

人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫功能的影响

杨正丽, 刘君丽, 钱科蕾, 刘 玺, 杨 隽, 洪新宇*
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要: 目的: 研究人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫功能的影响。方法: 72 只雄性SPF级C57BL/6J小鼠随机分成空白组、模型组、人参果汁浓缩液(83、166、249、332 mg/kg m_b)组, 每组12只。模型组和人参果汁浓缩液各剂量组自第1天开始, 每日腹腔注射40 mg/kg m_b 环磷酰胺, 连续10 d, 空白组腹腔注射等量的磷酸盐缓冲液; 同时自第1天开始, 人参果汁浓缩液各剂量组每日给予小鼠灌胃20 mL/kg m_b 不同剂量人参果汁浓缩液, 空白组和模型组灌胃等量的蒸馏水, 连续15 d后测定小鼠体质量、脾脏和胸腺质量、白细胞数量、淋巴细胞亚群数量、细胞因子表达水平以及免疫细胞核转录因子表达水平。结果: 人参果汁浓缩液可改善免疫低下小鼠的脾脏质量/指数, 提高免疫低下小鼠外周血细胞数量和免疫器官中淋巴细胞亚群数量, 促进免疫低下小鼠细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-2、IL-4和IL-17的表达和抑制负调控因子转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的表达, 以及部分恢复免疫细胞核转录因子T细胞中T-box (T-box expressed in T cells, *T-bet*)和叉头样转录因子3(forkhead box protein 3, *Foxp3*) mRNA的表达($P < 0.05$); 其中, 以249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液效果最为显著; 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠体质量和胸腺质量的恢复无明显效果。结论: 人参果汁浓缩液可以增强免疫低下小鼠的免疫功能。

关键词: 人参果; 皂苷; 环磷酰胺; 淋巴细胞; 免疫功能

Effects of *Panax ginseng* Fruit Juice Concentrate on Immune Function in Immunocompromised Mice

YANG Zhengli, LIU Junli, QIAN Kelei, LIU Xi, YANG Jun, HONG Xinyu*
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective: To explore the effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on immune function in immunocompromised mice. Methods: Totally 72 specific pathogen-free (SPF) C57BL/6J male mice were randomly divided into six groups ($n = 12$): blank, model, and low-, medium- and high-dose *Panax ginseng* fruit juice concentrate (83, 166, 249 and 332 mg/kg m_b). The model and *Panax ginseng* fruit juice concentrate groups were injected intraperitoneally with 40 mg/kg m_b cyclophosphamide on a daily basis for 10 days while the blank group was intraperitoneally injected with the same amount of phosphate buffered saline (PBS). Afterwards, the mice in the *Panax ginseng* fruit juice concentrate groups were intragastrically administrated with different dosage of *Panax ginseng* fruit juice concentrate at a volume of 20 mL/kg m_b , and those in the blank and model groups were gavaged with the same volume of distilled water for 15 days. Then, body, spleen and thymus mass, white blood cell count, the number of lymphocyte subsets, cytokine expression levels, and nuclear transcription factor expression levels in immune cells were measured. Results: *Panax ginseng* fruit juice concentrate could improve the spleen mass/index (spleen/body mass ratio) in immunocompromised mice, increase the number of peripheral blood cells and the number of lymphocytes in immune organs, promote the expression of cytokines interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-17, inhibit the expression of transforming growth factor (TGF)- β in immunocompromised mice and partially restore the RNA expression of T-box expressed in T cells (*T-bet*) and forkhead box protein 3 (*Foxp3*) ($P < 0.05$), and the effect of *Panax ginseng* fruit juice concentrate at a dose of 249 mg/kg m_b was the most significant. However, *Panax ginseng* fruit juice concentrate had no significant effect on restoring the body mass or thymus mass of immunocompromised mice. Conclusion: *Panax ginseng* fruit juice concentrate can enhance immune function in immunocompromised mice.

Keywords: *Panax ginseng* fruit; saponins; cyclophosphamide; lymphocyte; immune function

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220115-143

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)01-0175-07

收稿日期: 2022-01-15

第一作者简介: 杨正丽(1993—)(ORCID: 0000-0002-3906-8112), 女, 医师, 硕士, 研究方向为卫生毒理学。

E-mail: yangzhengli@scdc.sh.cn

*通信作者简介: 洪新宇(1978—)(ORCID: 0000-0002-1298-1585), 女, 主任医师, 博士, 研究方向为卫生毒理学。

E-mail: hongxinyu@scdc.sh.cn

引文格式:

杨正丽, 刘君丽, 钱科蕾, 等. 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(1): 175-181.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220115-143. <http://www.spkx.net.cn>

YANG Zhengli, LIU Junli, QIAN Kelei, et al. Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on immune function in immunocompromised mice[J]. Food Science, 2023, 44(1): 175-181. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220115-143. <http://www.spkx.net.cn>

