

论著

银杏外种皮多糖对正常 BALB/c 小鼠免疫功能的影响

齐丽娟 宋雁 贾旭东 张文众 向钱 张晓鹏 杨辉 李宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 探讨银杏外种皮多糖对小鼠免疫功能的影响。方法 以银杏外种皮多糖为受试物,设立 1.11 (低)、3.33 (中)、10.00 g/kg (高) 3 个剂量组和水对照组。给样方法为灌胃法,试验周期为 30 d。观察银杏外种皮多糖对小鼠免疫指标的影响。结果 银杏外种皮多糖各剂量组外周血 T 淋巴细胞 ($CD3^+CD19^-$)、Th 细胞 ($CD3^+CD4^+CD8^-$)、Th/Ts ($CD4^+/CD8^+$) 比值较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。其他指标较对照组差异无统计学意义。结论 在本研究剂量下,银杏外种皮多糖对正常 BALB/c 小鼠免疫功能有一定的调节作用。

关键词:银杏外种皮多糖;免疫调节

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0101-04

Influences of Ginkgo Biloba Endocarp Polysaccharide on the Immune Function of Normal BALB/c Mice

QI Li-juan, SONG Yan, JIA Xu-dong, ZHANG Wen-zhong, XIANG Qian, ZHANG Xiao-peng, YANG Hui, LI Ning

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of Ginkgo biloba endocarp polysaccharide (GBEP) on the immune function of normal BALB/c mice. **Method** Low, middle or high dosage of GBEP and distilled water were administered intragastrically to four groups of mice respectively for 30 days. The effects of GBEP on immunological indices of mice were observed. **Results** The percentage of T lymphocytes, Th lymphocytes and the ratio of Th/Ts in peripheral blood were significantly higher in GBEP groups than those in the control group ($P < 0.05$). There were no significant difference of other immunological indices between the control group and GBEP groups. **Conclusion** There were certain modulation of GBEP on immune functions of normal mice under the dosage in this study.

Key words: Ginkgo Biloba Endocarp Polysaccharide (GBEP); Immunomodulation

银杏外种皮多糖 (ginkgo biloba endocarp polysaccharide, GBEP) 是从银杏树的果实白果的外种皮中提取的活性多糖。有研究表明,GBEP 对荷瘤小鼠免疫功能低下状态有显著调节作用^[1]; 还有研究表明,GBEP 可提高环磷酰胺免疫抑制小鼠的免疫功能^[2]。本研究旨在观察 GBEP 对正常 BALB/c 小鼠免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试物 银杏外种皮多糖,纯度为 99.6% (购自徐州某银杏保健品有限公司)。

1.1.2 实验器材 紫外分光光度计 (BECKMAN 公司)、电子分析天平 (Sartorius 公司)、生物显微镜 (NIKON 公司)、CO₂ 恒温培养箱 (SHEL-LAB 公司)、酶联免疫检测仪 (DENLEY DRAGON 公司)、超净工作台、无菌室、低温高速离心机 (BECKMAN GS-15R)、制冰机 (SCOTSMAN 公司)、游标卡尺、流式细胞仪 (BD 公司)、日立 7080 型自动生化仪、恒温水浴箱 (北京长安科学仪器厂)。

1.1.3 主要试剂 RPMI 1640 培养液 (含 L-谷氨酰胺, Gibco)、Hank's 液 (HyClone)、小牛血清、青-链霉素、MTT 试剂 (北京欣经科生物技术有限公司)、异丙醇、PBS 缓冲溶液 (pH 值 7.2 ~ 7.4, HyClone)、丝裂霉素 C、SA 缓冲液、琼脂糖、绵羊红细胞、补体 (豚鼠血清)、都氏试剂、LDH 基质液、P 815 细胞 (购于协和医科大学基础医学细胞中心)、YAC-1 细胞 (购于协和医科大学基础医学细胞中心)、血生化检测试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司)、CBA 试剂盒 (BD 公司)、FITC-anti-CD3、PE-anti-CD4、

收稿日期:2009-07-21

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目 (2006BAK02A07)

