

沙棘籽原花青素对小鼠免疫功能调节作用的影响

曹少谦, 徐晓云, 潘思轶*
(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 以沙棘为原料, 对沙棘籽中原花青素进行提取精制, 研究了沙棘籽原花青素对小鼠体内免疫调节作用。研究表明, 沙棘籽原花青素能显著提高小鼠(雌, 雄)的碳廓清能力, 增强小鼠T淋巴细胞活性, 促进溶血素的形成。另外与空白组相比, 各剂量组对小鼠(雌, 雄)的脾和胸腺均无明显影响。结果提示: 沙棘籽原花青素能显著提高小鼠免疫力, 同时不会显著影响小鼠的免疫器官。

关键词: 沙棘; 制备; 原花青素; 免疫

Effects of Procyanidins from Sea Buckthorn Seed on the Immunity of Mice

CAO Shao-qian, XU Xiao-yun, PAN Si-yi*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Sea Buckthorn seed was used as raw material, and effects of procyanidins from the Sea Buckthorn seed (SBSPC) on the immunity of mice was studied. It showed that SBSPC could evidently improve the carbon clearance indexes; the activity of T lymphocyte and the form of hemolysin in mice. Compared with control group, spleens and thymus glands of the mice in each dose weren't impacted. The results indicated that SBSPC may contribute to the immune enhancement of mice without negative impact.

Key words: Sea Buckthorn; preparation; procyanidins; immunity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)06-0229-04

现代药理研究表明, 原花青素具有抗氧化、抗肿瘤、抗诱变、抗癌、抗炎、抗溃疡、抗过敏、抗病毒、抗微生物、保护心血管和预防高血压、保护肾功能、调节机体免疫力等生物药理活性, 此外还有皮肤保健及美容、改善视觉、促进毛发生长等作用^[1~6]。国内外对原花青素的提取及活性研究多集中在葡萄、高粱、苹果等原料, 近期有从沙棘中提取原花青素的报道。

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科(*Elaeagnaceae*)酸刺属的灌木或小乔木, 具有上百种营养及生物活性成分。原花青素是其中主要有效成分之一。我国沙棘资源丰富, 品种繁多, 但国内目前对沙棘开发与利用的研究多是关于沙棘中维生素、脂肪酸、蛋白质、氨基酸、黄酮等营养成份, 开发的药品如沙棘油和沙棘黄酮等, 对沙棘中原花青素的活性研究很少, 对沙棘中原花青素的利用尚属空白。

本文对沙棘籽中的原花青素进行提取、分离纯化, 通过研究其对小鼠碳廓清试验、DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应、血清溶血素、脏器体重比的影响, 旨在探讨沙棘籽原花青素对小鼠免疫调节作用, 为沙棘的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试样品

沙棘, 西北农林科技大学植保站提供, 取籽干燥, 粉碎。

1.1.2 主要试剂及仪器

DNFB AR, 中国医药集团上海试剂公司; 高铁氰化钾 AR, 北京益利精细化学品有限公司; 752 紫

收稿日期: 2004-11-30

* 通讯作者

基金项目: 中加合作项目; 加拿大 MRAC(Medical Research Advisory Committee)项目(2002MRAC109)

作者简介: 曹少谦(1980-), 女, 在读硕士, 研究方向为农产品加工化学。

外光栅分光光度计 上海分析仪器厂; TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.1.3 试验动物

清洁级昆明种小鼠, 体重 17~20g, 雌雄各半, 购于湖北省疾控中心实验动物研究中心。

1.2 实验方法

1.2.1 沙棘籽原花青素的提取纯化

采用 60% 乙醇作为提取液, 称取脱脂沙棘籽于大烧杯中, 按料液比 1:10(W/V)混合, 在室温下 45min, 提取 3 次, 合并提取液, 4000r/min 离心 20min, 合并上清液, 45℃减压旋转蒸发至 50ml 左右。将得到的浓缩提取液用大孔吸附树脂初步纯化。经 30%、50%、70% 乙醇分步洗脱得到洗脱液, 再分别旋转蒸发至 50ml 左右, 冷冻干燥, 分别得到 30%、50%、70% 三种粉末样品。