人参果是五加科植物人参的成熟果实。与人参其他部位如根和根茎等悠久的药用历史比较, 人参果的开发与应用相对较少; 随着科学技术的发展, 有研究发现, 人参果具有与人参其他部位相似的成分和药理功效^[1]。Yahara等^[2]研究了人参不同部位人参皂苷的含量, 发现人参根、茎、叶、花和果均含有人参皂苷Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re和Rg1, 其中在人参果中Re含量最高。从人参果中提取的人参果皂苷具有舒张血管、抗氧化和抗炎功效, 因此被广泛用于治疗中风、阿尔茨海默病、帕金森病、高血压、高胆固醇血症和心肌缺血等疾病^[3-4]。Liu Meiyang等^[5]研究发现人参果皂苷通过调节大脑皮层5-羟色胺水平发挥抗抑郁作用。上述研究均提示人参果具有潜在的药用功效。

皂苷、黄酮类化合物、萜类化合物和木脂素等植物化学物可调节机体免疫功能^[6]。姚月梅等^[7]研究发现, 人参果汁可提高小鼠吞噬细胞吞噬功能和细胞免疫功能, 提示人参果可增强小鼠的固有免疫系统和适应性免疫系统功能。然而, 关于人参果的免疫调节功能目前研究仍较少。本研究拟通过分析人参果汁浓缩液对环磷酰胺诱导的免疫低下小鼠体质量、免疫器官质量、外周血白细胞数量、淋巴细胞亚群数量、血清细胞因子水平和免疫细胞核转录因子表达的影响, 探讨其免疫调节功能, 以期为人参果汁浓缩液的药理功效和进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 动物、材料与试剂

健康SPF级雄性C57BL/6J小鼠, 6~8周, 体质量18~22 g, 由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(浙)2020-0002。动物饲养于屏障环境中, 温度23~26℃、相对湿度50%~60%, 照明模拟自然光照, 12 h/12 h明暗更替。实验期间小鼠自由饮水与进食。动物实验通过上海市疾病预防控制中心实验动物伦理审查委员会批准。

五加科植物人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.)鲜果产自吉林抚松; 环磷酰胺 美国Sigma公司; STROMATOLYSER-4DL白细胞分类溶血剂 日本Sysmex公司; 小牛血清 美国Gibco公司; 抗小鼠抗体

(CD16/32、CD3、CD4、CD8a和CD19) 美国Biologend公司; 小鼠转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 、白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-17A、IL-2试剂盒 上海酶联生物科技有限公司; TRIzol 美国Invitrogen公司; SuperReal荧光定量预混试剂增强版 天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 仪器与设备

XT-2000i动物血液细胞分析仪 日本Sysmex公司; Spark全波长多功能酶标仪 瑞士Tecan公司; CytoFlex流式细胞仪 美国Thermo公司; 5910R 4℃平板离心机 德国Eppendorf公司; 荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 人参果汁浓缩液制备

人参果经压榨、过滤、浓缩等工艺制成人参果汁浓缩液, 每100 g鲜人参果经浓缩得到2 g人参果汁浓缩液。

1.3.2 小鼠分组及其处理

将72只C57BL/6J雄性小鼠分成6组: 空白组(蒸馏水)、模型组(40 mg/kg m_b 环磷酰胺+蒸馏水)、83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组(40 mg/kg m_b 环磷酰胺)、166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组(40 mg/kg m_b 环磷酰胺)、249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组(40 mg/kg m_b 环磷酰胺)和332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组(40 mg/kg m_b 环磷酰胺)(依次相当于人体推荐剂量的10、20、30倍和40倍), 每组12只小鼠。模型组和人参果汁浓缩液各剂量组自第1天开始, 每日腹腔注射40 mg/kg m_b 环磷酰胺, 连续10 d, 以建立免疫低下小鼠模型, 空白组腹腔注射等量的pH为7.4的1 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。同时自第1天开始, 人参果汁浓缩液各剂量组每天灌胃人参果汁浓缩液1次, 灌胃剂量为20 mL/kg m_b , 空白组和模型组灌胃等量的蒸馏水, 连续15 d。第16天称取小鼠体质量并取材, 计算和检测各组小鼠的免疫器官脏器指数、外周血白细胞(white blood cell, WBC)数量、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)亚群数量、血清细胞因子水平和免疫细胞核转录因子表达。

1.3.3 免疫器官脏器指数测定

各组小鼠摘眼球取血后断颈处死, 称量分离的脾脏和胸腺质量。脏器指数按式(1)计算。

$$\text{脏器指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{脏器质量}/\text{mg}}{\text{小鼠处死前体质量}/\text{g}} \quad (1)$$

