

刺五加提取物对果蝇免疫功能的影响

李文佳, 刘 强, 金丽华*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 研究刺五加提取物对果蝇天然免疫和肠道免疫功能的影响。**方法** 用含或不含刺五加根或果实提取物的细菌或真菌生物溶液感染果蝇, 观察刺五加根和果实提取物对感染细菌或真菌以及对热刺激果蝇生存率的影响; 果蝇肠道组织免疫染色, 荧光显微镜观察肠壁细胞凋亡情况; 提取被真菌孢子感染的果蝇总 RNA, 检测抗菌肽表达量。**结果** 刺五加根和果实提取物能提高细菌感染后果蝇的生存率, 缓解肠壁细胞凋亡, 也可提高经真菌孢子感染后果蝇的生存率, 使体内部分抗菌肽出现高表达, 也能提高经热刺激处理果蝇的生存率。**结论** 刺五加根和果实提取物能显著提高果蝇机体免疫功能。

关键词: 刺五加; 果蝇; 肠道免疫; 天然免疫; 细胞凋亡

中图分类号: R979.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1997-05

Effect of extract from roots and rhizomes of *Acanthopanax senticosus* on immune function of *Drosophila melanogaster*

LI Wen-jia, LIU Qiang, JIN Li-hua

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the effect of the extract from the roots and rhizomes of *Acanthopanax senticosus* (ERA) and extract especially here from the fruits of *A. senticosus* (EFA) on innate immunity and gut immunity of *Drosophila melanogaster*. **Methods** *D. melanogaster* was infected by bacterial or fungal biological solution with or without ERA or EFA, and the effects of ERA or EFA on the survival rates of *D. melanogaster* with microbial infection and thermal stimulation were recorded. Cell apoptosis was observed using fluorescence microscopy after immunostaining gut tissue of *D. melanogaster*. The total RNA of spore-infected *D. melanogaster* was extracted and the expression of antimicrobial peptides was detected. **Results** ERA and EFA could improve the survival rate of bacteria-infected *D. melanogaster*, meanwhile alleviate the apoptosis of gut epithelial cells. The survival rate of spore-infected *D. melanogaster* was improved by ERA and EFA, and certain antimicrobial peptides were highly expressed *in vivo*. ERA and EFA could also improve the survival rate of *D. melanogaster* with thermal stimulation. **Conclusion** ERA and EFA could significantly improve the immune function of *D. melanogaster*.

Key words: roots and rhizomes of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; *Drosophila melanogaster* Meigen; gut immunity; innate immunity; apoptosis

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 为五加科植物, 干燥根和根茎可入药, 果实虽也具有药理活性^[1-4], 但对其的研究鲜见报道。刺五加具有增强机体免疫力、抗氧化、阻止细胞凋亡和调节炎症反应等多种功效^[5-6], 其果实水提取物中的活性成分有丁香苷、黄酮类和多糖等, 而根茎水提取物中上述有效成分的量相对较高^[7-8]。

果蝇没有类似哺乳动物的 B 和 T 淋巴细胞, 因而不具有获得性免疫系统, 只能通过天然免疫系统对病原微生物的侵染做出免疫应答^[9]。天然免疫是多

细胞生物抵抗各种微生物入侵的第一道防线, 而肠道免疫作为其重要组成部分, 是对抗细菌、毒素、食物抗原和潜在有害生物的生理和免疫屏障。近年来对中药在促进体液免疫和细胞免疫方面的研究较多, 而对其在肠道免疫和肠道炎症影响的报道较少^[10-11]。本实验利用细菌、真菌感染和热刺激诱导黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 肠道免疫和天然免疫, 通过检测果蝇生存率变化、体内抗菌肽表达和肠内细胞凋亡, 分析刺五加根和果实提取物对果蝇免疫功能的影响, 为刺五加在增强机体免

收稿日期: 2012-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30940063, 31070775); 中央高校基本科研业务费专项资金 (DL09DAQ01)

作者简介: 李文佳 (1988—), 女, 蒙古族, 硕士研究生, 研究方向为果蝇天然免疫。Tel: 13614518464 E-mail: 1016668226@qq.com

