

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.01.019

李凤娇, 李敬双, 王一伦, 等. 大枣多糖对小鼠淋巴细胞免疫调节作用的研究[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(1): 141-147.

LI F J, LI J S, WANG Y L, et al. Research on the immunoregulatory effect of jujube polysaccharide on lymphocyte in mice[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(1): 141-147.

# 大枣多糖对小鼠淋巴细胞免疫调节作用的研究

李凤娇, 李敬双, 王一伦, 金鑫, 李贤, 于洋✉

(锦州医科大学 食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** 研究大枣多糖对小鼠淋巴细胞的免疫调节作用。将小鼠淋巴细胞无菌分离, 制备细胞悬液, 设计空白组、阳性对照组(左旋咪唑)以及不同质量浓度的大枣多糖组(终浓度为 20、40、80、160 和 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。按照 MTT 法观察大枣多糖对小鼠淋巴细胞增殖的影响情况; 采用 ELISA 法观察大枣多糖对小鼠淋巴细胞上清液中 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 水平的影响; QRT-PCR 检测大枣多糖对小鼠淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 信使核糖核酸(mRNA)表达的影响。在 20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, 大枣多糖能促进小鼠淋巴细胞增殖, 同时提高细胞因子的分泌量, 进而促进细胞因子 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 mRNA 表达。在 20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, 大枣多糖通过诱导淋巴细胞增殖、淋巴细胞因子 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 分泌以及 mRNA 表达, 从而提高机体免疫功能。

**关键词:** 大枣多糖; 淋巴细胞; 细胞增值; 细胞因子; 信使核糖核酸

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)01-0141-07

网络首发时间: 2020-12-23 14:29:10

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20201223.1353.012.html>

## Research on the Immunoregulatory Effect of Jujube Polysaccharide on Lymphocyte in Mice

LI Feng-jiao, LI Jing-shuang, WANG Yi-lun, JIN Xin, LI Xian, YU Yang✉

(School of food science and engineering, Jinzhou medical university, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract:** To study the immunomodulatory effect of jujube polysaccharide on mouse lymphocytes. Mouse lymphocytes were sterile separated, cell suspension was prepared, and the blank group, the positive group (levamisole) and the jujube polysaccharide group with different mass concentrations (final concentrations of 20, 40, 80, 160 and 320 living  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were designed. The effect of jujube polysaccharide on the proliferation of mouse lymphocytes was observed by MTT method. The effects of jujube polysaccharide on the levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12) in the supernatant of mouse lymphocytes were observed by ELISA. The effect of jujube polysaccharide on the expression of

收稿日期: 2020-07-14

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20170540369); 2017 年国家级“大学生创新创业训练计划”项目(201610160011)。

**Supported by:** Natural Science Foundation of Liaoning, China (No. 20170540369); 2017 National “College Students’ Innovation and Entrepreneurship Training Program” project (No. 201610160011).

作者简介: 李凤娇, 女, 1995 年出生, 在读研究生, 研究方向为功能因子与健康的相关性。E-mail: Sunlifengjiao109@163.com.

通讯作者: 于洋, 男, 1962 年出生, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为功能因子与健康的相关性。E-mail: spyuyang@163.com.

IL-2, IL-6, IL-10 and IL-12 mRNA in mouse lymphocytes was detected by QRT-PCR. Jujube polysaccharide could promote the proliferation of mouse lymphocytes and the secretion of cytokines in the range of 20-320  $\mu\text{g/ml}$ , which further promoted the expression of cytokines IL-2 and IL-6, as well as IL-10 and IL-12 mRNA. Conclusion: jujube polysaccharide enhances immune function by inducing lymphocyte proliferation and the secretion and mRNA expression of lymphocyte cytokines IL-2 and IL-6, as well as IL-10 and IL-12.

**Key words:** jujube polysaccharide; spleen lymphocytes; cell proliferation; cytokines; mRNA

大枣 (*Ziziphus jujuba* Mill), 鼠李科植物枣的干燥成熟果实, 主要分布在亚洲和美洲的热带和亚热带, 少数分布在非洲和两半球温带, 大枣味美甘甜, 营养价值丰富, 我国已有几千年的栽培历史, 大枣也是脾胃虚弱、气血不足、倦怠无力、失眠多梦等患者良好的保健营养品。此外, 大枣对慢性肝炎、肝硬化、贫血、过敏性紫癜等病症有较好疗效, 典型的药食同源之品。