1.3.4 小鼠外周血液学指标测定

小鼠摘眼球取血后,取适量全血于EDTA-K2抗凝管中,充分混匀,用动物血液细胞分析仪测定WBC、LYM数量和LYM比例(LYM与WBC之比)。

1.3.5 小鼠免疫细胞分型测定

分离小鼠胸腺与脾脏,经研磨过滤,移至离心管中,493×g离心5 min,弃上清液,其中胸腺加入1 mL含体积分数5%小牛血清的PBS,制备成单细胞悬液备用;脾脏中加入1 mL红细胞裂解液混匀,室温静置340 s,加入10 mL含5%小牛血清的PBS终止裂解,493×g离心5 min,弃上清液,加入4 mL含5%小牛血清的PBS,制备成单细胞悬液备用。胸腺和脾脏细胞悬液以每孔200 μL铺于96孔板中,于4℃平板离心机中493×g离心5 min,弃上清液,每孔加入50 μL抗小鼠CD16/32抗体,冰上孵育20 min;于4℃平板离心机中493×g离心5 min,弃上清液后,胸腺细胞中加入50 μL含有抗小鼠CD3、CD4和CD8a的抗体混合液,脾脏细胞中加入50 μL含有抗小鼠CD3、CD4、CD8a和CD19的抗体混合液,避光于冰上孵育30 min,于4℃平板离心机493×g离心5 min,弃上清液,PBS洗涤一遍后,493×g离心5 min,弃上清液,每孔加入200 μL体积分数1%多聚甲醛溶液固定细胞。用流式细胞仪检测T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞和B细胞数量占比。

1.3.6 小鼠血清中细胞因子水平测定

小鼠摘眼球取血,12 000 r/min离心10 min,制备血清,取适量血清按照试剂盒说明书测定IL-4、IL-17A、IL-2、TGF-β质量浓度。

1.3.7 免疫细胞核转录因子表达测定

按照TRIzol说明书提取小鼠脾脏细胞RNA,经逆转录试剂盒合成cDNA,取逆转录产物进行实时荧光定量PCR扩增。引物序列见表1。采用式(2)计算基因相对表达量。

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}]} \quad (2)$$

表1 扩增基因引物序列

Table 1 Primer sequences used for amplification of genes

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
GAPDH	CTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC	GCAGGGATGATGTTCTGGGCAG
Gata3	CTCGGCCATTCGTACATGGAA	GGATACCTCTGCACCCGTAGC
Foxp3	CCCATCCCCAGGAGTCTTG	ACCATGACTAGGGGCACTGTA
T-bet	CAACAACCCCTTTGCCAAAG	TCCCCAAGCAGTTGACAGT
RoRyt	TACCTTGGCCAAAACAGAGG	ATGCCGTGGTTCTCAAAA

1.4 数据统计与分析

采用SPSS 25.0软件进行数据统计学分析,数据用平均值±标准差表示。采用单因素方差分析比较组间差异;方差齐时,两两比较采用最小显著差异法-t分析;方差不齐时,两两比较则采用Dunnnett-t检验。数据不满足

方差分析条件时,采用非参数检验。以P<0.05为有统计学差异的判断标准。

2 结果与分析

2.1 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠体质量的影响

如表2所示,各组间小鼠初始体质量差异不显著(P>0.05)。与空白组比较,模型组小鼠终末体质量极显著降低(P<0.01);人参果汁浓缩液各剂量组小鼠终末体质量与模型组比较差异不显著(P>0.05);人参果汁浓缩液各剂量组间终末体质量差异不显著(P>0.05)。上述结果表明环磷酰胺可降低小鼠体质量,本研究中人参果汁浓缩液并不能恢复环磷酰胺引起的小鼠体质量降低。

表2 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠体质量的影响

Table 2 Effects of Panax ginseng fruit juice concentrate on body mass in immunocompromised mice

组别	初始体质量/g	终末体质量/g
空白组	21.75±1.29	23.50±1.62
模型组	21.75±0.97	20.83±1.11**
83 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	21.67±1.07	20.58±1.51**
166 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	21.75±1.06	21.33±0.78**
249 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	21.75±1.06	20.83±1.40**
332 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	21.83±1.11	20.67±1.56**

注:与空白组比较,**差异极显著(P<0.01)。下同。

2.2 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫器官的影响

如表3所示,与空白组比较,模型组小鼠脾脏质量和脾脏指数极显著升高(P<0.01);与模型组比较,249 mg/kg m₀人参果汁浓缩液组小鼠脾脏质量和脾脏指数显著降低(P<0.05)。与空白组比较,模型组小鼠胸腺质量极显著降低(P<0.01);人参果汁浓缩液各剂量组小鼠胸腺质量与模型组比较差异并不显著(P>0.05)。各组小鼠胸腺指数无显著差异(P>0.05)。上述结果表明环磷酰胺可损伤小鼠的免疫器官,人参果汁浓缩液可减轻环磷酰胺对脾脏的损伤,但对环磷酰胺引起的胸腺损伤并无恢复作用。

