

# 红松多酚对免疫细胞活性影响的研究

符群<sup>1</sup>, 彭亚文<sup>1</sup>, 王振宇<sup>2\*</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

**摘要** [目的]了解红松多酚对免疫细胞功能的影响。[方法]采用 MTT 法研究了红松多酚对大鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响, 以中性红吞噬试验考察了红松多酚对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响。[结果]研究表明, 随着给药剂量的增加, 红松多酚对机体免疫细胞具有活性促进作用。剂量浓度达到 0.3 mg/ml 时, 脾淋巴细胞增殖呈现极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 腹腔巨噬细胞的吞噬中性红能力亦呈现极显著增强 ( $P < 0.01$ )。并且在一定浓度范围内, 作用效果均呈现剂量-效果关系。[结论]红松多酚对于机体的免疫细胞活性具有促进作用。

**关键词** 红松; 多酚; 免疫

**中图分类号** S609.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)28-09920-02

## The Influence of Korean Polyphenols on Immune Cells Viability

FU Qun<sup>1</sup>, PENG Ya-wen<sup>1</sup>, WANG Zhen-yu<sup>2\*</sup> (1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090)

**Key words** [Objective] To study the influence of Korean polyphenols on immune cells viability. [Method] This experiment used MTT method to study the influence of Korean polyphenols on spleen lymphocytes viability in rats and used the neutral red phagocytosis method to test the influence of Korean polyphenols on the peritoneal macrophages phagocytic ability. [Result] The result showed that, as the increasing of the dose, Korean polyphenols could significantly enhance the active of immune cells. When the concentration reached more than 0.3 mg/ml, the spleen lymphocytes increased remarkably ( $P < 0.01$ ) and the phagocytic ability of peritoneal macrophages on the neutral red increased remarkably ( $P < 0.01$ ). And in some certain concentration, effects were present dose-effect relationship. [Conclusion] Korean polyphenols could enhance the viability of immune cells in the body.

**Key words** Korean pine; Polyphenols; Immune

随着当今社会的不断发展, 人们生活工作节奏日渐加快, 环境污染日益严重, 人们的亚健康及患病机率也随之大幅度增加。无论对于亚健康人群和患病人群, 机体免疫能力的重要作用不亚于药物本身的作用, 而且完全依靠药物治疗, 对机体的副作用往往不可忽视<sup>[1]</sup>。目前, 国内外研究者对于具有免疫功能的物质的关注度不断加强<sup>[2]</sup>, 并致力于天然产物活性物质的研究。已有研究结论表明, 红松诸多部位可以作为人们祛病强身、延年益寿的药食两用材料, 松属植物具有较强免疫功能的生物活性, 其中最主要的有效成分即为多酚类和多糖类<sup>[3-4]</sup>。我国红松在东北地区分布较为广泛, 其种子由于营养丰富颇受人们欢迎, 但是食用松仁之后, 红松种鳞壳则基本属于废弃物, 红松的种皮、树皮、果鳞等不同部位皆含有不同量的多酚类化合物<sup>[5]</sup>, 未能得到充分地利用, 造成了资源的大量浪费。笔者对红松鳞片中的多酚物质进行研究, 既实现了资源的高效利用, 又对松多酚免疫作用进行了初步研究, 促进其药食用途的产业化进程。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 红松种鳞, 2012 年采自长白山地区 (42°10' N, 126°32' E); Wistar 大鼠, 黑龙江省中医药大学药物评价中心提供; RPMI1640 培养液, Gibco 公司; MTT、ConA, 均来自 Sigma 公司; Hank's 液, 北京百浩生物公司; 中性红染液、台盼兰, 均来自南京森贝嘉生物公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 红松种鳞多酚的制备。**取红松种鳞, 粉碎过 60 目

筛, 以石油醚 2 次脱脂, 称取脱脂后的红松种鳞 2 g 于 100 ml 烧杯中, 加入 60 ml 50% (V/V) 乙醇, 以 1:30 (M/V) 的料液比, 60 °C 水浴下提取 60 min。采用硅胶柱层析法, 以甲醇为洗脱剂, 将提取液纯化, 真空旋转蒸发去除溶剂, 采用福林酚法<sup>[6]</sup>测定纯化多酚含量, 收集多酚冷冻干燥备用。