大枣多糖 (Jujube polysaccharide, JP) 是大枣中一种重要的活性物质, 具有多种生理活性, 将其提取、纯化、分级<sup>[1]</sup>, 可作为免疫促进剂。大枣多糖能控制细胞的分裂和分化, 调节细胞的生长与衰老<sup>[2]</sup>; 能有效清除人体内的氧自由基<sup>[3]</sup>。大枣多糖是抗衰老的主要活性成分, 具有明显抗补体活性, 且中性多糖的活性要强于酸性多糖。研究发现, 大枣多糖具有抗氧化活性<sup>[4]</sup>、免疫调节活性<sup>[5]</sup>、保肝作用<sup>[6]</sup>、抗高脂血症作用<sup>[7]</sup>、抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>、减缓疲倦<sup>[9]</sup>。可广泛应用于医药、保健食品及功能食品, 作为绿色生物医药产品, 大枣多糖具有广阔的市场前景和应用价值。

随时代的进步, 关于大枣多糖的造血功能、抗氧化功能、修复肝损伤、抗疲劳、改善肠道、抑制肿瘤细胞等的报道越来越多, 大枣多糖毒性低, 不良反应少, 为了广泛应用于临床和保健食品, 大枣多糖的抗癌、抗氧化和增强免疫力的研究仍将是未来研究重点, 因此, 进一步探讨其作用机制对于为大枣多糖的深入研究、饲料添加剂的研制和开发具有重要意义。

本文以大枣多糖为研究对象, 建立免疫模型, 通过 MTT 法观察大枣多糖对小鼠淋巴细胞增殖的影响; ELISA 法观察大枣多糖对小鼠淋巴细胞上清液中 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 水平的影响; QRT-PCR 检测大枣多糖对小鼠淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 信使核糖核酸 (mRNA) 的表

达, 为大枣多糖的进一步开发与利用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

Balb/c 小鼠 SPF 级, 体重在 (20±2)g, 8~10 周龄, 饲养条件 20~26 °C, 锦州医科大学生命科学院, 生产许可证号为 SCXK (辽)2014~0004。

#### 1.1.2 药品

大枣多糖, 纯度 ≥90%: 晨光生物技术有限公司; 四季青优级胎牛血清: 浙江天杭生物科技有限公司产品; 甲基噻唑蓝 298-93-1 (MTT)、台盼蓝 (Trypan Blue)、RPMI-1640 培养基-11875、二甲基亚砜 D8370-100 (DMSO)、红细胞裂解液 (Tris-NH<sub>4</sub>Cl)、磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 和氯仿-P1014: 北京索莱宝科技有限公司; Trizol-R0016: 碧云天生物技术; 异丙醇、乙醇: 山东旭晨化工科技有限公司; 小鼠 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 细胞因子检测试剂盒: 上海酶联生物科技有限公司; TaKaRa 逆转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 RT-PCR 试剂盒 RR047A TAKARA、QPCR 试剂盒 RR820A TAKARA: 宝生物工程(大连)有限公司。

#### 1.1.3 仪器

Varioskan FlashT 多功能酶标仪: 美国赛默飞世尔科技公司; 超净工作 SW-CJ-1F 型: 苏州净化设备有限公司; 倒置显微镜 CKX41SF: 日本 OLYMPUS 公司; 低速离心机 TD5A: 湖南赫西仪器装备有限公司; 96 孔或 24 孔板台式离心机: 上海安亭 (TDL80-2B); CO<sub>2</sub> 培养箱: 日本 SHELLAB; FA2004N 型电子天平: 上海精密科学仪器有限公司; Mastercyler ep realplex<sup>4</sup> 型实时荧光定量 PCR 仪、AG 22331 Hamburg 型 PCR 扩增仪、BioPhotometer plus 型蛋白核酸分析仪: 德

