

网络出版时间:2021-12-10 15:40 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.06.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20211209.0850.001.html

刺梨总三萜的免疫活性研究

田 强^{1,2}, 李良群², 彭 梅², 李艳梅², 牛振鹏², 李齐激², 汪 涛^{1,2}, 杨小生^{1,2}

(1 贵州中医药大学 研究生院, 贵州 贵阳 550025;

2 贵州医科大学 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

【摘 要】【目的】探究刺梨总三萜对免疫抑制小鼠及小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的影响,综合评价刺梨总三萜的免疫活性。【方法】制备刺梨总三萜(TR),给 SPF 级健康昆明小鼠腹腔注射环磷酰胺(CTX)构建免疫抑制模型,灌胃给予高(200 mg/kg)、中(100 mg/kg)、低(50 mg/kg)剂量刺梨总三萜,每天 1 次,连续灌胃 14 d,试验同时设置空白对照组(不注射 CTX,灌胃生理盐水)、模型组(灌胃生理盐水)、阳性对照组(灌胃 3 mg/kg 香菇多糖片),采集血样及胸腺和脾脏,测算全血白细胞数、胸腺和脾脏指数、血清细胞因子(IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α)水平及酸性磷酸酶(ACP)和乳酸脱氢酶(LDH)活力、脾脏组织丙二醛(MDA)含量和过氧化氢酶(CAT)活力;制作小鼠脾脏组织切片,HE 染色后观察。检测 0(空白对照组),1,25,2.5,5,10,20 $\mu\text{g/mL}$ (终质量浓度)刺梨总三萜对 RAW264.7 小鼠巨噬细胞增殖的影响,研究低、中、高剂量刺梨总三萜(终质量浓度分别为 1.25,2.5,5 $\mu\text{g/mL}$)对经脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞 NO 分泌量的影响。【结果】与模型组相比,不同剂量刺梨总三萜处理小鼠全血白细胞数量、胸腺和脾脏指数均显著或极显著升高,血清中的 IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α 水平大多显著或极显著升高,ACP 和 LDH 活力极显著提高(除低、中剂量组 LDH 活力外);脾脏 MDA 含量极显著降低($P<0.01$),CAT 活力极显著升高($P<0.01$);脾脏组织细胞数量和排列情况均得到了较大改善。1.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 刺梨总三萜能显著或极显著促进 RAW264.7 小鼠巨噬细胞增殖,5 $\mu\text{g/mL}$ 总三萜可显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 的分泌。【结论】刺梨总三萜能改善由 CTX 诱导的免疫功能抑制,提高机体抗氧化应激能力,促进小鼠 RAW264.7 巨噬细胞增殖,抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 分泌,具有潜在的抗炎免疫活性。

【关键词】刺梨;总三萜;免疫功能;RAW264.7;抗氧化

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2022)06-0011-09

Immunocompetence of total triterpenoids from *Rosa roxburghii* Tratt fruit

TIAN Qiang^{1,2}, LI Liangqun², PENG Mei², LI Yanmei², NIU Zhenpeng²,
LI Qiji², WANG Tao^{1,2}, YANG Xiaosheng^{1,2}

(1 Graduate School, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China;

2 State Key Laboratory of Medicinal Plant Efficacy and Utilization, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550014, China)

Abstract: 【Objective】This study investigated the effects of total triterpenoids of *Rosa roxburghii* Tratt (TR) on macrophages of immunosuppressed mice and RAW264.7 mouse and comprehensively evaluated the immunocompetence of TR. 【Method】TR were prepared. The immunosuppression model was constructed by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX) into SPF-grade healthy Kunming mice,

【收稿日期】2021-08-06

【基金项目】贵州省发改委工程中心项目(黔财建[2019]303号);贵州省科技创新能力建设专项(黔科合服企[2020]4013号);贵州省教育厅高等学校特色重点实验室项目(黔教合 KY 字[2020]018号)

【作者简介】田 强(1995—),男(土家族),贵州沿河人,在读硕士,主要从事民族食药植物资源的生物活性物质及其药理作用机制研究。E-mail:1602508667@qq.com

【通信作者】杨小生(1966—),男(仡佬族),贵州贵阳人,研究员,博士生导师,主要从事民族食药植物资源的高效生态利用研究。E-mail:gzcnp@sina.cn

and high (200 mg/kg), medium (100 mg/kg) and low (50 mg/kg) doses of TR were given by gavage once a day for 14 days. The experiment also set up a blank group (with no CTX injection and gavage of saline), a model group (with gavage of saline) and a positive control group (with gavage of 3 mg/kg mushroom polysaccharide tablets). Blood samples, thymus and spleen were collected for determining whole blood leukocyte count, thymus and spleen indexes, serum cytokine (IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- α) levels, acid phosphatase (ACP) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, spleen tissue malondialdehyde (MDA) levels and catalase (CAT) activity. Spleen sections of mice were prepared and observed after HE staining. The effects of TR levels of 0 (blank group), 1, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration) on the proliferation of macrophages in RAW264.7 mice were investigated. Then, the effects of low, medium and high doses of TR (with final concentrations of 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$) on NO secretion in macrophages of RAW264.7 mice induced by lipopolysaccharide (LPS) were studied. The experiment was also conducted in the blank group, TR group and model group. 【Result】 Compared with the model group, the whole blood leukocyte count, thymus and spleen indexes of mice treated with different doses of TR were significantly or very significantly increased. Most serum levels of IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- α were significantly or very significantly improved, ACP and LDH viability were very significantly increased (except for LDH viability at low and medium doses), while the spleen MDA level was very significantly decreased ($P < 0.01$). CAT activity was significantly increased ($P < 0.01$). The number and arrangement of splenic tissue cells were greatly improved. TR at levels of 1.25–5 $\mu\text{g/mL}$ significantly or every significantly promoted macrophage proliferation in RAW264.7 mice, while 5 $\mu\text{g/mL}$ of TR significantly inhibited LPS-induced NO secretion by macrophages. 【Conclusion】 TR can improve CTX-induced immune function suppression and enhance the resistance to oxidative stress, which can promote macrophage proliferation in RAW264.7 mice. It also can significantly inhibit LPS-induced NO secretion by macrophages, showing potential anti-inflammatory immune activity.

