

【食品与发酵科技】富硒青钱柳-蛹虫草复方小鼠免疫调节及抗氧化实验研究

食品与发酵科技
Food and Fermentation Sciences & Technology
第57卷(第4期) Vol.57, No.4

富硒青钱柳-蛹虫草复方小鼠免疫调节及抗氧化实验研究

罗丹¹, 陈丹¹, 白曦晨², 向极轩³, 樊建元⁴, 刘卫^{2,5*}

(1. 武汉百思凯瑞生物科技有限公司, 湖北武汉 430075; 2. 华中科技大学大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430074;
3. 恩施州农业科学院, 湖北恩施 445099; 4. 恩施思慧益臣生态农业发展有限公司, 湖北恩施 445099;
5. 华中科技大学国家纳米药物工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

摘要: 从细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫三方面研究富硒青钱柳-蛹虫草复方对C57小鼠免疫功能的影响及抗氧化作用。将C57小鼠随机分为阴性对照组、阳性组、富硒青钱柳-蛹虫草复方低、中、高剂量组。分别进行Con A诱导脾淋巴细胞体外增殖实验、血清溶血素实验、巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验及自然杀伤细胞NK细胞活性实验, 评价富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠免疫调节功能的影响。此外, 通过流式细胞仪测定不同浓度的富硒青钱柳-蛹虫草复方对NIT-1细胞胞内ROS水平的变化。结果显示, 与阴性对照组比较, 富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠的体重、脾脏/体重比值、胸腺/体重比值无显著性影响($P > 0.05$), 低、中、高剂量组能显著促进Con A诱导的淋巴细胞增殖($P < 0.05$), 高剂量组对半数溶血值的增加有显著性影响($P < 0.05$), 且低、中、高各剂量组能显著增加吞噬指数和NK细胞活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。且样品浓度为25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胞内ROS水平与模型组比较显著降低($P < 0.01$)。结果表明, 富硒青钱柳-蛹虫草复方有效增强机体免疫力, 具有显著的抗氧化功效。

关键词: 富硒青钱柳; 蛹虫草; C57小鼠; 免疫调节; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-506X(2021)04-0008-0007

Selenium-enriched *Cyclocarya paliurus* and *Cordyceps militaris* Compound Immunity and Antioxidant Experiment Research in Mice

LUO Dan¹, CHEN Dan¹, BAI Xi-chen², XIANG Ji-qian³, FAN Jian-yuan⁴, LIU Wei^{2,5*}

(1. Wuhan Bestcarrier Biotechnology Co., Ltd., Wuhan Hubei 430075, China;
2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430074, China;
3. Enshi Academy of Agricultural Sciences, Enshi Hubei 445099, China;
4. Enshi Savant ecological agriculture development Co., Ltd., Enshi Hubei 445099, China;
5. National Engineering Research Center for Nanomedicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430075, China)

Abstract: From the cellular immunity, humoral immunity and nonspecific immune research Se-enriched *Cyclocarya paliurus* - *Cordyceps militaris* compound on the effect of C57 mice immune function and antioxidant function. The C57 mice were randomly divided into negative control group, positive drug group, Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound low, medium and high dose groups. Con A induced proliferation of spleen lymphocytes in vitro, serum hemolysin, macrophage phagocytosis of chicken red blood

收稿日期: 2021-01-06

基金项目: 恩施州特色资源应用技术与产品开发研究(湖北省科技支撑计划项目2013BEC048)。

作者简介: 罗丹(1990-), 硕士, 助理研究员。研究方向: 保健食品功效评价。

*通信作者

富硒青钱柳-蛹虫草复方小鼠免疫调节及 抗氧化实验研究

罗丹¹, 陈丹¹, 白曦晨², 向极轩³, 樊建元⁴, 刘卫^{2,5*}

(1. 武汉百思凯瑞生物科技有限公司, 湖北武汉 430075; 2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430074;
3. 恩施州农业科学院, 湖北恩施 445099; 4. 恩施慧益臣生态农业发展有限公司, 湖北恩施 445099;
5. 华中科技大学国家纳米药物工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