*通讯作者 金丽华 Tel: 15046109867 E-mail: lhjin2000@hotmail.com

疫功能方面的深入开发和广泛应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药材和试剂

刺五加根和果实购自哈尔滨世一堂大药房, 由东北林业大学生命科学学院王秀华教授鉴定为刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 根和果实。Trizol 试剂盒、7-AAD 染色试剂盒, Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs, TakaRa 公司。其他所用试剂均为分析纯。胰蛋白胨、酵母提取物, Oxoid 公司。

1.2 动物与菌种

野生型黑腹果蝇 *WT* (W^{1118}) 为实验室保存, 培养温度 25 °C、相对湿度 60%。白僵菌 *Beauveria bassiana*, 实验室保存; 革兰阴性菌阴沟肠杆菌 *Escherichia cloacae* (Jordan) 和革兰阳性菌单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* (Joseph Lister), 由厦门大学韩家淮教授提供。

1.3 仪器

ALC—210.4 型电子分析天平, 北京赛多利斯公司; Mastercycle Gradient 型 PCR 仪、5417R 型低温离心机, Eppendorf 公司; UV—1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; Elix5 去离子水系统, Millipore 公司; Picospritzer III 微量注射仪, Pneutronics 公司; SZ51 型显微镜, 日本 Olympus 公司; Axioskop 2 plus 型荧光显微镜, Zeiss 公司。

2 方法

2.1 刺五加根和果实提取液制备

将刺五加根、果实粉碎, 分别称取 20 g 置于 200 mL 去离子水中浸泡 24 h, 加热煮沸 3 h, 用纱布滤过, 再加入 200 mL 去离子水重复提取 1 次, 将两次提取液合并后煮沸浓缩至 200 mL, 4 °C 备用。色谱法测定含紫丁香苷不低于 0.5%, 符合《中国药典》2010 版(一部)的质量标准^[1]。

2.2 培养基配制

正常培养基: 每 200 mL 去离子水加入玉米粉 14.2 g、琼脂 1.1 g、酵母粉 3.3 g、大豆粉 1.9 g、白糖 17 g、丙酸 0.94 mL。刺五加培养基: 正常培养基中的去离子水换成等体积刺五加根或果实提取液 (0.1 g/mL)。

2.3 菌液配制

2.3.1 细菌菌液配制 将过夜培养的细菌按 1:100 比例接种到新鲜配制的 LB 液体培养基 (10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、5 g/L 氯化钠, 实验室自制) 中, 37 °C 振荡培养 14 h, 测菌液的浓度,

离心后弃上清液, 在菌体沉淀中加入去离子水(模型组)或刺五加根或果实提取液, 配制成吸光度 (A_{600}) 值为 200 的菌液, 4 °C 储存, 备用。

2.3.2 真菌孢子溶液配制 将白僵菌涂布到新鲜 LB 固体培养基上, 25 °C 静置培养 7 d, 培养基平板上的孢子用无菌 PBS 收集后滤过, 测定孢子浓度, 配制成 A_{600} 值为 0.05 的孢子溶液, 4 °C 储存, 备用。

2.4 对细菌诱导肠道炎症果蝇肠道免疫的影响

普通培养基中孵化的果蝇作为对照组, 含刺五加根或果实提取物的培养基中孵化的果蝇作为实验组。

2.4.1 对果蝇生存率的影响 随机收集各组羽化 3~4 d 的果蝇, 雌、雄各 15 只。先将果蝇饥饿 2 h, 再移到放有 5 层滤纸的果蝇管中, 向滤纸加入 420 μ L 的阴沟肠杆菌或单核细胞增生李斯特菌菌液将其充分浸润, 并将多余的菌液吸出^[12-13]。每 24 h 更换 1 次滤纸, 同时记录果蝇死亡数, 计算生存率, 共记录 6 d, 实验重复 3 次。

2.4.2 果蝇肠道免疫染色观察 随机收集各组羽化 3~4 d 的雌果蝇 30~40 只, 连续喂食菌液, 其中阴沟肠杆菌液喂食 4 d, 李斯特菌液喂食 5 d。在显微镜下分离出存活雌果蝇的完整肠道, 置于载玻片上, 7-AAD 染色 30 min, 40 g/L 的多聚甲醛固定 10 min, DAPI 染色 10 min, 封片后在 Zeiss 荧光显微镜下观察并拍照。每组分离果蝇肠道 8~10 条, 实验重复 3 次。

