

苦瓜水提物对免疫抑制小鼠肠道黏膜免疫功能的影响

温如燕, 李相玲, 白莎莎, 罗霞, 周联(广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究苦瓜水提物(*Momordica Charantia* Aqueous Extract, MCAE)对环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cy)致免疫抑制小鼠的肠道黏膜免疫功能的影响。方法 通过 CCK-8 法检测肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)和派氏结(Peyer's Patches, PPs)淋巴细胞转化增殖;流式细胞术检测 MLN 及 PPs 中 B 淋巴细胞的比例和活化水平;ELISA 试剂盒检测肠道 sIgA 的分泌水平。结果 与 Cy 诱导的免疫抑制模型组比较, MCAE 中、高剂量(200, 400 mg·kg⁻¹)分别对 Cy 抑制的小鼠 MLN 和 PPs 淋巴细胞转化增殖能力有一定的上调作用($P < 0.05$); MCAE 中剂量对 MLN 和 PPs 中 B 淋巴细胞比例及活化水平的降低同样具有一定的上调作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 苦瓜水提物对 Cy 诱导的肠道黏膜免疫功能低下有一定的上调作用,其作用机制可能与 MLN 和 PPs 中 B 淋巴细胞的增殖、活化有关。

关键词: 苦瓜水提物;免疫抑制;肠道黏膜免疫

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)03-0261-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.014

Effects of *Momordica charantia* Aqueous Extracts on Intestinal Mucosa in Immunosuppressive Mice

WEN Ruyan, LI Xiangling, BAI Shasha, LUO Xia, ZHOU Lian (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the effects of *Momordica charantia* aqueous extracts(MCAE) on intestinal mucosa in immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide. **Methods** Cell proliferation was detected by CCK-8 in mesenteric lymph nodes(MLN) and the Peyer's Patches(PPs), and the proportion and activation of B lymphocytes were detected by flow cytometry in MLN and PPs. Intestinal sIgA was detected by ELISA. **Results** Compared with the immunosuppressive group, the groups of middle dose of and high dose of MACE significantly up the regulated the dropping ability of proliferation of MLN and PPs lymphocytes. Middle dose of MACE could increase the proportion level of B cells in MLN and PPs. **Conclusion** *Momordica charantia* aqueous extracts can up-regulate intestinal mucosa immune in immunosuppressive mice induced by cyclophosphamide, and its mechanism is closely related to the proliferation and activation of B lymphocytes in MLN and PPs.

Keywords: *Momordica charantia* aqueous extracts.; Immunosuppression; Intestinal mucosal immune

苦瓜(*Momordica charantia* L.)系莨菪目葫芦科苦瓜属植物苦瓜的果实,归心、脾、胃三经。《本草纲目》中记载:苦瓜苦寒、无毒,除邪热、解疲乏、清心明目、益气壮阳^[1],是著名药食两用的民间中草药。虽然现代医学研究已证实,苦瓜的水提液、醇提液或苦瓜粉具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、降血糖等多种活性作用^[2-9],但是目前尚不清楚苦瓜水提物的免疫调节作用是否与其对肠道黏膜免疫功能

的影响有关。肠道因其巨大的表面积和丰富的淋巴组织在整体免疫中扮演着重要角色,肠道黏膜是口服疫苗和诱导免疫耐受的重要部位或靶点^[10],肠道不但是食物消化吸收的场所,而且很可能是口服中药发挥局部免疫效应从而影响整体免疫的主要场所^[11]。因此,本实验研究苦瓜水提物(*Momordica Charantia* Aqueous Extracts, MCAE)对环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cy)诱导的免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖指

收稿日期: 2012-11-05

作者简介: 温如燕,女,硕士研究生,研究方向:免疫药理。Email: wenruyan.work@foxmail.com。通讯作者: 周联,研究员,博士生导师,研究方向:免疫药理与毒理。Email: zl@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省教育部产学研项目(20100907);广州中医药大学创新项目(K0100078)。