Key words: *Rosa roxburghii* Tratt; total triterpenoid; immune function; RAW264.7; antioxidant

药食两用植物资源由于存在天然的抗氧化和抗衰老等成分,在作为药物治疗疾病的同时兼有食品保健功能,因此引发越来越多科研人员的关注^[1]。刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt.)为蔷薇科蔷薇属植物缙丝花的果实,别名野刺梨、野石榴、茨梨、文光果、油刺果等^[2]。据文献记载,刺梨味甘、酸涩、性平,归脾、胃经,具有健胃、消食、止泻的作用,主治食积饱胀,肠炎腹泻,并具滋补强壮之功效^[3]。刺梨主要分布于贵州、云南、四川、湖南、湖北、陕西等地,其中贵州野生刺梨资源最为丰富,多分布在海拔 1 000~1 600 m 的山区丘陵地带^[4]。现代研究表明,刺梨富含维生素 C、超氧化物歧化酶(SOD)、黄酮、五环三萜、氨基酸、多糖等化学成分^[5-7],具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗癌等多种生物活性^[8-13]。刺梨为药食两用植物资源,富含多种营养成分和功效物质,具有很高的营养价值和药用价值,广泛应用于食品、医药、保健品等行业^[14-15]。

免疫功能障碍与诸多疾病的发生和发展息息相关^[16-18]。最新研究表明,肆虐全球的新冠肺炎病毒(COVID-19)与宿主的免疫系统也具相互联系,可以

提高机体的免疫功能并有助于患者的康复^[19]。刺梨总提物或刺梨汁由于具有抗氧化、改善机体免疫功能而表现出良好的免疫增强活性^[20-24],但目前对于刺梨中发挥免疫调节作用的物质基础尚不清楚,其中三萜类成分是否有免疫增强作用也有待进一步研究。基于此,本试验研究了刺梨总三萜对免疫抑制小鼠的影响,结合 RAW264.7 巨噬细胞试验,从体内外综合评价刺梨总三萜的免疫活性,初步探索其发挥免疫调节作用的可能机制,旨在为刺梨相关药物和免疫保健功能产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

刺梨鲜果采于贵州贵定敏子食品有限公司刺梨种植基地,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为蔷薇科植物缙丝花(*Rosa roxburghii* Tratt)的果实。

SPF 级昆明小鼠 60 只,雌雄各半,体质量 18~22 g/只,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号: XSCXK(辽)2020-0001;小鼠腹腔 RAW264.7 巨噬细胞,购于中国科学院干细胞库。

注射用环磷酰胺(Cyclophosphamide for injection,CTX),百特国际有限公司;香菇多糖片(Lentinan,LNT),武汉迪奥药业有限公司;白介素 IL-2、IL-4、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒,博士德生物工程有限公司;酸性磷酸酶(ACP)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)试剂盒,南京建成生物工程研究所;白细胞稀释液,北京索莱宝科技有限公司;PBS 缓冲液(pH 7.4),BIOEXPLORER;胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、双抗(10 kU/mL 青霉素+10 mg/mL 链霉素组成的 100 $\times$ 工作液),Gibco;二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),美国 Sigma 公司;注射用氯化钠,贵州科伦药业有限公司;NO 检测试剂盒(Nitric Oxide Assay Kit),上海碧云天生物技术有限公司。

多功能酶标仪,PerkinElmer 公司;冷冻离心机,Centrifuge 5427 R;电子天平,上海菁海仪器有限公司;倒置光学显微镜,Nikon;-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱、CO₂ 培养箱,Thermo。

1.2 刺梨总三萜的制备

参考文献[25]的方法制备刺梨总三萜(TR)。

1.3 刺梨总三萜对免疫抑制小鼠的影响

1.3.1 试验设计 将 SPF 级昆明小鼠(雌雄各半)于(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、光照 12 h/d、相对湿度 40%~45%的环境中饲养,自由进食、饮水。小鼠适应环境 1 周后,取 50 只,按 70 mg/(kg $\cdot$ d)的剂量腹腔注射 CTX,连续注射 7 d,构建免疫抑制小鼠模型。将 50 只建模小鼠按雌雄各半随机平均分为模型组(M)、阳性对照组(P)以及总三萜高剂量组(TH)、中剂量组(TM)和低剂量组(TL),另取 10 只正常 SPF 小鼠作为空白对照组(B)。空白对照组和模型组小鼠按每 10 g 体质量 0.1 mL 的剂量灌胃生理盐水;阳性对照组小鼠以 3 mg/kg 剂量灌胃香菇多糖片;总三萜高、中、低剂量组分别按 200、100 和 50 mg/kg 剂量灌胃刺梨总三萜。各组小鼠每天灌胃 1 次,连续 14 d。末次给药后禁食 12 h,称体质量,眼眶静脉丛采血,部分血样用于全血白细胞计数;其余血液冰浴静置 30 min,4 $^{\circ}$ C、3 500 r/min 离心 10 min,取血清,-20 $^{\circ}$ C 储存备用。取脾脏和胸腺,称质量,备测。剪取小鼠的部分脾脏,用 PBS 冲洗干净,用于制备组织切片,HE 染色后观察;其余脾脏样品冻存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3.2 全血白细胞数测定 取 0.5 mL 离心管,加

