

- mechanisms in *Enterococcus* [J]. Virulence, 2012, 3 (5): 421-433.
- [13] Arias C, Murray B. The rise of the *Enterococcus*; beyond vancomycin resistance[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(4): 266-278.
- [14] Sanchez-Diaz A M, Cuartero C, Rodriguez J D, et al. The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: a risk for bacteraemia? [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(1): 59. e1-59. e8.
- [15] 彭子欣, 王伟, 胡豫杰, 等. 食品及环境样品中肠球菌快速检验方法的建立及优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2240-2246.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement[S]. Wayne: CLSI, 2016.
- [17] 谢伟, 景春梅, 王偲. 2009—2013年重庆地区儿童感染粪肠球菌和屎肠球菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(8): 611-616.
- [18] 俞道进, 尹兵, 易秀丽, 等. 猪源万古霉素耐药肠球菌分离及表型和基因型检测[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(2): 236-242.
- [19] 贾伟, 魏军, 赵志军, 等. 宁夏地区临床分离肠球菌属对高浓度庆大霉素耐药基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(17): 3539-3541.
- [20] Jackson C R, Fedorka-cray P J, Barrett J B, et al. High-level aminoglycoside resistant *Enterococci* isolated from swine [J]. Epidemiol Infect, 2005, 133(2): 367-371.
- [21] Diaz L, Tran T T, Munita J M, et al. Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs [J]. Antimicrob Agents Ch, 2014, 58(8): 4527-4534.

研究报告

枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠增强免疫功能的影响

段雨劼, 胡余明, 姚松银, 崔鲁炜, 刘志光

(湖南省疾病预防控制中心, 湖南长沙 410005)

摘要:目的 研究枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠免疫力的增强作用。方法 选用200只健康ICR小鼠随机分为5大组, 每大组40只小鼠按体质量随机分为4小组, 即枸杞籽油和亚麻籽油混合物低、中、高剂量组(0.25、0.50、1.50 g/kg BW)和对照组。连续经口灌胃30天后, 检测枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠免疫器官脏器比、细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能和NK细胞活性等指标的影响。结果 与对照组比较, 中、高剂量组能明显提高小鼠迟发型变态反应能力及NK细胞活性, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 高剂量组能明显提高血清半数溶血值、抗体生成细胞数, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。各剂量组对小鼠胸腺/体质量比值、脾脏/体质量比值、单核-巨噬细胞碳廓清能力、淋巴细胞转化能力及巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力均无明显影响, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 枸杞籽油和亚麻籽油混合物具有增强小鼠免疫力的功能。

关键词: 枸杞籽油; 亚麻籽油; 免疫功能; 体液免疫; 细胞免疫; NK细胞活性; 小鼠

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2016)06-0743-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.06.012

Effects of mixture of lycium seed oil and flaxseed oil on immune function in mice

DUAN Yu-jie, HU Yu-ming, YAO Song-yin, CUI Lu-wei, LIU Zhi-guang

(Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hunan Changsha 410005, China)

Abstract: Objective To study the effect of boxthorn seed oil and flaxseed oil complex on mice immunity. **Methods** Chose 200 institute of cancer research (ICR) mice and divided into five groups, and 40 mice in each group were randomly divided into 4 subgroups according to body weight, including three different doses (0.25, 0.50, 1.50 g/kg BW) and the control. After gavage administration of 30 days, body weight, immune organ-body ratios, cell immunity, humoral immunity, mononuclear macrophage phagocytosis and natural killer (NK) cell activity index were measured. **Results** Compared with the control group, the medium and high dose groups had significantly increased delayed-type hypersensitivity (DTH) and NK cell activity ($P < 0.05$). The high dose groups also showed a significant increase in half hemolytic

收稿日期: 2016-09-07

作者简介: 段雨劼 女 医师 研究方向为卫生毒理 E-mail: duanyujie123@qq.com

通信作者: 胡余明 男 副主任技师 研究方向为卫生毒理 E-mail: huyuming@vip.sina.com

content (HC₅₀) and antibody generating cell ($P < 0.05$). There were no significant changes in body weight gains, immune organ-body ratios, mononuclear macrophage phagocytosis and lymphocyte transformation capability ($P > 0.05$).