数、肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)和派氏结(Peyer's Patches, PPs)中B细胞比例和活化水平以及肠道sIgA分泌水平的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及药物 BALB/c小鼠, 雄雄, 6~8周龄, 体质量18~22 g, 广东省医学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2008-0002。MCAE, 陕西森弗生物技术有限公司, 为淡黄棕色, 粉末状, 用苯酚-硫酸法测得苦瓜多糖的含量为83.8%, 实验前用蒸馏水配制成混悬液; Cy, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: H32020875。

1.2 试剂及仪器 RPMI 1640培养液, 美国Gibco公司, 批号: 31800-022; 胎牛血清(FBS), HyClone公司, 批号: NXE0629; 刀豆蛋白(ConA), 美国Sigma公司, 批号: 11028-71-0; Cell Counting Kit-8 (CCK-8), 日本Dojindo公司; APC-anti-mouse B220 (批号: B147077)、FITC-anti-mouse CD69 (批号: E018089), 美国Biolegend公司; 小鼠sIgA ELISA试剂盒, 上海西塘公司, 批号: 1209162。自动细胞计数仪(AUTO-T4), 美国Nexcelom公司; 多功能酶标仪(Spectra FLUOR plus), 瑞士Tecan公司; 流式细胞仪(FACS-Canto II), 美国BD公司; 台式冷冻高速离心机(CS-15R), 美国Beckman公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 分组与给药 30只BALB/c小鼠, 随机分为5组, 每组6只, 分别为正常对照组(Control), 模型组(Model), 苦瓜水提取物高剂量组(HDMCAE)、中剂量组(MDMCAE)、低剂量组(LDMCAE)。根据文献报道^[12]和预试验结果, MCAE高、中、低剂量组分别给予MCAE 400, 200, 100 mg·kg⁻¹, 正常对照组和模型组给予等量纯水, 2次/d, 灌胃容积为20 mL·kg⁻¹, 连续7 d。给药第6天, 模型组和各给药组按80 mg·kg⁻¹腹腔注射Cy, 正常对照组注射生理盐水。

1.4 取材 无菌操作, 于给药的第8天, 脱颈椎处死小鼠, 浸入75%酒精2 min, 打开腹腔, 取MLN与PPs分别置于盛有预冷的PBS无菌培养皿中, 并从回盲端起取15 cm的肠段置于盛有10 mL PBS的培养皿中。

1.5 淋巴细胞增殖指数测定 机械分散法^[13]制备MLN与PPs细胞悬液, 1000 r·min⁻¹离心10 min, 4℃洗细胞2次, 用含10%FBS的RPMI1640重悬细胞, 自动细胞计数仪计数, 调整细胞浓度为2×10⁶个/mL, 以4×10⁵个/孔接种于96孔板, 加入终浓度

为5 μg·mL⁻¹的ConA, 同时设无刺激物的对照孔和细胞培养液的调零孔, 37℃, 5%CO₂, 饱和湿度下培养68 h后, 每孔加入CCK-8试剂10 μL, 震荡混匀, 继续孵育1 h, 酶标仪在波长450 nm处检测各孔吸光度(OD值), 按以下公式计算增殖指数: 增殖指数(SI)=刺激孔的OD值/未刺激孔的OD值^[14]。

1.6 MLN及PPs中B淋巴细胞比例和活化水平测定 按1.5项下方法制备MLN和PPs淋巴细胞悬液, 调整细胞数至1×10⁶个/mL, 取约4×10⁵个/管至流式管, 用APC-anti-mouse B220和FITC-anti-mouse CD69流式抗体标记后上流式细胞仪检测B细胞在淋巴结细胞中的比例(B220)和活化水平(B220-CD69)。

1.7 肠道sIgA测定 以10 mL PBS反复冲洗肠段5次, 收集冲洗液于15 mL离心管, PBS补足至12 mL, 3000 r·min⁻¹离心5 min。收集上清分装于1.5 mL EP管中。ELISA试剂盒检测sIgA, 按照ELISA试剂盒说明进行操作。