白细胞稀释液 380 μ L,再加 20 μ L 小鼠全血,立即混匀,待红细胞完全破坏,液体变成棕褐色后,再次混匀,取 10 μ L 冲池至细胞计数板上,室温静置 2~3 min,待白细胞沉淀后,置于显微镜低倍镜下依次计数四角 4 个大方格内的白细胞(N),计算白细胞数:白细胞数=($N\div 20$) $\times 10^9$ 。

1.3.3 小鼠免疫器官指数测定 计算小鼠胸腺指数和脾脏指数:胸腺指数=胸腺质量(mg)/体质量(g);脾脏指数=脾脏质量(mg)/体质量(g)。

1.3.4 血清细胞因子水平和酶活力测定 取冻存的血清,用 ELISA 试剂盒分别测定 IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 含量;按照试剂盒使用说明,测定 ACP 和 LDH 活力。

1.3.5 抗氧化能力测定 取脾脏组织样品约 50 mg,用眼科剪尽快剪碎成组织块,加入约 9 倍体积的生理盐水,在匀浆管中匀浆,制备体积分数 10%的匀浆液。将脾脏匀浆液 2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明分别测定丙二醛(MDA)含量和过氧化氢酶(CAT)活力。

1.3.6 脾损伤观察 将小鼠脾脏组织冲洗干净,放入体积分数 4%的多聚糖甲醛溶液中固定 24 h,脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红染色中性树胶封片,显微镜观察、拍照。

1.4 刺梨总三萜对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的影响

1.4.1 对 RAW264.7 细胞增殖的影响 将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种于高糖 DMEM 完全培养基中(含有体积分数 10% FBS 和 1% 双抗),置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。选择对数生长期的 RAW264.7 细胞,调整其密度为 4 $\times 10^4$ mL⁻¹,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 90 μ L,过夜培养后,设置 1.25,2.5,5,10,20 μ g/mL(终质量浓度)刺梨总三萜组及空白对照组,每组 5 孔重复。刺梨总三萜组每孔加相应质量浓度药物 10 μ L,空白对照组加等体积的无血清培养基,继续培养 24 h;弃去上清液,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL)溶液,于 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h;弃去上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 溶液,振荡混匀后于 490 nm 处测定吸光值(OD₄₉₀)。设置 3 次独立试验获得最终结果,计算细胞增殖率。细胞增殖率=(试验组 OD₄₉₀/空白对照组 OD₄₉₀) $\times 100\%$ 。

1.4.2 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响 将 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板,每孔 450 μ L,细胞接种量为 5 $\times 10^5$ 孔⁻¹,培养过夜后,分为空白对照组、总三萜 TR 组、模型组及总三萜低、中、高剂量

组。模型组和总三萜低、中、高剂量组给予一定体积的 LPS(终质量浓度 $6\text{ }\mu\text{g/mL}$)诱导,空白对照组和 TR 组用等量无血清培养基补足。2 h 后,总三萜低、中、高剂量组加一定体积的总三萜,使其终质量浓度分别为 $1.25, 2.5, 5\text{ }\mu\text{g/mL}$,TR 组给予总三萜,使其终质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$;空白对照组和模型组用等体积无血清培养基补足。给药后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h,每孔吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 培养上清液于 96 孔板中,重复 3 孔,按照 NO 检测试剂盒说明书操作,每孔分别添加 Griess I 和 Griess II 试剂各 $50\text{ }\mu\text{L}$,振荡混匀后,于 540 nm 波长处检测其 OD 值(OD_{540})。设置 3 次独立试验获得最终结果。依照事先绘制的 NaNO_2 标准曲线(按照 NO 检测试剂盒绘制),计算细胞上清液中的 NO 浓度。

1.5 数据统计分析

结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。试验数据使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件作图及统计学分析,多组数据之间的差异采用单因素方差分析与 Bonferroni 校正。

2 结果与分析

2.1 刺梨总三萜对小鼠全血白细胞数的影响

由图 1 可知,与空白对照组相比,模型组小鼠白细胞数极显著降低($P<0.01$),表明其免疫力减退,免疫抑制小鼠模型构建成功。与模型组相比,阳性对照组和总三萜低、中、高剂量组小鼠血液中的白细胞数量均极显著升高($P<0.01$),且不同剂量总三萜组高于阳性对照组,表明刺梨总三萜可提高免疫抑制小鼠的白细胞数量,且效果优于香菇多糖片。阳性对照组和总三萜低、中、高剂量组的白细胞数量虽低于空白对照组,但差异不明显。

2.2 刺梨总三萜对小鼠免疫器官指数的影响

由图 2 可见,与空白对照组相比,模型组小鼠的

胸腺指数和脾脏指数均极显著降低($P<0.01$),说明建模成功。与模型组相比,阳性对照组和总三萜低剂量组胸腺指数显著升高($P<0.05$),总三萜中剂量组和高剂量组胸腺指数极显著升高($P<0.01$);与模型组相比,总三萜低剂量组脾脏指数显著升高($P<0.05$),阳性对照组和总三萜中、高剂量组脾脏指数均极显著升高($P<0.01$)。与空白对照组相比,阳性对照组和总三萜低、中剂量组胸腺指数有所降低;阳性对照组和总三萜中、高剂量组脾脏指数略有升高,总三萜低剂量组脾脏指数略有降低;但均无显著性差异。