实验分别测定了经过大孔树脂纯化后的 30%、50% 和 70% 乙醇洗脱组分中的原花青素含量, 结果发现 50% 级分中的原花青素含量最高, 达 99.44%。因此, 后续实验均采用该级分的冻干粉。

1.2.2 试验分组

将小鼠随机分为四组, 空白组(蒸馏水代替), 低剂量组(30mg/kgbw), 中剂量组(150mg/kgbw), 高剂量组(300mg/kgbw)。灌胃量为每只每天 0.2ml。

1.2.3 小鼠碳廓清试验^[9~11]

将注射用墨汁原液用生理盐水稀释 5 倍, 小鼠连续灌胃 30d 后再从小鼠的尾静脉向小鼠注入墨汁。注射墨汁后第 2、14min, 分别从小鼠内眦静脉丛取血 20μl, 加到 2ml 的 0.1%(m/V)Na₂CO₃ 溶液中。在 600nm 测 OD 值, 以 Na₂CO₃ 溶液作空白对照。然后将小鼠处死, 取肝脏和脾脏, 吸干脏器表面血污, 称重。把所测出的 OD 值, 肝脏和脾脏重量代入公式, 计算吞噬指数 α。

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$\text{吞噬指数 } \alpha = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times K^{1/3} \quad (2)$$

其中: OD₁ 指注入墨汁 2min 后, 从小鼠内眦静脉丛取血, 在 600nm 波长处测光密度值。OD₂ 指注入墨汁 14min 后, 从小鼠内眦静脉丛取血, 在 600nm 波长处测光密度值。

1.2.4 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应^[7~9]

DNFB 溶液应新鲜配制, 称取 DNFB 50mg, 置清洁干燥小瓶中, 将预先配好的 5ml 丙酮: 麻油(1:1, V/

V) 倒入小瓶, 盖好瓶塞并用胶布密封, 混匀后, 用注射器通过瓶盖取用。将小鼠连续灌胃 30d 后, 再在其腹部皮肤上用硫化钠溶液(8%, m/V)脱毛, 范围约 3cm × 3cm, 用 DNFB 溶液 50μl 均匀涂抹致敏。致敏 5d 后, 用 DNFB 溶液 10μl 均匀涂抹于小鼠右耳两面, 再次致敏。再次致敏 24h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 剪下左右两耳, 用打孔器取下直径 8mm 的耳片称重, 小鼠左右两耳重量之差表示 DTH 的程度。

1.2.5 血清溶血素测定^[9~11]

采集豚鼠血, 分离出血清备用, 使用前将 1ml 积压 SRBC 加入到 5ml 豚鼠血清中, 放入 4℃ 冰箱 30min 以除去非特异性补体参与的溶血, 经 2000r/min 离心 10min 后取上清, 用时以生理盐水 1:10 稀释。小鼠连续灌胃 30d 后, 用已脱纤维的 SRBC 的细胞悬液(约 4 × 10⁸)0.2ml 对小鼠进行免疫。免疫后继续将小鼠灌胃 5d, 然后眼球取血于离心管中, 放置约 1h, 使血清充分析出, 2000r/min 离心 10min, 收集血清。用生理盐水稀释血清, 稀释至 500 倍以上(此时血清中补体可忽略不计), 取 1ml 稀释后的血清置试管内, 依次加入 10%(V/V)SRBC 0.5ml(用生理盐水按 1:10 稀释), 另设不加血清的对照管(以生理盐水代替), 置 37℃ 恒温水浴中保温 15min 后, 冰浴终止反应。2000r/min 离心 10min, 取上清液 1ml 于试管内, 再加入 3ml 都氏试剂, 同时取 10%(V/V)SRBC (约 10⁹ 个)0.25ml 于另一支试管内, 再加入都氏试剂至 4ml 充分混匀, 放置 10min 后, 于 540nm 处以对照管作空白, 分别测定各管光密度值, 算出样品的半数溶血值。

1.2.6 脏器体重比测定^[9~11]

$$\text{样品半数溶血值} = \frac{\text{样品光密度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数} \quad (3)$$