Conclusion Boxthorn seed oil and flaxseed oil had positive effects on mice immune function.

Key words: Lycium seed oil; flaxseed oil; immune function; humoral immunity; cellular immunity; NK cell activity; mice

随着社会经济的发展和人民生活水平的不断提高,人类的生存环境问题也越来越不容小觑。吸入有害气体和颗粒物、膳食饮水摄入过量或过少微量元素等均可影响机体免疫能力,甚至导致免疫力下降^[1-2]。此外,增龄和长期身心紧张等因素,亦可不同程度的导致机体免疫力降低^[3-4]。因此,寻找天然有效增强免疫力作用的物质,成为人们关注的热点。枸杞和亚麻既是食物,也是药物。枸杞籽油、亚麻籽油分别是从小红袍和亚麻籽中提取的功能性油脂,其中富含不饱和脂肪酸、维生素 E 和多种微量元素等生物活性物质。多项研究表明枸杞籽油和亚麻籽油具有降血脂、降血糖、抗氧化和抗疲劳等生理功能^[3, 5-7]。目前,枸杞籽油和亚麻籽油已在医药、保健食品等领域开发应用^[8]。本研究就枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠增强免疫力作用进行了初步研究,为进一步开发枸杞籽油和亚麻籽油保健食品应用提供一定的理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雌性小鼠 200 只,体质量 18 ~ 22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[生产许可证号:SCXK(湘)2011-0003,使用许可证号:SYXK(湘)2010-0010]。动物于屏障环境中饲养,试验期间环境温度 21 ~ 24 ℃,湿度 50% ~ 60%。每 40 只小鼠为一大组,共五大组。免疫 I 组,进行碳廓清试验;免疫 II 组,进行 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验、NK 细胞的活性测定;免疫 III 组,进行脏器比、半数溶血值 (HC₅₀) 和抗体生成细胞数的测定;免疫 IV 组,进行迟发型变态反应试验;免疫 V 组,进行小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验。每大组 40 只小鼠按体质量随机分为 4 小组,即对照组和低、中、高剂量组(0.25、0.50、1.50 g/kg BW),每小组 10 只小鼠。

1.1.2 主要仪器与试剂

722 分光光度计、酶标仪(美国 Thermo Electron)、显微镜、游标卡尺(精密度 150 mm)、微量注射器(50 μl)等。

绵羊红细胞(SRBC,江门市凯林贸易有限公司)、噻唑蓝(MTT,美国 Sigma)、补体(豚鼠血清,临

用前生理盐水 1:8 稀释)、印度墨汁、鸡红细胞、甲醇、Giemsa 染液(珠海贝索生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 受试物处理

枸杞籽和亚麻籽分别通过烘干除杂、粉碎过筛、超零界 CO₂ 萃取等工艺制成枸杞籽油和亚麻籽油,然后按比例混合。受试物中枸杞籽油的比例为 58%,亚麻籽油的比例为 40%,另有 2% 的维生素 E。

根据人体口服推荐剂量为每日 3.0 g,故设低、中、高剂量分别为 0.25、0.50、1.50 g/kg BW,即取枸杞籽油和亚麻籽油混合物 2.50、5.00、15.00 g 加植物油定容至 100 ml,按 0.1 ml/10 g BW 体积给小鼠灌胃,对照组灌胃予以等体积的植物油。每天一次,连续灌胃 30 天。

1.2.2 脏器比测定^[9]

称重后处死小鼠,取出脾脏和胸腺称重,计算脏器比。

1.2.3 迟发型变态反应(DTH)检测(足跖增厚法)^[9]