摘要: 从细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫三方面研究富硒青钱柳-蛹虫草复方对C57小鼠免疫功能的影响及抗氧化作用。将C57小鼠随机分为阴性对照组、阳性组、富硒青钱柳-蛹虫草复方低、中、高剂量组。分别进行Con A诱导脾淋巴细胞体外增殖实验、血清溶血素实验、巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验及自然杀伤细胞NK细胞活性实验, 评价富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠免疫调节功能的影响。此外, 通过流式细胞仪测定不同浓度的富硒青钱柳-蛹虫草复方对NIT-1细胞内ROS水平的变化。结果显示, 与阴性对照组比较, 富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠的体重、脾脏/体重比值、胸腺/体重比值无显著性影响($P > 0.05$), 低、中、高剂量组能显著促进Con A诱导的淋巴细胞增殖($P < 0.05$), 高剂量组对半数溶血值的增加有显著性影响($P < 0.05$), 且低、中、高各剂量组能显著增加吞噬指数和NK细胞活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。且样品浓度为25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胞内ROS水平与模型组比较显著降低($P < 0.01$)。结果表明, 富硒青钱柳-蛹虫草复方有效增强机体免疫力, 具有显著的抗氧化功效。

关键词: 富硒青钱柳; 蛹虫草; C57小鼠; 免疫调节; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-506X(2021)04-0008-0007

Selenium-enriched *Cyclocarya paliurus* and *Cordyceps militaris* Compound Immunity and Antioxidant Experiment Research in Mice

LUO Dan¹, CHEN Dan¹, BAI Xi-chen², XIANG Ji-qian³, FAN Jian-yuan⁴, LIU Wei^{2,5*}

(1. Wuhan Bestcarrier Biotechnology Co., Ltd., Wuhan Hubei 430075, China;

2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430074, China;

3. Enshi Academy of Agricultural Sciences, Enshi Hubei 445099, China;

4. Enshi Savant ecological agriculture development Co., Ltd., Enshi Hubei 445099, China;

5. National Engineering Research Center for Nanomedicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430075, China)

Abstract: From the cellular immunity, humoral immunity and nonspecific immune research Se-enriched *Cyclocarya paliurus* - *Cordyceps militaris* compound on the effect of C57 mice immune function and antioxidant function. The C57 mice were randomly divided into negative control group, positive drug group, Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound low, medium and high dose groups. Con A induced proliferation of spleen lymphocytes in vitro, serum hemolysin, macrophage phagocytosis of chicken red blood

收稿日期: 2021-01-06

基金项目: 恩施州特色资源应用技术与产品开发研究(湖北省科技支撑计划项目2013BEC048)。

作者简介: 罗丹(1990-), 硕士, 助理研究员。研究方向: 保健食品功效评价。

*通信作者

cells, and NK cell activity were conducted respectively to evaluate the effect of Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound on the immune regulatory function of mice. In addition, the changes of ROS levels in NIT-1 cells with different concentrations of Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound were measured by flow cytometry. The results showed that the Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound had no significant effect on the body weight, spleen/body weight ratio and thymus/body weight ratio of mice compared with the negative control group ($P > 0.05$). Con A induced lymphocyte proliferation was significantly promoted in low, medium and high dose groups ($P < 0.05$), the high dose group had a significant effect on the increase of half of the hemolysis value ($P < 0.05$). The phagocytosis index and NK cell activity were significantly increased in the low, medium and high dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And when the sample concentration was 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the intracellular ROS level was significantly lower than that of the model group ($P < 0.01$). The results showed that the Se-enriched *Cyclocarya paliurus*-*Cordyceps militaris* compound has the ability to enhance immunity and the antioxidant.