**1.2.2 大鼠脾淋巴细胞体外增殖研究。**

**1.2.2.1 脾淋巴细胞的收集与培养。**于无菌条件下取大鼠脾组织, 去除脂肪等附着物, 以无菌 PBS 液清洗 3 次。针筒轻轻磨碎脾组织, 过 200 目无菌筛网过滤细胞, 使其形成单个细胞。用 PBS 液洗涤细胞 2 次, 每次 3 ml, 离心 10 min, 速度为 1 000 r/min。然后将细胞重悬于 1 ml 新鲜 RPMI1640 培养液中, 用台盼兰染色法<sup>[7]</sup>记录活细胞数量在 95% 以上, 调整细胞浓度为  $1.0 \times 10^6$  个/ml<sup>[8]</sup>。

**1.2.2.2 脾淋巴细胞增殖试验。**将调整好浓度的脾淋巴细胞悬浮液分别加入到 96 孔培养板中, 每孔 95  $\mu$ l, 培养过夜。待脾细胞贴壁生长后, 加入纯化多酚, 调整每水平的终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml, 每水平中 3 孔加入 5  $\mu$ l ConA 溶液 (使其终浓度为 7.5  $\mu$ g/ml), 另外 3 孔作为对照, 加入 5  $\mu$ l PBS 缓冲溶液, 置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h, 每孔加入 10  $\mu$ l MTT (5 mg/ml), 继续培养 4 h 后, 离心去除上清, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO, 振荡培养 15 min, 使紫色结晶完全溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定反应溶液的吸光度值<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 大鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力研究。**

**1.2.3.1 巨噬细胞的收集与培养。**无菌条件下腹腔注射 10 ml 无菌 Hank's 液, 轻揉鼠腹, 约 10 min 后, 吸取液体收集至 15 ml 离心管中, 离心弃上清, 以 RPMI1640 培养基重新悬

**作者简介** 符群 (1974 -), 女, 黑龙江哈尔滨人, 高级工程师, 在读博士, 从事天然产物制备及功能研究。\* 通讯作者。

**收稿日期** 2014-08-22

浮沉淀物<sup>[10]</sup>。

**1.2.3.2 大鼠巨噬细胞吞噬增殖反应试验。**调整细胞浓度每孔 100  $\mu\text{l}$  接种至 96 孔板中,培养过夜。待巨噬细胞贴壁后,加入纯化多酚,调整每水平的终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/ml,各水平分别做 3 孔平行。培养 24 h 后,每孔加入中性红 100  $\mu\text{l}$ ,于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 30 min 后,用 Hank's 液清洗,4  $^\circ\text{C}$  冰箱过夜后,在 490 nm 波长下,酶标仪测定 OD 值<sup>[11]</sup>。

对于试验数据采用 SPSS 18.0 软件分析组间差异显著性。

## 2 结果与分析

**2.1 大鼠脾淋巴细胞体外增殖研究** 脾脏是机体内重要的免疫器官,富含 T、B 淋巴细胞,加之其易于分离,是体外试验中淋巴细胞的重要来源。测定淋巴细胞体外增殖反应是检测淋巴细胞功能的常用方法。该试验采用 MTT 法对大鼠脾淋巴细胞进行增殖试验,各剂量组吸光值结果如表 1 所示。

表 1 红松多酚对大鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

剂量组别//mg/ml	脾淋巴细胞 OD 值	剂量组别//mg/ml	脾淋巴细胞 OD 值
空白组	0.125 $\pm$ 0.015	0.3	0.315 $\pm$ 0.021**
0.1	0.154 $\pm$ 0.025*	0.4	0.380 $\pm$ 0.017**
0.2	0.235 $\pm$ 0.022*		

注: \*、\*\* 为与空白组相比较  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

由表 1 可知,相比空白组,各红松多酚剂量组对机体淋巴细胞均有促进其增殖的作用。采用 SPSS18.0 软件进行组间差异性分析可知,当红松多酚剂量浓度达到 0.3 mg/ml 以上时,与空白组相比,淋巴细胞增殖的差异达到极显著水平( $P < 0.01$ )。而在 0.1 ~ 0.4 mg/ml 浓度范围内,也呈现差异的显著性( $P < 0.05$ ),且呈现剂量与效果之间的正相关关系。因此可知,红松多酚对于淋巴免疫细胞体外有促进增殖作用,且随多酚浓度提高,刺激作用不断增强,表明红松多酚对脾淋巴细胞增殖活性呈现明显剂量依赖性。

**2.2 大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能研究** 巨噬细胞作为机体免疫系统的重要组成部分,在体液免疫和细胞免疫中发挥中心作用。它可以直接吞噬外来异物及衰老的自身细胞,还可分泌白介素等细胞因子,进而发挥抗病毒、抗肿瘤作用。红松多酚干预后的大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能试验吸光值数据如表 2 所示。

表 2 红松多酚对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响( $\bar{X} \pm S, n=3$ )