国 Eppendorf 公司；全自动凝胶成像系统：中国 Tanon 2500。

## 1.2 方法

### 1.2.1 淋巴细胞悬液的制备

参考桑卡娜等<sup>[10]</sup>、马玉芳等<sup>[11]</sup>实验方法，颈椎脱臼法处死小鼠，将小鼠身体浸泡在 75%酒精 3 min 消毒，注意不要将小鼠口鼻浸入酒精，将浸泡后的小鼠放在培养皿中移到无菌超净工作台内取出脾脏，放于盛有磷酸盐缓冲溶液（PBS）的平皿中冲洗干净，将脾脏用 10 mL 注射器拉杆柄尾部将其磨碎，使脾脏通过 200 目滤网浸入 1640 培养基中。收集全部的细胞悬液于离心管中吹匀，将离心机调整至 1 500 r/min 4 °C，离心 5 min，将上清液弃去，使用移液枪将红细胞裂解液（Tris-NH<sub>4</sub>Cl）滴加 3 mL 至大离心管中吹匀重悬，静置 5 min，离心 5 min，弃去上清液，若离心管中仍存在红细胞，重复操作至红细胞完全裂解。加入适量 RPMI-1640 完全培养基（胎牛血清 3 mL，1640 27 mL，配成 30 mL 的完全培养基）重悬沉淀细胞，离心弃上清，取 900 μL 细胞悬液置于 EP 管内，加 100 μL 台盼蓝（Trypan Blue）溶液，染色计数细胞活力，混匀后，吸出少量混合液放在计数板上，在显微镜下倒置观察，调整直至细胞活力 ≥ 95%。用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞密度为 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL，得到淋巴细胞悬液。

### 1.2.2 分组方式和分组处理

设置空白组，阳性对照组（左旋咪唑），大枣多糖组（终浓度为 20、40、80、160、320 μg/mL），空白组孔中加入 RPMI 1640 完全培养基，大枣多糖组加入不同浓度的大枣多糖溶液，阳性对照组加入左旋咪唑。

### 1.2.3 MTT 法检测大枣多糖对淋巴细胞增殖的影响

参考张思哲等<sup>[12]</sup>实验方法，上述制备好的淋巴细胞悬液加到 96 孔板中，每组设置 5 个复孔，每孔 100 μL，将加入淋巴细胞的培养板置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h，2 h 后加药。将 96 孔板置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中连续培养 44 h，取出后，每孔加入 20 μL MTT 溶液（称取 MTT 0.005 g，溶于 1 mL PBS 缓冲液中，摇匀至

全部溶解，使其终浓度为 5.0 mg/mL，0.22 μm 滤膜过滤除菌，20 °C 避光保存）。继续培养 4 h，取出培养板将离心机调整至 1 800 r/min 4 °C 离心 10 min，弃去上清液，每孔加入 150 μL DMSO 溶液。振荡混匀，置于全自动酶标仪 570 nm 处检测 OD 值。结果以增殖指数（PI）的大小，表达小鼠淋巴细胞增殖含量，PI =（实验组 OD 值/对照组 OD 值）× 100%

### 1.2.4 ELISA 法检测大枣多糖对淋巴细胞分泌细胞因子的影响

参考 Xie 等<sup>[13]</sup>实验方法，上述制备好的淋巴细胞悬液加到 24 孔板中，每组设置 3 个复孔，每孔 1 mL，置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中，培养 2 h 后加 1 mL 不同浓度的大枣多糖溶液，空白组加入 1 mL 1640 完全培养基，再培养 48 h。将离心机调至 1 500 r/min 4 °C 离心 5 min，收集上清液。用 ELISA 法观察大枣多糖对淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 分泌的影响，按照试小鼠白细胞介素细胞因子试剂盒说明书进行操作。

### 1.2.5 大枣多糖对 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12mRNA 表达的影响

参考 Pan L C 等<sup>[14]</sup>实验方法，24 孔细胞培养板，每孔加入 1 mL 淋巴细胞悬液，按 1.2.2 分组方式和分组处理。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。弃去上清液，用 PBS 清洗干净，每管加 1 mL Trizol，使细胞完全裂解，换 EP 管，以 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min，弃沉淀，每管加入 200 μL 三氯甲烷，用力上下颠倒，并剧烈摇晃震荡 30 s，取出碎冰放在泡沫箱，冰浴 10 min。调整离心机以 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min，弃去上清液，加入 500 μL 的异丙醇，上下颠倒 8 次，放入盛有冰块的泡沫箱里，冰浴 10 min，调整离心机以 12 000 r/min，4 °C 离心 15 min，仔细弃去上清液，将底部小部分沉淀物小心保留。加入 1 mL 75%冰乙醇，上下颠倒混匀，调整离心机以 12 000 r/min，4 °C 离心 10 min，再弃去上清液后，置于室温下 30 min。加入 RNase-free 水 20 μL 使沉淀溶解。取 1 μL 已经溶解好的 RNA 溶液，在超微量紫外或者可见分光光度计下调整波长为 260/280 nm 观察其吸光度 A 的比值，并将其 total RNA 的浓度记下，若比值