Key words: selenium-enriched *Cyclocarya paliurus*; *Cordyceps militaris*; C57 mice; immune regulation; antioxidant

doi:10.3969/j.issn.1674-506X.2021.04-002

青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ijinskaja), 为我国特有胡桃科属植物,是国家重点保护的濒危植物之一,被誉为医学界的“第三棵树”^[1]。研究表明,青钱柳主要的活性成分为青钱柳多糖、黄酮、三萜皂苷等化合物,其活性成分在降血糖、降血脂、抗氧化及提高免疫力等方面发挥重要作用^[2-3]。此外,还含有硒、锰、铁、铜等微量元素。硒是一种人体重要的微量元素,具有提高免疫力和抗氧化作用等功效,缺硒可抑制机体免疫应答反应,影响细胞毒性T淋巴细胞活性的诱导和效-靶细胞的结合,因此,适量补硒对于免疫力的调节具有重要意义^[4-5]。蛹虫草(*Cordyceps militaris* (L.) Link),又名北虫草,寄生于鳞翅目昆虫蛹体后能形成虫菌复合体的真菌,其主要功效成分为核苷类化合物,研究认为这类化合物具有提高免疫、抗氧化和抗癌等作用^[6]。此外,还含有糖醇类、甾醇类、氨基酸类、多糖类等化合物^[7]。发酵虫草菌粉由天然蛹虫草进行深层发酵得来,与天然虫草具有类似的药用功效,腺苷和虫草素含量常常被作为评价发酵虫草菌粉的质量标准。目前已有大量研究报道,其在保肝护肾、治疗心脑血管、免疫调节作用、调节代谢及抗肿瘤等方面有着重要作用^[8]。

本团队前期对富硒青钱柳-蛹虫草复方进行了研究,获得的富硒青钱柳-蛹虫草复方中硒含量为 79.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、腺苷含量为 895 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[9]。本文将从细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫三方面研究富硒青钱柳-蛹虫草复方对 C57 小鼠免疫功能的影响以及抗氧化作用,为富硒青钱柳-蛹虫草复方健康产品的

研究和开发提供理论及实验依据。

1 材料与与方法

1.1 动物、细胞材料

SPF 级雄性 C57 小鼠 50 只,体质量 18~20 g,许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。实验动物、普通维持料由湖北省疾病预防控制中心提供。动物饲养于屏障级动物房,使用许可证号 SYXK(鄂)2017-0065,温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%。YAC-1 细胞、NIT-1 胰岛素瘤 β 细胞购买于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

1.2 材料与试剂

富硒青钱柳提取物,由湖北省恩施州农业科学院提供;发酵蛹虫草菌粉,由湖北恩施慧慧生物科技有限公司提供;贞芪扶正颗粒,修正药业集团股份有限公司;RPMI Medium 1640、胎牛血清,美国 Gibco 公司;10%绵羊红细胞(SRBC)、1%鸡红细胞,浙江联硕生物科技有限公司;CCK-8 试剂,日本同仁化学;刀豆蛋白 A (ConA),美国 Sigma 公司;CytoTox 96 非放射性细胞毒性检测试剂盒(用于 NK 细胞活性检测),Promega 公司;活性氧检测试剂盒,碧云天生物技术公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

Victor 多标记分析仪,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;紫外-可见分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;台式高速冷冻离心机,长沙非凡仪器仪表有限公司;BS 124S 分析天平,Sartorius 公司;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;HERACELL 150 型 CO_2 培养箱,美国 Thermo 公

司;CKX31倒置生物显微镜,日本Olympus公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及给药

将50只小鼠随机分为阴性对照组、阳药组和富硒青钱柳-蛹虫草复方低、中、高剂量处理组,每组10只。阳药组每天灌胃贞芪扶正颗粒,给药剂量为1.29 g/kg,由人体推荐量换算得来,富硒青钱柳-蛹虫草复方低(0.19 g/kg)、中(0.38 g/kg)、高(0.76 g/kg)剂量组每天灌胃相应剂量的复方,分别相当于人体推荐量的5、10、20倍,受试样品均用超纯水稀释溶解,阴性对照组每天灌胃等体积超纯水,灌胃体积为0.1 mL/10 g,连续灌胃给药30 d。