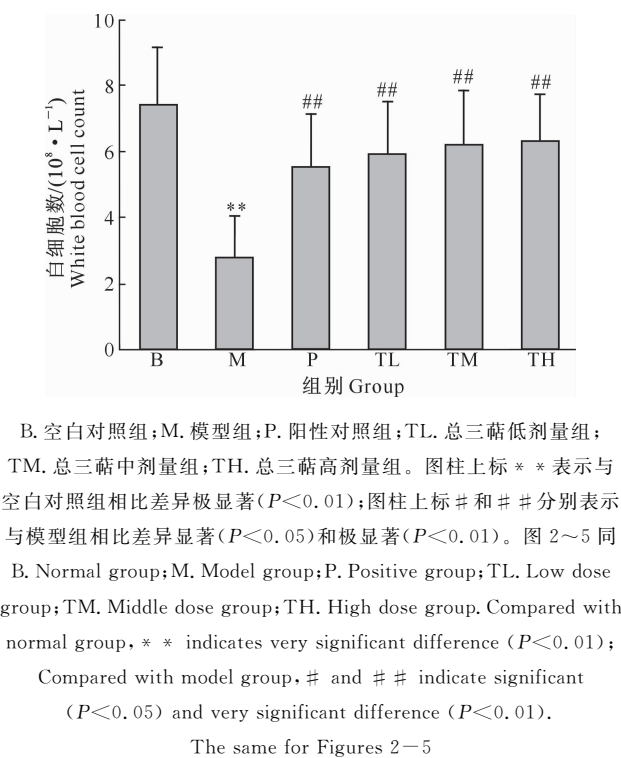


图 1 刺梨总三萜对小鼠全血白细胞数的影响
Fig.1 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on total white blood cell count in mice

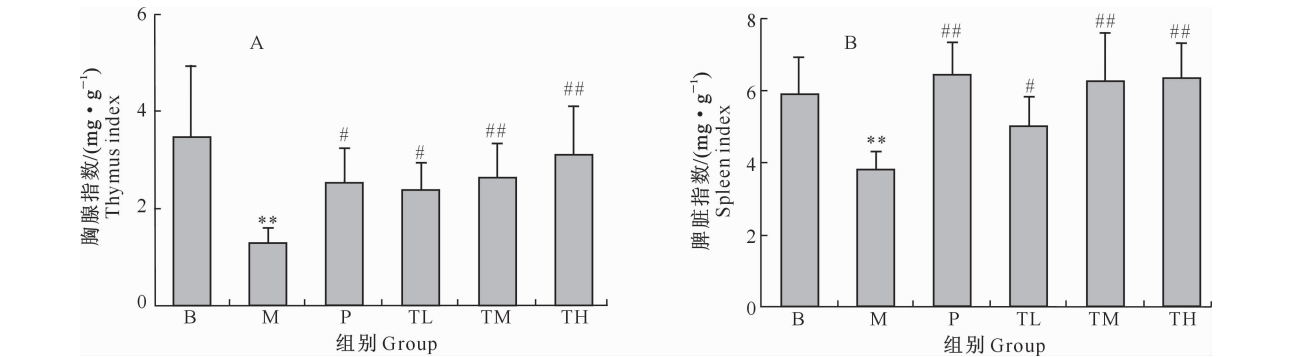


图 2 刺梨总三萜对小鼠胸腺指数(A)和脾脏指数(B)的影响
Fig. 2 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on body thymus index (A) and spleen index (B) of mice

2.3 刺梨总三萜对小鼠血清中免疫因子水平和酶活力的影响

由表1可以看出,与空白对照组相比,模型组小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6和TNF-α水平均极显著降低($P<0.01$),这说明环磷酸胺可以抑制小鼠的

免疫功能。与模型组相比,不同剂量总三萜组小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6和TNF-α水平升高(除低剂量组IL-4水平外),尤其是IL-2和IL-6水平升高明显,均达显著水平,这说明刺梨总三萜可以通过调节细胞因子的水平改善由环磷酸胺诱导的免疫抑制。

表1 刺梨总三萜对小鼠血清中细胞因子含量的影响($n=10$)

Table 1 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt in serum cytokine content of mice($n=10$)

组别 Treatment group	IL-2/(ng·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
空白对照组 Normal group	42.20±21.14	128.67±23.41	77.49±21.74	643.51±81.29
模型组 Model group	15.45±5.76**	96.88±14.46**	46.88±5.67**	431.41±13.60**
阳性对照组 Positive control group	23.48±12.37	114.39±15.10#	83.89±21.18#	524.33±63.58#
总三萜低剂量组 Low dose group of TR	75.33±13.66##	81.71±13.16	69.05±21.05#	529.85±59.36#
总三萜中剂量组 Middle dose group of TR	79.07±18.16##	115.10±4.89#	113.54±7.89#	433.42±14.14
总三萜高剂量组 High dose group of TR	79.62±14.93##	101.93±7.90#	73.68±16.27#	466.54±31.05

注:与空白对照组比较,同列数据后标**表示差异极显著($P<0.01$);与模型组比较,同列数据后标#表示差异显著($P<0.05$),标##表示差异极显著($P<0.01$)。
Note:Compared with normal group,** shows very significant difference ($P<0.01$);Compared with model group,# and ## show significant ($P<0.05$) and very significant difference ($P<0.01$).