在 1.8~2.1 之间, 则表明提取的 RNA 未被污染, 且质量好。

采用 TaKaRa 逆转录试剂盒的说明配制反应体系: 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, gDNA Eraser 1 μL, Rnase Free dH2O 6 μL, 1 μL Total RNA 总体系为 10 μL, 混合均匀, 置于室温 20 min 后, 加入 Primescript RT Enzyme Mix I 1 μL, RT Primer Mix 1 μL, 5×PrimeScript Buffer 2 4 μL, Rnase Free dH2O 4 μL, 其总体系为 20 μL。在 37 °C 的条件下反应 15 min, 在 85 °C 反应 5 s, 最终得到 cDNA 样品放于-80 °C 保存。

根据 NCBI 基因库中相关基因序列, 采用 Primer 6 引物设计软件设计, 如表 1 所示。

表 1 实验中小鼠 IL-2、IL-6、IL10、IL-12 和内参 ACTB 引物序列

Table 1 Mouse IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 and internal reference ACTB primer sequences in the Experiment

Primer	Sequence	Length /bp
IL-2F	5'-CCCAGGATGCTCACCTTCA-3	93
IL-2R	5'-CCGAGAGGTCGAAGTTCA-3	
IL-6F	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3	169
IL-6R	5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTC-3	
IL-10F	5'-GCCAGAGCCACATGCTCCTA-3'	145
IL-10R	5'-GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA-3'	
IL-12F	5'-TTCATAAGAGTCAGGTGGTCTTGG-3'	86
IL-12R	5'-CCTTTGGGGAGATGAGATGTG-3'	
ACTB F	5'-GATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
ACTB R	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	

采用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒的说明配制反应体系: 2×TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, 引物为 2 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌水为 8.5 μL, 总共 25 μL, 混合均匀, 进行 Real time PCR 反应, 采用扩增试剂盒的程序, 将仪器调整为预变性 95 °C 30 s, 变性 95 °C 5 s, 退火 60 °C 30 s, 调整为 40 个循环。以 ACTB 作为内参, 扩增完后按照 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法进行数据分析从而得到目的基因的相对表达量。

### 1.2.6 统计学分析

按照 (平均数±标准差) 表示数据结果。应用 SPSS 20.0 统计软件分析实验结果, 数据用( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 按照单因素方差分析进行观察, 用 LSD 法表达其显著性, 检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $\alpha=0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 大枣多糖对淋巴细胞增殖的影响

由表 2 可知, 与空白组相比, 阳性对照组淋巴细胞指数显著升高 ( $P<0.01$ ), 说明淋巴细胞在阳性对照组的加入后, 增殖量有所提升; 与空白组相比, 大枣多糖处理组淋巴细胞指数呈现上升趋势 ( $P<0.01$ ), 说明大枣多糖能够刺激淋巴细胞增殖, 当大枣多糖浓度在 20~160 μg/mL 时, 淋巴细胞增殖指数随大枣多糖浓度升高出现显著上升趋势, 表现出一种良好的剂量-效应关系; 当大枣多糖浓度到达 320 μg/mL 时, 淋巴细胞指数反而显著下降, 说明大枣多糖对淋巴细胞增殖呈双向调节作用。与阳性对照组相比, 大枣多糖为 20、40、80、320 μg/mL 浓度组淋巴细胞指数显著降低 ( $P<0.01$ ), 当大枣多糖浓度为 160 μg/mL 时, 淋巴细胞指数不存在统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 大枣多糖对淋巴细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

Table 2 Effect of jujube polysaccharide on lymphocyte proliferation ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

组别	淋巴细胞增殖指数
空白组	1±0 <sup>Dd</sup>
阳性对照组	3.987±0.130 <sup>Aa</sup>
20 μg/mL 大枣多糖组	1.609±0.023 <sup>Cc</sup>
40 μg/mL 大枣多糖组	1.988±0.068 <sup>Bb</sup>
80 μg/mL 大枣多糖组	3.372±0.073 <sup>Bb</sup>
160 μg/mL 大枣多糖组	4.341±0.116 <sup>Aa</sup>
320 μg/mL 大枣多糖组	2.640±0.046 <sup>Bb</sup>

