

## 红景天提高黑腹果蝇肠道免疫功能研究

左占广, 朱彩霞, 鲁东立, 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 研究红景天提取物对果蝇肠道免疫功能的影响。方法 利用真菌和十二烷基硫酸钠(SDS)诱导果蝇肠道损伤, 通过比较果蝇生存率、肠道上皮细胞死亡、肠道上皮细胞内活性氧(ROS)的量和肠道形态变化等, 探讨红景天提取物对果蝇肠道免疫功能的影响。结果 红景天提取物可明显提高 *Beauveria bassiana* 孢子和 SDS 诱导后果蝇的生存率 ( $P < 0.05$ ); 降低肠道上皮细胞的死亡和肠道上皮细胞内 ROS 的量; 保护和维持肠道形态。结论 红景天提取物对真菌和 SDS 诱导的肠道免疫损伤具有很好的缓解和保护作用。

**关键词:** 红景天; 黑腹果蝇; 肠道免疫; 肠道上皮细胞; 生存率

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)05-0691-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.018

## Improvement of *Rhodiola rosea* on intestinal immune function of *Drosophila melanogaster*

ZUO Zhan-guang, ZHU Cai-xia, LU Dong-li, JIN Li-hua

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

**Abstract: Objective** To study the effect of *Rhodiola rosea* extracts on intestinal immune function of *Drosophila melanogaster*.

**Methods** *D. melanogaster* was treated by SDS and fungal biological solution with or without *R. rosea* extracts, and the effect of *R. rosea* extracts on the survival rate of *D. melanogaster*, intestinal epithelium cell death, relative contents of reactive oxygen species (ROS) in intestinal epithelium cells, and intestinal morphology changes were analyzed. **Results** *R. rosea* extracts could significantly improve the survival rate of SDS and fungus (*Beauveria bassiana*)-infected *D. melanogaster* ( $P < 0.05$ ), reduce the intestinal epithelial cell death and the level of intestinal ROS levels, and protect and maintain the intestinal morphology. **Conclusion** *R. rosea* extracts could significantly improve the intestinal immune function of *D. melanogaster* with the amelioration and protection of intestinal immunologic function injury induced by fungi and SDS.

**Key words:** *Rhodiola rosea* L.; *Drosophila melanogaster* Meigen; intestinal immunity; intestinal epithelium cell; survival rate

红景天 *Rhodiola rosea* L. 为景天科 (Crassulaceae) 红景天属 *Rhodiola* L. 的多年生草本或亚灌木植物, 其化学成分有红景天苷、酪醇、黄酮类和多酚类物质, 以及各种氨基酸和微量元素<sup>[1]</sup>。研究表明红景天具有增强记忆、改善心脑血管系统功能、增强免疫、抗疲劳、耐缺氧、抗肿瘤、降血糖、抗病毒、抗微波辐射和保护器官免受自由基损伤等多方面药理作用<sup>[2-6]</sup>。

肠道黏膜除了具有消化和吸收功能外, 还能够保护宿主免受外来物质的侵害, 是宿主抵御细菌、毒素、食物抗原和潜在有害生物的生理和免疫屏障<sup>[7-8]</sup>。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 的肠道免

疫系统的抵御机制是非常复杂的, 当果蝇肠道受到外界环境有害物质入侵时, 肠道上皮细胞作为肠道宿主抵御病原微生物的第一道防线会对其内部和外部因子做出应答, 从而维持其肠道内环境的稳态。肠道免疫应答主要表现在活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 的产生, 这两种重要的互补效应机制控制着肠道病原微生物的感染。此外, 肠道还通过动态生成和消除 ROS 来维持肠道内环境的氧化还原平衡, 这对肠道免疫应答起到了重要的补充作用<sup>[9-10]</sup>。

本实验利用真菌和致炎因子诱导果蝇肠道免疫

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070775, 31270923); 国家基础科学人才培养基金一科研训练及科研能力提高项目资助 (J1210053); 东北林业大学本科创新项目 (201210225109)

作者简介: 左占广 (1991—), 男, 山东人, 本科生。Tel: 18745032240 E-mail: zuozhanguang@gmail.com

\*通信作者 金丽华 Tel: 15046109867 E-mail: lhjin2000@hotmail.com

功能损伤,通过分析生存率、肠道上皮细胞死亡、肠道上皮细胞 ROS 产生和肠道形态学变化,探讨红景天提取物对果蝇肠道免疫功能的影响,为红景天在增强肠道免疫功能方面的研究和应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与试剂

红景天产自云南,由东北林业大学生命科学学院王秀华教授鉴定。NaCl 和十二烷基硫酸钠(SDS), Amresco 公司;  $H_2O_2$ , Sigma 公司; 7-氨基放线菌素(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)和二氢乙啶(dihydroethidium, DHE), Invitrogen 公司; 胰蛋白胨和酵母提取物, Oxoid 公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 果蝇与菌株