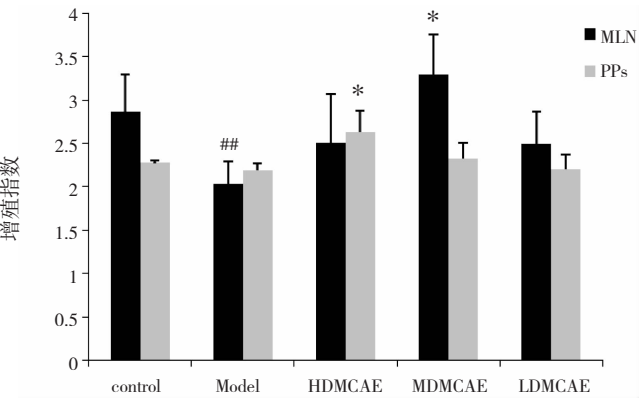
1.8 统计学处理方法 所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用SPSS17.0统计学软件, 多组间比较采用单因素方差分析方法, 组间两两比较用dunnett法。

2 结果

2.1 MCAE对淋巴细胞增殖指数的影响 与正常对照组比较, 模型组MLN淋巴细胞增殖指数明显降低($P < 0.01$), 但PPs淋巴细胞增殖指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, MDMCAE组能明显上调MLN淋巴细胞增殖能力, 差异有统计学意义($P < 0.05$); HDMCAE组对PPs淋巴细胞的增殖能力有明显上调作用, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图1。

2.2 MCAE对MLN和PPs中B淋巴细胞的比例和活化水平的影响 与正常对照组比较, 模型组MLN和PPs中的B细胞比例(B220)明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), PPs中的B细胞的活化水平(B220-CD69)明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, MDMCAE组能明显上调MLN和PPs中B细胞比例($P < 0.05$), 明显上调PPs中B细胞的活化水平, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。LDMCAE组能明显上调PPs中B细胞的比例($P < 0.01$), 见表1。

2.3 MCAE对肠道sIgA的影响 与正常对照组比较, 模型组小鼠肠道sIgA的分泌水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); MCAE中、低剂量组有促进小鼠肠道sIgA分泌的趋势, 但无统计学意义($P >$



注：与正常对照组比较，^{##}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05。
图 1 苦瓜水提取物对 MLN 和 PPs 淋巴细胞增殖指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Figure 1 Effects of *Momordica charantia* aqueous extracts on lymphocyte proliferation of mice MLN and PPs

表 1 MCAE对 MLN 和 PPs 中 B 淋巴细胞的影响($\bar{x} \pm s$, %)
Table 1 Effects of *Momordica charantia* aqueous extracts on B lymphocyte of mice MLN and PPs

组别	<i>n</i>	MLN		PPs	
		B220	B220-CD69	B220	B220-CD69
Control	6	14.88 ± 6.18	0.80 ± 0.20	68.23 ± 5.05	7.95 ± 2.19
Model	6	7.33 ± 2.58 ^{##}	0.70 ± 0.14	41.18 ± 9.33 ^{##}	2.85 ± 0.54 [#]
HDMCAE	6	8.90 ± 0.70	0.55 ± 0.07	39.05 ± 5.82	4.70 ± 1.60
MDMCAE	6	11.60 ± 2.50 [*]	0.78 ± 0.60	53.50 ± 2.50 [*]	7.40 ± 0.71 ^{**}
LDMCAE	6	10.78 ± 1.50	0.88 ± 0.50	54.83 ± 7.23 ^{**}	4.27 ± 0.58

注：与正常对照组比较，^{*}*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

0.05)，见表 2。

表 2 MCAE 对肠道 sIgA 的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of *Momordica charantia* aqueous extracts on sIgA of mice intestine