2.5 对果蝇感染真菌的影响

普通培养基中孵化的果蝇作为对照组, 含刺五加根或果实提取液的培养基孵化的果蝇作为实验组。

2.5.1 对果蝇死亡率的影响 收集各组雌、雄各 15 只, 用毛细玻璃管 ip 白僵菌孢子溶液 60 nL, 每组注射 1 次, 注射后果蝇放回相应培养基内, 每隔 3 天更换 1 次培养基, 每 24 h 记录果蝇死亡数, 计算生存率, 共记录 7 d, 实验重复 3 次。

2.5.2 对果蝇抗菌肽的影响 随机收集各组羽化 3~4 d 的雄果蝇各 15 只, ip 白僵菌孢子 6 h 后, 提取存活果蝇的总 RNA, 反转录成 cDNA 后利用半定量 PCR 方法检测多种抗菌肽的表达。

2.6 对果蝇热刺激损伤的影响

普通培养基中孵化的果蝇作为对照组, 含刺五加根或果实培养液的培养基中孵化的果蝇作为实验组。分别收集各组羽化 3~4 d 的果蝇, 雌雄各 30 只。将各组果蝇放置在 35 °C、相对湿度 60% 的培养箱中进行热刺激处理, 每隔 1 h 分别记录 1 次雌雄果蝇的死亡数, 共记录 6 h, 实验重复 3 次^[14]。

2.7 统计学处理

采用 Minitab 软件进行统计分析, 组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对细菌诱导肠道炎症果蝇肠道免疫的影响

3.1.1 对果蝇生存率的影响 喂食阴沟肠杆菌菌液 6 d 后, 模型组果蝇的生存率为 28%, 而刺五加根、果实提取物组果蝇的生存率分别为 86%、98% ($P < 0.05$ 、 0.01), 比模型组分别提高了 2、2.5 倍。刺五加也可提高单核细胞增生李斯特菌诱导的果蝇生存率, 在给予菌液第 6 天, 模型组果蝇的生存率为 21%,

刺五加根、果实组果蝇的生存率为 49%、72% ($P < 0.05$ 、 0.01), 比模型组提高了 1.3、2.4 倍, 效果略低于对阴沟肠杆菌的作用。结果见图 1。

3.1.2 果蝇肠道免疫染色观察 给予刺五加根或果实提取物后, 感染阴沟肠杆菌的果蝇肠道内凋亡细胞数量与模型组相比分别减少了 89.1%、91.8% ($P < 0.05$ 、 0.01), 而感染单核细胞增生李斯特菌果蝇肠道内凋亡细胞则分别减少了 89.8%、92.9% ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明刺五加根和果实提取物能缓解阴沟肠杆菌和单核细胞增生李斯特菌对肠道细胞造成的损害。结果见图 2。

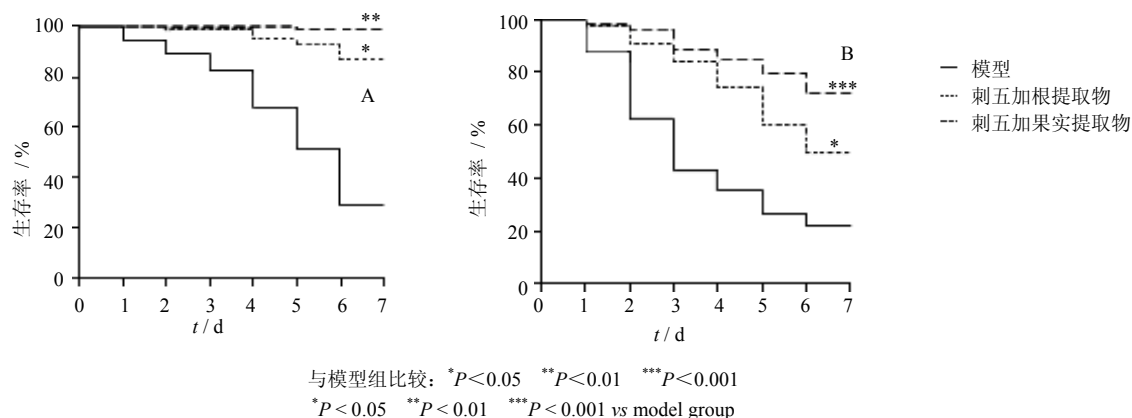


图 1 刺五加根和果实提取物对感染阴沟肠杆菌 (A) 和单核细胞增生李斯特菌 (B) 后果蝇生存率的影响 ($n=30$)