由图3可知,模型组小鼠血清中的ACP和LDH活力均极显著低于空白对照组($P<0.01$)。与模型组相比,阳性对照组和总三萜低、中、高剂量组的ACP活力均极显著提高($P<0.01$);阳性对照

组和总三萜高剂量组的LDH活力极显著提高($P<0.01$)。该结果表明,刺梨总三萜可上调免疫抑制小鼠体内ACP和LDH的活力。

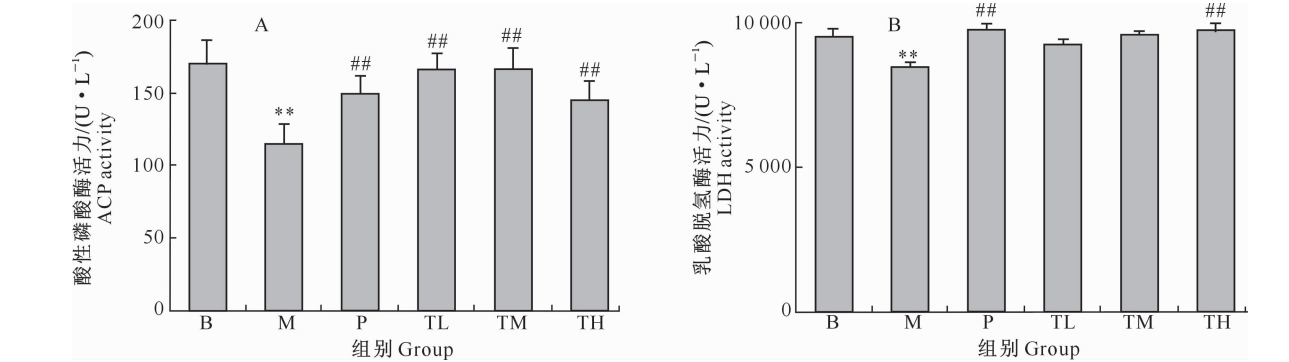


图3 刺梨总三萜对小鼠血清中ACP(A)和LDH(B)活力的影响

Fig. 3 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on ACP(A) and LDH(B) activity in serum of mice

2.4 刺梨总三萜对小鼠脾脏抗氧化能力的影响

刺梨总三萜对小鼠MDA含量和CAT活力的影响见图4。

影响见图4。

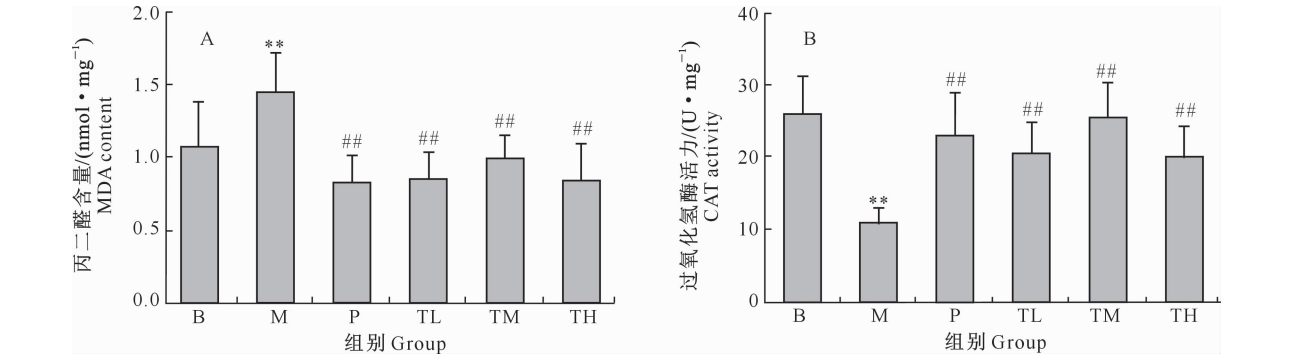


图4 刺梨总三萜对小鼠MDA含量(A)和CAT活力(B)的影响

Fig. 4 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on MDA(A) content and CAT(B) activity in mice

由图 4 可知,在本试验设置的 6 个组中,与空白对照组相比,模型组小鼠脾脏中的 MDA 含量极显著升高($P<0.01$),CAT 活力极显著降低($P<0.01$),表明建模成功。与模型组相比,阳性对照组和总三萜低、中、高剂量组的 MDA 含量均极显著降低($P<0.01$),CAT 活力均极显著升高($P<0.01$)。结果表明,刺梨总三萜可提高免疫抑制小鼠的抗氧化能力。

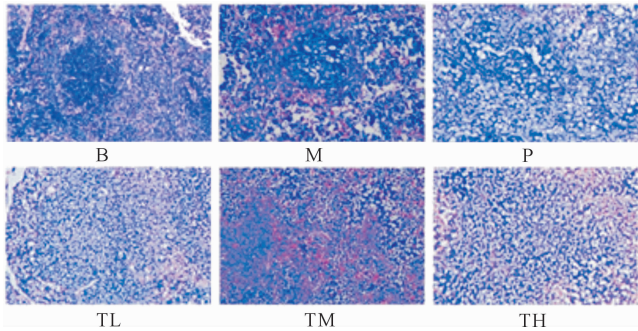


图 5 刺梨总三萜对小鼠脾脏形态结构的影响(200×)

Fig. 5 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on mice spleen(200×)