小鼠腹腔注射 2% SRBC (0.2 ml/只)致敏后 4 天,测量左后足跖部厚度,然后在测量部位皮下注射 20% SRBC (0.02 ml/只),于注射后 24 h 测量左后足跖部厚度,同一部位测量三次,取平均值。以攻击前后足跖厚度差值(足跖肿胀度)来表示 DTH 的程度。

1.2.4 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化试验(MTT 法)^[9]

无菌取脾,制成脾细胞悬液并调整细胞浓度,再将脾细胞悬液加入 96 孔培养板中,每一份脾细胞 3 个孔加 ConA 液(7.5 μg/ml),另 3 个孔不加 ConA 液作为对照。置 5% CO₂,37 ℃ 培养 72 h。按 MTT 法在 570 nm 处测定光密度(OD)值。淋巴细胞的增殖能力用加 ConA 孔的 OD 值减去不加 ConA 孔的 OD 值表示。

1.2.5 抗体生成细胞检测(Jerne 改良玻片法)^[9]

每只鼠腹腔注射 2% SRBC 0.2 ml,4 天后将小鼠处死,取脾制成细胞悬液并调整细胞浓度。按 Jerne 改良玻片法计数溶血空斑数。

1.2.6 半数溶血值(HC₅₀)的测定^[9]

每只鼠经腹腔注射 2% SRBC 0.2 ml,4 天后,

取小鼠血清并稀释 200 倍,取 1 ml 置试管内,依次加入 10% SRBC 0.5 ml,补体 1 ml。另设不加血清的对照管。置 37 °C 恒温水浴中保温 30 min 后,冰浴终止反应。2 000 r/min 离心 10 min,取上清 1 ml,加都氏试剂 3 ml。在 540 nm 处以对照管作空白,分别测定各管 OD 值。溶血素的量以 HC_{50} 表示。

1.2.7 小鼠碳廓清试验^[9]

按 0.1 ml/10 g 体积,小鼠尾静脉注射印度墨汁(生理盐水 1:3 稀释),于注入墨汁后第 2、10 min,分别从内眦静脉丛取血 20 μ l,加入到 2 ml 0.1% Na_2CO_3 溶液中,摇匀。以 Na_2CO_3 溶液作空白对照,用分光光度计在 600 nm 波长处比色测 OD 值。将小鼠处死,取肝、脾,称重,计算吞噬指数。

1.2.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验(半体内法)^[9]

小鼠腹腔注射 20% 的鸡红细胞悬液 1 ml,间隔 30 min,颈椎脱臼处死,仰位固定于鼠板上,正中剪开腹壁皮肤,经腹腔注入生理盐水 2 ml,转动鼠板 1 min。取腹腔巨噬细胞洗液 1 ml,滴于载玻片上,置 37 °C 孵箱温育 30 min。在生理盐水中漂洗,晾干,以甲醇-丙酮(1:1, V/V)固定,4% Giemsa-磷酸缓冲液染色,用蒸馏水漂洗晾干,用油镜观察计数,计算吞噬率和吞噬指数。

1.2.9 NK 细胞活性的测定(乳酸脱氢酶测定法)

小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,制成脾细胞悬液,按乳酸脱氢酶法,用酶标仪在 490 nm 处测定 OD 值,计算 NK 细胞活性。

1.3 统计学分析

本试验数据计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计分析软件进行统计学分析,先对数据进行方差齐性检验,若方差齐,采用单因素方差分析进行总体比较,发现差异再用 Dunnett 法进行多个剂量组与一个对照组均数间的两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠免疫器官脏体比的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物各剂量组的小鼠脾脏/体质量比值和胸腺/体质量比值与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

2.2 对小鼠迟发型变态反应的影响

如表 2 所示,枸杞籽油和亚麻籽油混合物中、高剂量组小鼠注射后 24 h 足趾厚度和组织肿胀度与对照组比较均有增加,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠免疫器官脏体比的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of test substance on immune organ-body ratios in ICR mice