注: 图中大写字母代表差异的极显著性 ( $P<0.01$ ), 当差异存在统计学意义时, 用不同字母, 当差异不存在统计学意义时, 用相同字母。大写字母 A 代表着浓度组中的均值的最大组, B、C、D 按照字母顺序, 代表存在统计学意义的其它各组。图中小写字母代表差异显著性 ( $P<0.05$ ), 当差异存在统计学意义时, 用不同字母, 当差异不存在统计学意义时, 用相同字母。小写字母 a 代表浓度组中的均值最大组, b、c、d 按字母大小顺序, 分别代表存在统计学意义的其它各组, 下面则按照此方式进行标注。

### 2.2 大枣多糖对淋巴细胞分泌细胞因子的影响

由表 3 可知, 与空白组相比, IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 的阳性对照组分泌量显著升高 ( $P<0.01$ ), 说明阳性对照组能够诱导细胞因子分泌; 与空白组相比, 大枣多糖浓度组中细胞因子分泌量呈现上升趋势 ( $P<0.01$ ), 说明大枣多糖能够诱导细胞因子分泌; 当大枣多糖浓度组在 20~160 μg/mL 范

围时, 淋巴细胞的分泌量随大枣多糖浓度组浓度的升高呈现上升趋势, 表现出一种良好的剂量-效应关系; 当大枣多糖浓度到达 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 淋巴细胞分泌量反而下降, 由此可以说明, 大枣

多糖对诱导细胞因子分泌呈现双向调节作用。与阳性对照组相比, 当大枣多糖浓度为 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞因子分泌量不存在统计学意义 ( $P>0.05$ ), 其余各浓度组均存在统计学意义 ( $P<0.01$ )。

表 3 大枣多糖对淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 分泌的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

Table 3 Effect of jujube polysaccharide on the secretion of IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 in lymphocytes ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

组别	IL-2 含量/(pg/mL)	IL-6 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)	IL-12 含量/(pg/mL)
空白组	24.483 $\pm$ 0.091 <sup>Dd</sup>	3.063 $\pm$ 0.021 <sup>Ef</sup>	22.877 $\pm$ 0.052 <sup>Dd</sup>	10.638 $\pm$ 0.109 <sup>Dd</sup>
阳性对照组	63.461 $\pm$ 0.080 <sup>Aa</sup>	25.382 $\pm$ 0.044 <sup>Aa</sup>	75.337 $\pm$ 0.035 <sup>Aa</sup>	65.223 $\pm$ 0.106 <sup>Aa</sup>
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	33.951 $\pm$ 0.089 <sup>Cc</sup>	9.381 $\pm$ 0.066 <sup>Dd</sup>	32.162 $\pm$ 0.032 <sup>Cc</sup>	21.079 $\pm$ 0.101 <sup>Cc</sup>
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	39.125 $\pm$ 0.041 <sup>Bb</sup>	18.538 $\pm$ 0.050 <sup>Bb</sup>	44.854 $\pm$ 0.085 <sup>Bb</sup>	38.617 $\pm$ 0.255 <sup>Bb</sup>
80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	45.180 $\pm$ 0.080 <sup>Bb</sup>	19.890 $\pm$ 0.037 <sup>Bb</sup>	54.875 $\pm$ 0.070 <sup>Bb</sup>	39.890 $\pm$ 0.354 <sup>Bb</sup>
160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	68.109 $\pm$ 0.098 <sup>Aa</sup>	27.250 $\pm$ 0.075 <sup>Aa</sup>	79.331 $\pm$ 0.076 <sup>Aa</sup>	68.278 $\pm$ 0.159 <sup>Aa</sup>
320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	53.206 $\pm$ 0.023 <sup>Bb</sup>	15.738 $\pm$ 0.048 <sup>Cc</sup>	55.162 $\pm$ 0.126 <sup>Bb</sup>	37.716 $\pm$ 0.506 <sup>Bb</sup>

### 2.3 大枣多糖对淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 的影响

由表 4 可知, IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 与空白组相比, 阳性对照组细胞因子 mRNA 表达显著升高 ( $P<0.01$ ), 由此说明, 阳性对照组通过增加细胞因子 mRNA 表达量调节, 促进细胞因子的分泌。与空白组相比, 大枣多糖浓度组细胞因子 mRNA 表达显著升高 ( $P<0.01$ ), 由此说明, 大枣多糖通过增加细胞因子 mRNA 表达量调节, 促进细