1.4.2 小鼠体重及免疫器官指数测定

记录受试小鼠给予富硒青钱柳-蛹虫草复方前后的体重。称重后处死小鼠后,采集脾脏和胸腺,用棉签吸去浮血并称质量,免疫器官指数按如下公式计算。

$$\text{脾脏指数(mg/g)} = \text{脾脏质量/体质量}$$

$$\text{胸腺指数(mg/g)} = \text{胸腺质量/体质量}$$

1.4.3 ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验

采用Con A诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验测定细胞免疫功能^[9]。小鼠颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡5 min,分离小鼠脾脏。处死后无菌取脾,置于Hank液中轻轻磨碎,200目筛网过滤。1000 r/min离心10 min。将细胞悬浮于完全培养液中,调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。将细胞悬液分为2孔加入96孔培养板中,每孔100 μ L,一孔加5 μ L ConA液,另一孔加入培养液5 μ L作为对照。于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱孵育48 h。培养结束前4 h每孔轻轻吸去上清液70 μ L,加入70 μ L不含胎牛血清的RPMI1640培养液,同时加入CCK-8液10 μ L/孔,继续培养4 h。培养结束后于450 nm处,对照孔调零,测定吸光度。用加ConA孔OD值减去不加ConA孔OD值,代表淋巴细胞的增殖能力。

1.4.4 血清溶血素的测定(HC_{50})

采用血清溶血素(HC_{50})实验测定小鼠体液免疫功能^[11]。取血清用生理盐水稀释200倍,将稀释后的血清100 μ L置1.5 mL离心管中,依次加入10% (v/v) SRBC 50 μ L,补体100 μ L(用生理盐水稀释1:8)。置37 $^{\circ}$ C恒温水浴中保温30 min后,冰浴终止反应,2000 r/min离心10 min。取上清液50 μ L加入到平底96孔板中,加都氏液150 μ L; SRBC半数溶血值测定组加10% (v/v) SRBC 12.5 μ L,都氏液

187.5 μ L;上述各项均设三个平行孔,振荡混匀10 min,540 nm测定光密度值(OD)。

$$\text{HC}_{50} = \frac{\text{样品OD值}}{\text{SRBC半数溶血OD值}} \times \text{血清稀释倍数}$$

1.4.5 单核-巨噬细胞功能测定

采用小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验测定单核-巨噬细胞功能^[12]。于给药第7 d每只动物腹腔注射2% (v/v) SRBC悬液0.2 mL,免疫4 d,末次给药24 h脱颈椎处死,于无菌条件下,每只小鼠腹腔注射加入含5% FBS的Hank's液2 mL,用吸管吸取腹腔洗液至试管内。将0.3 mL腹腔洗液与0.3 mL 1%的鸡红细胞悬液混匀,滴于载玻片上并推平,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育30 min。孵育结束后生理盐水冲去附着的细胞,用甲醇固定1 min, Giemsa液染色12 min。用双蒸水冲洗,晾干。油镜下观察小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬情况,计数100个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞个数和鸡红细胞个数,计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬率(%) = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数 $\times 100$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬的鸡红细胞数/巨噬细胞总数}$$

1.4.6 NK细胞活性测定

NK细胞活性测定按照CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒操作^[9]。取脾脏以制备单细胞悬浮液,离心,灭菌水加入细胞浆用于裂解红细胞,加Hank's液,离心,培养液调整细胞浓度。96孔培养板中加入脾细胞和YAC-1细胞,其中加培养液和YAC-1细胞的为YAC-1细胞自然释放孔,加2.5% Triton和YAC-1细胞的为YAC-1细胞最大释放孔,经4 h培养后,离心,平底96孔培养板中加入上清液及LDH基质液,10 min后再加1 mol/L的HCl,在波长490 nm处酶标仪测定光密度值。如剂量组NK细胞活性显著高于对照组,视为阳性试验结果。按照下面公式计算NK细胞的活性。

$$\text{NK细胞活性}(\%) = (\text{反应孔吸光度} - \text{自然释放孔吸光度}) / (\text{最大释放孔吸光度} - \text{自然释放孔吸光度}) \times 100$$

1.4.7 对NIT-1细胞胞内ROS水平的影响

取对数生长期NIT-1胰岛素瘤 β 细胞,将NIT-1细胞接种于6孔板,调整细胞浓度为 3×10^6 个/孔。设置正常组,模型组,给药组,正常组每孔加入2 mL DMEM高糖培养基,模型组和给药组加入1.7 mL DMEM和300 μ L STZ溶液(8 mmol/L),培养过夜。

