

刺梨汁对免疫功能的影响

研究生 严卫星

导师 戴寅 徐晋康

卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

摘要 以小鼠饮水补充刺梨汁,浓度为刺梨原汁稀释6倍、20倍、50倍、100倍,其抗坏血酸含量分别为每ml含2.50mg、0.75mg、0.30mg和0.15mg,并设相同剂量的抗坏血酸作对照。对淋巴细胞转化反应,白细胞介素II的产生,抗体形成细胞以及干扰素等指标进行了研究。结果表明在15天喂养实验中,刺梨汁对以上各指标均无影响。当实验时间延长至35天时,可观察到刺梨汁能够促进抗体形成细胞的产生。然而,对其它指标没有影响。

刺梨属蔷薇科植物,其味酸甜,微涩,有特殊浓郁的香味,可食用,酿酒和入药。80年代,罗登义教授就对刺梨进行了化学成分的分析,发现其含有大量的抗坏血酸,此外还含有B族维生素、胡萝卜素、有机酸、纤维素以及多种微量元素^[1]。刺梨在《本草纲目》上就记载有“食之可解闷消积滞”,具有消食健胃、清热利尿之功效。目前,对刺梨的防癌作用引人注目。吴立夫等^[2]的研究结果表明刺梨汁在和化学致癌物二甲基亚硝胺的前物氨基比林、硝酸钠同时给大鼠灌服时,显示出对肝脏毒性的明显防护作用。实验提示刺梨汁有效地阻断了二甲基亚硝胺的体内合成。林东昕^[3]的实验结果显示,刺梨汁对动物和人体内N—亚硝基脯氨酸的合成有明显的阻断作用,且其作用效果优于刺梨汁中相同含量的抗坏血酸。提示刺梨中除了抗坏血酸外可能还有其他成分能阻断体内的亚硝化。另外,刺梨汁还可阻断N—亚基乙基脒在孕鼠体内合成及其经胎盘对仔鼠的致癌作用。刺梨是我国特产的野果,作为一种天然食品其阻断致癌物的形成而显示出可能有的

防癌结果。然而,其对免疫系统的作用如何,尚未见文献报道。因此,研究刺梨汁对免疫系统的影响,有助于从免疫学的角度阐明刺梨汁防治肿瘤及其它疾病的作用机制,为刺梨的广泛开发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 刺梨汁 贵阳市刺梨产品开发公司产的刺梨原汁,(北京医科大学宋圃菊教授提供)经测定其抗坏血酸含量为15mg/ml。

1.1.2 实验动物 C₅₇BL/6J 雌性小鼠由中国医学科学院实验动物中心提供,体重17—19g。

1.1.3 实验动物分组

15天喂养实验 共分9组。对照组;刺梨汁I、II、III、IV组,分别为刺梨汁原液稀释6、20、50、及100倍,其抗坏血酸含量分别为每ml含2.50、0.75、0.30及0.15mg;抗坏血酸I、II、III、IV组,剂量分别为每12.50、0.75、0.30、0.015mg。

35天喂养实验 共分7组。去除15天喂养实验中的刺梨汁I组和抗坏血酸I组,

选用 15 天喂养实验中余下的 7 组作为该实验的剂量组。实验小鼠随机分组。自由进食。对照组自由饮用自来水,各实验组自由饮用刺梨汁稀释液或抗坏血酸液。

1.1.4 标准品与细胞系

小鼠干扰素标准品 中国军事医学科学院微生物与流行病学研究所制品。

大鼠白细胞介素 II 标准品 美国 SIGMA 公司。

水泡性口膜炎病毒 (VSV) Indiana 株, (中国医学科学院医用生物技术研究室病毒室赠)。VSV 用鸡胚纤维母细胞传代, $TCID_{50}$ 为 10^{-5} 。($TCID_{50}$ 指能使 50% 细胞出现病变效应的最高病毒稀释度)。

鼠 L-929(L₉₂₉B) 细胞系 中国医学科学院运动生物技术研究室病毒室提供。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾淋巴细胞转化反应 MTT 比色分析法^[4,5]。

1.2.2 抗体形成细胞溶血空斑试验 琼脂玻片法^[6]。

1.2.3 小鼠体内诱生干扰素试验 微量细胞病变抑制观察法^[7]。

1.2.4 白细胞介素 II (IL-2) 活性测定^[5,8]

IL-2 的制备 小鼠在给予不同剂量的刺梨汁及抗坏血酸 15 天或 35 天后处死, 无菌

取脾, 制成脾细胞悬液, 浓度为 5×10^6 个/ml, 加 ConA 5ug/ml, 置二氧化碳培养箱内培养 48h 后, 离心取上清液即为粗制的 IL-2, 置 -20°C 保存。ConA 对照以 RPMI1640 培养液代替脾细胞。

