

- 刊,2015(25):54-55.
- [9] 冯冰,韩军花,张坚,等.特殊医学用途配方食品法规概述及管理建议[J].中国卫生标准管理,2014,5(10):88-91.
- [10] 韩军花,杨玮.特殊医学用途配方食品良好生产规范[J].中国标准导报,2015,9(6):20-22.
- [11] 国家食品药品监督管理总局.国家食品药品监督管理总局法制司《特殊医学用途配方食品注册管理办法(试行)》(征求意见稿)[J].中国食品,2015(19):132-134.
- [12] Georgiou N A, Garssen J, Witkamp R F. Pharma-nutrition interface: the gap is narrowing [J]. European Journal of Pharmacology,2010, 651(1/3):1-8.
- [13] 邱斌,徐同成,刘丽娜,等.我国特殊医学用途配方食品产业现状[J].中国食物与营养,2015,02:32-33
- [14] Ojo O. The impact of changes in health and social care on enteral feeding in the community [J]. Nutrients, 2012, 4(11):1709-1722.

研究报告

复合多糖对小鼠细胞免疫功能的影响

罗霞¹,马忠华²,胡明华²,马方励²,温如燕¹,周联¹

(1. 广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006;

2. 无限极(中国)有限公司,广东 广州 510623)

摘要:目的 比较香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖及按一定配比组成的复合多糖对免疫抑制小鼠细胞免疫功能影响。方法 采用常规迟发型超敏反应(DTH)动物模型检测T细胞功能,Luminex液相蛋白芯片分析系统检测血清中白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)等细胞因子的含量,通过流式细胞技术(FCM)检测T细胞比例及分型,采用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法检测T细胞增殖。结果 各多糖组小鼠耳肿胀度与模型对照组相比趋于恢复正常,其中香菇多糖组、复合多糖组这一作用更明显,均差异有统计学意义($P < 0.05$);香菇多糖、茯苓多糖和复合多糖具有上调免疫抑制小鼠血清IL-6水平的的作用,均差异有统计学意义($P < 0.05$);各多糖均有提高小鼠外周血调节性T细胞(Treg)细胞比例的趋势,其中银耳多糖、复合多糖组与模型对照组比较,均差异有统计学意义($P < 0.05$);各多糖组均有恢复小鼠外周血Th1/Th2(Th1、Th2为2种辅助性T细胞)细胞比例的作用,均差异有统计学意义($P < 0.05$),其中复合多糖组的这一作用最明显;各多糖均有恢复免疫抑制小鼠脾脏T、B淋巴细胞比例的趋势,其中复合多糖的作用较明显;4种多糖均有促进免疫抑制小鼠脾脏T淋巴细胞增殖的趋势,其中香菇多糖、复合多糖组与模型对照组比较,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 由香菇多糖、茯苓多糖和银耳多糖,以及按一定配比组成的复合多糖对免疫抑制小鼠细胞免疫功能均有一定的恢复作用,但复合多糖较单一多糖的作用更明显,显示出复合多糖组分的协同作用。

关键词:多糖;香菇多糖;茯苓多糖;银耳多糖;免疫抑制;细胞免疫;小鼠;协同作用

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0186-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.010

Effects of compound polysaccharide on cellular immunity in mice

LUO Xia, MA Zhong-hua, HU Ming-hua, MA Fang-li, WEN Ru-yan, ZHOU Lian
(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangdong Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To compare the different effects of lentinan, pachyman, tremella polysaccharide and their complex on cellular immunity of immuno-suppressed mice. **Methods** The function of T cells was detected by delayed type hypersensitivity (DTH) test, and the quantity of cytokines such as IL-2 and IL-6 in serum were detected using Luminex liquid protein microarray analysis system. The ratio and subtype of cells were detected by flow cytometry (FCM), and the proliferation of T cells was determined by using a colorimetric method with MTT. **Results** The ear swelling tends to be

收稿日期:2015-12-15

基金项目:广东省教育厅科研项目基金资助(2013LYM0014)