作者简介:齐丽娟 女 硕士生 研究方向为食品毒理

E-mail: jgxpig@163.com

通信作者:李 宁 女 研究员

PerCP-anti-CD8 荧光抗体(BD 公司)。

1.2 动物与分组

BALB/c 小鼠,雌性 6~8 周龄,体重 18~22 g,由中国医学科学院实验动物研究所提供[SPF 级,动物合格证号:SCXK(京)2004-0001]。颗粒饲料由中国医学科学院实验动物研究所提供[许可证号:SYXK(京)2003-0006]。饲养地点为中国医学科学院实验动物研究所[SPF 级,合格证号:SCXK(京)2001-0003],室温(22±2)℃,湿度 60%~80%。

动物在实验室条件下检疫 1 周后,按体重分层后随机将 120 只昆明小鼠分成 6 组,每组 20 只,依据银杏多糖的“动物最大给予量”设定 GBEP 高、中、低剂量分别为 10.00、3.33 和 1.11 g/kg 3 个剂量组,并设阴性对照组。各试验剂量组均用纯净水配制所需浓度,灌胃给样,对照组给予纯净水,灌胃容积为 0.3 ml/10 g。每周根据体重调整给样量,连续给样 30 d。

1.3 实验方法和测定指标

动物处死前眼眶内眦静脉取血,其中 EDTA-K2 抗凝血用于血液中 T、B 淋巴细胞分类计数,离心获取血清用于血生化检测、细胞因子、血清半数溶血值的测定。无菌取脾用于空斑形成试验、细胞毒性 T 细胞活性试验和 NK 细胞活性试验。

1.3.1 血生化检测 动物处死前眼眶内眦取血,凝固后 4000 r/min 离心 10 min,分离血清。测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)。

1.3.2 外周血 T、B 淋巴细胞分类计数^[3] 动物处死前眼眶内眦静脉取血,EDTA-K2 抗凝血,每只设定 3 支流式试管进行测定,每管加入 50 μl 抗凝血。分别在 3 管中加入 CD3/CD19、CD3/CD4/CD8 不同荧光素标记的单克隆小鼠抗体。每管加入 2 ml FACS 红细胞裂解液,室温下避光保存 20 min。1200 r/min 离心 5 min,弃去上清液。每管再加入 2 ml PBS,1200 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入 0.5 ml PBS 混匀后上流式细胞仪进行检测。

1.3.3 细胞毒性 T 淋巴细胞活性试验 脾细胞悬液的制备(效应细胞):无菌取脾,用 4 层纱布将脾磨碎,制成单细胞悬液。用 Hank's 液洗 2 次,每次离心 10 min(1000 r/min)。弃上清将细胞浆弹起,加入 0.5 ml 灭菌水 20 s,裂解红细胞后再加入 5 ml Hank's 液,混匀后 1000 r/min,10 min 离心,用 1 ml 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液重悬,调整细胞浓度为 2×10⁷ 个/毫升;加 0.5 ml 此细胞悬液于 24 孔培养板,留一孔不加脾细胞作为对照孔。

制备刺激细胞^[4,5]:1000 r/min,10 min 离心处于对数生长期的 P 815 细胞,用 5 ml DMEM 培养液悬浮 P 815 细胞于 15 ml 离心管中,计数细胞。加入丝裂霉素 C 相当于 50 μg/(2~5×10⁷) 个细胞。用锡纸包裹离心管,以避光,在 37℃ 水浴 30 min。用 Hank's 液洗 P 815 细胞 3 次,之后 Hank's 液悬浮 P 815 细胞,室温孵育 15~20 min 后,离心 1 次。将 P 815 悬浮于培养液中,计数细胞及活性,调整终浓度为 1.2×10⁶ 个/毫升,加 0.5 ml 此悬液于含有脾细胞悬液的 24 孔(包括对照孔)板中。37℃,5% CO₂ 孵育 5 d。5 天期间,每隔一天换一次液。

制备效应细胞:收集 24 孔培养板中的培养物,用 Hank's 液洗 1 次,200 r/min 离心 10 min,收集细胞,重悬于 RPMI 1640 培养液中,计数细胞及活性,调整细胞浓度 2×10⁷ 个/毫升。用完全培养液配制 3 个系列稀释的细胞悬液,每个稀释度 100 μl,做 3 个复孔。

制备靶细胞:离心处于对数生长期的 P 815 细胞,重悬于 0.5 ml Hank's 液里,离心后重悬于 RPMI 1640 完全培养液,调整细胞浓度为 2×10⁵ 个/毫升。

