

研究报告

苦瓜提取物对 BALB/c 小鼠免疫功能的影响

方瑾^{1,2},梁春来¹,王伟¹,张文众¹,孙拿拿¹,贾旭东¹,李宁¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 探讨苦瓜提取物对小鼠免疫功能的影响。方法 200 只雌性 BALB/c 小鼠,以体重分层随机分为 4 个大组,每大组 50 只,每大组再按体重随机分为 5 组,每组 10 只,分别为:阴性对照组(纯净水)、阳性对照组(环磷酰胺)、苦瓜水提物低、中、高剂量组(1.11、3.33、10.00 g/kg BW),连续灌胃 30 d,观察苦瓜提取物对小鼠体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫的影响。结果 苦瓜提取物中、高剂量组 IgA 水平较阴性对照组升高($P < 0.05$),苦瓜提取物中剂量组 IgG 水平较对照组升高($P < 0.05$),苦瓜提取物低剂量组 IL-6、IL-4 水平较阴性对照组升高($P < 0.05$)。其他指标较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在本研究剂量下,苦瓜提取物对正常 BALB/c 小鼠免疫功能有一定的调节作用,尤其对体液免疫及细胞免疫可能有促进的作用,对非特异性免疫无明显影响。

关键词:苦瓜提取物;体液免疫;细胞免疫;非特异性免疫

中图分类号:R155;R392.12 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)03-0223-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.03.005

Effects of *Momordica charantia* extract on the immune function of BALB/c mice

FANG Jin, LIANG Chun-lai, WANG Wei, ZHANG Wen-zhong, SUN Na-na, JIA Xu-dong, LI Ning

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of *Momordica charantia* extract (MCE) on the immune function of BALB/c mice. **Methods** A total of 200 female BALB/c mice were randomly divided into negative control group (distilled water), positive control group (cyclophosphamide) and three dosage group (1.11, 3.33, 10.00 g/kg BW), and the mice were administered intragastrically for 30 days, the effects of MCE on humoral immunity, cellular immunity and nonspecific immunity of BALB/c mice were observed. **Results** The IgA levels of the middle and high-dose group of MCE compared with the negative control group were significantly higher ($P < 0.05$), the IgG levels of the low dose group were significantly higher than the control group ($P < 0.05$), and the IL-6, IL-4 levels of the low dose group was significantly higher ($P < 0.05$) compared with the negative control group. Other indicators compared with the negative control group was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Under the dosage in this study, MCE had some regulatory effects on immune function of BALB/c mice, especially for humoral immunity and cellular immunity. However, there was no significant effects on non-specific immune.

Key words: *Momordica charantia* extract; humoral immunity; cellular immunity; non-specific immune

苦瓜是葫芦科苦瓜属蔓性草本植物,广泛分布于热带地区,含有三萜、甾体类、生物碱、蛋白、有机酸及糖类等多种活性化学成分^[1],有降血糖、降血脂、调节

酶活性、抗氧化、抗肿瘤和抗病毒等功效^[2]。

近年来,关于苦瓜成分对免疫系统影响的报道结果并不一致,有研究表明苦瓜多糖对 ICR 小鼠具有免疫增强作用,苦瓜中的三萜和甾体类物质能改变衰老小鼠 T 细胞各亚群比例,从而促进 IL-2 分泌,增强吞噬指数,提高衰老小鼠免疫功能^[3],体外研究发现苦瓜提取物能够诱导肿瘤细胞凋亡^[4-5],但也有研究表明苦瓜蛋白经尾静脉注射长期给予大鼠后,大鼠的 WBC 和 RBC 数量减少,产生明显的免疫毒性作用^[6]。苦瓜作为常用的药食两用植物,其提取物经消

收稿日期:2013-12-16

基金项目:食品化学污染物与新资源危害识别关键技术研究(2012BAK01B04)

作者简介:方瑾 女 博士生 研究方向为食品毒理
E-mail:fangjin99168@163.com

通讯作者:李宁 女 研究员 研究方向为食品毒理
E-mail:lining_65@163.com

化道重复摄入后对机体免疫系统的影响尚不清楚,故本研究以苦瓜水提取物为受试物,采用国际通用的免疫抑制模型,选择体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫等观察指标,初步探讨了苦瓜提取物对正常 BABL/c 小鼠免疫系统及其功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