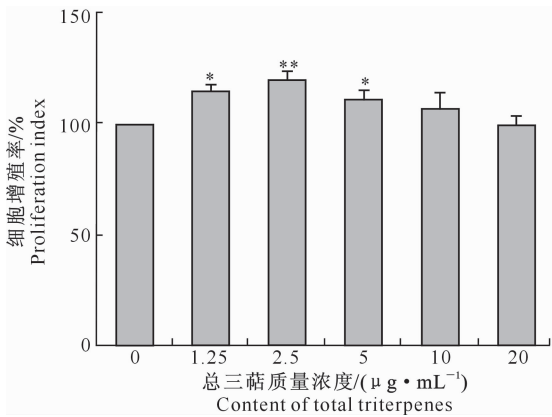
2.6 刺梨总三萜对 RAW264.7 细胞增殖的影响

由图 6 可以看出,与空白对照组(0 $\mu\text{g/mL}$ 刺梨总三萜)相比,刺梨总三萜处理组小鼠巨噬细胞的增

2.5 刺梨总三萜对小鼠脾损伤的影响

染色观察结果(图 5)显示,空白对照组(B 组)小鼠的脾脏组织结构正常,细胞排列未见异常。模型组(M 组)脾脏组织细胞数量明显减少,排列无序。与模型组相比,阳性对照组(P 组)和刺梨总三萜低、中、高剂量组(TL、TM、TH 组)细胞较多,排列紧密。结果表明,刺梨总三萜可以缓解由 CTX 所致的免疫器官损伤。

殖率均升高,当刺梨总三萜的终质量浓度为 1.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 时,巨噬细胞增殖率显著或极显著升高。



图柱上标 * 和 ** 分别表示各组间差异显著 ($P<0.05$) 和极显著 ($P<0.01$); 下图同

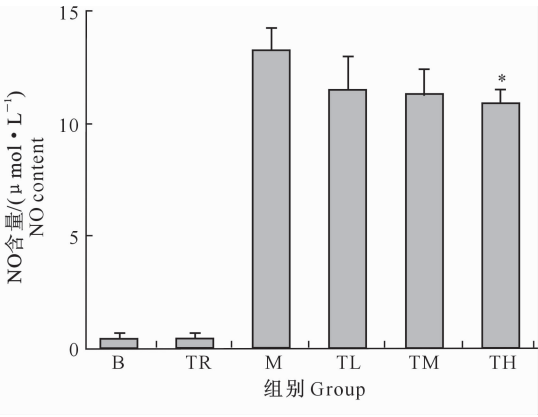
* and ** indicate significant ($P<0.05$) and very significant difference ($P<0.01$) between different group. The same below

图 6 刺梨总三萜对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

Fig. 6 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on proliferation index of RAW264.7 cells

2.7 刺梨总三萜对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

由图 7 可知,TR 组 NO 含量与空白对照组无显著性差异,表明刺梨总三萜(5 $\mu\text{g/mL}$)单独作用 RAW264.7 细胞时,对巨噬细胞 NO 的分泌量没有



B. 空白对照组; TR. 总三萜组(5 $\mu\text{g/mL}$); M. 模型组; TL. 总三萜低剂量组; TM. 总三萜中剂量组; TH. 总三萜高剂量组

B. Normal group; TR. Total triterpenes group; M. Model group; TL. Low dose group; TM. Middle dose group; TH. High dose group

图 7 刺梨总三萜对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

Fig. 7 Effects of total triterpenes from *Rosa roxburghii* Tratt on NO secretion of RAW264.7 cells

影响。总三萜低、中、高剂量组 NO 含量较模型组明显降低,其中高剂量组差异达显著水平,表明总三萜可降低 LPS 诱导的巨噬细胞的 NO 分泌。结果提示,刺梨总三萜具有潜在的抗炎活性。

3 讨论与结论

免疫器官和免疫细胞因子水平、相关酶的变化是机体产生免疫应答的表现^[26]。CTX是一种常用的免疫抑制剂,可降低机体的免疫器官指数及淋巴细胞和吞噬细胞的活性^[27-29]。本研究通过给小鼠腹腔注射CTX构建免疫抑制模型,结果显示,与空白对照组相比,模型组小鼠的全血白细胞数量及胸腺指数和脾脏指数均极显著降低,说明免疫抑制小鼠模型建模成功。

胸腺、脾脏作为重要的免疫器官,与机体的免疫功能紧密相关。血液白细胞数量和免疫器官变化是机体免疫功能变化最直观的反映,当免疫功能受到抑制时,常伴随着白细胞数量和免疫器官指数的降低^[28-30]。本研究发现,与模型组比较,总三萜试验组小鼠白细胞数量和胸腺脾脏指数显著或极显著升高,脾脏组织中的细胞数量和排列情况得到了极大改善,说明刺梨总三萜能缓解CTX对胸腺、脾脏的损伤,提升免疫细胞的数量,增强机体免疫功能。

巨噬细胞是机体内非常重要的一类免疫细胞,其作用是吞噬、杀灭外来病原体并释放细胞因子而参与免疫应答,而ACP和LDH的活性能够直观地反映巨噬细胞的激活程度^[31-33]。本研究结果显示,与模型组比较,刺梨总三萜各剂量组小鼠的ACP活力极显著增强,高剂量组的LDH活力极显著升高($P<0.01$),这说明刺梨总三萜可以调节小鼠体内的ACP和LDH活力。另外,体外细胞试验结果显示,1.25~5 $\mu\text{g/mL}$ 刺梨总三萜可显著或极显著促进RAW264.7小鼠巨噬细胞的增殖。在用LPS诱导巨噬细胞构建炎症模型基础上,检测巨噬细胞的NO分泌量可用于评价药物潜在的抗炎活性^[34]。本研究发现,刺梨总三萜直接作用于巨噬细胞,对细胞的NO分泌量无显著影响,但可显著降低LPS诱导的巨噬细胞的NO分泌量。这表明刺梨总三萜具有潜在的抗炎免疫活性,其具体的作用机制有待进一步探究。