Fig. 1 Effects of ERA and EFA on survival rate of *D. melanogaster* infected by *E. cloacae* (A) and *L. monocytogenes* (B) ($n=30$)

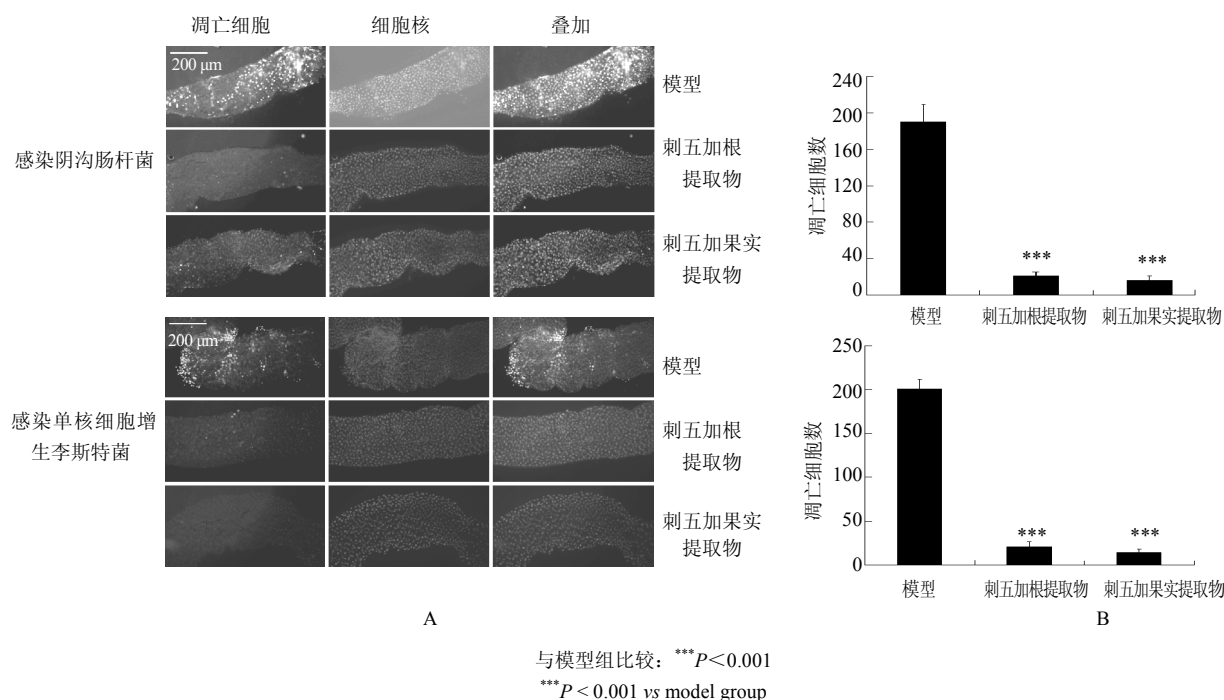


图 2 刺五加根和果实提取物对感染细菌后果蝇的肠细胞免疫染色结果 (A) 和凋亡细胞数 (B) 的影响

Fig. 2 Effects of ERA and EFA on immunostaining (A) and apoptosis cell account (B) of enterocytes in *D. Melanogaster* infected by bacteria

3.2 对果蝇真菌感染的影响

模型组在注射真菌孢子液后第 7 天, 生存率为 3%, 而刺五加根、果实组果蝇的生存率分别为 43%、55% ($P < 0.05$), 表明刺五加可减轻真菌感染造成的损害, 其中刺五加果实的效果比根更显著(图 3)。在注射真菌孢子液 6 h 后检测抗菌肽的表达量, 发现刺五加根、果实组的果蝇 Dfn 表达量比模型组分别提高了 5.5、6.5 倍, 刺五加果实组果蝇 CecC 的表达量比模型组提高了 4 倍(图 4)。