表3 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫器官的影响

Table 3 Effects of Panax ginseng fruit juice concentrate on immune organ indices in immunocompromised mice

组别	脾脏质量/mg	脾脏指数/(mg/g)	胸腺质量/mg	胸腺指数/(mg/g)
空白组	63.50±13.16	2.60±0.22	41.50±6.22	1.87±0.37
模型组	159.33±58.38**	7.85±2.96**	26.83±12.51**	1.30±0.54
83 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	127.33±64.30**	6.93±3.17**	24.50±8.53**	1.36±0.48
166 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	119.33±33.85*	6.22±1.35**	23.00±2.37**	1.22±0.10
249 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	101.50±21.51 [#]	4.95±0.96 [#]	26.50±8.31**	1.29±0.39
332 mg/kg m ₀ 人参果汁浓缩液组	119.33±14.60*	6.44±0.57**	22.67±8.78**	1.22±0.45

注:与空白组比较,*差异显著(P<0.05);与模型组比较,#差异显著(P<0.05)。下同。

2.3 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠血液学指标的影响

如表4所示,与空白组比较,模型组WBC数量降低($P>0.05$);与模型组比较,83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组小鼠WBC数量显著升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组LYM比例极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组小鼠LYM比例显著升高($P<0.05$)。上述结果表明人参果汁浓缩液对环磷酰胺引起的外周血免疫细胞失衡有一定的缓解作用。

表4 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠血液学指标的影响
Table 4 Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on hematological indicators in immunocompromised mice

组别	WBC数量/ (10^3 个/ μ L)	LYM数量/ (10^3 个/ μ L)	LYM比例/%
空白组	4.42±0.89	3.27±0.52	74.82±7.38
模型组	3.21±0.81	0.82±0.30**	21.08±10.93**
83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	5.66±2.49 [†]	0.58±0.37**	13.10±10.96**
166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	3.89±2.49	0.70±0.48**	18.02±6.02**
249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	2.85±1.18	0.95±0.37**	33.68±3.66** [†]
332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	2.15±1.21*	0.47±0.25**	23.13±7.37**

2.4 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠脾脏和胸腺中淋巴细胞的影响

如表5所示,与空白组比较,模型组小鼠胸腺中CD4⁺T细胞占比和CD8⁺T细胞占比极显著降低($P<0.05$);249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组小鼠胸腺中CD4⁺T细胞占比显著高于模型组($P<0.05$),接近空白组水平;249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组小鼠胸腺中CD8⁺T细胞占比显著高于模型组($P<0.05$)。上述结果表明人参果汁浓缩液在一定剂量下可以恢复免疫低下小鼠胸腺淋巴细胞的数量。

表5 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠胸腺淋巴细胞的影响
Table 5 Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on percentages of thymic lymphocytes in immunocompromised mice

组别	CD4 ⁺ T细胞占比/%	CD8 ⁺ T细胞占比/%
空白组	6.80±0.53	1.71±0.18
模型组	3.31±1.19**	0.54±0.23**
83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	3.76±2.26**	0.74±0.15**
166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	4.23±0.42**	0.65±0.04**
249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	5.25±0.78 [†]	0.98±0.13** [†]
332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	3.23±0.47**	0.85±0.53**

如表6所示,与空白组比较,模型组小鼠脾脏中T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞比例极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,人参果汁浓缩液各剂量组小鼠脾脏中T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞比例均升高,其中249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组与模型组比较差异显著($P<0.05$)。与空白组比较,模型组小鼠脾脏中B细胞比例极显著降低($P<0.01$);与模型组比较,

83、166 mg/kg m_b 和249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组小鼠脾脏中B细胞比例均升高,其中249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组B细胞比例极显著升高($P<0.01$)。上述结果表明249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组对恢复免疫低下小鼠脾脏中淋巴细胞有较好的效果。

表6 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠脾脏淋巴细胞的影响
Table 6 Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on percentages of splenic lymphocytes in immunocompromised mice

组别	T细胞占比/%	CD4 ⁺ T细胞占比/%	CD8 ⁺ T细胞占比/%	B细胞占比/%
空白组	29.60±3.13	14.79±1.76	6.15±0.63	58.93±1.76
模型组	7.94±3.02**	0.59±0.23**	0.33±0.21**	2.52±1.91**
83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	10.53±5.45**	1.23±0.66**	0.59±0.52**	2.55±1.32**
166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	9.71±2.23**	1.07±0.40**	0.56±0.29**	3.86±2.10**
249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	12.64±2.08** [†]	1.78±1.15** [†]	0.91±0.62** [†]	6.96±2.88** [†]
332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	8.04±1.56**	0.86±0.37**	0.38±0.19**	2.28±0.65**