CTL 检测:按效应细胞和靶细胞为 100:1、50:1、25:1 和 12.5:1(各加 100 μl)在圆孔 96 孔培养板的培养孔中加入细胞,每孔液体总体积为 200 μl,设 3 个复孔。同时设靶细胞自然释放对照组(0.1 ml 靶细胞+0.1 ml 培养液)和最大释放对照组(0.1 ml 靶细胞+0.1 ml 1% NP-40 液),效应细胞对照孔(0.1 ml 效应细胞+0.1 ml 培养液),用 96 孔板水平转头 500 r/min 离心 5 min,37℃ 5% CO₂ 培养 4~6 h。1000 r/min 离心 5 min,每孔吸取 100 μl 上清,加于另一 ELISA 反应板的孔中,每孔中加入新鲜配制的底物液 50 μl,室温避光反应 30 min 后,每孔加入 50 μl 终止液,终止酶促反应。在酶联检测仪 492 nm 波长下读取各孔 A 值,CTL 活性用杀伤率表示,按如下公式计算:CTL 杀伤效率(%)=(实验孔 A 值-靶细胞对照孔 A 值-效应细胞对照孔 A 值)/(靶细胞最大释放孔 A 值-靶细胞对照孔 A 值)×100%。

1.3.4 细胞因子的测定 实验前调试好流式细胞仪,按照 CBA 试剂盒说明书进行实验操作。用 BD 公司 CBA 分析软件进行数据分析^[6-8]。

1.3.5 半数溶血值(HC₅₀)的测定 参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)测定。

1.3.6 NK 细胞活性测定 参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)测定。

1.4 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 GBEP 对 BALB/c 小鼠血生化的影响

由表 1 可见,GBEP 各剂量组小鼠血生化指标与对照组比较差异无统计学意义。

2.2 GBEP 对 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞分类计数的影响

由表 2 可见,GBEP 各剂量组 T 淋巴细胞(CD3⁺CD19⁻)较对照组显著升高(P < 0.001);GBEP 低、中和高剂量组 Th 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)较对照组显著升高(P < 0.001, P < 0.001, P < 0.05);GBEP 各剂量组小鼠外周血 Th/Ts(CD4⁺/CD8⁺)比值较对照组显著升高(P < 0.001)。

2.3 GBEP 对 BALB/c 小鼠 CTL 细胞活性的影响

由表 3 可见,GBEP 高剂量组小鼠 CTL 细胞活性较对照组有升高趋势,但差异无统计学意义。

2.4 GBEP 对 BALB/c 小鼠血清细胞因子浓度的影响

由表 4 可见,GBEP 各剂量组小鼠血清中 6 种细胞因子浓度较对照组差异无统计学意义。

2.5 GBEP 对 BALB/c 小鼠半数溶血值(HC₅₀)的影响

由表 5 可见,GBEP 各剂量组 HC₅₀较对照组有增高趋势,但差异无统计学意义。

2.6 GBEP 对 BALB/c 小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 6 可见,GBEP 各剂量小鼠 NK 细胞活性较对照组有增高趋势,但差异无统计学意义。

表 1 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠血生化指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	ALP (U/L)	GLU (mmol/L)	BUN (mmol/L)
阴性对照组	0	26.71 ± 7.09	121.29 ± 23.09	74.74 ± 16.74	43.81 ± 10.22	63.29 ± 13.14	3.18 ± 0.59	5.91 ± 0.57
GBEP 低剂量组	1.11	23.57 ± 2.37	122.29 ± 22.87	101.73 ± 52.82	41.63 ± 7.63	71.57 ± 9.24	3.59 ± 0.98	7.90 ± 1.01
GBEP 中剂量组	3.33	28.00 ± 9.66	130.71 ± 14.89	91.26 ± 30.85	42.00 ± 7.04	62.14 ± 10.75	3.80 ± 0.93	8.59 ± 0.73
GBEP 高剂量组	10.00	26.67 ± 7.99	110.33 ± 18.37	86.63 ± 17.98	40.38 ± 3.21	63.67 ± 12.09	3.79 ± 0.99	8.26 ± 0.93