组别	动物数/只	脾脏/体质量/%	胸腺/体质量/%
对照组	10	0.462 \pm 0.085	0.296 \pm 0.065
低剂量组	10	0.500 \pm 0.081	0.311 \pm 0.054
中剂量组	10	0.482 \pm 0.091	0.330 \pm 0.069
高剂量组	10	0.510 \pm 0.084	0.345 \pm 0.061

表 2 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of test substance on DTH in ICR mice

组别	动物数/只	注射前足趾厚/mm	注射后 24 h 足趾厚度/mm	注射后 24 h 足趾肿胀度/mm
对照组	10	2.56 \pm 0.13	2.81 \pm 0.11	0.25 \pm 0.14
低剂量组	10	2.53 \pm 0.12	2.88 \pm 0.11	0.34 \pm 0.16
中剂量组	10	2.58 \pm 0.10	3.03 \pm 0.15*	0.46 \pm 0.16*
高剂量组	10	2.54 \pm 0.13	3.05 \pm 0.11*	0.50 \pm 0.18*

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 对小鼠 ConA 诱导的淋巴细胞转化能力的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物各剂量组对小鼠淋巴细胞转化能力没有明显的影响,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 3。

表 3 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠淋巴细胞转化能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of test substance on lymphocyte transformation capability in ICR mice

组别	动物数/只	加 ConA 的 OD 值	不加 ConA 的 OD 值	淋巴细胞增殖能力(OD 差值)
对照组	10	0.228 \pm 0.018	0.192 \pm 0.016	0.036 \pm 0.017
低剂量组	10	0.229 \pm 0.011	0.187 \pm 0.015	0.041 \pm 0.016
中剂量组	10	0.231 \pm 0.014	0.186 \pm 0.019	0.045 \pm 0.019
高剂量组	10	0.236 \pm 0.015	0.189 \pm 0.019	0.047 \pm 0.017

2.4 对小鼠体液免疫的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物高剂量组小鼠溶血空斑数、 HC_{50} 与对照组比较均有提高,且差异有统计学意义($P < 0.05$),如表 4 所示。

表 4 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠体液免疫的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of test substance on humoral immunity in ICR mice

组别	动物数/只	溶血空斑数/(个/10 ⁶ 个脾细胞)	HC_{50}
对照组	10	141 \pm 60	163.83 \pm 57.69
低剂量	10	176 \pm 51	188.66 \pm 48.01
中剂量	10	198 \pm 46	201.57 \pm 38.10
高剂量	10	209 \pm 53*	225.28 \pm 56.55*

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

2.5 对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

2.5.1 对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物各剂量组小鼠碳

廓清能力与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表5。

表5 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of test substance on clearance of carbon in ICR mice

组别	动物数/只	吞噬指数
对照组	10	4.42 ± 0.79
低剂量组	10	4.60 ± 1.27
中剂量组	10	4.98 ± 1.67
高剂量组	10	5.36 ± 0.88

2.5.2 对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物各剂量组与对照组相比,小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的增强均差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表6。

表6 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of test substance on phagocytosis ability of macrophage in ICR mice

组别	动物数/只	吞噬率/%	吞噬率平方根反正弦转换值	吞噬指数
对照组	10	21.8 ± 4.54	27.7 ± 3.19	0.93 ± 0.22
低剂量组	10	25.9 ± 7.72	30.4 ± 5.05	1.00 ± 0.26
中剂量组	10	26.2 ± 5.65	30.7 ± 3.69	1.05 ± 0.26
高剂量组	10	27.5 ± 4.17	31.6 ± 2.67	1.10 ± 0.23

2.6 对小鼠NK细胞活性的影响

枸杞籽油和亚麻籽油混合物中、高剂量组小鼠NK细胞活性与对照组比较均有提高,且均差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表7。

表7 枸杞籽油和亚麻籽油混合物对小鼠NK细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of test substance on NK cell activity in ICR mice