注:与模型组比较,##,差异极显著($P<0.01$)。下同。

2.5 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠血清中细胞因子水平的影响

如表7所示,模型组与空白组IL-2、IL-4、IL-17A和TGF- β 质量浓度均差异不显著($P>0.05$)。与空白组比较,166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-2质量浓度显著降低($P<0.05$),而332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-2质量浓度显著升高($P<0.05$);与模型组比较,166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-2质量浓度极显著降低($P<0.01$)。与空白组比较,249、332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-4质量浓度显著或极显著升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$);与模型组比较,166、249 mg/kg m_b 和332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-4质量浓度显著或极显著升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。与空白组和模型组比较,332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组IL-17A质量浓度均极显著升高($P<0.01$)。与空白组和模型组比较,332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组TGF- β 质量浓度显著或极显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。上述结果表明332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液对改善免疫低下小鼠免疫活性分子水平效果较好。

表7 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠血清中细胞因子的影响
Table 7 Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on serum cytokine levels in immunocompromised mice

组别	IL-2质量浓度/ (pg/mL)	IL-4质量浓度/ (pg/mL)	IL-17A质量 浓度/(pg/mL)	TGF- β 质量浓度/ (pg/mL)
空白组	242.40±8.43	163.26±9.87	32.49±2.29	128.36±23.22
模型组	245.52±8.45	156.74±11.19	32.97±2.12	135.53±26.11
83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	238.82±17.32	159.23±7.37	33.89±2.06	137.04±28.77
166 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	227.89±6.12** [†]	168.94±5.96 [†]	34.41±1.32	118.35±15.80
249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	239.04±9.93	175.64±10.92** [†]	35.02±1.63	112.19±23.19
332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组	257.16±10.48*	199.64±9.72** [†]	39.71±3.51** [†]	97.27±19.20** [†]

2.6 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠脾脏中免疫细胞核转录因子mRNA相对表达量的影响

如图1所示,与空白组比较,模型组 *T-bet*、*Gata3*、*RoRyt*、*Foxp3* mRNA相对表达量均极显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组 *T-bet* mRNA相对表达量极显著升高 ($P < 0.01$),332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组 *Foxp3* mRNA相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明人参果汁浓缩液可使免疫低下小鼠部分免疫细胞核转录因子表达水平得以改善。

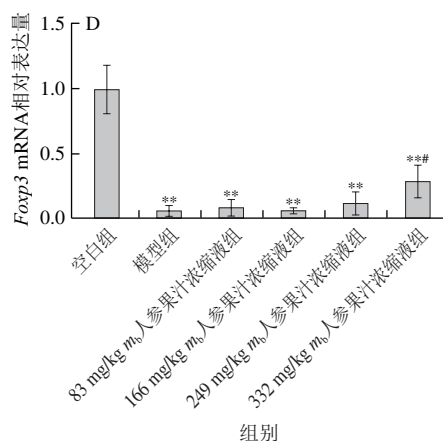
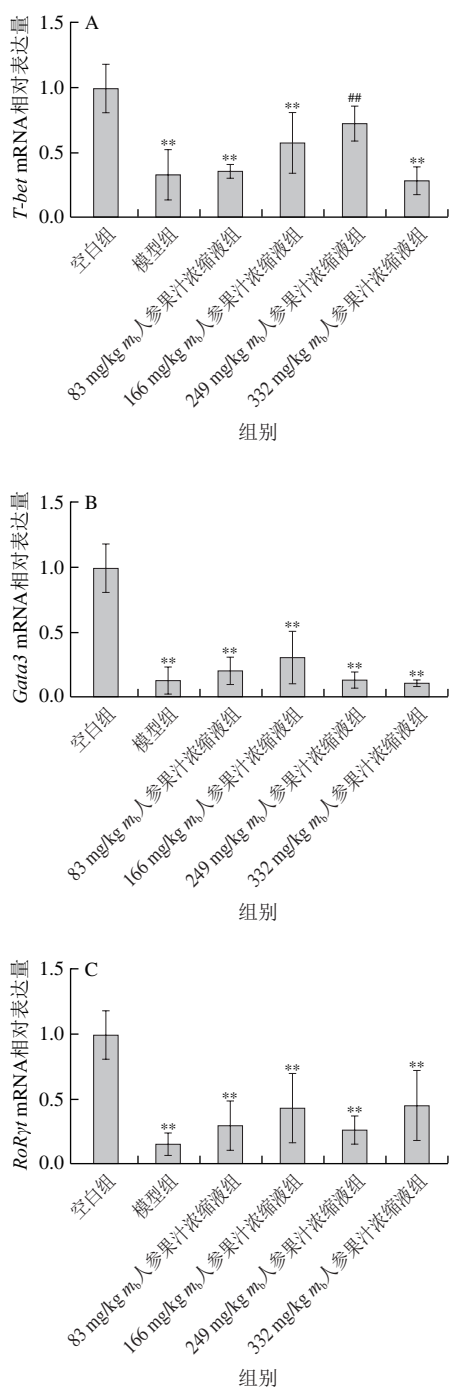