细胞因子具有多种免疫功能,并参与免疫调节。小鼠Th1亚群分泌产生IL-2, Th2亚群分泌产生IL-4, IL-2和IL-4均能促进T细胞的增殖,且IL-4还可以增强B细胞的提呈抗原能力,提升IgG1和IgE水平,使免疫系统对抗原刺激产生免疫反应^[35-37]。IL-6和TNF- α 是巨噬细胞主要的细胞因子,IL-6存在于多种免疫反应中,可以促进淋巴细胞的增殖、分化;TNF- α 作为促炎细胞因子,能直接

杀灭肿瘤细胞,参与宿主的炎症反应和免疫反应^[38-39]。本研究结果显示,与模型组比较,刺梨总三萜处理小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6和TNF- α 的含量整体明显升高,说明其可通过影响小鼠血清中的免疫细胞因子水平而发挥免疫调节作用。

MDA是免疫系统产生的一种脂质过氧化物,对体内自由基代谢异常反应较为灵敏^[40];CAT可以减少毒性氢氧自由基的形成,保护抗氧化系统^[41-42]。本研究结果显示,与模型组比较,刺梨总三萜处理组小鼠脾脏组织的MDA含量极显著降低($P<0.01$),而CAT极显著增强($P<0.01$),说明刺梨总三萜可以通过提升小鼠抗氧化应激能力而发挥免疫调节作用。

[参考文献]

- [1] Xu D P, Li Y, Meng X, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 96.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 苗药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 334.
Editorial Board of Chinese Materia medica, National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica: Miao medicine volume [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999: 334.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第四卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 236.
Editorial Board of Chinese Materia Medica, National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica (Volume 4) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999: 236.
- [4] 张丽婷, 聂祥志, 蹇黎. 野生刺梨种质资源的SWOT分析 [J]. 现代园艺, 2017(9): 37-38.
Zhang L T, Nie X Z, Jian L. SWOT analysis of wild germplasm resources of *Rosa roxburghii* [J]. Xiandai Horticulture, 2017(9): 37-38.
- [5] 李齐激, 南莹, 秦晶晶, 等. 药食两用植物刺梨的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 451-455.
Li Q J, Nan Y, Qin J J, et al. Chemical constituents from medicinal and edible plants of *Rosa roxburghii* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(3): 451-455.
- [6] 代甜甜, 李齐激, 南莹, 等. 刺梨抗氧化活性部位的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 62-65.
Dai T T, Li Q J, Nan Y, et al. Chemical components of antioxidant activity parts of *Rosa roxburghii* fruit [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(21): 62-65.
- [7] 梁梦琳, 李清, 龙勇兵, 等. 刺梨的化学成分鉴定及其抗菌活性 [J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 10-13.
Liang M L, Li Q, Long Y B, et al. Identification of chemical

- constituents of *Rosa roxburghii* and their antibacterial [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(5): 10-13.
- [8] 戴支凯, 余丽梅, 杨小生, 等. 刺梨提取单体 CL-1 对胃癌细胞系增殖的抑制作用 [J]. 遵义医学院学报, 2005(5): 405-408.
Dai Z K, Yu L M, Yang X S, et al. Proliferation inhibition effects of CL-1, a monomer of *Rosa roxburghii* Tratt, on gastro carcinoma cells *in vitro* [J]. Journal of Zunyi Medical College, 2005(5): 405-408. (in English)
- [9] 戴支凯, 余丽梅, 杨小生, 等. 刺梨三萜化合物 CL1 体外抗人子宫内腺癌作用 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1656-1658.
Dai Z K, Yu L M, Yang X S, et al. Effects of triterpenoid CL1 on human endometrial adenocarcinoma *in vitro* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(7): 1656-1658.
- [10] Chen G J, Kan J Q. Ultrasound-assisted extraction, characterization, and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) fruit [J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(3): 1083-1092.
- [11] Xu P, Liu X X, Xiong X W, et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt exhibit anti-apoptosis properties by regulating PARP-1/AIF [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11): 3943-3952.
- [12] Xu Y Y, Yu C, Zeng Q B, et al. Assessing the potential value of *Rosa roxburghii* Tratt in arsenic-induced liver damage based on elemental imbalance and oxidative damage [J]. Environ Geochem Health, 2021, 43(3): 1165-1175.
- [13] Yuan H F, Wang Y R, Chen H, et al. Protective effect of flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt on myocardial cells via autophagy [J]. 3 Biotech, 2020, 10(2): 58.
- [14] Xu J W, Vidyarthi S K, Bai W B, et al. Nutritional constituents, health benefits and processing of *Rosa roxburghii*: a review [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 103456.
- [15] 金 晶, 金 平, 吴洪娥, 等. 贵州蔷薇属植物资源调查与应用研究 [J]. 种子, 2020, 39(8): 61-65, 69.
Jin J, Jin P, Wu H E, et al. Investigation and application of *Rosa* plant resources in Guizhou [J]. Seed, 2020, 39(8): 61-65, 69.
- [16] Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder [J]. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2016, 76(4): 257-268.
- [17] Cohen G, Vanholder R. Special issue: immune dysfunction in uremia [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(1): 70.
- [18] Fuentes E, Fuentes M, Alarcon M, et al. Immune system dysfunction in the elderly [J]. An Acad Bras Cienc, 2017, 89(1): 285-299.
- [19] Gorji A, Khaleghi Ghadiri M. Potential roles of micronutrient deficiency and immune system dysfunction in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic [J]. Nutrition, 2021, 82: 111047.
- [20] 刘铭洁, 詹继红, 郭银雪, 等. 刺梨冻干粉对肾纤维化模型大鼠的影响及干预机制研究 [J]. 临床肾脏病杂志, 2017, 17(6): 366-371.
Liu M J, Zhan J H, Guo Y X, et al. Effect of cili freeze-dried powder on renal fibrosis model in rats and intervention mechanism [J]. Journal of Clinical Nephrology, 2017, 17(6): 366-371.
- [21] 李 军, 张爱华, 徐玉艳, 等. 强化 SOD 刺梨汁对燃煤型砷中毒大鼠免疫损伤的干预作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(2): 233-237.
Li J, Zhang A H, Xu Y Y, et al. Intervention effects of SOD-enriched cili juice on immune function in arseniasis rats caused by coal burning [J]. Chin J Pharm Toxicol, 2014, 28(2): 233-237.
- [22] 李梦云, 邱荣超, 杨建平, 等. 刺梨提取物对小鼠免疫器官指数血液指标及抗氧化功能的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(9): 51-54.
Li M Y, Qiu R C, Yang J P, et al. Effects of *Rosa roxburghii* Tratt extracts on immune organ index, blood parameters and antioxidant function in mice [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(9): 51-54.
- [23] 杨建平, 姬向波, 石志芳, 等. 刺梨粗提物对肉鸡生长性能、免疫器官指数和抗氧化能力的影响 [J]. 家畜生态学报, 2016, 37(10): 30-33, 54.
Yang J P, Ji X B, Shi Z F, et al. Effects of extract of *Rosa roxburghii* Tratt. on growth performance, immune organ index and antioxidation in broilers [J]. Chinese Journal of Domestic Animal Ecology, 2016, 37(10): 30-33, 54.
- [24] 相聪坤. 强化 SOD 刺梨汁对砷中毒大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(2): 233-234.
Xiang C K. Effect of SOD-enriched cili juice on immune function of rats with arsenic poisoning [J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2016, 31(2): 233-234.
- [25] 代甜甜, 李齐渡, 陈晓靓, 等. 刺梨总三萜的提取及含量测定 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2018, 36(3): 36-39.
Dai T T, Li Q J, Chen X L, et al. Extraction and determination of total triterpenoids from *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Science Edition), 2018, 36(3): 36-39.
- [26] Furman D, Davis M M. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection [J]. Vaccine, 2015, 33(40): 5271-5281.
- [27] de Jonge M E, Huitema A D, Rodenhuis S, et al. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide [J]. Clin Pharmacokinet, 2005, 44(11): 1135-1164.
- [28] Liu Y J, Wu X L, Jin W H, et al. Immunomodulatory effects of a low-molecular weight polysaccharide from enteromorpha prolifera on RAW264. 7 macrophages and cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse models [J]. Mar Drugs, 2020, 18(7): 340.
- [29] Bai R B, Zhang Y J, Fan J M, et al. Immune-enhancement effects of oligosaccharides from *Codonopsis pilosula* on cyclophosphamide induced immunosuppression in mice [J]. Food Funct, 2020, 11(4): 3306-3315.
- [30] Huan X H, Lin Y P, Gao T, et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte

- subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice [J]. *Int Immunopharmacol*,2011,11(9):1293-1297.
- [31] Belska N V,Guriev A M,Danilets M G,et al. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response [J]. *Int Immunopharmacol*,2010,10(8):933-942.
- [32] Chen X M,Lu J X,Zhang Y D,et al. Studies of macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes* [J]. *Int J Biol Macromol*,2008,43(3):252-256.
- [33] Du J,Zhu H X,Liu P,et al. Immune responses and gene expression in hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* challenged by a novel pathogen spiroplasma MR-1008 [J]. *Fish Shellfish Immunol*,2013,34(1):315-323.
- [34] Su C H,Lu M K,Lu T J,et al. A (1→6)-Branched (1→4)-β-d-Glucan from *Grifola frondosa* inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in RAW264. 7 macrophages by binding to TLR2 rather than Dectin-1 or CR3 receptors [J]. *J Nat Prod*,2020,83(2):231-242.
- [35] Kumar A,Rani L,Mhaske S T,et al. IL-3 receptor wxpression on activated human Th cells is regulated by IL-4,and IL-3 synergizes with IL-4 to enhance Th2 cell differentiation [J]. *J Immunol*,2020,204(4):819-831.
- [36] Tang C,Sun J,Zhou B,et al. Effects of polysaccharides from purple sweet potatoes on immune response and gut microbiota composition in normal and cyclophosphamide treated mice [J]. *Food Funct*,2018,9(2):937-950.
- [37] Zanno A E,Romer M A,Fox L,et al. Reducing Th2 inflammation through neutralizing IL-4 antibody rescues myelination in IUGR rat brain [J]. *J Neurodev Disord*,2019,11(1):34.
- [38] Gupta U,Hira S K,Singh R,et al. Essential role of TNF-α in gamma c cytokine aided crosstalk between dendritic cells and natural killer cells in experimental murine lymphoma [J]. *Int Immunopharmacol*,2020,78:106031.
- [39] Voirin A C,Perek N,Roche F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6,IL-17,TNF-α) leads to a loss of integrity on bEnd. 3 endothelial cells *in vitro* BBB model [J]. *Brain Res*,2020,1730:146647.
- [40] Zhang Y C,Li Z S,Ma Y,et al. Association of total oxidant status, total antioxidant status,and malondialdehyde and catalase levels with psoriasis;a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Rheumatol*,2019,38(10):2659-2671.
- [41] El-Kheshen G,Moeini M,Saadat M. Susceptibility to ulcerative colitis and genetic polymorphisms of A251G SOD1 and C-262T CAT [J]. *J Med Biochem*,2016,35(3):333-336.
- [42] Wan B S,Zhang Q F,Ni J J,et al. Type VI secretion system contributes to enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS) [J]. *PLoS Pathog*,2017,13(3):e1006246.