作者简介:罗霞 女 实验师 研究方向为免疫药理学 E-mail:luoxia@gzucm.edu.cn

通信作者:周联 男 研究员 研究方向为免疫学及中药药理学 E-mail:zl@gzucm.edu.cn

normal compared with the model group ($P < 0.05$), and the lentinan group and polysaccharides complex group had the most significant difference ($P < 0.05$). The tremella polysaccharide and polysaccharide complex could upregulated the level of IL-6 in serum of immuno-suppressed mice ($P < 0.05$). All the polysaccharides had the tendency of enhancing the ratio of regulatory T cells (Tregs) in blood, the difference in tremella polysaccharide and polysaccharide complex had statistical significance comparing with model group ($P < 0.05$). All test samples had function of restoring the ratio of Th1/Th2 cells in peripheral blood in immuno-suppressed mice ($P < 0.05$), the function of polysaccharide complex was the most significant among them. All four polysaccharides had the tendency of restoring the ratio of splenic T and B cells in immuno-suppressive mice, the most obvious trend of which was polysaccharide complex. All the four polysaccharides had the tendency of promoting proliferation of splenic T cells, the difference of lentinan and polysaccharide complex was statistically significant comparing to the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Lentinan, pachymaran, tremella polysaccharide and their complex could restore the cellular immunity in immuno-suppressed mice, and the complex was the best.

Key words: Compound polysaccharide; mushroom polysaccharide; poria cocos mushroom polysaccharides; tremella fucifamis berte; immunosuppress; cellular immunity; mice; synergistic effect

多糖广泛存在于各种生命体中,其具有复杂多样的生物学活性,因此,众多来源于动物、植物和真菌的多糖成分陆续被分离出来。大量药理学试验已证明,中草药多糖不仅能激活巨噬细胞(M ϕ)、淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)、毒性T淋巴细胞(CTL)和树突状细胞(DC)等免疫细胞,还可以促进细胞因子生成、激活补体系统、促进抗体产生等,对免疫系统发挥多方面的调节作用^[1-3]。因多糖在组成和结构上的差异,使得生物学活性不尽相同。

复合多糖是按一定比例进行组合,并通过反复试验筛选得出科学、有效的多糖组合^[4]。有研究表明,单一活性多糖按优化的组合比例组合,其生物活性更强^[5]。本研究以免疫抑制小鼠细胞免疫功能为主要指标,比较香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖3种多糖及由这3种多糖组成的复合多糖对免疫功能影响的差别,以期复合多糖的研究和应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级Balb/c小鼠(白变种实验室老鼠),体质量18~22g,共60只,雌雄各半,由广东省医学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(粤)2013-0002],实验操作在广州中医药大学实验动物中心SPF级实验室进行[许可证号:SYXK(粤)2013-0085],温度(25±2)°C,相对湿度(50±5)%。

1.1.2 主要仪器与试剂

Luminex液相蛋白芯片分析系统(美国RD)、MCO-20AIC型二氧化碳培养箱(日本SANYO)、酶标仪(美国THERMO)、FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD)。

1640培养基(美国Gibco),二硝基氟苯溶液(DNFB,日本东京化成工业株式会社),环磷酰胺(山西普德药业股份有限公司),刀豆蛋白A(ConA),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)均购自美国Sigma,佛波酯(PMA)、离子霉素(imonomycin)、莫能霉素(monensin)、IL-2检测试剂、Treg & Kit试剂盒、IL-6检测试剂及荧光抗体[CD3-PE-Cy7、CD4-PE-Cy5、IL-4-PE、IFN- γ -FITC、Foxp3⁺-PE、CD3、CD19(PEcy7/FITC)]均购自美国eBioscience,试验中所用的香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖、复合多糖样品均由无限极(中国)有限公司提供(其中复合多糖由香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖组成,经前期T细胞体外增殖试验筛选后选择最优组合,其中香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖的质量比为7:4:1)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

将动物随机分为正常对照组、免疫抑制模型对照组、香菇多糖组、茯苓多糖组、银耳多糖组、复合多糖组,每组动物10只。多糖组按成人的日口服剂量的10倍(即小鼠等效剂量),以500mg/kg BW的剂量和0.2ml/10g BW的体积每日灌胃1次,连续30d,正常对照组以及模型对照组给予等体积蒸馏水。除正常对照组以外,其余各组均于给予试验样品后第24天腹腔注射环磷酰胺40mg/kg BW,1次/d,连续两天,以制作免疫抑制小鼠模型。