ConA 活化小鼠脾细胞的制备 (白细胞介素 II 活性检测细胞) 取未经任何处理正常的 C₅₇BL/6J 小鼠, 颈椎脱位处死, 无菌取脾, 制成脾细胞悬液, 调整细胞数为 5×10^6 /ml, 加入 ConA 5ug/ml, 二氧化碳培养箱中培养 48h, 收集培养细胞, 再用含 2-甲基甘露糖苷的 RPMI1640 培养液洗三次, 然后重悬于 RPMI1640 培养液中, 调整细胞数为 5×10^6 个/ml。

鼠白细胞介素 II 活性测定 MTT 比色分析法。

2 结果

表 1 35 天实验小鼠脏器与体重比值 ($\bar{X} \pm SE$)

组 别	动物数	脾 / 体比值	胸腺 / 体比值
		(mg/g)	(mg/g)
对 照 组	25	5.440 ± 0.114	3.105 ± 0.093
刺梨汁 II 组	25	5.726 ± 0.233	3.472 ± 0.129
抗坏血酸 II 组	24	5.781 ± 0.161	3.371 ± 0.133
刺梨汁 III 组	25	5.679 ± 0.227	3.351 ± 0.143
抗坏血酸 IV 组	25	5.601 ± 0.159	3.173 ± 0.090
刺梨汁 IV 组	25	5.971 ± 0.256	3.305 ± 0.124
抗坏血酸 IV 组	25	5.926 ± 0.337	3.199 ± 0.106

表 2 15 天和 35 天实验小鼠脾淋巴细胞转化反应

组 别	15 天 实 验		35 天 实 验	
	动物数	OD 值 ($\bar{X} \pm SE$)	动物数	OD 值 ($\bar{X} \pm SE$)
对 照 组	10	0.407 ± 0.035	20	0.453 ± 0.021
刺梨汁 I 组	12	0.420 ± 0.027		
抗坏血酸 I 组	12	0.392 ± 0.018		
刺梨汁 II 组	11	0.452 ± 0.026	20	0.503 ± 0.019
抗坏血酸 II 组	12	0.425 ± 0.018	18	0.488 ± 0.026
刺梨汁 III 组	10	0.407 ± 0.027	20	0.474 ± 0.021
抗坏血酸 III 组	12	0.408 ± 0.019	20	0.464 ± 0.025
刺梨汁 IV 组	12	0.456 ± 0.031	20	0.445 ± 0.019
抗坏血酸 IV 组	11	0.470 ± 0.029	20	0.470 ± 0.018

2.1 刺梨汁对小鼠脏器与体重比值的影响

15 天或 35 天喂养实验各剂量组的脾脏与体重比和胸腺与体重比与对照组之间均无显著差别,见表 1。15 天实验结果略。

2.2 对小鼠脾脏淋巴细胞转化反应的影响

表 2 显示 15 天或 35 天喂养实验小鼠脾

淋巴细胞转化反应,结果表明各实验组与对照组相比差别无显著性。

2.3 对小鼠白细胞介素 II 产生的影响

本实验采用 MTT 比色分析法测定样品中的白细胞介素 II,结果显示 15 天喂养实验以及 35 天喂养各组白细胞介素 II 的产生均无显著差别,见表 3。

表 3 15 天和 35 天实验小鼠 IL-2 的测定

组 别	15 天		35 天	
	动物数	OD 值 ($\bar{X} \pm SE$)	动物数	OD 值 ($\bar{X} \pm SE$)
对 照 组	17	0.149 $\pm$ 0.022	16	0.160 $\pm$ 0.018
刺梨汁 I 组	20	0.192 $\pm$ 0.020		
抗坏血酸 I 组	16	0.183 $\pm$ 0.021		
刺梨汁 II 组	17	0.153 $\pm$ 0.020	20	0.169 $\pm$ 0.015
抗坏血酸 II 组	17	0.140 $\pm$ 0.024	20	0.165 $\pm$ 0.015
刺梨汁 III 组	15	0.172 $\pm$ 0.029	20	0.147 $\pm$ 0.014
抗坏血酸 III 组	15	0.121 $\pm$ 0.015	20	0.158 $\pm$ 0.016
刺梨汁 IV 组	16	0.133 $\pm$ 0.024	20	0.128 $\pm$ 0.015
抗坏血酸 IV 组	15	0.143 $\pm$ 0.035	20	0.111 $\pm$ 0.014

