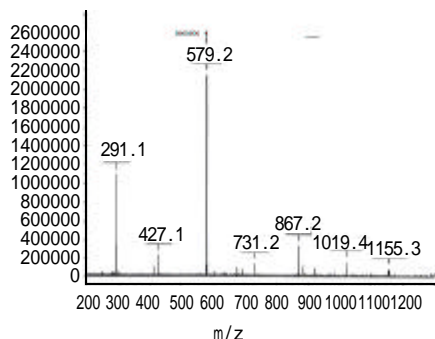


图1 LSPC的ESI-MS质谱分析图

Fig.1 ESI-MS spectrum of LSPC

1.2 实验方法

1.2.1 分组与给药剂量

1.2.1.1 S₁₈₀ 肉瘤细胞: 无菌取腹腔内传代7d的S₁₈₀ 腹水瘤细胞, 生理盐水(无菌)洗涤3次, 1:4体积比加入生理盐水(无菌), 0.2ml/只接种于昆明种小鼠腋下(每只小鼠接种 1×10^6 个细胞)后, 随机分成4组, 阴性对照组、阳性药物对照组和莲房原花青素组, 每组12只, 次日给药。

1.2.1.2 给药方式与剂量

LSPC组每天灌胃给药(LSPC₁ 60mg/kg、LSPC₂ 90mg/kg、120mg/kg); 以环磷酰胺(CY)为阳性药物对照组, 每天连续腹腔注射给药(30mg/kg); 阴性对照组每天灌胃等量的生理盐水, 正常组自由饮水、进食, 连续给药7d。

1.2.2 体内抑瘤实验^[8,9]

分组与给药剂量见1.2.1, 连续给药7d, 于8d称重, 处死小鼠, 剥离肿瘤组织, 称重。另外, 取胸腺、脾脏称重, 增长指数按每mg/10g计算。

1.2.3 碳粒廓清试验^[10]

小鼠碳粒廓清试验采用印度墨汁法。取接种S₁₈₀ 腹水瘤细胞的昆明种雄性小白鼠60只, 分组与给药剂量见1.2.1。连续给药7d, 最后一次给予LSPC 30min后, 往小鼠尾静脉注射印度墨汁0.1ml/10g(体重)。在注射后第2min和第12min内, 用预先经肝素溶液润湿的微量取样器从小鼠眼眶后静脉丛取血20μl, 混合于2ml 0.1%的 Na_2CO_3 溶液中, 摇匀后以0.1%的 Na_2CO_3 为对照, 在680nm处测吸光度(A), 最后将小鼠颈椎脱臼处死, 分别取肝脏、脾脏称重。按下式计算廓清指数(即吞噬指数)k和校正廓清指数α。

$$\text{廓清指数 } k = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$\text{校正廓清指数 } \alpha = \frac{\sqrt[3]{k} \cdot \text{体重}}{\text{肝 脏 脾 脏}} \quad (2)$$

式中 A_1 、 A_2 —在时间为 t_1 、 t_2 时所取血样的吸光度;
 t_1 、 t_2 —取两血样的时间差。

1.2.4 迟发型超敏反应实验(DTH)^[11,12]

取接种S₁₈₀ 腹水瘤细胞的昆明种雄性小白鼠60只, 分组与给药剂量见1.2.1。连续给药7d, 于第7d将小鼠腹部每只去毛约3cm×2.5cm的范围并用8% Na_2S 脱毛, 次日用50μl 1%DNFB丙酮-麻油溶液均匀涂抹致敏。5d后, 将10μl 1%DNFB溶液均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击, 攻击后24h颈椎脱臼处死小鼠, 用打孔器取下直径8mm的耳片进行称重, 以左、右耳片重量之差为肿胀度, 计算肿胀率:

$$\text{肿胀率}(\%) = \frac{\text{给药组} - \text{对照组}}{\text{对照组}} \times 100 \quad (3)$$

1% DNFB溶液: 取50mg DNFB置于清洁干燥的青

霉素小瓶中,加入5ml,丙酮-麻油(1:1)盖好并用胶布密封,混匀后用注射器通过瓶盖取用。

1.2.5 LSPC 对血清总补体活性(IgM)的测定^{[10][13]}

取接种 S₁₈₀ 腹水瘤细胞的昆明种雄性小白鼠 60 只,分组与给药剂量见 1.2.1。连续给药 7d。免疫 4d 后,眼眶取血并离心分离血清,用生理盐水稀释 500 倍,吸取 1ml 稀释血清加入反应管中,再加入 0.5ml 10% SRBC(约 10⁹ 个)置于冰浴中,再往试管中加入 1ml 稀释的豚鼠血清,立即移置于 37℃ 水浴中保温 10min。保温结束后放入冰浴中终止反应,经 2000r/min 离心 10min,取上清液 1ml 加 3ml 都氏试剂,摇匀后静置 10min。在 540nm 波长处进行比色,以不加血清的空白管作对照,测定吸光度值,按下式计算半数溶血值(HC₅₀)。

$$HC_{50} = \frac{\text{样品的吸光度}}{\text{SRBC 半数溶血时的吸光度}} \times \text{稀释倍数} \quad (4)$$