1.2.2 规迟发型超敏反应(DTH)试验

给予样品后第25天,在小鼠右侧背中部涂擦脱毛剂脱毛。第26天,用微量加样器在脱毛部位滴涂20 μ l 5% DNFB溶液致敏。第30天,以20 μ l 1% DNFB溶液滴涂小鼠左耳壳(两面)作为攻击;右耳滴涂20 μ l丙酮溶液作为对照。第31天(攻击后24h),称体质量,颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔

器取直径 8 mm 的耳片,立即称重。以左右耳片重量之差为耳廓肿胀度反映迟发型超敏反应的强度。同时取小鼠胸腺、脾脏称重,以每 10 g 小鼠的脾脏和胸腺湿重(mg)作为脾脏指数和胸腺指数。

1.2.3 细胞因子检测

给予样品后第 31 天,从眼眶静脉丛采集全血,静置 30 min,4 ℃ 1 200 × g 离心 15 min,取血清。采用 Luminex 液相蛋白芯片分析系统检测血清中 IL-2、IL-6 的含量。

1.2.4 T 细胞亚型分析

给予样品后第 31 天,从眼眶静脉丛采集全血于肝素钠抗凝管中,摇匀,取 200 μl 全血样本,用 RPMI1640 按 1:1 等比例稀释。Th1 及 Th2 细胞(Th1、Th2 为 2 种辅助性 T 细胞)检测:将全血样本等体积分装于两管中,分别作为阴性对照管(A 管)和测定管(B 管),A 管中加入 Monensin 工作液;B 管中加入 PMA 工作液、Ionomycin 工作液和 Monensin 工作液;37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 5 h;取 100 μl,加入适量 CD3-PE-Cy7 和 CD4-PE-Cy5,孵育 15 min;用固定破膜剂固定和破膜,加入适量 IL-4-PE 和 IFN-γ-FITC,孵育 15 min;磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤一次,去上清,PBS 洗涤细胞沉淀,用流式细胞仪检测。

调节性 T 细胞(Treg)检测:取小鼠外周血淋巴细胞 100 μl,分别加入 CD4、CD25 抗体各 2 μl,振荡混合均匀后,避光室温孵育 30 min;300 × g 离心 5 min,冷 PBS 洗涤后,加入 1 ml 经过稀释的固定、透膜剂,反应 50 min,用缓冲液洗涤并重悬,加入 10 μl Foxp3⁺-PE(同时设同型对照反应管),反应 30 min 后洗涤,用 300 μl 冷 PBS 重悬,用流式细胞仪检测。

1.2.5 T、B 淋巴细胞比例分析

给予样品后第 31 天,颈椎脱臼处死小鼠,无菌取其脾脏,常规制备小鼠脾淋巴细胞悬浮液,调整细胞浓度为 10⁶/ml,取 400 μl 加入 CD3、CD19(PEcy7/FITC)染色后于流式细胞仪检测。

1.2.6 淋巴细胞增殖

给予样品后第 31 天,颈椎脱臼处死小鼠,无菌取其脾脏,常规制备脾细胞悬液,调整细胞数为 2 × 10⁶/ml,将细胞悬液加入细胞培养板,每孔 190 μl,加入 ConA 使其终浓度为 5 μg/ml(每孔 10 μl),以未加 ConA 孔作对照孔,并设 1640 培养液正常对照,每个样品设 3 个复孔。5% CO₂、37 ℃,饱和湿度下培养 72 h;培养结束前 4 h 左右,每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT;37 ℃,饱和湿度下培养 4 h,吸弃上清,加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO)溶解

10 min。用酶联免疫检测仪,在波长为 570 nm 处测定每孔 OD 值,计算时取复孔平均值。

1.3 数据分析

刺激指数 = (ConA 孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值)。

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

给予环磷酰胺后,模型对照组小鼠耳肿胀度、脏器指数(胸腺和脾脏)均低于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各多糖组耳肿胀度均高于模型对照组,均差异有统计学意义($P < 0.05$),其中复合多糖的数值最接近正常对照组;除茯苓多糖组外,其他多糖组胸腺指数及脾脏指数高于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同试验组的免疫抑制小鼠迟发型超敏反应结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of polysaccharides on DTH reaction in immunosuppressive mice