图1 人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠脾脏中免疫细胞核转录因子mRNA相对表达水平的影响

Fig. 1 Effects of *Panax ginseng* fruit juice concentrate on relative mRNA expression levels of nuclear transcription factors in spleen of immunocompromised mice

3 讨论

环磷酰胺是一种烷化剂,已经被广泛用作于化疗药物,可产生免疫抑制、骨髓抑制、白细胞减少症和氧化应激等多种不良反应^[8-11]。本研究参照高敏等^[12]的研究,给予小鼠连续10 d腹腔注射40 mg/kg m_b 环磷酰胺,以建立免疫低下小鼠模型。本研究结果显示,环磷酰胺降低了小鼠体质量、免疫器官质量和外周血免疫细胞数量,这与Qi Qiuchen等^[13]报道的环磷酰胺能够引起小鼠体质量降低、免疫器官受损和外周血细胞失衡结果一致,提示小鼠免疫低下模型建立成功。

本研究结果显示,人参果汁浓缩液干预组小鼠终末体质量与模型组比较无显著变化且均低于空白组 ($P > 0.05$),一方面提示环磷酰胺明显的毒性作用使得体质量恢复过程缓慢;另一方面提示在该研究方案中人参果汁浓缩液改善免疫低下小鼠体质量的能力可能较弱或者欠缺。

脾脏与胸腺是机体重要的免疫器官,胸腺是T细胞分化与成熟的重要场所,脾脏含有多种免疫细胞,参与多项免疫应答^[14]。脾脏质量与胸腺质量在一定程度上可以反映机体的免疫功能^[15]。在本研究中,模型组脾脏质量与脾脏指数均极显著高于空白组 ($P < 0.01$),这与前期造模时出现的环磷酰胺引起脾脏质量与脾脏指数降低表现不一,表明脾脏随时间延长出现了代偿性变化,提示脾脏可能存在水肿和增生^[16];与模型组比较,人参果汁浓缩液干预组脾脏质量和脾脏指数均呈现降低趋势,其中249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组脾脏质量和脾脏指数显著

低于模型组 ($P < 0.05$)；上述研究结果提示人参果汁浓缩液对环磷酰胺引起的小鼠脾脏损害有缓解作用。模型组与人参果汁浓缩液干预组胸腺质量均极显著低于空白组 ($P < 0.01$)，提示在本研究方案中人参果汁浓缩液对环磷酰胺引起的小鼠胸腺损伤无改善作用。

外周血WBC是免疫系统重要组成成分，通过与体内其他系统协同工作，以定位和杀死入侵的病原体等^[17]。因此，若WBC数量降低，机体感染的风险则会增加，故WBC的数量可反映机体免疫功能情况。在本研究中，模型组WBC数量与空白组比较呈现下降趋势；83 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组白细胞数增加，提示人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠WBC数量有一定的改善作用。外周血LYM数量可反映机体免疫状态^[18]。与模型组比较，249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液LYM数量和比例升高，提示人参果汁浓缩液可以改善环磷酰胺引起的小鼠外周血LYM的失衡。

LYM分布于人体不同的器官中，如中枢淋巴器官（骨髓和胸腺）和外周淋巴器官（脾脏和淋巴结等）等^[18]。胸腺是T细胞免疫功能发育的初始部位，对T细胞发育和成熟至关重要^[19-21]。本研究探讨了胸腺和脾脏中主要免疫细胞的变化。结果发现，模型组胸腺中CD4⁺T细胞比例和CD8⁺T细胞比例均极显著低于空白组 ($P < 0.01$)，提示环磷酰胺对胸腺免疫细胞的损害作用。经人参果汁浓缩液干预后，CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞不同程度地恢复，其中249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组CD4⁺T细胞恢复至与空白组相当水平，提示人参果汁浓缩液可恢复免疫低下小鼠胸腺中免疫细胞的水平。脾脏在免疫防御过程中发挥重要作用^[22]。脾脏中免疫细胞数量在一定程度上反映出机体免疫状态。本研究中模型组脾脏T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞比例和B细胞比例均极显著低于空白组 ($P < 0.01$)；人参果汁浓缩液干预后，仅249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液组呈现出改善作用，提示此剂量对恢复脾脏中免疫细胞数量具有良好的效果。