2.4 对小鼠抗体形成细胞的影响

由表 4 可见,15 天喂养实验各组抗体形成细胞数(PFC)无显著差异。当实验延长至 35 天时,对照组小鼠的抗体形成细胞数(1587 $\pm$ 81)显著低于各实验组($P < 0.05$)。然而,刺梨汁和抗坏血酸各剂量组间以及刺梨汁组与抗坏血酸组间的差别均无统计学意义。

2.5 血清干扰素滴度的测定

本试验采用微量细胞病变抑制法检测血清中的干扰素滴度,结果显示 15 天及 35 天喂养实验各组血清对水泡性口膜炎病毒引起的鼠 L-929 细胞病变均无保护作用。

3 讨论

刺梨汁对机体免疫功能的影响尚未见报道。刺梨汁富含抗坏血酸,而抗坏血酸与机体免疫功能的实验研究较多,但结果并不完全一致。

3.1 淋巴细胞转化反应

淋巴细胞转化反应是细胞免疫功能的重要指标之一。体外淋巴细胞对非特异性有丝分裂原的反应是一个已被公认的反应体内淋巴细胞遇到外部抗原而进行克隆增殖能力的指标。

关于抗坏血酸对实验动物及人淋巴细胞转化功能影响的研究结果不一致。Delafuente 等^[9]的实验结果表明,老年人每天口服抗坏血酸,其淋巴细胞转化反应没有改变;正常志愿者补充抗坏血酸和人为造成抗坏血酸缺乏,结果表明淋巴细胞对有丝分裂素的反应在补充期和缺乏期无差异^[10];Zweiman^[11]等的研究工作显示,坏血病豚鼠的外周血淋巴细胞具有完好的对有丝分裂原的反应能力,抗坏血酸不影响豚鼠血淋巴细胞对 PHA 的反应;给予豚鼠不同剂量的

抗坏血酸,其脾脏淋巴细胞对 ConA 的反应不受抗坏血酸的影响^[12]。然而, Siegel^[13]报道了 BALB/C 小鼠饮水中补充抗坏血酸,浓度为 250mg/100ml,可增加 ConA 诱导的 T 淋巴细胞转化反应; Fraser^[14]的实验研究显示,豚鼠补充抗坏血酸后,能增加外周血淋巴细胞 ³H—TdR 的掺入量。

综观以上各研究结果,抗坏血酸对淋巴细胞转化反应的影响目前尚难以定论。本次试验的结果显示,15 天及 35 天喂养实验的各组光密度值均无统计差异(表 2),说明在本试验剂量下的刺梨汁及抗坏血酸对小鼠淋巴细胞转化反应没有影响,与 Delafuente 等研究

者的结果相吻合^[9、10、11、12]。

3.2 对 IL—2 产生的影响

IL—2 是一种重要的免疫调节因子。它能够促进 T 细胞分化增殖为具有各种免疫功能的 T 细胞亚群,发挥各种免疫效应;促进 B 细胞增殖反应,高浓度的 IL—2 还可能具有诱导 B 细胞分泌免疫球蛋白的作用,而无需 T 细胞的存在;IL—2 还具有增强 NK 细胞的活性;诱导干扰素的产生;并已用于肿瘤的治疗。抗坏血酸对 IL—2 产生的影响如何,目前尚未见报道。本次试验结果表明刺梨汁及抗坏血酸对 IL—2 的产生没有影响(表 3)。

表 4 15 天和 35 天实验小鼠抗体形成细胞数(PFC)

组 别	15 天		35 天	
	动物数	PFC($\bar{X} \pm SE$)/10 ⁶	动物数	PFC($\bar{X} \pm SE$)/10 ⁶
对 照 组	13	1451 $\pm$ 197	25	1587 $\pm$ 81
刺梨汁 I 组	14	1307 $\pm$ 142		
抗坏血酸 I 组	13	1392 $\pm$ 187		
刺梨汁 II 组	13	1413 $\pm$ 252	25	2201 $\pm$ 138 ^a
抗坏血酸 II 组	13	1518 $\pm$ 214	24	1877 $\pm$ 86 ^a
刺梨汁 III 组	13	1776 $\pm$ 181	25	2077 $\pm$ 166 ^a
抗坏血酸 III 组	13	1713 $\pm$ 160	25	2046 $\pm$ 122 ^a
刺梨汁 IV 组	13	1671 $\pm$ 135	25	2058 $\pm$ 91 ^a
抗坏血酸 IV 组	13	1542 $\pm$ 152	25	2193 $\pm$ 125 ^a