组别	剂量 (g/kg)	CRE (μmol/L)	Ca (mmol/L)	CHO (mmol/L)	TG (mmol/L)	K (mmol/L)	Na (mmol/L)
阴性对照组	0	135.63 ± 55.72	0.29 ± 0.02	1.96 ± 0.72	2.25 ± 0.68	10.08 ± 2.69	262.57 ± 58.03
GBEP 低剂量组	1.11	130.99 ± 68.37	0.30 ± 0.01	2.16 ± 0.57	2.48 ± 0.96	6.93 ± 0.76	333.00 ± 115.78
GBEP 中剂量组	3.33	142.69 ± 51.22	0.30 ± 0.01	1.65 ± 0.94	3.01 ± 0.88	10.33 ± 2.29	347.43 ± 105.49
GBEP 高剂量组	10.00	103.90 ± 50.27	0.48 ± 0.28	1.92 ± 0.69	1.75 ± 1.093	21.33 ± 15.71	311.67 ± 133.46

表 2 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞分类计数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	CD3 ⁺ CD19 ⁻ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组	0	49.88 ± 8.58	29.90 ± 13.33	11.08 ± 5.18	2.29 ± 0.76
GBEP 低剂量组	1.11	71.15 ± 2.58 ^a	52.30 ± 2.98 ^a	12.42 ± 1.17	4.23 ± 0.26 ^a
GBEP 中剂量组	3.33	74.27 ± 3.06 ^a	54.21 ± 2.41 ^a	12.11 ± 1.50	4.53 ± 0.50 ^a
GBEP 高剂量组	10.00	65.48 ± 12.75 ^a	42.06 ± 2.68 ^b	7.79 ± 4.09	5.03 ± 1.55 ^a

注:统计方法为方差分析。^a为与对照组比较 P < 0.001; ^b为与对照组比较 P < 0.05。

表 3 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠 CTL 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	CTL 细胞活性 (%)
对照组	0	8	7.17 ± 4.26
GBEP 低剂量组	1.11	8	11.91 ± 9.17
GBEP 中剂量组	3.33	8	8.38 ± 3.22
GBEP 高剂量组	10.00	11	12.28 ± 9.97

注:统计方法为非参数检验。

表 4 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠血清细胞因子浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	IFN-γ (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF (pg/ml)
对照组	0	3.60 ± 2.03	2.35 ± 0.48	2.05 ± 0.14	5.68 ± 1.04	7.35 ± 2.43	13.21 ± 5.43
GBEP 低剂量组	1.11	2.60 ± 0.23	2.51 ± 0.20	1.84 ± 0.15	5.49 ± 0.43	8.19 ± 1.12	10.59 ± 1.21
GBEP 中剂量组	3.33	2.60 ± 0.41	2.46 ± 0.14	2.02 ± 0.19	5.86 ± 0.28	9.12 ± 2.10	9.66 ± 1.10
GBEP 高剂量组	10.00	2.67 ± 0.56	2.43 ± 0.12	2.03 ± 0.24	5.61 ± 0.48	8.79 ± 1.88	12.44 ± 7.73

注:统计方法为非参数检验。

表5 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠半数溶血值(HC₅₀)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	HC ₅₀
对照组	0	8	49.24 ± 32.32
GBEP 低剂量组	1.11	9	72.50 ± 58.68
GBEP 中剂量组	3.33	7	78.58 ± 40.93
GBEP 高剂量组	10.00	9	87.20 ± 60.25

注:统计方法为非参数检验。

表6 银杏外种皮多糖对 BALB/c 小鼠 NK 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	NK 细胞活性(%)
对照组	0	7	12.16 ± 9.83
GBEP 低剂量组	1.11	9	14.59 ± 5.42
GBEP 中剂量组	3.33	8	13.58 ± 2.77
GBEP 高剂量组	10.00	7	14.62 ± 9.18

注:统计方法为非参数检验。

3 讨论

本研究发现,分别给予正常小鼠灌胃 GBEP 1.11、3.33 和 10.00 g/kg 后,GBEP 对 BALB/c 小鼠的血生化各项指标无显著影响,表明 GBEP 对小鼠的肝肾功能无不良影响。本研究中 GBEP 对小鼠 HC₅₀及 NK 细胞活性无显著影响,提示 GBEP 对小鼠的体液免疫功能和非特异免疫功能无毒副作用。

细胞介导的免疫反应在机体抗感染及抗肿瘤免疫、移植排斥反应和自身免疫疾病中发挥重要作用。细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是其效应细胞之一,测定 CTL 的活性是了解机体细胞免疫功能和探索疾病机制的重要方法之一。本研究中 GBEP 对 BALB/c 小鼠 CTL 细胞活性无显著影响,提示 GBEP 对小鼠的细胞免疫功能无抑制作用。