细胞因子是免疫反应的重要介质^[23-24]。本研究探讨了IL-2、IL-4、IL-17A质量浓度和TGF- β 质量浓度的变化，结果发现，在该免疫抑制模型中，环磷酰胺对上述细胞因子的水平无明显影响；但经人参果汁浓缩液干预后，细胞因子的水平均呈现出变化。IL-2在早期T淋巴细胞克隆扩增和分化中起重要作用^[25-26]；人参果汁浓缩液对的IL-2影响呈现出双向性；在人参果汁浓缩液剂量相对较高水平下，可促进IL-2生成，提示人参果汁浓缩液在一定剂量水平下可能会促进T细胞增殖^[27]。IL-4可促进促炎性巨噬细胞向抑炎性巨噬细胞转变^[28]；IL-4质量浓度随人参果汁浓缩液剂量升高而升高，提示人参果汁浓缩液可能具有一定的抑制炎症功效。IL-17是组织信号细胞因子，有利于保护皮肤、肺和胃肠道等

屏障器官^[29]；人参果汁浓缩液可促使IL-17的生成，提示其对屏障器官可能有一定的保护作用。TGF- β 是负向调控因子，可抑制免疫应答^[30]；模型组TGF- β 质量浓度较空白组呈升高趋势；人参果汁浓缩液干预后，随其剂量升高TGF- β 质量浓度降低，提示人参果汁浓缩液可能对免疫抑制作用具有缓解功效。

T-bet、Gata3、RoR γ t和Foxp3分别为辅助性T细胞（helper T cell, Th）1、Th2、Th17和调节性T细胞（regulatory cells, Treg）特异性核转录因子，可调控Th细胞分化，而不同的Th细胞群具有不同的免疫功能^[23]。模型组T-bet、Gata3、RoR γ t、Foxp3 mRNA相对表达量均极显著低于空白组 ($P < 0.01$)，提示环磷酰胺对Th1、Th2、Th17和Treg特异性核转录因子均抑制作用。人参果汁浓缩液干预后，上述基因水平不同程度地恢复，其中249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液可使T-bet mRNA相对表达量水平恢复至与空白组相当水平；332 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液使Foxp3 mRNA相对表达量显著高于模型组 ($P < 0.05$)。上述研究结果提示人参果汁浓缩液可改善免疫低下小鼠的免疫细胞特异性核转录因子表达。

本实验通过使用环磷酰胺建立免疫低下小鼠模型，研究人参果汁浓缩液是否可以改善免疫低下小鼠的免疫功能，结果发现人参果汁浓缩液可以减轻环磷酰胺对脾脏的损伤、增加外周血及免疫器官中免疫细胞的数量、升高血清中IL-2、IL-4、IL-17A细胞因子的水平和抑制负调控因子TGF- β 的表达以及部分恢复免疫细胞中核转录因子水平，提示人参果汁浓缩液对免疫低下小鼠免疫器官、免疫细胞以及免疫活性分子等均有改善作用，其中以249 mg/kg m_b 人参果汁浓缩液效果最为显著，未存在明显的剂量效应关系，不同剂量的人参果汁浓缩液可改善免疫低下小鼠不同的免疫指标，表明人参果汁浓缩液在一定剂量水平下可以增强免疫低下小鼠的免疫功能。本研究初步探讨出人参果汁浓缩液可以改善免疫功能，但关于其通过何种机制来调控免疫功能需要在后续的研究中进一步探索。

参考文献：

- [1] ZHAO H F, XU F F, GUO Y T, et al. Identification of a *Panax ginseng* fruit fingerprint by HPLC-ESI-MS[J]. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(1): 15017235. DOI:10.4238/gmr.15017235.
- [2] YAHARA S, TANAKA O. Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* c.a. meyer[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1979, 27(1): 88-92. DOI:10.1248/cpb.27.88.
- [3] KIM H J, KIM P, SHIN C Y. A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system[J]. Journal of Ginseng Research, 2013, 37(1): 8-29. DOI:10.5142/jgr.2013.37.8.
- [4] LEE C H, KIM J H. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases[J]. Journal of Ginseng