组别	剂量 / (mg/kg BW)	耳肿胀度 / mg	胸腺指数 / (mg/10 g)	脾脏指数 / (mg/10 g)
正常对照组	—	27.40 ± 2.69	17.31 ± 2.59	53.58 ± 3.89
模型对照组	—	18.24 ± 4.05*	5.78 ± 2.29*	37.34 ± 4.71*
香菇多糖组	500	22.32 ± 3.14 ^Δ	8.90 ± 1.64 ^Δ	42.67 ± 5.06 ^Δ
茯苓多糖组	500	21.54 ± 2.96 ^Δ	7.12 ± 1.80 ^Δ	39.67 ± 7.22
银耳多糖组	500	21.83 ± 2.63 ^Δ	8.21 ± 1.44 ^Δ	42.21 ± 6.17 ^Δ
复合多糖组	500	23.71 ± 1.89 ^Δ	8.80 ± 2.26 ^Δ	43.32 ± 2.26 ^Δ

注: * 表示与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);^Δ 表示与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);—表示无剂量,给予小鼠 0.2 ml/10 g BW 的蒸馏水

与正常对照组相比,模型对照组血清中 IL-2 降低、IL-6 水平升高,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。多糖对血清中 IL-2 水平有一定的恢复趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$),香菇多糖、茯苓多糖和复合多糖对血清 IL-6 水平有较理想的恢复作用,与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同试验组的免疫抑制小鼠细胞因子结果($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Results of polysaccharides on cytokines reaction in immunosuppressive mice

组别	剂量 / (mg/kg BW)	IL-2 / (pg/ml)	IL-6 / (pg/ml)
正常对照组	—	1.49 ± 0.27	4.28 ± 1.03
模型对照组	—	1.06 ± 0.28*	9.43 ± 3.26*
香菇多糖组	500	1.15 ± 0.49	5.79 ± 1.23 ^Δ
茯苓多糖组	500	1.05 ± 0.28	6.01 ± 1.53 ^Δ
银耳多糖组	500	1.29 ± 0.67	7.23 ± 1.70
复合多糖组	500	1.22 ± 0.31	6.73 ± 1.16 ^Δ

注: * 表示与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);^Δ 表示与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);—表示无剂量,给予小鼠 0.2 ml/10 g BW 的蒸馏水

给予环磷酰胺后,小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺/CD4⁺ (Treg)细胞比例减少(其中 Foxp3⁺ 为一种转录因子),CD4⁺ IFN- γ ⁺ 比例变化不明显,而 CD4⁺ IL-4⁺ 比例减少,Th1/Th2 比例升高,给予不同多糖后,

银耳多糖、复合多糖可提高小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg)细胞比例,香菇多糖、茯苓多糖、银耳多糖、复合多糖均有恢复小鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例作用,均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 不同试验组的免疫抑制小鼠 T 细胞亚型分析结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Results of polysaccharides on T cell subsets reaction in immunosuppressive mice

组别	剂量 /(mg/kg BW)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺ /%	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ /%	CD4 ⁺ IL-4 ⁺ /%	IFN- γ /IL-4 (Th1/Th2) /%
正常对照组	—	5.48 ± 0.33	4.85 ± 0.36	0.83 ± 0.14	5.55 ± 1.62
模型对照组	—	4.48 ± 0.29*	4.62 ± 0.25	0.51 ± 0.10*	9.15 ± 1.87*
香菇多糖组	500	4.74 ± 0.44	4.65 ± 0.36	0.72 ± 0.15 ^Δ	6.74 ± 0.85 ^Δ
茯苓多糖组	500	4.71 ± 0.79	4.73 ± 0.29	0.76 ± 0.13 ^Δ	6.29 ± 1.83 ^Δ
银耳多糖组	500	5.46 ± 0.80 ^Δ	4.87 ± 0.31	0.85 ± 0.10 ^Δ	5.32 ± 1.04 ^Δ
复合多糖组	500	5.26 ± 0.57 ^Δ	4.89 ± 0.30	0.87 ± 0.16 ^Δ	5.30 ± 1.98 ^Δ