胞因子分泌。当大枣多糖的浓度在 20~160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞因子 mRNA 表达量随大枣多糖浓度的升高出现上升的趋势, 表现出一种良好的剂量-效应关系; 当大枣多糖浓度达到 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞因子 mRNA 表达量反而下降, 说明大枣多糖对诱导淋巴细胞细胞因子 mRNA 表达量呈双向调节作用。与阳性对照组相比, 大枣多糖浓度为 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞因子 mRNA 表达量不存在统计学意义 ( $P>0.05$ ), 其余各浓度组都存在统计学意义 ( $P<0.01$ )。

表 4 大枣多糖对淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 的影响 ( $n=5$ )

Table 4 Effect of jujube polysaccharide on IL-2、IL-6、IL-10 and IL-12 mRNA of lymphocytes ( $n=5$ )

组别	IL-2mRNA 相对表达量	IL-6mRNA 相对表达量	IL-10mRNA 相对表达量	IL-12mRNA 相对表达量
空白组	1 $\pm$ 0 <sup>Dd</sup>	1 $\pm$ 0 <sup>Dd</sup>	1 $\pm$ 0 <sup>Dd</sup>	1 $\pm$ 0 <sup>Dd</sup>
阳性对照组	8.356 $\pm$ 0.093 <sup>Aa</sup>	9.146 $\pm$ 0.041 <sup>Aa</sup>	7.072 $\pm$ 0.178 <sup>Aa</sup>	6.706 $\pm$ 0.073 <sup>Aa</sup>
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	2.647 $\pm$ 0.625 <sup>Cb</sup>	3.460 $\pm$ 0.081 <sup>Cc</sup>	3.577 $\pm$ 0.075 <sup>Bb c</sup>	3.460 $\pm$ 0.081 <sup>Cc</sup>
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	5.167 $\pm$ 0.036 <sup>Bb</sup>	4.670 $\pm$ 0.032 <sup>Dd</sup>	4.040 $\pm$ 0.033 <sup>Bb</sup>	4.670 $\pm$ 0.032 <sup>Dd</sup>
80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	6.324 $\pm$ 0.203 <sup>Bb</sup>	6.371 $\pm$ 0.163 <sup>Dd</sup>	6.354 $\pm$ 0.520 <sup>Bb</sup>	6.371 $\pm$ 0.163 <sup>Dd</sup>
160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	8.687 $\pm$ 0.469 <sup>Aa</sup>	8.483 $\pm$ 0.163 <sup>Aa</sup>	8.735 $\pm$ 0.031 <sup>Aa</sup>	8.483 $\pm$ 0.163 <sup>Aa</sup>
320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大枣多糖组	4.618 $\pm$ 0.033 <sup>Bb</sup>	7.285 $\pm$ 0.076 <sup>Bb</sup>	2.328 $\pm$ 0.053 <sup>Cc</sup>	7.285 $\pm$ 0.076 <sup>Bb</sup>

## 3 讨论

### 3.1 大枣多糖对淋巴细胞增殖的影响

本实验研究表明, 大枣多糖浓度在 20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内, 对小鼠淋巴细胞体外增殖具有促进作用, 当大枣多糖浓度为 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时效果最佳, 与阳性对照组差异不显著; 有效提高小鼠淋巴细胞增殖的能力。众所周知, 脾脏是动物

机体重要的外周淋巴器官, 脾脏免疫功能的正常发挥与其生长发育和组织结构密切相关, 脾脏是由大量的淋巴细胞组成的<sup>[15]</sup>, 因此, 可以说脾脏生长发育的优劣取决于脾脏内淋巴细胞的增殖和凋亡。本实验中, 大枣多糖可以使小鼠的淋巴细胞增殖率显著提升, 淋巴细胞增殖产生效应淋巴细胞, 清除非己抗原, 提高机体免疫功能。机体的系统免疫中淋巴细胞增殖是机体对非己抗原刺