3.3 对热刺激损伤的影响

果蝇最适宜的生长温度是 25 °C, 升高培养温度对果蝇会造成一定损伤。在热刺激 6 h 后, 模型组雄性果蝇全部死亡, 而刺五加根、果实组的雄性果蝇生存率分别为 31%、51% ($P < 0.05$); 模型组雌性果蝇生存率为 3%, 而刺五加根、果实组雌性果蝇的生存率分别为 77%、63% ($P < 0.05$ 、0.001),

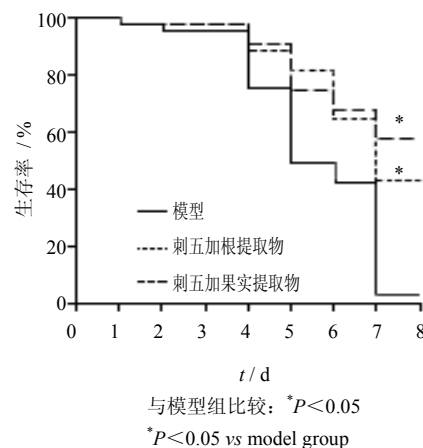
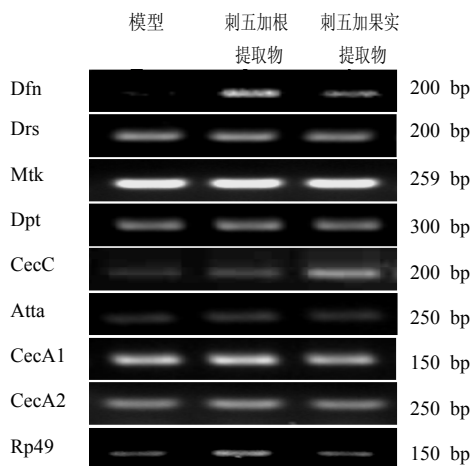


图 3 刺五加根和果实提取物对感染白僵菌果蝇生存率的影响 ($n=30$)

Fig. 3 Effects of ERA and EFA on survival rate of *D. melanogaster* infected by *B. bassiana* ($n=30$)



与模型组比较: $*P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs model group

图 4 刺五加根和果实提取物对感染白僵菌的果蝇抗菌肽表达的影响 ($n=30$)

Fig. 4 Effects of ERA and EFA on expression of antimicrobial peptides of *D. melanogaster* infected by *B. bassiana* ($n=30$)

表明刺五加根和果实提取物可增强果蝇对非特异性有害刺激的抵抗力。结果见图 5。

4 讨论

刺五加可增强机体非特异性防御能力, 具有免疫调节、扩张血管、降血压、抗肿瘤及抗疲劳作用, 临床上还可用于调节血压, 治疗冠心病等^[15-16]。肠道是病原微生物入侵机体的最主要部位, 许多疾病的发生都是从影响肠道的免疫功能开始。本实验用细菌诱导果蝇肠道免疫和肠道炎症, 考察刺五加根和果实提取物的免疫促进作用。结果表明, 刺五加根和果实提取物明显提高感染细菌果蝇的生存率,

肠道内壁细胞凋亡明显降低, 表明刺五加能够增强果蝇肠道免疫、降低肠道壁细胞引起的炎症反应, 从而对肠道产生保护作用。刺五加根和果实提取物还增强机体对热刺激损伤的抵抗力, 与刺五加可以增强机体对非特异性损伤的抵抗力的研究结果相符^[17]。刺五加根和果实提取物还可提高注射真菌孢子液果蝇的生存率, 明显增加其体内抗菌肽表达量, 表明果蝇免疫系统抗病能力得到提高, 这可能与刺五加提高腹腔内巨噬细胞的吞噬能力有关。本实验中刺五加果实的药效与根茎相似, 表明刺五加果实也具有较高的药用价值。