注: * 表示与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);^Δ 表示与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);—表示无剂量,给予小鼠 0.2 ml/10 g BW 的蒸馏水

各试验组均有恢复免疫抑制小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞比例的趋势,其中复合多糖组数值最接近正常对照组,但与模型对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表4。

体评价见表6。

表6 不同多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响
总体评价

Table 6 Evaluation on influence of polysaccharides on immune function in immunosuppressive mice

组别	细胞因子		迟发型 超敏 反应	T 细胞亚群		T 细胞 增殖	脏器指数	
	IL-2	IL-6		Treg	Th1/Th2		胸腺	脾脏
香菇多糖	-	+	+	-	+	+	+	+
茯苓多糖	-	+	+	-	+	-	+	-
银耳多糖	-	-	+	+	+	-	+	+
复合多糖	-	+	+	+	+	+	+	+

注: + 表示与相应研究的模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); - 表示与相应研究的模型对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)

表4 不同多糖对免疫抑制小鼠 T、B 比例的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Results of polysaccharides on proportion of T and B cells in immunosuppressive mice

组别	剂量 /(mg/kg BW)	CD19 ⁺ /%	CD3 ⁺ /%
正常对照组	—	51.68 ± 1.75	37.15 ± 3.64
模型对照组	—	32.61 ± 4.91*	48.45 ± 6.75*
香菇多糖组	500	34.37 ± 3.46	44.78 ± 3.52
茯苓多糖组	500	35.13 ± 5.32	44.79 ± 2.95
银耳多糖组	500	33.69 ± 2.47	47.20 ± 5.70
复合多糖组	500	36.54 ± 4.92	43.86 ± 3.74

注: * 表示与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);—表示无剂量,给予小鼠 0.2 ml/10 g BW 的蒸馏水

采用 ConA 刺激脾脏 T 淋巴细胞增殖后发现,与模型对照组相比,香菇多糖、复合多糖组小鼠淋巴细胞刺激指数上升,均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

表5 不同多糖对免疫抑制小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Results of polysaccharides on proliferation of T cells in immunosuppressive mice

组别	剂量/(mg/kg BW)	刺激指数
正常对照组	—	8.94 ± 2.08
模型对照组	—	4.16 ± 1.00*
香菇多糖组	500	6.75 ± 2.61 ^Δ
茯苓多糖组	500	4.82 ± 1.96
银耳多糖组	500	4.54 ± 1.97
复合多糖组	500	6.16 ± 2.45 ^Δ

注: * 表示与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);^Δ 表示与模型对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);—表示无剂量,给予小鼠 0.2 ml/10 g BW 的蒸馏水

不同多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响总

3 讨论

植物多糖的免疫促进作用已被证实,其中,真菌多糖的应用较为广泛。临床上,茯苓多糖常协同环磷酰胺等抗癌药用于肿瘤的治疗,猪苓多糖具有明显抑制膀胱癌细胞的作用,猴头菇多糖可治疗消化道炎症及溃疡等。由于多糖中的糖单体有多种链接点,使其在分子量、支化度、粘度、链构象等化学特性具有多样性,相应药理作用也不尽相同,通过不同中药多糖的组合,或许可以实现中药多糖的活性优化。本研究从小鼠的细胞免疫功能考察单一多糖与复合多糖的作用差别。

细胞免疫主要指的是 T 细胞受到抗原刺激后,增殖、分化为效应 T 细胞,从而释放细胞因子以及对相应抗原发生特异性的杀伤作用。研究采用的 DTH 试验是检测 T 细胞功能的经典,主要反映其 T 细胞的功能,被攻击的小鼠的耳廓肿胀程度与其 T 细胞功能强弱呈正相关^[6]。结果表明,本试验选用的多糖均具有恢复免疫功能低下小鼠 T 细胞功能的作用,其中复合多糖组最明显。IL-2 主要由活化