注: a 与对照组相比 P<0.05

3.3 对抗体形成细胞产生的影响

15 天喂养实验的抗体形成细胞(PFC)的数目的各组间均无统计差别,导致此试验中刺梨汁及抗坏血酸作用不显著的原因是由于小鼠补充刺梨汁和抗坏血酸的时间太短。当实验时间延至 35 天时,可见各实验组的 PFC 值均显著高于对照组,但各剂量组间以及刺梨汁与抗坏血酸组间却无统计差异,这说明补充刺梨汁及抗坏血酸的时间延长而表现出对 PFC 产生的增加作用,而刺梨汁的这种增加作用主要是由抗坏血酸引起。由于各剂量

组间没有差异,因而可以认为本实验所设计的三种不同剂量的刺梨汁及抗坏血酸所产生的作用是相似的(表 4)。关于抗坏血酸与 PFC 产生关系的研究只见 Siegel 的一篇报道^[13]。该实验选择 BALB/C 小鼠,在饮水中加入抗坏血酸,浓度为 250mg/100ml,小鼠自由饮用 2 周、4 周、8 周后的结果表明补充抗坏血酸组小鼠与对照小鼠的 PFC 值无显著差别。Siegel 的 2 周结果与我们的 15 天结果相符。但 4 周和 8 周结果与我们 5 周结果不一致,原因可能是由于在 Siegel 的实验中仍然

保持高剂量的抗坏血酸(250mg/100ml),而在我们5周实验中舍去了这一剂量,因为从我们15天实验结果可见250mg/100ml剂量组的PFC值还低于对照组。由Siegel和我们的实验结果表明高浓度的抗坏血酸对PFC的促进作用反而降低。

3.4 对干扰素的诱生作用

干扰素是一组具有广泛生物学活性的物质。它除了抑制病毒复制和肿瘤细胞增殖外,还具有免疫调节功能。Siegel报道了BALB/C小鼠饮水中补充抗坏血酸,表现为小鼠白血病病毒感染后的小鼠体内干扰素水平的提高^[15];体外培养的鼠细胞,加入抗坏血酸后,以PolyI:C(聚肌胞)作为诱生剂,结果引起干扰素合成的增加^[16]。本试验结果表明,补充刺梨汁和抗坏血酸15天后或35天后,小鼠血清对VSV引起鼠L—929细胞的病变没有保护作用,说明小鼠血清中缺乏

有效的抗病毒物质即干扰素。

以上Siegel两个实验都是在干扰素诱生剂如病毒PolyI:C存在的情况下,检测抗坏血酸对干扰素产生的影响,而在我们的实验中,是在没有给予干扰素诱生剂的情况下,补充抗坏血酸后测定血清干扰素的水平。由此表明抗坏血酸可以引起由干扰素诱生剂所致的干扰素合成的增加,但无干扰素诱生剂作用时,连续给予抗坏血酸没有诱生干扰素的作用。

4 结论

本试验结果表明,小鼠饮用刺梨汁,对机体免疫功能具有一定的影响,主要表现为促进抗体形成细胞的产生,且这种作用主要是由抗坏血酸引起。由于刺梨汁富含抗坏血酸,因此可以推论人长期饮用适当剂量的刺梨汁可能对抗体形成细胞有刺激作用。

参 考 文 献

影响·中国免疫学杂志1987;3(2):70。

作用·贵州农学院学报1989;9:50。

〔3〕林东昕,等·刺梨汁阻断N—亚硝基化合物体内合成·北京医科大学硕士学位研究生论文。

〔4〕Mosmann T·Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:Application to proliferation and cytotoxicity assays·J Immunol Methods 1983;65:55.

〔5〕周洪道,等·测定淋巴细胞转化和鼠白细胞介素2活性的新方法—MTT比色分析法·中国免疫学杂志1986;2(1):39。

〔6〕陶义训主编·临床免疫学检验·上册·上海:上海科学技术出版社,1983年:102—104。

〔7〕杜平主编·医用实验病毒学·北京:人民军医出版社,1985年:160—162。

〔8〕翁晓春,等·免疫调变剂对大鼠IL—2产生的

scurvy·Am J Clin Nutr 1982;36(1):127.

〔11〕Zweiman B, et al·The effect of the scorbutic state on tuberculin hypersensitivity in the guinea pig: III. In vitro mitotic response of lymphocytes·J Immunol 1966;96:672.

〔12〕Adrianne B, et al·Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens·J Nutr 1984;114(9):1588.

〔13〕Siegel B V, et al·Vitamin C and the immune response. Experientia 1977;33:393.

〔14〕Fraser R C, et al·The effect of variations of vitamin C intake on the cellular immune response of guinea pigs·Am J Clin Nutr 1980;33(4):839.

(下接5页)