小鼠被连续灌胃 30d 后, 称重, 颈椎脱臼处死, 解剖动物, 取出胸腺和脾, 吸干血迹后称重, 算出体重和胸腺及体重与脾脏之间的比值。

1.2.7 数据处理方法

小鼠碳廓清试验、DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应、血清溶血素测定、脏器体重比测定实验数据分别采用邓肯法分析。

2 结果与分析

2.1 沙棘籽原花青素对小鼠碳廓清能力的影响

小鼠碳廓清试验、DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应、血清溶血素测定、脏器体重比测定实验结果分别如表 1、2、3、4 所示。

由公式(1)、(2)计算吞噬指数 α, 雌雄无太大差异, 雄鼠吞噬指数稍高于雌鼠, 可能与体重有关; 与空白组相比较, 各剂量组的小鼠(雌, 雄)吞噬细胞的吞

噬指数均有提高,且剂量、效应之间呈正相关关系;低、中、高3个剂量组与空白组相比均有显著差异,即沙棘籽原花青素能显著地增强小鼠的碳廓清能力,其中以高剂量(300mg/kgbw)作用最强,但三个剂量组之间没有显著性差异。小鼠吞噬碳颗粒的吞噬细胞主要包括中性粒细胞和巨噬细胞,有非特异性地吞噬异物与消化异物的能力。实验结果表明沙棘籽原花青素能显著提高小鼠的中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬活性,从而增强小鼠的非特异性免疫功能活性。

2.2 沙棘籽原花青素对小鼠迟发型变态反应的影响

用左右两耳重量之差表示迟发变态反应的程度,迟发变态反应程度越强表示小鼠淋巴细胞的活性越强,所以用左右两耳之差可以代表淋巴细胞的功能活性。雌雄小鼠没有太大差异。雌鼠的3个剂量组与空白组相比,各剂量组左右两耳的差值均有提高,剂量与效应呈正相关关系,其中高剂量组差值与空白组相比有显著性差异,即高剂量组能显著增强雌性小鼠T淋巴细胞活性。雄鼠的3个剂量组与其空白组相比,3个剂量组左右两耳的差值均有提高,且有量效关系,其中中剂量组和高剂量组与空白组相比都有显著性差异,但它们两者之间没有显著性差异。该实验结果显示沙棘籽原花青素能增强小鼠的细胞免疫功能。

2.3 沙棘籽原花青素对小鼠半数溶血值的影响

表3 沙棘籽原花青素对小鼠半数溶血值的影响

Table 3 Effects of SBSPC on HC₅₀ of mice

性别 Gender	组别 Group	剂量(mg/kgbw) Dose	HC ₅₀
雌	空白组	0	57.2 ± 16.033 ^A
性	低剂量组	30	84.7 ± 21.940 ^{AB}
小	中剂量组	150	90.6 ± 21.648 ^B
鼠	高剂量组	300	99.4 ± 19.527 ^C
雄	空白组	0	54.3 ± 20.128 ^A
性	低剂量组	30	83.6 ± 19.257 ^B
小	中剂量组	150	88.1 ± 20.346 ^B
鼠	高剂量组	300	97.3 ± 21.075 ^B

由公式(3)计算HC₅₀。雌鼠的半数溶血值比雄鼠稍大。与空白组相比较,各剂量组均能提高小鼠半数溶血值,剂量与效应呈正相关关系,其中以高剂量组作用最强。且中剂量组和高剂量组与空白组相比均有显著性差异。对于雌鼠,其中剂量组和高剂量组也有显著性差异,但对于雄鼠中剂量组和高剂量组之间没有显著性差异。半数溶血值测定结果表明了沙棘籽原花青素能够提高小鼠的体液免疫功能。