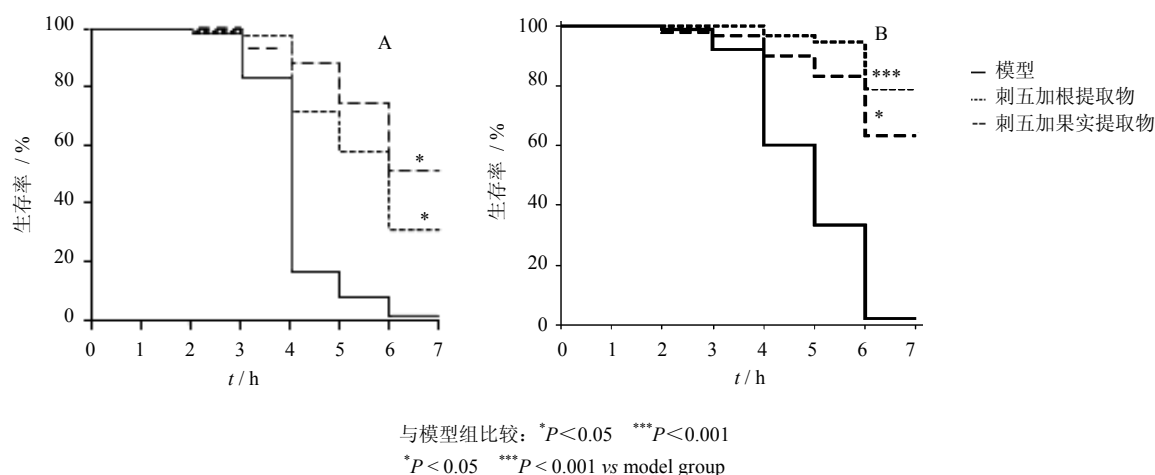


图 5 刺五加根和果实提取物对热刺激后雄性果蝇 (A) 和雌性果蝇 (B) 生存率的影响 ($n=30$)
Fig. 5 Effect of ERA on survival rate of male (A) and female (B) *D. melanogaster* after thermal stimulation ($n=30$)

随着畜牧业规模化发展、细菌耐药性以及畜产品中兽药残留的问题日益严重, 中药免疫增强剂抗微生物作用和基本不产生抗药性的优势日益凸显, 并将拥有广阔的发展前景^[18]。本研究为刺五加作为免疫增强剂进行广泛和深入的研究、开发提供了新的思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 何文兵, 徐 晶, 朱俊义, 等. 长白山野生刺五加果实的开发与利用 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 319-321.
- [3] 李志峰, 杨金义, 张武岗, 等. 刺五加的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 852-855.
- [4] 梁启明, 曲绍春, 于晓风, 等. 刺五加叶皂苷 B 对急性心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 444-447.
- [5] 王亚贤, 李继红, 张书芬, 等. 刺五加注射液对脑缺血再灌注大鼠转化生长因子 B1 表达的影响 [J]. 中医药信息, 2005, 22(5): 73-75.
- [6] 涂正伟, 周渭渭, 单 淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [7] 刘建华, 吕 宁, 李敬芬. 刺五加茎叶果实的生药学研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1193-1194.
- [8] 林秋叶. 刺五加水提物抗炎作用及其机制研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2007.
- [9] Brennan C A, Anderson K V. *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 457-483.
- [10] Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing [J]. *Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30 (Supl): 4-12.
- [11] Nagler-Anderson C, Shi H N. Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens [J]. *Crit Rev Immunol*, 2001, 21(1/3): 121-131.
- [12] Ha E M, Oh C T, Bae Y S, *et al*. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity [J]. *Science*, 2005, 310(5749): 847-850.
- [13] Ryu J H, Kim S H, Lee H Y, *et al*. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila* [J]. *Science*, 2008, 319(5864): 777-782.
- [14] Schriener S E, Katoozi N S, Pham K Q, *et al*. Extension of *Drosophila* lifespan by *Rosa damascena* associated with an increased sensitivity to heat [J]. *Biogerontology*, 2012, 13(2): 105-107.
- [15] 陈 凌, 王 利. 刺五加叶皂甙研究进展 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2005, 31(3): 91-93.
- [16] 程嘉艺, 李降薇, 柳 倩. 刺五加提取物对实验性急性脑缺血的保护作用 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 358-359.
- [17] 林秋叶, 李龙华, 金礼吉, 等. 刺五加化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(2): 25-28.
- [18] 王宏伟, 王 萱, 王忠仁, 等. 中草药免疫增强剂的有效成分与作用 [J]. 养殖技术顾问, 2010(4): 176.