200 只 BABL/c 雌性小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,由北京华卓康生物科技股份有限公司提供[SPF 级,动物合格证号:SCXK(京)2009-0007]。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]。饲养地点为中国疾病预防控制中心动物房[合格证号:SCXK(京)2009-0032],SPF 级,室温(22±2)℃,湿度 60%~80%。

1.1.2 受试物

苦瓜提取物为棕色、有典型气味的细粉末,易溶于水,其中苦瓜皂甙含量为 20.18%(南京泽朗医药科技有限公司)。阳性物为环磷酰胺(江苏省恒瑞医药股份有限公司)。

1.1.3 主要仪器与试剂

紫外分光光度计、电子分析天平(感量 0.0001 g)、生物显微镜、CO₂ 恒温培养箱、酶联免疫检测仪(芬兰 Thermo)、超净工作台、低温高速离心机、制冰机、流式细胞仪、恒温水浴箱。

RPMI 1640 培养液(美国 Gibco),MTS 细胞增殖检测试剂盒(美国 Promega),ConA 和 LPS 均购自美国 Sigma,YAC-1 细胞(协和医科大学基础医学细胞中心),绵羊红细胞(北京兰伯瑞生物技术有限公司),小鼠免疫球蛋白 ELISA 试剂盒(美国 Genway),CBA 小鼠 Th1/Th2/Th17 细胞因子试剂盒、CD4/CD8/CD3 流式检测抗体均购自美国 BD。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

200 只 BABL/c 雌性小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,按体重分层后,随机分成个大组,每组 50 只,每个大组再按体重分层随机分为 5 个小组,每组 10 只,分别为阴性对照组、苦瓜提取物低、中、高剂量组和环磷酰胺阳性组(根据苦瓜提取物的“动物最大给予量”设定高、中、低剂量分别为 10.00、3.33 和 1.11 g/kg BW)。各试验剂量组均用纯净水配制所需浓度,灌胃给予;对照组给予纯净水,灌胃容积为 0.3 ml/10 g。环磷酰胺阳性对照组于试验结束前 24 h,以 200 mg/kg BW 的剂量腹腔注射环磷

酰胺,作为免疫低下模型。每周根据体重调整给样量,连续给样 30 d。

1.2.2 各组小鼠的处理及检测指标

第一组:喂养期起始、结束时均称重,眼眶内眦静脉放血处死动物后,取脾脏、胸腺称重,计算脏器系数。其中 EDTA-K2 抗凝血用于血液中 T、B 淋巴细胞分类计数,1 500 r/min 离心 10 min,获取血清用于血生化检测、细胞因子和免疫球蛋白的测定;第二组:测定溶血空斑数和半数溶血值(HC₅₀值);第三组:测定刀豆素 A(concavalin A, ConA)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脾淋巴细胞增殖能力;第四组:测定 NK 细胞活性。

1.2.3 检测指标及方法

外周血 T、B 淋巴细胞分型^[7]每只小鼠设定 3 支流式试管进行测定,每管采集 50 μl 抗凝血。分别在 3 流式试管中加入 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 红细胞裂解液,室温下避光保存 20 min。1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液。每管再加入 2 ml 磷酸盐缓冲液 PBS,1 200 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。

血清细胞因子和免疫球蛋白的测定^[8]分别按照 CBA 试剂盒说明书和 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

溶血空斑数和 HC₅₀的测定,ConA 和 LPS 诱导的脾淋巴细胞增殖试验,NK 细胞活性试验均参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)^[9]进行。

1.3 统计分析

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差分析的结果显示方差齐时用 LSD 法进行组间数据比较,方差不齐时用 Dunnett 比较法进行组间数据比较。

2 结果

2.1 对动物体重增长与脏器系数的影响

试验期间,动物生长状况良好,苦瓜提取物低、中、高试验组及阳性对照组与阴性对照组均无明显区别;连续给予苦瓜提取物 30 d 后,阳性对照组小鼠经腹腔注射给予环磷酰胺 24 h 后,脾脏和胸腺的绝对重量和相对重量均低于阴性对照组,且差异有统计学意义;苦瓜提取物 3 个剂量组与阴性对照组比较,小鼠终体重、肝体比、肾体比、脾体比及腺体比,差异无统计学意义。见表 1、2。

表1 苦瓜提取物对小鼠每周的体重影响($\bar{x} \pm s, n = 10, g$)