损伤结束后,吸去培养基,正常组与模型组加入2 mL培养基,给药组加入2 mL富含硒青钱柳-蛹虫草复方(浓度分别为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基,培养24 h后去除培养基,加入1 mL DCFH-DA溶液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)孵育30 min。孵育完成后吸出DCFH-DA溶液,并使用PBS溶液洗两次,使用胰蛋白酶消化细胞,离心后重悬过滤膜备用,使用流式细胞仪测定细胞中荧光强度^[13]。

1.5 数据处理

采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计学分析,对实验数据进行方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。先进行方差齐性检验,方差齐则进行单因素

方差分析,差异显著后采用LSD法进行组间多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠体重及免疫器官指数的影响

胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,胸腺的主要功能是产生T淋巴细胞和分泌胸腺素,主要参与细胞免疫;脾脏中有丰富的淋巴细胞和巨噬细胞,与体液免疫关系更为密切,其重量指数可反应机体的免疫功能^[14]。富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠体重及免疫器官指数的影响见表1。

表1 对小鼠体重及免疫器官指数的影响
Tab.1 The effect on body weight and immune organ index of mice

组别	剂量(g/kg)	初始体重(g)	结束体重(g)	脾脏指数(mg/g)	胸腺指数(mg/g)
阴性对照组	-	17.52 \pm 0.24	23.59 \pm 0.52	4.41 \pm 0.24	1.98 \pm 0.17
阳药组	1.29	17.56 \pm 0.18	23.02 \pm 0.48	4.60 \pm 0.25	2.08 \pm 0.17
低剂量	0.19	18.07 \pm 0.22	23.25 \pm 0.35	4.63 \pm 0.36	2.12 \pm 0.22
中剂量	0.38	18.34 \pm 0.16	22.03 \pm 0.48	4.48 \pm 0.12	2.04 \pm 0.18
高剂量	0.76	17.97 \pm 0.12	22.21 \pm 0.46	4.57 \pm 0.22	2.13 \pm 0.26

由表1可知,30 d灌胃试验结束后,与阴性对照组比较,低、中、高各剂量组小鼠的体重均无显著差异($P > 0.05$),说明富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠体重无影响。各剂量组小鼠脾脏指数和胸腺指数比阴性对照组均有所增加,但无显著性差异($P > 0.05$),说明该复方对小鼠的脏器/体重比值无明显影响。

2.2 对小鼠细胞免疫功能的影响

淋巴细胞是适应性免疫反应中的关键细胞,淋巴细胞增殖实验常用于评估动物的细胞免疫能力,由于T淋巴细胞对ConA敏感,我们选择用ConA诱导T淋巴细胞增殖。富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠细胞免疫的影响见表2。

由表2可知,与阴性对照组比较,低、中、高剂量组小鼠Con A诱导的脾淋巴细胞增殖能力显著性增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠细胞免疫功能具有促进作用,且高剂量效果更为显著,结果判定富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠细胞免疫功能试验结果阳性。

表2 对小鼠细胞免疫功能的影响

Tab.2 The effect on cellular immune function of mice

组别	剂量(g/kg)	脾淋巴细胞增殖能力
阴性对照组	-	1.01 \pm 0.07
阳药组	1.29	1.19 \pm 0.09*
低剂量	0.19	1.28 \pm 0.12*
中剂量	0.38	1.24 \pm 0.18*
高剂量	0.76	1.39 \pm 0.07**

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,下同

2.3 对小鼠体液免疫功能的影响

体液免疫主要是B淋巴细胞经过抗原刺激产生特异性抗体,从而消除细胞外病原体的免疫反应,以清除特异性抗原达到保护目的的免疫机制。血清溶血素水平是体液免疫的重要指标,溶血素数值可以表达B淋巴细胞增殖分化的能力与补体结合分泌溶血素的能力,从而反映机体体液免疫能力^[15],富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠半数溶血值的影响见表3。

表3 对小鼠体液免疫功能的影响
Tab.3 The effect on humoral immune function of mice

组别	剂量(g/kg)	半数溶血值HC ₅₀
阴性对照组	-	52.53 ± 6.23
阳药组	1.29	60.03 ± 9.85
低剂量	0.19	59.44 ± 7.29
中剂量	0.38	58.64 ± 8.82
高剂量	0.76	62.36 ± 5.59*