- Research, 2014, 38(3): 161-166. DOI:10.1016/j.jgr.2014.03.001.
- [5] LIU Meiyan, LIU Jianyang, ZHANG Lijun, et al. Antidepressant-like effects of ginseng fruit saponin in myocardial infarction mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 115: 108900. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108900.
- [6] AGHADAVOD E, KHODADADI S, BARADARAN A, et al. Role of oxidative stress and inflammatory factors in diabetic kidney disease[J]. Iranian Journal of Kidney Diseases, 2016, 10(6): 337-343.
- [7] 姚月梅, 张英艳, 陈国静, 等. 人参果汁对小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药学报, 2002, 30(4): 14-15. DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.2002.04.010.
- [8] ELAZAB M, YOUNES A M, GAAFAR A Y, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(16): 20784-20793. DOI:10.1007/s11356-020-11893-8.
- [9] DENG Jie, ZHONG Yifei, WU Yanping, et al. Carnosine attenuates cyclophosphamide-induced bone marrow suppression by reducing oxidative DNA damage[J]. Redox Biology, 2018, 14: 1-6. DOI:10.1016/j.redox.2017.08.003.
- [10] SUN Chenghong, YANG Jian, PAN Lihong, et al. Improvement of icaritin on hematopoietic function in cyclophosphamide-induced myelosuppression mice[J]. Immunopharmacology Immunotoxicology, 2018, 40(1): 25-34. DOI:10.1080/08923973.2017.1392564.
- [11] MANENTE F A, QUINELLO C, FERREIRA L S, et al. Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model[J]. Medical Mycology, 2018, 56(6): 711-722. DOI:10.1093/mmy/myx098.
- [12] 高敏, 侯衍豹, 杨勇, 等. 不同条件环磷酰胺建立小鼠免疫力低下模型的比较及偏最小二乘法(PLS)数学建模分析[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 62-69. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.012.
- [13] QI Qiuchen, DONG Zhonghua, SUN Yueyue, et al. Protective effect of bergenin against cyclophosphamide-induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2668. DOI:10.3390/molecules23102668.
- [14] 杨迪, 李丽杰, 张曾亮, 等. 南极磷虾油灵芝孢子油纳米乳复合物提高小鼠的免疫功能[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 14-21; 50. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.003.
- [15] 贾执瑛, 谢雯, 王晓艳, 等. 人参主要成分对大鼠免疫功能的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3363-3366. DOI:10.4268/cjcmm20141731.
- [16] 李睿珺, 秦勇, 周雅琳, 等. 鹰嘴豆肽对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 133-139. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191102-016.
- [17] CARRICK J B, BEGG A P. Peripheral blood leukocyte[J]. Veterinary Clinics of North America Equine Practice, 2008, 24(2): 239-259. DOI:10.1016/j.cveq.2008.05.003.
- [18] BLUM K S, PABST R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs?[J]. Immunology Letters, 2007, 108(1): 45-51. DOI:10.1016/j.imlet.2006.10.009.
- [19] MAJUMDAR S, NANDI D. Thymic atrophy: experimental studies and therapeutic interventions[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2018, 87(1): 4-14. DOI:10.1111/sji.12618.
- [20] GODFREY D I, KENNEDY J, SUDA T, et al. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression[J]. Journal of Immunology, 1993, 150(10): 4244-4252.
- [21] SOLANKI A, YANEZ D C, ROSS S, et al. Gli3 in fetal thymic epithelial cells promotes thymocyte positive selection and differentiation by repression of Shh[J]. Development, 2018, 145(3): dev146910. DOI:10.1242/dev.146910.
- [22] KRUEZMANN S, ROSADO M M, WEBER H, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen[J]. Journal of Experimental Medicine, 2003, 197(7): 939-945. DOI:10.1084/jem.20022020.
- [23] ZHU Jinfang. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity[J]. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2018, 10(10): a030338. DOI:10.1101/cshperspect.a030338.
- [24] DONG Chen. Cytokine regulation and function in T cells[J]. Annual Review of Immunology, 2021, 39: 51-76. DOI:10.1146/annurev-immunol-061020-053702.
- [25] VINH L B, PARK J U, DUY L X, et al. Ginsenosides from Korean red ginseng modulates T cell function via the regulation of NF-AT-mediated IL-2 production[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(1): 237-242. DOI:10.1007/s10068-018-0428-8.
- [26] BOYMAN O, SPRENT J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system[J]. Nature Review Immunology, 2012, 12(3): 180-190. DOI:10.1038/nri3156.
- [27] PARK J U, KANG B Y, KIM Y R. Ethyl acetate fraction from *Dendropanax moribifera* leaves increases T cell growth by upregulating NF-AT-mediated IL-2 secretion[J]. The American Journal Chinese Medicine, 2018, 46(2): 453-467. DOI:10.1142/S0192415X18500234.
- [28] HE Yang, GAO Yang, ZHANG Qiang, et al. IL-4 switches microglia/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neurological damage by modulating the JAK1/STAT6 pathway following ICH[J]. Neuroscience, 2020, 437: 161-171. DOI:10.1016/j.neuroscience.2020.03.008.
- [29] EYERICH K, DIMARTINO V, CAVANI A. IL-17 and IL-22 in immunity: driving protection and pathology[J]. European Journal of Immunology, 2017, 47(4): 607-614. DOI:10.1002/eji.201646723.
- [30] 陈煜璐, 钱莉. 调节性B细胞在肿瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(10): 1023-1028.