Table 1 Effects of momordica charantia extract on body weight gain

组别	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
阴性对照组	20.2 ± 0.7	19.4 ± 0.8	20.0 ± 0.8	20.1 ± 0.8	20.1 ± 0.8
低剂量组	20.9 ± 1.1	20.3 ± 1.1	20.2 ± 1.0	20.4 ± 1.0	19.9 ± 1.0
中剂量组	20.0 ± 1.7	20.1 ± 1.3	20.5 ± 1.5	20.7 ± 1.4	20.2 ± 1.2
高剂量组	20.7 ± 1.1	19.7 ± 1.2	19.2 ± 1.2	20.2 ± 1.6	19.8 ± 1.3
阳性对照组	20.4 ± 1.1	20.1 ± 1.6	20.5 ± 1.5	20.9 ± 1.0	19.9 ± 1.3

2.2 外周血淋巴细胞表型

阳性对照组小鼠外周血 T 淋巴细胞(CD₃⁺CD₁₉⁻)百分比、Th 细胞(CD₃⁺CD₄⁺)百分比和 Th/Ts 比值(CD₄⁺/CD₈⁺)高于阴性对照组, B 淋巴细胞(CD₃⁻CD₁₉⁺)百分比低于阴性对照组;受试物中剂量组 NK 细胞

表2 苦瓜提取物对小鼠脏体比的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of momordica charantia extract on organ/body weight ratio

组别	脾脏		胸腺	
	绝对重量/g	相对重量/%	绝对重量/g	相对重量/%
阴性对照组	0.092 ± 0.008	0.450 ± 0.053	0.049 ± 0.006	0.240 ± 0.052
低剂量组	0.099 ± 0.026	0.494 ± 0.158	0.049 ± 0.006	0.237 ± 0.032
中剂量组	0.100 ± 0.009	0.497 ± 0.046	0.048 ± 0.010	0.235 ± 0.045
高剂量组	0.169 ± 0.236	0.475 ± 0.062	0.044 ± 0.017	0.222 ± 0.082
阳性对照组	0.049 ± 0.020 ^a	0.249 ± 0.099 ^a	0.031 ± 0.012 ^a	0.158 ± 0.062 ^a

注:a为阴性对照组相比, P < 0.05

(CD₃⁻CD₄₉⁺)百分比低于阴性对照组,高剂量组也有降低,但差异无统计学意义(P > 0.05);其他剂量组 T 淋巴细胞、Th 细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞百分比及 Th/Ts 比值差异均无统计学意义(P > 0.05),见表3。

表3 苦瓜提取物对小鼠外周血淋巴细胞分型结果($\bar{x} \pm s, n = 10, %$)

Table 3 Effects of momordica charantia extract on peripheral blood lymphocytes of genotyping

组别	CD ₃ ⁺ CD ₁₉ ⁻	CD ₃ ⁻ CD ₁₉ ⁺	CD ₃ ⁻ CD ₄₉ ⁺	CD ₃ ⁺ CD ₄ ⁺	CD ₃ ⁺ CD ₈ ⁺	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
阴性对照组	48.62 ± 10.62	31.06 ± 10.70	17.13 ± 6.86	40.48 ± 8.85	14.08 ± 3.10	2.91 ± 0.28
低剂量组	52.14 ± 13.79	30.30 ± 4.74	12.35 ± 2.81	40.04 ± 2.77	15.77 ± 1.45	2.55 ± 0.14
中剂量组	57.29 ± 6.04	29.31 ± 5.46	8.03 ± 1.74 ^a	42.68 ± 4.06	15.13 ± 1.64	2.84 ± 0.30
高剂量组	49.78 ± 4.88	34.23 ± 6.06	9.76 ± 2.99	34.99 ± 5.21	13.30 ± 1.90	2.64 ± 0.20
阳性对照组	68.86 ± 13.79 ^a	4.19 ± 1.97 ^a	20.28 ± 15.26	60.27 ± 6.83 ^a	15.64 ± 2.97	3.94 ± 0.64 ^a

注:a为与阴性对照组相比, P < 0.05

2.3 小鼠血清细胞因子及免疫球蛋白含量

受试物的中、高剂量组小鼠血清 IgA 水平高于阴性对照组,且差异有统计学意义(P < 0.05);受试物的中剂量组小鼠血清 IgG 水平高于阴性对照组,且差异有统计学意义(P < 0.05);其他各组小鼠血清 IgA、IgG、IgM 水平与阴性对照组相比,差异均无统计学意义(P > 0.05),见表4。