组别	<i>n</i>	sIgA 分泌量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Control	6	38.27 ± 8.74
Model	6	16.02 ± 5.88 ^{##}
HDMCAE	6	15.28 ± 0.22
MDMCAE	6	19.10 ± 3.33
LDMCAE	6	18.25 ± 4.49

注：与正常对照组比较，^{##}*P* < 0.01。

3 讨论

肠道黏膜免疫在很多较难吸收的大分子物质生物活性作用机制研究中具有重要地位^[11]，通过肠道黏膜给药，达到黏膜局部和整体同时获得预防和治疗特定疾病的能力是肠道黏膜免疫研究的重点之一^[15-16]。

肠道中 MLN 是肠相关淋巴组织的重要组成部分，沿空、回肠血管及其分支排列，在肠道免疫防御中起重要作用。PPs 是存在于哺乳动物小肠段的集合淋巴小结，沿肠系膜对侧分布，其中富含 T、B 淋巴细胞，是肠道黏膜免疫系统的免疫诱导部位。MLN 和 PPs 所含淋巴细胞数量和活化状态等反映肠道黏膜局部的免疫状态。肠道黏膜免疫以 B 细胞为主，B 细胞的数量和活化水平可直接反映肠道黏膜免疫功能。本研究中 Cy 能明显抑制肠道 B 细胞的比例和活化水平，而 MCAE 可改善或恢复 B 细胞的比例及活化水平。MCAE 对肠道黏膜免疫功能的影响主要表现为 MDMCAE 能改善 Cy 对 MLN 和 PPs 淋巴细胞增殖能力的抑制作用，对 Cy 诱导的肠道 MLN 和 PPs 中 B 淋巴细胞比例的失衡和活化水平的降低具有改善或恢复作用，这可能是其发挥肠道黏膜免疫调节作用的主要机制之一。

sIgA 主要存在于乳汁、唾液、泪液、呼吸道、消化道、生殖道黏膜表面分泌物中，参与局部黏膜免疫，是机体抗感染的“边防军”^[17]。以 sIgA 为主的体液免疫在肠道黏膜免疫中发挥主导作用，阻止肠道微生物及其毒性分子对肠黏膜的攻击^[18]。本研究结果表明，MCAE 有改善 Cy 诱导的小鼠肠道 sIgA 分泌水平降低的趋势。而 sIgA 主要由 B 细胞产生，由此说明 MCAE 对 B 细胞功能恢复有一定作用，进而改善肠道黏膜免疫的功能。苦瓜原汁能明显提高正常小鼠和 Cy 所致免疫抑制小鼠的血清溶菌酶含量、血清血凝抗体滴度、白细胞吞噬活性和免疫玫瑰花形成细胞形成率^[19]。苦瓜原汁与 MCAE 成分基本类似。本研究发现随着剂量的增加，淋巴细胞的增殖指数，B 细胞比例和肠道 sIgA 的分泌水平并没有继续恢复，可能与供试品相对复杂的成分有关，本研究所使用的 MCAE 中苦瓜多糖所占比例为 83.8%，苦瓜皂苷约 10%，还有约 6.2% 的其他水溶性成分。蔡寅等^[12]研究表明，苦瓜多糖具有较强的免疫增强活性并可能通过刺激淋巴细胞、增强巨噬细胞的活化来调节机体的免疫功能，从而抑制肿瘤细胞的生长。推测 MCAE 对肠道黏膜免疫功能的影响可能与其中含量最多的苦瓜多糖有关，具体细节还有待进一步研究。

参考文献：

[1] 张瑜, 崔炯谟, 赵余庆. 苦瓜抗肿瘤研究进展[J]. 中国现代中药, 2009, 11(1): 4-6.