由表3可知,与阴性对照组比较,高剂量组小鼠半数溶血值的增加具有显著性差异($P < 0.05$)。说明该复方高剂量可以提高正常小鼠的半数溶血值HC₅₀,具有增强小鼠体液免疫的功能,结果判定

表4 对小鼠非特异性免疫功能的影响
Tab.4 The effect on non-specific immune function of mice

组别	剂量(g/kg)	小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞		NK细胞活性
		吞噬率(%)	吞噬指数	
阴性对照组	-	13.25±1.56	0.16±0.03	0.343±0.017
阳药组	1.29	18.34±4.23*	0.24±0.05*	0.387±0.024*
低剂量	0.19	18.76±2.28*	0.25±0.04**	0.394±0.032*
中剂量	0.38	17.53±2.35*	0.23±0.06*	0.379±0.021*
高剂量	0.76	19.25±2.07*	0.26±0.05**	0.405±0.035*

由表4可知,低、中、高各剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的细胞吞噬率及吞噬指数显著高于阴性对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量的细胞吞噬率和吞噬指数最高;低、中、高各剂量组小鼠NK细胞活性明显高于阴性对照组($P < 0.05$)。说明该复方对小鼠非特异性免疫功能具有促进作用,结果判定富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠非特异性免疫功能试验结果阳性。

2.5 对NIT-1细胞胞内ROS水平的影响

活性氧(ROS)是一类化学性质活泼,具有较高氧化活性的分子或粒子的总称。细胞中过量的ROS能够引起生物大分子的氧化损伤,导致脂质过氧化物的形成,起到细胞杀伤作用,从而影响其正常的生理生化功能^[16]。ROS及其氧化损伤与神经退行性疾病、糖尿病、癌症和早衰老等多种疾病相关^[17]。有文献报道胰岛细胞损伤跟体内活性氧自

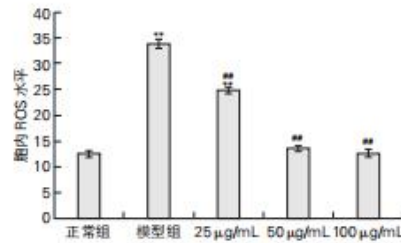
富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠体液免疫功能试验结果阳性。

2.4 对小鼠非特异性免疫功能的影响

巨噬细胞在机体免疫系统中发挥极为重要的作用,是清除病原微生物的重要效应细胞,其生理功能广泛,在特异性免疫和非特异性免疫中都能发挥功能,巨噬细胞可吞噬外来病原体 and 自身突变细胞,是非特异性免疫的组成部分,巨噬细胞吞噬能力的高低直接反映机体免疫功能^[16]。NK细胞是机体重要的免疫细胞,起着联系先天性免疫和获得性免疫的作用,可以在没有主要组织相容性复合物(MHC)的情况下直接识别并杀死受感染的细胞,具有自然杀伤活性^[17]。富硒青钱柳-蛹虫草复方对小鼠非特异性免疫的影响见表4。

由基水平有关,富硒青钱柳-蛹虫草复方对NIT-1细胞胞内ROS水平的影响见图1。

由图1可知,模型组胞内ROS水平显著高于正



注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图1 富硒青钱柳虫草复方对NIT-1细胞胞内ROS水平影响

Fig.1 The effect on the level of ROS in NIT-1 cells

常组($P < 0.01$),猜测链脲佐菌素损伤 NIT-1 细胞机理跟影响其胞内 ROS 水平有关。与模型组比较,富硒青钱柳-蛹虫草复方浓度为 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞胞内 ROS 水平显著降低($P < 0.01$),且当其浓度高于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,胞内 ROS 水平降至与正常组相当。说明富硒青钱柳-蛹虫草复方能清除体内堆积的 ROS,发挥抗氧化作用。