2.4 小鼠血清细胞因子的测定

阳性对照组 IL-6 水平低于阴性对照组,且差异有统计学意义(P < 0.05);受试物低剂量组 IL-6、IL-4 水平高于阴性对照组,且差异有统计学意义(P < 0.05);其他受试物组 IL-10、IL-17A、IL-4、IL-6、IL-2、

表4 苦瓜提取物对小鼠血浆免疫球蛋白的影响

($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu g/ml$)

Table 4 Effects of momordica charantia extract on serum immunoglobulins

组别	IgA	IgG	IgM
阴性对照组	23.11 ± 5.80	554.0 ± 189.0	212.2 ± 63.5
低剂量组	29.40 ± 4.81	639.0 ± 138.8	249.2 ± 29.9
中剂量组	32.46 ± 6.30 ^a	724.6 ± 86.6 ^a	260.4 ± 39.5
高剂量组	36.75 ± 5.70 ^a	466.8 ± 83.5	239.6 ± 35.0
阳性对照组	20.76 ± 1.35	447.1 ± 85.6	187.7 ± 24.7

注:a为与阴性对照组比较, P < 0.05

TNF、 γ -IFN 水平与阴性对照组比较,差异无统计学意义(P > 0.05),见表5。

表5 苦瓜提取物对小鼠外周血细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10, pg/ml$)

Table 5 Effects of momordica charantia extract t on serum cytokine quantification

组别	IL-10	IL-17A	IL-6	IL-4	IL-2	TNF	γ -IFN
阴性对照组	4.04 ± 1.21	4.47 ± 1.34	44.65 ± 20.20	4.79 ± 0.79	6.59 ± 3.06	24.22 ± 16.49	3.70 ± 3.59
低剂量组	5.53 ± 0.91	5.97 ± 1.73	87.24 ± 14.31 ^a	11.87 ± 3.80 ^a	25.26 ± 14.38	44.12 ± 10.64	17.63 ± 11.62
中剂量组	5.07 ± 1.59	6.68 ± 2.84	58.5 ± 28.94	5.65 ± 31.53	5.75 ± 3.64	20.24 ± 9.93	4.10 ± 5.24
高剂量组	5.55 ± 2.07	8.42 ± 4.47	34.20 ± 22.20	8.28 ± 4.49	9.88 ± 6.17	16.06 ± 10.61	8.90 ± 6.48
阳性对照组	5.22 ± 2.15	3.15 ± 2.17	2.54 ± 0.87 ^a	6.13 ± 4.65	5.17 ± 3.71	11.77 ± 10.95	2.85 ± 1.77

注:a为与阴性对照组比较, P < 0.05。

2.5 小鼠溶血空斑数和 HC₅₀ 值的测定

阳性对照组溶血空斑数和血清 HC₅₀ 值低于阴性对照组;受试物高剂量组血清 HC₅₀ 值低于阴性对照组;其他受试物组与阴性对照组相比,差异均无统计学意义(P > 0.05),见表6。

2.6 小鼠脾淋巴细胞增殖能力, NK 细胞活性的测定

阳性对照组 ConA 及 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力低于阴性对照组;受试物低剂量组 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖能力高于阴性对照组,其他受试物组小鼠 ConA 及 LPS 诱导的小鼠脾淋巴

表6 苦瓜提取物对小鼠空斑形成细胞数和血清 HC₅₀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of bitter melon extract on plaque forming cell number and serum HC₅₀

组别	空斑形成细胞数 (/10 ⁶ 脾细胞)	血清 HC ₅₀
阴性对照组	32.6 ± 11.2	26.77 ± 1.08
低剂量组	21.3 ± 8.8	27.68 ± 0.81
中剂量组	40.4 ± 24.6	27.25 ± 1.08
高剂量组	24.8 ± 13.0	24.04 ± 1.00
阳性对照组	14.0 ± 4.0 ^a	23.23 ± 1.01 ^a

注:a为与阴性对照组比较, $P < 0.05$

细胞增殖能力、NK细胞活性与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表7。

表7 苦瓜提取物对小鼠脾细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of momordica charantia extract on splenocyte proliferation and natural killer cell activity