2.4 沙棘籽原花青素对小鼠免疫器官的影响

与空白组相比较,各剂量组对小鼠(雌,雄)的脾和胸腺均无明显影响,也就是说沙棘籽原花青素在提高小

表1 沙棘籽原花青素对小鼠碳廓清能力的影响

Table 1 Effects of SBSPC on carbon clearance indexes of mice

性别 Gender	组别 Group	剂量(mg/kgbw) Dose	体重(g) Weight	肝+脾(g) Liver + Spleen	OD ₁	OD ₂	α
雌	空白组	0	30.75 ± 2.31 ^A	1.7641 ± 0.135	0.384 ± 0.079	0.173 ± 0.057	5.347 ± 0.331 ^A
性	低剂量组	30	32.02 ± 2.257	1.8276 ± 0.187	0.379 ± 0.037	0.117 ± 0.029	6.117 ± 0.436 ^B
小	中剂量组	150	30.14 ± 2.416	1.7031 ± 0.149	0.361 ± 0.038	0.106 ± 0.023	6.261 ± 0.217 ^B
鼠	高剂量组	300	30.44 ± 2.360	1.7310 ± 0.201	0.368 ± 0.073	0.088 ± 0.047	6.556 ± 0.352 ^B
雄	空白组	0	43.58 ± 3.120	2.0069 ± 0.139	0.278 ± 0.065	0.169 ± 0.073	5.692 ± 0.521 ^A
性	低剂量组	30	43.35 ± 2.820	1.9775 ± 0.189	0.290 ± 0.038	0.146 ± 0.056	6.396 ± 0.443 ^B
小	中剂量组	150	43.76 ± 2.736	2.0057 ± 0.167	0.292 ± 0.046	0.140 ± 0.063	6.513 ± 0.319 ^B
鼠	高剂量组	300	44.03 ± 2.472	2.0118 ± 0.197	0.303 ± 0.053	0.137 ± 0.078	6.700 ± 0.370 ^B

注:具有相同字母的组在0.05水平上没有显著差异(p > 0.05),两组间若无相同字母则代表两组间在0.05水平上有显著差异(p < 0.05,字母相距越远,差异越大。n=10, $\bar{X} \pm SD$ (下同)。

表2 沙棘籽原花青素对小鼠迟发型变态反应的影响

Table 2 Effects of SBSPC on DTH of mice

性别 Gender	组别 Group	剂量(mg/kgbw) Dose	左耳(mg) Left ear	右耳(mg) Right ear	差值(mg) Difference
雌	空白组	0	14.35 ± 0.814	36.959 ± 1.703	22.609 ± 0.889 ^A
性	低剂量组	30	14.010 ± 0.680	38.020 ± 2.013	24.010 ± 1.333 ^{AB}
小	中剂量组	150	13.900 ± 0.768	38.880 ± 1.663	24.980 ± 0.895 ^{AB}
鼠	高剂量组	300	13.141 ± 0.862	38.927 ± 2.092	25.786 ± 1.230 ^B
雄	空白组	0	17.443 ± 0.901	40.001 ± 2.096	22.558 ± 1.195 ^A
性	低剂量组	30	16.917 ± 0.866	40.873 ± 2.101	23.956 ± 1.235 ^{A^B}
小	中剂量组	150	16.712 ± 0.982	41.802 ± 1.968	25.090 ± 0.986 ^B
鼠	高剂量组	300	17.019 ± 0.799	42.816 ± 1.889	25.797 ± 1.090 ^B