3 讨论

本文根据《保健食品检验与评价技术规范》增强机体免疫力评价方法,选择了细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞功能测定及 NK 细胞活性测定四个方面指标来研究富硒青钱柳-蛹虫草复方对 C57 小鼠免疫调节功能的影响。实验结果表明与阴性对照组比较,低、中、高剂量组能显著增加脾淋巴细胞增殖能力,高剂量组小鼠半数溶血值的增加显著高于阴性对照组,低、中、高各剂量组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的细胞吞噬率及吞噬指数显著增高,低、中、高各剂量组小鼠 NK 细胞活性明显提高。综合分析,富硒青钱柳-蛹虫草复方能显著增强小鼠特异性和非特异性免疫功能,具有免疫调节活性,同时对免疫器官无刺激作用。

机体免疫能力与体内活性氧关系密切,ROS 作为细胞代谢的毒性产物,ROS 蓄积过多会导致氧化应激而引起细胞凋亡。其次,巨噬细胞可分泌 ROS,有研究表明^[20],巨噬细胞源性 ROS 诱导 Treg 生成,这表明源自巨噬细胞的 ROS 具有免疫抑制作用。本文研究了链脲佐菌素损伤的 NIT-1 细胞胞内 ROS 水平的影响,结果显示,与模型组比较,富硒青钱柳-蛹虫草复方能极显著降低胞内 ROS 水平,清除体内堆积的 ROS,发挥抗氧化作用。

本团队前期通过普通青钱柳叶面喷施硒肥处理得到富硒青钱柳,测得富硒青钱柳叶中硒含量最高可达 7.31 mg/kg ,是空白组的 41 倍^[21]。硒在青钱柳内存在协同或拮抗效应影响了硒的多种生理生化过程,将无机硒代谢转化为生物活性更高的有机硒。前期研究表明^[22],富硒青钱柳多糖提升 SOD、GSH-Px 酶活的能力及提高小鼠免疫的能力显著优于普通青钱柳多糖、无机硒、普通青钱柳多糖加无机硒的组合。蛹虫草能够调节机体的免疫功能,有研究表明^[23],发酵虫草菌粉多糖能促进脾淋巴细胞增殖,且对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 具有促进作用。TNF- α 是单核巨噬细胞产生的细胞因子,参与非特异性和特异性免疫的重要递质,能增

强淋巴细胞、单核巨噬细胞的活性,具有调节免疫活性的能力。

综上所述,富硒青钱柳提取物与发酵虫草菌粉科学配伍得到的复方可有效发挥协同增效效应,具有显著增强免疫及抗氧化的能力。本文研究工作为富硒青钱柳-蛹虫草复方健康产品的研究和开发提供理论及实验依据。

参考文献

- [1] 唐梅,赵立春,扈芷怡,等.青钱柳化学成分及药理作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2017,44(9):851-859.
- [2] XIE JH, SHEN MY, NIE SP, et al. Analysis of monosaccharide composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide with anion exchange chromatography[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98: 976-981.
- [3] XIE JH, DONG CJ, NIE SP, et al. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Hjninskaja leaves[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 97-105.
- [4] 齐鹏翔,黄双霞,陈华磊,等.硒多糖的合成方法及其特性研究进展[J].食品工业科技,2019,40(1):332-336.
- [5] HAQUE MM, MOGHAL MR, SARWAR MS, et al. Low serum selenium concentration is associated with preeclampsia pregnant women from Bangladesh[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016, 33: 21-25.
- [6] 涂俊铭,王碧,夏险.蛹虫草生物活性成分及药理作用研究进展[J].食用菌,2020,42(6):4-7.
- [7] 李靖靖,郭林.蛹虫草培养基中虫草多糖的提取[J].食品与发酵科技,2016,52(5):49-54.
- [8] LEE JS, KWON DS, LEE KR, et al. Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 120: 29-37.
- [9] 李东山,吕萌,谭开祥,等.富硒青钱柳虫草片降血糖、免疫调节的实验研究[J].中国医药指南,2019,17(18):29-31.
- [10] 陈丹,李立勇,霍小位,等.肿瘤平对 S180 荷瘤小鼠抑制作用及免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(4):141-145.
- [11] 李春美,谢笔钧.儿茶素氧化聚合物体内外抗肿瘤作用及对正常小鼠免疫功能的影响[J].食品科学,2001(11):23-27.
- [12] 齐晓甜,赵春暖,张家祥,等.中药类保健食品增强免疫力功能评价现状和研究策略[J].中国中药杂志,2019,44(5):875-879.