的 T 细胞产生, IL-6 可由 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞以及单核细胞产生, 二者均具有广泛的生物学活性^[7]。与正常对照组相比, 本试验中模型对照组血清 IL-2 明显降低, 这与环磷酰胺所致的 T 细胞抑制有关; 模型对照组小鼠 T 细胞增殖能力下降, 但 IL-6 明显升高, 由于 T 细胞不是唯一分泌 IL-6 的细胞, 分泌 IL-6 的细胞还包括巨噬细胞、内皮细胞等, 其次也可能与 IL-6 参与造血调控有关。环磷酰胺可造成骨髓抑制现象, 导致外周血细胞减少, 为了补充血细胞, 机体将代偿性的分泌 IL-6 促进造血, 以上结果均与文献报道一致^[8-9]。香菇多糖、银耳多糖和复合多糖在促进其恢复正常水平作用较明显, 结合 DTH 试验, 反映出这几种多糖对 T 细胞介导的免疫功能具有促进作用。

现代研究发现 T 淋巴细胞具有多个亚群, 不同的 T 细胞亚群的功能也有明显差别。本研究进一步对几种主要的 T 细胞亚群进行检测, 其中, Treg 细胞具有免疫负调节功能, 在维持自身耐受、自身稳定中起了极其重要的作用。天然的调节性 T 细胞(即 nTreg)主要表达 CD4 分子、CD25 分子以及其特征性标志分子 Foxp3^[10], 本研究通过这几种表面分子标记 nTreg 达到试验目的。环磷酰胺的免疫抑制作用明显降低了小鼠的 Treg 细胞数量, 银耳多糖、复合多糖能明显改善这种现象, 与文献报道一致^[11]。依据产生的细胞因子的不同, 辅助性 T 细胞主要分为 Th1 和 Th2 亚群。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ , 主要与细胞免疫应答相关; Th2 细胞主要分泌 IL-4, 引起体液免疫应答。通常情况下, Th1/Th2 细胞比例处于相对平衡的状态, 两者通过细胞因子相互促进和制约, 以维持机体免疫的动态平衡, 使机体既能通过免疫系统清除抗原性异物, 又不至于导致自身组织的损伤^[12]。与正常对照组相比, 本试验中模型对照组 Th1/Th2 发生明显变化, 与文献报道一致^[13]。从 Th1 和 Th2 细胞所占 CD4⁺ T 细胞的比例看, 各多糖均有恢复紊乱的外周血 Th1/Th2 平衡, 其中以复合多糖的作用最明显。

正常情况下, 脾脏的淋巴细胞中 B 细胞约 50%~60%, T 细胞约 40%~50%, T、B 细胞维持在一定比例的平衡状态。从免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞比例变化分析, 本研究中环磷酰胺在导致 B 细胞的减少同时, T 细胞比例相应地升高, T、B 细胞比例的平衡失调, 与文献报道一致^[14-15]。4 种多糖均具有促进 T、B 淋巴细胞比例恢复正常的趋势, 复合多糖的作用较为明显。进一步用 MTT 检测 ConA 刺激不同组小鼠脾脏淋巴细胞增殖情况后发现, 复合多糖组小鼠脾脏淋巴细胞增殖现象明显。