表4 沙棘籽原花青素对免疫器官的影响
Table 4 Effects of SBSPC on immunity apparatus of mice

性别	组别	剂量(mg/kgbw)	体重(g)	脾(g)	脾/体重(mg/g)	胸腺(g)	胸腺/体重(mg/g)
Gender	Group	Dose	Weight	Spleen	Spleen/Weight	Thymus	Thymus/Weight
雌	空白组	0	30.14 ± 2.472	0.1032 ± 0.009	3.42 ± 0.0036 [△]	0.0901 ± 0.012	2.99 ± 0.0048 [△]
性	低剂量组	30	29.45 ± 2.238	0.0991 ± 0.012	3.37 ± 0.0053 [△]	0.0863 ± 0.013	2.93 ± 0.0058 [△]
小	中剂量组	150	30.16 ± 2.736	0.1016 ± 0.010	3.36 ± 0.0037 [△]	0.0870 ± 0.012	2.89 ± 0.0043 [△]
鼠	高剂量组	300	29.70 ± 2.821	0.0983 ± 0.014	3.31 ± 0.0049 [△]	0.0869 ± 0.017	2.93 ± 0.0060 [△]
雄	空白组	0	42.63 ± 3.114	0.1667 ± 0.016	3.91 ± 0.0051 [△]	0.1591 ± 0.019	3.73 ± 0.0061 [△]
性	低剂量组	30	41.86 ± 2.965	0.1611 ± 0.014	3.85 ± 0.0047 [△]	0.1570 ± 0.017	3.75 ± 0.0057 [△]
小	中剂量组	150	42.76 ± 3.017	0.1705 ± 0.010	3.99 ± 0.0033 [△]	0.1605 ± 0.016	3.75 ± 0.0053 [△]
鼠	高剂量组	300	41.43 ± 3.085	0.1602 ± 0.017	3.87 ± 0.0055 [△]	0.1553 ± 0.021	3.74 ± 0.0068 [△]

鼠免疫能力的同时没有负面影响。

3 结论

3.1 沙棘籽原花青素提取液上大孔树脂后,先用蒸馏水洗脱除去糖等杂质,再用50%乙醇洗脱可以得到纯度较高的原花青素,精制后达99%以上。

3.2 沙棘籽原花青素能显著提高小鼠的中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬活性,即能增强小鼠的非特异性免疫功能活性。

3.3 沙棘籽原花青素能增强小鼠的细胞免疫功能。

3.4 沙棘籽原花青素能够提高小鼠的体液免疫功能。

3.5 沙棘籽原花青素在提高小鼠免疫能力的同时没有负面影响。

参考文献:

- [1] 石碧,狄莹.植物多酚[M].科学出版社,2000.5-7.
- [2] 赵超英,姚小曼.葡萄籽提取物原花色素的营养保健功能(综述)[J].中国食品卫生杂志,2000,12(6):38-41.
- [3] Leslie Wada, Boxin Ou, et al. Antioxidant activity and phe-

nolic content of Oregon canberries[J]. J Agric, 2002, 50:3495-3500.

- [4] Tibor Fuleki, Jorge M Ricardo da Silva. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1156-1160.
- [5] Takuro Koga, Keiko Moro, Kaoru Nakmoui, et al. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seed[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 1892-1897.
- [6] Gow-Chin Yen, et al. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 30-34.
- [7] 姚开,等.葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法比较[J].化学研究与应用,2002,14(2):230-232.
- [8] L P Porter, L N Hrstich, B G Chan. The conversion of procyanidins and prodelphinins to cyaniding and delphinidin[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 223-230.
- [9] 郑建仙.功能性食品[M].中国轻工业出版社.
- [10] 石岩,梅世昌.医学动物实用手册[M].中国农业出版社.
- [11] 方喜业.医学实验动物学[M].北京:人民卫生出版社,1995.

信息

英国公司发明花生和鸡蛋病原体测试器具

英国国际生物追溯公司(Biotrace International)推出了两种病原体测试工具,用于追溯食品中的鸡蛋和花生成分。该公司指出:“对花生和鸡蛋进行追溯将有助于食品制造商符合全球在食品标签上注明主要病原体的指导方针。”欧盟要求今年11月24日起食品制造商在产品标签上列名所有可能的病原体,美国也将于2006年1月1日出台类似的法令。

鸡蛋测试工具旨在对食品 and 食品相关样品中的鸡蛋进行检测和测量。根据美国国家标准和技术标准协会的校准,这种工具能测试出食品中的蛋白和蛋黄蛋白。目前市场上的大部分鸡蛋测试工具只能对蛋白进行测试,但蛋黄也能造成鸡蛋敏感群体产生过敏反应。第二种测试工具——花生测试工具也经过美国标准的校准用于检测和测量。这两种工具都能保证使用者选择适合他们的方案,测试工具能产生简单的视觉信号,表明鸡蛋和花生的存在与否;同时使用者还能从计算器中获取鸡蛋或花生存在的数量。