- [2] 许红心, 倪坚军. 苦药的药用研究概况[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(4): 73-75.
- [3] Evandro FF, Chris ZYZ, Jack HW, et al. The MAP30 protein from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Letters, 2012, 324(1): 66-74.
- [4] Thenmozhi AJ, Subramanian P. Antioxidant potential of *Momordica charantia* in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2010, (4): 1-7.
- [5] Nivtabishekam SN, Asad M, Prasad VS. Pharmacodynamic interaction of *Momordica charantia* with rosiglitazone in rats[J]. Chem Bio Interact, 2009, 177(3): 247-253.
- [6] Shih CC, Lin CH, Lin WL. Effects of *Momordica charantia* on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 81(2): 134-143.
- [7] Cheng HL, Huang HK, Chang CI, et al. A cell based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase[J]. Agric Food Chem, 2008, 56(16): 6835-6843.
- [8] Prasad V, Jain V, Dorle AK. Evaluation of *Momordica charantia* ghrita for immunomodulatory activity[J]. Journal of Plant Sciences, 2006, 1(1): 80-85.
- [9] Tripathi UN, Chandra D. Diabetes induced oxidative stress: a comparative study on protective role of *Momordica charantia* and metformin [J]. Pharmacognosy Research, 2009, 1(5): 299-306.
- [10] Kay RA, Ferguson A. The immunological consequences of feeding cholera toxin I. Feeding cholera toxin suppresses the induction of systemic delayed-type hypersensitivity but not humoral immunity[J]. Immunology, 1989, 66(3): 410-415.
- [11] Zhao HY, Luo YY, Lu C, et al. Enteric mucosal immune response might trigger the immunomodulation activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide in mice[J]. Planta Med, 2010, 76(3): 223-227.
- [12] 蔡寅, 刘敏, 吴勋贵, 等. 苦瓜多糖抗肿瘤及免疫增强活性的研究[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(2): 131-134.
- [13] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 53.
- [14] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT法和CCK-8法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(4): 400-401.
- [15] Fortun-Lamothe L, Boullier S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits[J]. Livestock Science, 2007, 107(1): 1-18.
- [16] Mann JF, Acevedo R, Campo JD, et al. Delivery systems: a vaccine strategy for overcoming mucosal tolerance[J]. Expert Review of Vaccines, 2009, 8(1): 103-112.
- [17] 龚非力, 熊思东. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 35.
- [18] 刘冬妍, 刘沛. 肠道分泌型IgA的成分及功能[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(12): 2845-2848.
- [19] 程光文, 陈清山, 张绪忠. 苦瓜对正常小鼠和免疫抑制小鼠免疫促进作用的实验观察[J]. 中国冶金工业医学杂志, 1996, 15(4): 198-200.

(编辑: 梁进权)

清金得生片联合化疗对 Lewis 荷瘤小鼠 Fas、FasL mRNA 表达的影响

陈燕¹, 刘展华², 周岱翰¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察清金得生片联合化疗对 Lewis 荷瘤小鼠 Fas、FasL mRNA 表达的影响。**方法** Lewis 肺癌荷瘤小鼠随机分为模型组、清金组、顺铂组、清金加顺铂组, 给药 10 d 后, 取肿瘤组织, 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠 Fas、FasL mRNA 的表达。**结果** 清金加顺铂组瘤体组织 Fas mRNA 的表达显著高于模型组 ($P < 0.05$), 各给药组间差异无统计学意义; 与模型组比较, 清金组、顺铂组、清金加顺铂组瘤体组织 FasL mRNA 的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 各给药组间差异无统计学意义。**结论** 清金得生片联合化疗的抗肿瘤作用与调节 Fas/FasL 系统, 从而逆转肿瘤的免疫逃逸有关。

关键词: 清金得生片; Lewis 肺癌; Fas mRNA; FasL mRNA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0264-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.015

收稿日期: 2012-11-23

作者简介: 陈燕, 女, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤的中西医结合临床及实验研究。Email: 554885653@qq.com。通讯作者: 周岱翰, 首席教授, 主任医师, 研究方向: 肿瘤的中西医结合临床及基础研究。Email: 13902206571@139.com。