综上所述, 相比 3 种单一多糖而言, 复合多糖在调节 IL-6 分泌、促进 T 细胞增殖作用方面明显。此外, 在 4 种多糖均具有统计学意义的指标中, 复合多糖组的数据也更接近正常对照组。本研究结果提示由单一多糖按一定比例组成的复合多糖, 对提高免疫抑制小鼠的 T 细胞免疫功能有促进作用。多糖的功效与其活性部位密切相关, 其中 β -葡聚糖抗肿瘤活性最强, 香菇多糖成分中以 β -(1,3)-D 葡聚糖为主, 含少量的木糖和甘露糖, 而茯苓多糖成分中以 β -(1,4)-D 葡聚糖为主, 银耳多糖是以 α -(1,3)-D-甘露糖为主链的杂多糖。按照不同的比例将这 3 种多糖进行组合, 其可被机体所利用的活性部位可能会增加, 或者更容易被机体所吸收, 但由于多糖结构复杂, 此外其功能还涉及理化特性, 本试验中复合多糖对 T 细胞的作用优于单一多糖, 这种结果是否与单糖结构和分子量相关, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] 江益平, 马方励, 周联, 等. 香菇多糖对免疫抑制小鼠肠道派氏结 T 细胞的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1236-1239.
- [2] Rout D, Mondal S, Chakraborty I, et al. Chemical analysis of a new(1y3)-(1y6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida* [J]. Carbohydr Res, 2005, 340(16): 25331-25339.
- [3] ZHU Y, Pettolino F, Mau S L. Immunoactive polysaccharide rich fractions from *Panaxnoto ginseng*[J]. Planta Med, 2006, 72(13): 11991-11993.
- [4] 苏富琴, 崔红霞, 刘吉成. 复合多糖的免疫协同作用[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(5): 317-319.
- [5] 谢好贵, 韦明钊, 陈美珍, 等. 3 种复合多糖体外抗肿瘤协同增效作用初步研究[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 289-294.
- [6] Doebis C, Menning A, Neumann K, et al. Accumulation and local proliferation of antigen-specific CD4⁺ T cells in antigen-bearing tissue[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 89(4): 566-572.
- [7] 林丽艳, 张慧云, 何韶衡. IL-6 及其受体与炎症性疾病关系的新进展[J]. 中国热带医学, 2008, 8(4): 680-682.
- [8] 唐振, 李世杰, 王颖飞, 等. 化疗减毒汤对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠的保护机制研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(27): 3360-3365.
- [9] 陈晶晶, 范颖, 张红梅, 等. 黄芪有效部位对化疗性贫血小鼠细胞因子 IL-2、IL-4、IL-6 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(8): 77-79.
- [10] Dan R L, Alexander Y R. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation[J]. Cell, 2010, 140(3): 845-858.
- [11] 苑晓娟, 樊卫平, 张凯, 等. 小剂量环磷酰胺对正常小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的调节作用[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 292-296.
- [12] Susanne J, Kim S T, Costa G L, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment [J]. Cell, 2000, 100(3):

655-669.

[13] 张丰丰,赵宗江,张新雪,等. 补肾益髓生血法对苯与环磷酰胺诱导 AA 大鼠 Th1/Th2 细胞分泌细胞因子影响的实验研究 [J]. 世界中医药,2014,9(6):704-712.

[14] 宋雁,贾旭东,崔文明,等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小

鼠免疫抑制模型的对比研究 [J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):218-225.

[15] Stephen A M, Judith E D. Effects of cyclophosphamide on murine candidiasis [J]. Infect Immunity,1980,27:376-386.

· 请示批复 ·

食品药品监管总局办公厅关于非法添加药品氨茶碱和双氯芬酸钠违法行为定性的复函

(食药监办食监三函[2016]72号)

河北省食品药品监督管理局:

你局《关于非法添加药品氨茶碱、双氯芬酸钠违法行为定性的请示》(冀食药监[2015]47号)收悉。经研究,现函复如下:

非法添加的物质不仅限于《食品中可能违法添加的非食用物质名单》和《保健食品中可能非法添加的物质名单》中所列物质,氨茶碱、双氯芬酸钠也属于非法添加的物质。(来源:食品伙伴网)

(相关链接:<http://www.foodmate.net/law/shipin/188243.html>)

食品药品监管总局办公厅

2016年2月1日

· 请示批复 ·

食品药品监管总局办公厅关于食品添加剂羟丙基甲基纤维素有关问题的复函

(食药监办食监一函[2016]7号)

新疆维吾尔自治区食品药品监督管理局:

你局《关于食品添加剂羟丙基甲基纤维素有关问题的请示》(新食药监办[2015]91号)收悉。经研究,现函复如下:

根据原卫生部办公厅《关于食品添加剂使用原料级别问题的复函》(卫办监督函[2011]321号),凡食品添加剂产品标准中对原料级别作出规定的,食品添加剂生产企业必须使用相应级别或质量更高的原料;对原料级别未作具体规定的,食品添加剂生产企业可自行选择原料级别,食品添加剂生产工艺和产品应当符合食品安全国家标准。(来源:食品伙伴网)

(相关链接:<http://www.foodmate.net/law/shipin/188175.html>)

食品药品监管总局办公厅

2016年1月5日