组别	动物数/只	NK细胞活性/%	NK细胞活性平方根反正弦转换值
对照组	10	21.64 ± 5.23	27.57 ± 3.71
低剂量组	10	24.25 ± 4.82	29.40 ± 3.26
中剂量组	10	27.25 ± 4.61	31.40 ± 2.97*
高剂量组	10	28.29 ± 4.11	32.07 ± 2.74*

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

免疫系统是机体执行免疫应答及免疫功能的重要系统,是由细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫共同构成的防御系统。各种原因使得免疫系统不能正常发挥保护作用,即免疫力低下或免疫力超常时,会引起多种对机体有害的结果,如极易感染细菌病毒、炎症反复发作、肿瘤形成和自身免疫病等^[10]。

国内外开发应用了多种以枸杞籽油、亚麻籽油

为原材料之一的保健食品,但主要集中在降血脂、降血糖、抗氧化和抗疲劳等生理功能上^[8]。多项机制研究提示,枸杞籽油和亚麻籽油具有增强机体免疫力的作用可能与其富含亚油酸、 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸等有关^[11-13]。亚油酸可通过提高免疫球蛋白表达水平、促进T细胞繁殖和调节多种细胞因子等途径,提高机体体液免疫功能和细胞免疫功能^[11]。同时, α -亚麻酸能提高小鼠的抗体生成细胞数和血清溶血素水平,促进碳廓清和巨噬细胞吞噬能力,促进小鼠的迟发型变态反应,提高小鼠NK细胞的活性等,提示 α -亚麻酸具有增强小鼠免疫力的作用^[12]。运用体液芯片检测技术发现, γ -亚麻酸可影响小鼠血清中多种细胞因子含量变化,具有明显的免疫调节作用^[13]。枸杞籽油、亚麻籽油增强免疫力的作用早已成为保健食品研究及开发的热点,本研究为枸杞籽油和亚麻籽油混合物在增强免疫力的产品开发及应用上提供了一定的依据。此外,枸杞籽油和亚麻籽油混合物是否比枸杞籽油或亚麻籽油在增强免疫力作用上更有效,且两者之间是否存在相加作用、独立作用或是协同作用,则仍需作进一步的试验研究。

参考文献

- [1] 孙艳. 空气污染导致儿童呼吸系统疾病的相关研究进展[J]. 医学信息, 2014, 27(4): 544-545.
- [2] 王钦文, 胥锋. 重金属污染粮食的危害与防治[J]. 粮食加工, 2012, 37(2): 81-84.
- [3] 段文杰. 枸杞子的药理作用及价值[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(1): 127-128.
- [4] 陈实. 不良心理社会因素致病的原因分析[J]. 中国保健医学研究版, 2008, 16(2): 62.
- [5] 黄琼, 黄俊明, 陈瑞仪, 等. 大豆, 枸杞子, 山楂复合提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 208-211.
- [6] 姜怡邓, 董晓薇, 毛忠英, 等. 枸杞籽油对小鼠耐缺氧抗疲劳作用的实验研究[J]. 宁夏医学院学报, 2004, 26(1): 19-21.
- [7] 邓乾春, 禹晓, 黄庆德, 等. 亚麻籽油的营养特性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(4): 715-721.
- [8] 苏宁静, 王辉. 枸杞籽油开发应用[J]. 中国油脂, 2004, 29(8): 56-58.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[A]. 2003.
- [10] 孙薇, 陆大祥. 神经-内分泌-免疫调节网络与疾病[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(8): 761-763.
- [11] 包海生, 左福元. 共轭亚油酸对动物免疫调节的研究[J]. 饲料研究, 2006(3): 13-15.
- [12] 姚思宇, 赵鹏, 李彬, 等. α -亚麻酸对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(3): 334-336.
- [13] 乔冬, 庞广昌, 李杨. γ -亚麻酸对小鼠免疫系统的调节作用[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 247-252.