剂量组别//mg/ml	吞噬功能 OD 值	剂量组别//mg/ml	吞噬功能 OD 值
空白组	0.347 $\pm$ 0.017	0.3	0.241 $\pm$ 0.071**
0.1	0.338 $\pm$ 0.018	0.4	0.239 $\pm$ 0.059**
0.2	0.314 $\pm$ 0.051		

注: \*、\*\* 为与空白组相比较  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

由表 2 数据可知,红松多酚干预巨噬细胞后,对于巨噬细胞的吞噬功能有一定影响。以 SPSS18.0 软件进行显著性分析可知,当红松多酚给药浓度达到 0.3 mg/ml 以上时,巨噬细胞的吞噬功能与空白组相比,呈现极显著的差异( $P <$

0.01),而在 0.1 ~ 0.2 mg/ml 浓度范围中未呈现显著的差异。一般认为,巨噬细胞的代谢状况和其吞噬能力直接相关,代谢旺盛,则说明巨噬细胞的吞噬能力增强;代谢减弱,则吞噬功能下降。因此该试验数据表明,红松多酚对于机体巨噬细胞的代谢能力有促进,对于剂量具有一定依赖性,且对剂量的反应极敏感。

## 3 结论

该试验通过 MTT 淋巴细胞增殖试验和大鼠巨噬细胞吞噬增殖反应试验验证了红松多酚对脾淋巴细胞和大鼠巨噬细胞的增殖具有促进作用。试验结果表明,红松多酚对脾淋巴细胞具有显著( $P < 0.05$ )促进增殖的作用,且在 0.1 ~ 0.4 mg/ml 浓度范围内呈现出剂 - 效关系。巨噬细胞作为机体主要的免疫细胞,既可以直接吞噬外来异物及衰老的自身细胞,又可分泌白介素等细胞因子,进而发挥抗病毒、抗肿瘤作用。试验结果同时表明,红松多酚对于腹腔巨噬细胞具有增强其代谢能力的作用,且在 0.3 mg/ml 浓度以上,作用极显著( $P < 0.01$ )。通过机体具有代表性的免疫细胞活性研究,初步表征了红松多酚作为一种天然产物,具有较强的机体免疫细胞活性促进作用。

在药物研究趋势由化学合成药物转向天然药物的今天,到目前为止研究者已对多种植物多酚进行了结构、活性作用机理等研究。该试验的结论为红松多酚作为良好的免疫促进剂类保健品或药物提供了科学依据,表明对红松多酚的进一步研究与开发具有科学和实用意义。

## 参考文献

- [1] 杨澍,洪阁,刘天军. 植物多酚类物质的生物学活性研究进展[C]//中国科学技术协会、贵州省人民政府. 第十五届中国科协年会第 21 分会场: 中药与天然药物现代研究学术研讨会论文集. 中国科学技术协会, 贵州省人民政府, 2013: 6.
- [2] SEIFRIEDH E, ANDERSON E, FISHERE I, et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(9): 567 - 579.
- [3] CHIVA - BLANCH G, URPI - SARDA M, LLORACH R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2012, 95(2): 326 - 334.
- [4] WENG C J, YEN G C. Chemo preventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives [J]. Cancer Treatment Reviews, 2012, 38(1): 76 - 87.
- [5] 鲁玉妙, 马惠玲. 我国植物多酚研究文献计量及研究热点分析 [J]. 食品科学, 2012(17): 290 - 296.
- [6] SILICI S, SAGDIC O, EKICI L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys [J]. Food Chemistry, 2009, 121(1): 238 - 243.
- [7] BYUNG-CHEON LEE, KI HOON EOM, KWANG-SUP SOH. In situ staining of the primo vascular system in the ventricles and subarachnoid space of the brain by trypan blue injection into the lateral ventricle [J]. Neural Regeneration Research, 2011, 28: 2171 - 2175.
- [8] 周革非, 魏元臣, 孔娜娜, 等.  $\alpha$ -卡拉胶降解组分的分离纯化、抗氧化及免疫活性研究 [J]. 海洋科学, 2009(8): 58 - 62.
- [9] 周非, 李海涛, 尹鸿萍. 蝙蝠蛾被孢菌丝体多糖对小鼠免疫细胞的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2011(3): 41 - 44.
- [10] 李丽, 马伟伟, 曲雁, 等. 海葵子乙酸乙酯相提取物的抑菌和体外免疫活性的研究 [J]. 海洋科学, 2013(12): 47 - 51.
- [11] 王凌, 孙利芹, 周妍. 小球藻多糖体外免疫调节活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2013(7): 30 - 33.