SRBC 半数溶血时的吸光度测定方法:取 0.25ml SRBC(2×10⁹/ml),加入都氏液至 4ml,摇匀后静置 10min,离心取上清液在 540nm 波长处比色测定。

1.3 数据处理

采用 SAS 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2 结果与分析

2.1 LSPC 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用和免疫器官增长

表 1 LSPC 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制作用和对免疫器官增长指数的影响
Table 1 Effect of LSPC on the inhibition of S₁₈₀ sarcoma and immune organ increasing index in S₁₈₀ sarcoma bearing mice

组别	剂量 (mg/kg·d)	胸腺 (mg/10g)	脾脏 (mg/10g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
阴性组	0	11.7±3.5	33±17	1.97±0.20	0
CY 组	30	10.5±2.7	30±16	0.42±0.13 ^b	79
	60	19.4±9.3 ^a	38±19	1.20±0.28 ^a	40
LSPC 组	90	24.5±6.0 ^a	50±11 ^a	1.05±0.27 ^a	47
	120	29.1±3.5 ^b	59±9 ^b	0.65±0.29 ^b	67

注: a: p<0.05; b: p<0.01; 与阴性对照组间比较。

指数的影响

从表 1 可以看出 LSPC 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤有明显的抑制作用,当 LSPC 浓度达到 120mg/kg 时,与阴性对照组相比有极显著性差异(p<0.01),抑制率可达 67%。阳性药物 CY 组抑制率可达 79%,说明 CY 对确实对 S₁₈₀ 肉瘤具有很好的抑制作用。

对荷瘤小鼠胸腺和脾脏增长指数统计表明, LSPC 试验组都能提高荷瘤小鼠免疫器官增长指数,且 120mg/kg 组效果最佳,与阴性对照组间有极显著性差异(p<0.01)。而 CY 组使荷瘤小鼠免疫器官增长下降,与阴性对照组无显著差异。

2.2 对荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

表 2 是 LSPC 对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响结果,从显著性分析表明, LSPC 在 60~120mg/kg 之间时,荷瘤小鼠廓清指数和校正廓清指数随剂量的增加而提高,并存在剂量依赖关系。其中 120mg/kg bw LSPC 组与阴性对照组间有极显著差异(p<0.01)。可见 LSPC

表 2 LSPC 对荷瘤小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of LSPC on phagocytosis of macrophages in S₁₈₀ sarcoma bearing mice

组别	只 (n)	剂量 (mg/kg·d)	廓清指数 k (×1000)	校正廓清指数 α
正常组	12	0	57±7 ^a	70±4
阴性组	12	0	38±9	49±11
CY 组	12	30	47±8	56±9
LSPC 组	12	60	51±11 ^a	63±3 ^a
	12	90	59±16 ^b	65±7 ^a
	12	120	65±14 ^b	70±6 ^b

注: a: p<0.05; b: p<0.01 与对照组相比较。

在试验浓度范围内对荷瘤小鼠体内腹腔巨噬细胞吞噬功能有较强的增强作用。

表 3 LSPC 对荷瘤小鼠皮肤迟发型超敏反应的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of LSPC on delayed type hypersensitivity (DTH) in S₁₈₀ sarcoma bearing mice

组别	剂量 (mg/kg·d)	胸腺增长指数 (mg/10g)	脾脏增长指数 (mg/10g)	左、右耳片 肿胀度之差 (×1000)	肿胀率 (%)
正常组	0	21.7±4.1	33.9±5.6	1.5±1.5	56±11
阴性组	0	10.1±7.9	20.6±6.9	0.9±1.6	11±10
CY 组	30	17.2±8.2	25.8±9.1	1.2±1.5	22±19
LSPC 组	60	19.8±6.6	27.3±7.3	1.3±1.3 ^a	39±15 ^a
LSPC 组	90	22.6±4.3 ^a	34.6±8.5 ^a	1.6±2.0 ^a	62±13 ^b
LSPC 组	120	28.8±9.3 ^a	39.6±7.5 ^a	1.8±2.2 ^b	84±17 ^b

注: a: p<0.05; b: p<0.01 与对照组间比较。

2.3 LSPC 对二硝基氟苯(DNFB)诱导荷瘤小鼠迟发型超敏反应(DTH)的影响

从表 3 可见 LSPC 的三个不同剂量组都能不同程度的提高荷瘤小鼠的耳廓肿胀率。其中, 120mg/kg LSPC 组肿胀率最大,与阴性对照组间有极显著差异(p<0.01)。提示: LSPC 可以不同程度的增强 DNFB 所诱导的迟发型反应,从而增强荷瘤小鼠细胞免疫功能。并能不同程度提高荷瘤小鼠免疫器官增长指数。

2.4 LSPC 对荷瘤小鼠血清总补体活性(IgM)的影响

从表 4 可见 LSPC 的三个不同剂量组都能不同程度的提高荷瘤小鼠半数溶血值(HC₅₀),且存在明显的剂量依赖关系。其中 120mg/kg LSPC 组效果最佳,与阴性对照组间有极显著性差异(p<0.01)。提示: LSPC 可以血清溶血素的含量显著提高,增强抗体形成能力,从而增