组别	ConA 诱导的脾 细胞增殖能力	LPS 诱导的脾 细胞增殖能力	NK 细胞 活性
阴性对照组	0.83 ± 0.29	0.42 ± 0.13	8.51 ± 4.75
低剂量组	1.08 ± 0.20 ^a	0.41 ± 0.14	9.94 ± 7.95
中剂量组	0.87 ± 0.27	0.35 ± 0.13	5.88 ± 3.48
高剂量组	0.96 ± 0.34	0.40 ± 0.14	6.21 ± 2.01
阳性对照组	0.25 ± 0.05 ^a	0.07 ± 0.06 ^a	6.22 ± 1.63

注:a为与阴性对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

环磷酸胺作为常用的免疫抑制阳性物,能够抑制体液免疫和细胞免疫;本研究中阳性对照组小鼠的脾脏、胸腺的相对重量减轻、外周血 T 淋巴细胞百分比升高、B 淋巴细胞百分比降低、Th 细胞百分比和 Th/Ts 比值升高,IL-6 水平降低,溶血空斑数和血清 HC₅₀ 值降低,ConA 和 LPS 诱导的脾淋巴细胞增殖能力降低,表明本试验成功建立了免疫低下模型。

T、B 淋巴细胞是反映机体特异性免疫功能的最重要标志,其产生和分泌的免疫球蛋白及血清细胞因子水平的改变,对维持细胞功能的正常和相互之间的作用均有影响;IL-6、IL-4 属于 Th2 型细胞因子,主要介导机体的体液免疫、B 细胞和嗜酸性粒细胞活化以及抗体的生成;本研究发现苦瓜提取物对血清免疫球蛋白 IgA、IgG 的产生,以及细胞因子 IL-6、IL-4 的分泌有明显的促进作用,已有研究证实苦瓜水提取物有改善环磷酸胺诱导的免疫抑制小鼠肠道 sIgA 分泌水平降低的趋势,对 B 淋巴细胞功能恢复有一定作用^[10];从而提示苦瓜

提取物对小鼠体液免疫有一定的调节作用。提高机体内淋巴细胞的数量,增加其转化率,促进淋巴因子的产生,增强机体的免疫功能,因此脾淋巴细胞转化试验是测定机体细胞免疫功能的一项重要指标。本研究中苦瓜提取物低剂量组 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖能力较阴性对照组升高,而另有研究表明苦瓜多糖在 10 ~ 500 μg/ml 浓度时,与空白组相比均能促进小鼠淋巴细胞增殖,且具有剂量依赖关系^[11],因此说明苦瓜提取物对小鼠细胞免疫具有一定的调节作用。

在本研究剂量范围内,苦瓜提取物对正常 BALB/c 小鼠的免疫功能无明显毒副作用,且对小鼠细胞免疫、体液免疫有一定的调节作用。

参考文献

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese herbal medicines [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1986:1281.
- [2] 查青,董英,徐斌. 苦瓜的药理作用研究概况 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 33-36.
- [3] 王先远,金宏,许志勤. 苦瓜皂甙对衰老小鼠免疫功能的影响 [J]. 营养学报, 2001(3): 263-265.
- [4] Agrawal R C, Beohar T. Chemopreventive and anticarcinogenic effects of *Momordica charantia* extract [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2010, 11(2): 371-375.
- [5] LI C J, Tsang S F, Tsai C H, et al. *Momordica charantia* extract induces apoptosis in human cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012: 1-11.
- [6] 万莉,孟延发,沈富兵,等. 苦瓜蛋白 RIP 的免疫毒性研究 [J]. 四川大学学报:医学版, 2009, 40(6): 1033-1037.
- [7] 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(1): 37-46.
- [8] Hill H R, Martin T B. The flow cytometric analysis of cytokines using multi-analyte fluorescence microarray technology [J]. Methods, 2006, 38(4): 312-316.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范食品安全性毒理学评价程序和方法 (2003 版) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 温如燕,李相玲,白莎莎,等. 苦瓜水提取物对免疫抑制小鼠肠道黏膜免疫功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 261-264.
- [11] 蔡寅,刘敏,吴勋贵. 苦瓜多糖抗肿瘤及免疫增强活性的研究 [J]. 药学与临床研究, 2010(2): 131-134.