(下转第 50 页)

- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.225-2016《食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [22] 崔日宝. 河西走廊不同产地原料及浸渍工艺对赤霞珠干红葡萄酒挥发性成分的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [23] 周文杰, 王鹏, 詹萍, 等. 香气活度值法结合PLSR用于梨酒特征香气物质筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 138-143.
- [24] 祝霞, 刘琦, 赵丹丹, 等. 干白葡萄酒增香酿造工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2019, 35(18): 282-291.
- [25] ZHANG DW, DONG W, JIN L, et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* YDJ05 from the spontaneous fermentation pear wine and study of the yeast growth dynamics during the association fermentation [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 156: 266-271.
- [26] 王诗, 王璐璐, 赵丹丹, 等. 甘肃河西走廊产区本土酒球菌对赤霞珠干红葡萄酒香气品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 245-251.
- [27] ZHANG BQ, LUAN Y, DUAN CQ, et al. Use of *Torulopsis delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 606.
- [28] 王妮, 祝霞, 杨学山, 等. 混菌发酵对美乐低醇桃红葡萄酒香气的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2195-2207.
- [29] LYUMUGABE F, IYAMARERE I, KAYITARE M, et al. Volatile aroma compounds and sensory characteristics of traditional banana wine "Urwagwa" of Rwanda [J]. *Rwanda Journal*, 2018, 2: 1-24.
- [30] TUFARIELLO M, CAPONE S, SICILIANO P. Volatile components of Negroamaro red wines produced in Apulian Salento area [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132: 2155-2164.
- [31] 程玉, 杨勇, 黄治钰, 等. 中国5个产区赤霞珠干红葡萄酒挥发性香气成分差异研究[J]. 酿酒科技, 2015(1): 23-26.
- [32] JOSÉ GÓMEZ-MÍGUEZ M, CACHO JF, FERREIRA V, et al. Volatile components of Zalema white wines [J]. *Food Chemistry*, 2007, 99(4): 1464-1473.
- [33] 马腾球, 李颖, 张莉, 等. 油橄榄酒的酿造及香气成分分析[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 161-166.
- [34] 原苗苗, 姜凯凯, 孙玉霞, 等. 戴尔有孢圆酵母对葡萄酒香气的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 99-105.

(上接第13页)

- [13] 李向阳, 田青, 董峰. 辐对胎盘绒毛外滋养层 HTR-8/SVneo 细胞内抗氧化酶活性的影响[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(2): 201-206.
- [14] 张岚, 王丹, 聂晶石. 蚕蛹虫草片剂对体液免疫和细胞免疫功能的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 349-352+357.
- [15] 翟旭楠, 刘永武, 张娜, 等. 刺五加多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药信息, 2020, 37(6): 42-45.
- [16] 张丽娟, 王珍, 廖尚高. 太子参多糖对 RAW 264.7 巨噬细胞免疫调节作用的初步研究[J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(4): 14-17.
- [17] Dahlberg C, Sarhan D, Chrobok M, et al. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 605.
- [18] 白鸿爱, 何勇静, 张奇, 等. 基于 FoxO1 通路探讨仙茅苷对 H₂O₂ 诱导成骨细胞氧化损伤的保护作用及机制[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1296-1304.
- [19] 李喜存, 赵家义. 活性氧在非小细胞肺癌肿瘤免疫中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(11): 1295-1298.
- [20] KRAAIJ MD, SAVAGE NDL, VAN DER KOOIJ SW, et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species [J]. *PNAS*, 2010, 107(41): 17686-17691.
- [21] 吕萌, 陈伟鸿, 许琦, 等. 有机富硒肥对青钱柳叶中硒、微量元素及功效成分的影响[J]. 农学学报, 2016, 6(5): 39-42.
- [22] 张浩, 陈伟鸿, 马方勋, 等. 富硒青钱柳多糖对糖尿病模型小鼠血糖、血脂和免疫力的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 228-232.
- [23] 蒋洪亮, 赵修南, 麻浩, 等. 发酵虫草菌粉多糖免疫活性实验研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(8): 2032-2035.