激产生免疫应答过程中的关键一步。淋巴细胞增殖效果决定了机体免疫应答反应的强度, 反应机体的细胞免疫状态<sup>[16]</sup>。

### 3.2 大枣多糖对淋巴细胞 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 分泌及 mRNA 表达的影响

机体的免疫细胞可以通过分泌细胞因子来发挥免疫作用, 本研究主要测定了淋巴细胞几个重要细胞因子 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 的分泌。大枣多糖可浓度依赖性增加淋巴细胞中细胞因子 IL-2 的浓度, 作用于免疫细胞, 包括 T 细胞、大颗粒淋巴细胞、单核细胞、B 细胞等, 促进细胞增殖和分泌细胞因子以及 Th0 和 CTL 的增殖。研究发现莱籽多糖体外可促进小鼠脾淋巴细胞 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$  mRNA 的表达<sup>[17]</sup>。大枣多糖可使淋巴细胞分泌细胞因子 IL-6 水平成浓度依赖性升高, 诱导 B 细胞分化产生免疫球蛋白, 促进 T 细胞增殖生长, 增强血细胞的分化及其抗癌效应, 促进骨髓造血干细胞增殖, IL-6 可以上调 STAT3 介导的维甲酸, 促进 CD4<sup>+</sup> 幼 T 细胞向 Th17 细胞转化<sup>[18]</sup>。大枣多糖可浓度依赖性增加淋巴细胞中细胞因子 IL-10 的浓度, 对于 T 细胞、NK 细胞、B 细胞、单核巨噬细胞和肥大细胞起抑制作用, 为 T 细胞发育的辅助生长因子、刺激抗体激活 B 细胞快速生长和分化, T 细胞产生的 IL-10 可以作为抗炎因子, 在疾病中发挥其抗炎镇静作用, 黄芪多糖可抑制高糖状态下 HMCs 细胞过度增殖, 下调高糖状态下 HMCs 细胞 IL-8 mRNA 及蛋白的表达, 上调 IL-10 mRNA 及蛋白的表达, 可能通过减轻炎症反应对 DN 肾脏起到保护作用<sup>[19]</sup>。大枣多糖可浓度依赖性增加淋巴细胞中细胞因子 IL-12 的浓度, 诱导受刺激的 T 细胞增殖, 与 IL-2 有协同作用, 增加 NK 细胞活性, 促进 T 辅助细胞 1 (Th1) 的增殖, IL-12 促进 Th0 向 Th1 分化, IL-12 在诱导时产生 Th1, 使 Th2 转化为 Th1, 在 Th 细胞亚群的平衡中起着关键性作用, 中药复方多糖能不同程度的促进各 MHC B-L $\beta$  II 基因型 IL-2、IL-4、IL-12 mRNA 的表达<sup>[20]</sup>。本实验研究发现大枣多糖的浓度依赖性增加淋巴细胞中的 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 的浓度, 通过调控 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 mRNA 表达, 最

终达到细胞因子的分泌量, 提高机体免疫功能。

## 4 结论

大枣多糖在小鼠淋巴细胞体外免疫活性中起着重要的作用, 大枣多糖在 20~320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内, 小鼠淋巴细胞体外增殖显著增加, 通过上调 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12 mRNA 表达量实现免疫活性的提高, 促进 IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-12 细胞因子的分泌, 增强了机体的免疫功能, 更好的保障人类的健康。

### 参考文献:

- [1] 林勤保, 高大维, 于淑娟, 等. 大枣多糖的分离和纯化[J]. 食品工业科技, 1998, 4: 22-23.  
LIN Q B, GAO D W, YU S J, et al. Isolation and purification of jujube polysaccharide [J]. Science and Technology of food Industry, 1998, 4: 22-23.
- [2] WANG Y, LIU X, ZHANG J, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from Zizyphus jujuba cv. Muzao[J]. RSC Adv, 2015, 5(11): 7860-7867.
- [3] 邢彦超, 郑彧, 刘刘, 等. 大枣多糖与柴胡疏肝散联用对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤治疗作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(11): 29-31.  
XING Y C, ZHENG Y, LIU G, et al. Therapeutic effect of jujube polysaccharide combined with Bupleurum shugan Powder on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Journal of Liaoning University of Chinese Medicine, 2016, 018(11): 29-31.
- [4] LI J, LIU Y, FAN L, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 390-394.
- [5] 苗明三. 大枣多糖对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1 $\alpha$  及脾细胞体外增殖的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(4): 21-22.  
MIAO M S. Effect of Jujube polysaccharide on il-1 production of peritoneal macrophages and proliferation of spleen cells in immunosuppressed mice[J]. Pharmacology and Clinic of Traditional Chinese Medicine, 2004, 20(4): 21-22.
- [6] YUE Y, WU S, ZHANG H, et al. Characterization and hepatoprotective effect of polysaccharides from Ziziphus jujuba Mill. var. spinosa (Bunge) Hu ex H. F. Chou sarcocarp[J]. Food & Chemical Toxicology, 2014, 74: 76-84.
- [7] ZHAO Y, YANG X, REN D, et al. Preventive effects of jujube polysaccharides on fructose-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice[J]. Food & Function, 2014, 5(8): 1771.
- [8] WANG Y, LIU X, ZHANG J, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from Zizyphus jujuba cv. Muzao[J]. Rsc Advances, 2015, 5(11): 7860-7867.