根据细胞因子分泌模式^[7],CD4⁺T 细胞可分为 Th1 和 Th2 亚群,Th1 主要分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF,称为 Th1 型细胞因子;Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13,称为 Th2 型细胞因子。Th1 介导细胞免疫、细胞毒性 T 细胞(CTL)和巨噬细胞活化以及迟发型超敏反应(DTH),在诱发器官特异性自身免疫疾病、器官移植排斥反应和抗感染免疫中起着重要的免疫调节作用。Th2 介导体液免疫、B 细胞和嗜酸性粒细胞活化以及 IgE 的生成,在诱发过敏反应中起着决定性的作用。Th1 和 Th2 细胞功能的正常和相互间保持平衡,是维持正常免疫功能和身体健康的基础。本研究中 GBEP 对 BALB/c 小鼠的血清细胞因子 Th1 和 Th2 浓度无显著影响。

T 细胞表面的 CD₃ 抗原代表总 T 细胞;CD₄ 抗原代表辅助 T 细胞(Th 细胞),主要功能是帮助其

他细胞提升其免疫应答,帮助 B 淋巴细胞分裂、分化和产生抗体;细胞毒性 T 细胞(T_s 细胞)表达 CD₈ 抗原,具有细胞毒性和杀死靶细胞的特性。T 淋巴细胞亚群的稳定是维持机体正常免疫调节功能所必需的,是评估机体细胞免疫功能的重要指标,CD₄⁺和 CD₈⁺ 细胞是机体免疫调节的枢纽,CD₄⁺/CD₈⁺ 值较高时,表明机体处于较好的免疫状态,而当 CD₄⁺/CD₈⁺ 失调或缺陷时,可导致各种免疫疾病如恶性肿瘤、遗传性免疫缺陷病、艾滋病的发生。本研究发现 GBEP 有助于提高小鼠外周血中 T 淋巴细胞(CD3⁺CD19⁻)、Th 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)的百分率及 Th/T_s(CD4⁺/CD8⁺) 比值。已有研究对环磷酰胺免疫抑制的小鼠分别灌胃 GBEP 50、100 和 200 mg/kg,与免疫抑制模型组比较,GBEP 3 个剂量组的小鼠 CD3⁺T 细胞及 CD4⁺T 细胞百分率上升^[2]。另有研究表明 GBEP 100、200 mg/kg 灌胃给予正常小鼠后,正常小鼠脾脏总 T 淋巴细胞数增加^[9]。这与本研究结果有一致之处,因此提示在本研究剂量范围内 GBEP 对小鼠的细胞免疫有一定的调节作用。

总之,在本研究剂量下,GBEP 对正常 BALB/c 小鼠的免疫功能不但无毒副作用,而且在一定程度上可能对小鼠的细胞免疫功能有调节作用。

参考文献

- [1] 许爱华. 银杏外种皮多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 1996, 7(3): 22.
- [2] 许爱华. 银杏外种皮多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠免疫反应的调节作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(1): 69-72.
- [3] MORRIS D L, KOMOCSAR W J. Immunophenotyping analysis of peripheral blood, splenic, and thymic lymphocytes in male and female rats[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1997, 37: 37-46.
- [4] CAO L Z. Regulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(4): 312-326.
- [5] SHENG X L, ZHANG H. In-vitro activation of cytotoxic T lymphocytes by fusion of mouse hepatocellular carcinoma cells and lymphotactin gene-modified dendritic cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(44): 5944-5950.
- [6] VIGNALLI D A A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays[J]. J Immunol Methods, 2000, 243: 243-255.
- [7] HILL H R, MARTIN T B. The flow cytometric analysis of cytokines using multi-analyte fluorescence microarray technology[J]. Methods, 2006, 38: 312-316.
- [8] LOZA M J, FAUST J S, PERUSSIA B. Multiple color immunofluorescence for cytokine detection at the singlecell level[J]. Mol Biotechnol, 2003, 23: 245-258.
- [9] 陈华圣. 银杏外种皮多糖对小鼠 T 淋巴细胞的作用[J]. 江苏临床医学杂志, 1997, 1(5): 321-323.