表4 LSPC对荷瘤小鼠血清总溶血素活性(IgM)的影响
Table 4 Effect of LSPC on serum hemolysin(IgM) in S₁₈₀ sarcoma bearing mice

组别	剂量 (mg/kg·d)	胸腺增长指数 (mg/10g)	脾脏增长指数 (mg/10g)	IC ₅₀ ($\bar{X} \pm S$)
正常组	0	16.1±3.8	24.7±8.6	65±11
阴性组	0	7.8±6.1	17.3±10.0	41±125
CY组	30	10.6±3.5	20.3±7.5	53±10
	60	14.5±4.6	22.5±9.6 ^a	56±7 ^a
LSPC组	90	19.1±2.2 ^a	36.2±8.1 ^b	77±15 ^b
	120	23.3±5.7 ^b	44.3±9.1 ^b	81±18 ^b

注: a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$ 与对照组间比较。

强机体的体液免疫功能。并能提高荷瘤小鼠胸腺和脾脏增长指数。说明, LSPC能显著增强免疫器官的功能。

3 讨论

3.1 荷瘤小鼠碳粒廓清实验中K可反映网状内皮系统(RES)的吞噬功能, α 则反映单个单核-巨噬细胞的吞噬能力, 属于非特异性免疫; DTH是典型的IV型变态反应、血清溶血素反映特异性体液免疫功能。通过以上试验, 结果表明: LSPC能显著增强荷瘤小鼠RES吞噬功能、DNFB诱导的小鼠耳肿胀及特异性体液免疫。说明LSPC对荷瘤小鼠免疫系统功能有较强增强作用。

3.2 LSPC对小鼠S₁₈₀肉瘤有较强的抑制作用, 且能很好的改善因肿瘤引起的免疫器官萎缩。这说明LSPC对S₁₈₀肉瘤的抑制作用可能与其保护小鼠免疫器官的同时并增强其功能有关。

3.3 LSPC对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制率虽低于阳性药物环磷酰胺(CY)组, 但环磷酰胺(CY)组对荷瘤小鼠免疫功能调节作用不如LSPC组强。这进一步说明LSPC对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制作用机理可能与其增强免疫系统功能有关。而环磷酰胺(CY)组对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制作用可能

与其增强免疫功能无关。

参考文献:

- [1] Liu F J, et al. Procyanidins from the bark of Hamamelis virginiana exhibit antimutagenic properties against nitroaromatic compounds[J]. Cell Mol Life Sci, 1998, 54(10): 1168.
- [2] Cheshier JE, et al. Immunomodulation by Pycnogenol in retrovirus-infected ethanol-fed mice[J]. Life Sci, 1996, 58(5): 87.
- [3] 凌智群, 谢笔钧. 莲房原花青素抗氧化损伤作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 98-100.
- [4] 段玉清, 谢笔钧. 莲房原花青素体内抗氧化研究[J]. 营养学报, 2003, 25(3): 306-308.
- [5] 凌智群, 谢笔钧. 莲房原花青素对氧自由基和脂质过氧化的作用[J]. 营养学报, 2002, 24(2): 121-125.
- [6] 凌智群, 谢笔钧, 等. 莲房原花青素对家兔血脂及肝组织形态的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 62-64.
- [7] 凌智群, 谢笔钧, 等. 莲房原花青素对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6): 687-690.
- [8] 孙光星, 丁声颂, 钱瑶君. 掌叶半夏总蛋白的提取、化学分析和对小鼠S₁₈₀瘤株的抑制作用[J]. 上海医科大学学报, 1992, 19(1): 17-20.
- [9] 徐长福, 王冰, 罗琦, 等. 多抗乙素与阿霉素、5-氟尿嘧啶联用对小鼠S₁₈₀肉瘤的抑制作用[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(10): 786-787.
- [10] 郑建仙. 功能性食品(第三卷)[M]. 中国轻工业出版社, 1999, 83-131.
- [11] 杨廷彬, 王殷福. 免疫学及免疫学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 33-43.
- [12] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 人民军医出版社, 2000, 151-190.
- [13] 雷林生, 孙莉莎, 杨淑琴. 有限稀释微量溶血法测定小鼠血清溶血素的活性[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(3): 274-276.



营养强化面粉标准将出台

从刚刚闭幕的中国国际农产品交易会上获悉: 我国的营养强化面粉国家标准的出台, 已经进入了最后倒计时阶段, 预计将在今年年底开始向全国推行 -- 营养强化面粉将逐步走进老百姓的生活。这将成为继加碘食盐、铁强化酱油之后, 在全国推行的又一个强化食品。

营养强化面粉是指根据国家相关标准, 在生产过程中添加维生素B₁、维生素B₂、尼克酸、叶酸、铁、钙和锌等7种营养素, 并推荐添加维生素A的面粉。即所谓“7+1”营养强化面粉添加配方。到2008年, 有关标准将作为强制性标准向全国推行, 所有面粉生产企业都将加入到营养强化面粉生产行列中。