- [9] HUANG X J, JIANG J G, LIN F L, et al. The extraction of polysaccharides from semen ziziphus jujube (SZJ) and its sedative and hypnotic effects[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2006, (2): 37-39+42.
- [10] 桑卡娜, 高艳艳, 周德刚. 五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响[J]. *中国兽药杂志*, 2017, 51(3): 44-47.  
 SAN K N, GAO Y Y, ZHOU D G. Effect of Wujia Qi powder on lymphocyte proliferation and antibody-forming cells in mice [J]. *Chinese journal of veterinary medicine*, 2017, 51(3): 44-47.
- [11] 马玉芳, 郑乃珍, 郑小香, 等. 金线莲多糖对小鼠脾淋巴细胞体外分泌 NO 的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(2): 287-290.  
 MA Y F, ZHENG N Z, ZHENG X X, et al. Effect of polysaccharides from *acanthopanax aureus* on the exocrine of NO in mouse spleen lymphocyte [J]. *Chinese journal of veterinary medicine*, 2017, 37(2): 287-290.
- [12] 张思哲, 严亚锋. 杨梅素对小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞增殖的影响[J]. *中医药导报*, 2017, 23(6): 37-40.  
 ZHANG S Z, YAN Y F. Effects of myricetin on proliferation of spleen lymphocytes and peritoneal macrophages in mice [J]. *Journal of traditional Chinese medicine*, 2017, 23(6): 37-40.
- [13] XIE W, DING W, DAI W, et al. Effects of bingxiang powder on lymphocyte proliferation and cytokine secretion in mice infected with influenza A[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2013(6): 578-581.
- [14] PAN L C, XU X H, ZHANG N N, et al. HJB-1, a 17-hydroxy-jolkinolide B derivative, inhibits LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages[J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 21(2): 474-480.
- [15] 赵洁, 王哦鸣, 李继祥. MTT 法检测淋巴细胞增殖能力的影响因素[J]. *畜禽业*, 2008, (2): 28-30.  
 ZHAO J, WANG W M, LI J X. Influence factors of lymphocyte proliferation by MTT assay [J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2008, (2): 28-30.
- [16] 裴亚琼, 张倩, 胡倩倩, 等. 硼对大鼠脾脏淋巴细胞的毒性作用及增殖和凋亡的影响[J]. *安徽科技学院学报*, 2018, 32(2): 7-13.  
 PEI Y Q, ZHANG Q, HU Q Q, et al. Toxic effect of boron on spleen lymphocytes and its effects on proliferation and apoptosis in rats [J]. *Journal of Anhui University of Science and Technology*, 2018, 32(2): 7-13.
- [17] 宋美芳, 李光, 陈曦, 等. 两种石斛多糖提高小鼠免疫活性的初步研究[J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(6): 428-430.  
 SONG M F, LI G, CHEN X, et al. A preliminary study on immune activity enhancement of two dendrobium polysaccharides in mice [J]. *Chinese Journal of Pharmacy*, 2013, 48(6): 428-430.
- [18] 杜春艳. 大叶性肺炎患儿血清和支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10、HMGB1 的水平变化及意义[D]. 第四军医大学, 2014.  
 DU C Y. Changes and significance of TNF-, IL-6, IL-8, IL-10, AND HMGB1 levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of children with lobar pneumonia [D]. Fourth Military Medical University, 2014.
- [19] 张秀德. 黄芪多糖对高糖状态下肾小球系膜细胞 IL-8 和 IL-10 表达的影响[D]. 2013.  
 ZHANG X D. Effect of ASTRagalus polysaccharide on the expression of IL-8 and IL-10 in glomerular mesangial cells in high glucose state [D]. 2013.
- [20] 马昭, 连科讯, 刘钢, 等. 中药复方多糖对不同 MHC B-L  $\beta$  II 基因型鸡淋巴细胞 IL-2, IL-4, IL-12 mRNA 表达量的影响[J]. *新疆农业科学*, 2017, 54(12): 2320-2328.  
 MA Z, LIAN K X, LIU G, et al. Chinese herbal medicine compound polysaccharide of different MHC-L beta II genotype B chicken lymphocytes IL 2, IL-4, the influence of the amount of IL-12 mRNA expression [J]. *Xinjiang Agricultural Science*, 2017, 54(12): 2320-2328. 