野生型黑腹果蝇 *WT* (*W<sup>1118</sup>*) 和真菌白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 为实验室保存。果蝇培养温度为 25 °C、相对湿度 60%。

### 1.3 仪器

UV-1800 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; Vortex-Genie 2 型涡旋振荡器, 美国 Scientific Industries 公司; SZ51 型显微镜, 日本 Olympus 公司; Axioskop 2 plus 型荧光显微镜, 德国 Zeiss 公司。

## 2 方法

### 2.1 红景天提取液的制备

将红景天粉碎,称取 20 g 于 200 mL 去离子水中浸泡 12 h, 小火煮沸 3 h, 滤过, 再加入 200 mL 去离子水用同样的方法提取 2 次, 合并 3 次提取液浓缩至 200 mL, 即获得 100 mg/mL 的红景天提取液, 4 °C 密封储存备用。高效液相色谱法测定红景天提取液中红景天苷质量分数为 0.513%。

### 2.2 培养基的配制

正常培养基: 培养基配制参见文献方法<sup>[10]</sup>。红景天提取物培养基: 正常培养基中的去离子水换成等体积的 25 mg/mL 红景天提取液。正常培养基中孵化的果蝇作为对照组, 含红景天提取物的培养基中孵化的果蝇作为实验组。

### 2.3 真菌孢子液的配制

将 *B. bassiana* 涂布到新鲜 LB 固体培养基上, 25 °C 静置培养 7 d, 培养基上的孢子用无菌 PBS 收集后滤过, 测定孢子浓度。孢子离心后弃上清, 在沉淀中加入 5% 蔗糖溶液(对照组)或含 5% 蔗糖的 25 mg/mL 红景天提取液(实验组), 配制成孢子溶液, 4 °C 储存备用。

### 2.4 果蝇生存率测定

随机收集羽化了 3~4 d 的果蝇, 雌、雄各 15 只。先将果蝇饥饿处理 2 h, 再移到放有 5 层滤纸的果蝇管中, 向滤纸中加入 450  $\mu$ L SDS 溶液(含 5% 蔗糖或含 5% 蔗糖的 25 mg/mL 红景天提取物)或菌液, 使滤纸充分浸润, 并吸除多余液体。每 24 小时更换 1 次滤纸, 同时记录果蝇死亡数, 计算生存率, 共记录 6~7 d, 每组实验重复 3 次。

### 2.5 肠道上皮细胞死亡观察和 ROS 定量测定

随机收集羽化了 3~4 d 的雌果蝇 30~40 只, 喂食含 5% 蔗糖的 SDS (0.6%) 溶液 96 h 或 48 h。在显微镜下分离出完整的肠道, 利用 7-AAD 或 DHE 染色 30 min, 多聚甲醛固定 10 min, DAPI 染色 10 min, 甘油封片后荧光显微镜下观察并拍照。每组分离的果蝇肠道约 10 条, 实验重复 3 次。

### 2.6 肠道形态变化观察

随机收集羽化 3~4 d 的雌果蝇 30~40 只, 喂食含 5% 蔗糖的 SDS (0.6%) 溶液 4~6 d。在显微镜下分离出完整的肠道于 PBS 中, 显微镜下观察并拍照。每组分离的果蝇肠道约 10 条, 实验重复 3 次。实验设在正常培养基孵化只喂食 5% 蔗糖溶液的正常组。

### 2.7 统计学处理

采用 Prism 软件进行统计学分析, 组间差异采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对果蝇生存率的影响

为了分析红景天提取物对果蝇肠道免疫功能的影响, 首先分别用真菌 *B. bassiana* 和致炎因子 SDS 处理实验组和对照组的果蝇, 观察红景天对果蝇生存率的影响。被 *B. bassiana* 孢子感染时, 喂食红景天提取物的实验组生存率明显高于对照组。处理 6 d 后对照组果蝇生存率为 15.6%, 而实验组的生存率为 55.6% (图 1-A), 与对照组相比提高了 40% ( $P < 0.05$ )。成体果蝇用 SDS (0.6%) 处理 6 d 后, 对照组的生存率仅为 3.3%, 而实验组的生存率为 54.5% (图 1-B), 比对照组提高了 51.2% ( $P < 0.05$ )。表明红景天提取物能抵御真菌和致炎因子 SDS 对果蝇的感染, 显著提高果蝇的生存率。

### 3.2 果蝇肠道上皮细胞死亡变化分析

为了探讨 SDS 处理后红景天提取物提高果蝇生存率的深一层机制, 本实验利用 7-AAD 染色分析肠道上皮细胞的死亡情况。7-AAD 作为一种核酸染料只能进入死亡细胞内与 DNA 结合, 激发后可

产生红色荧光。成体果蝇 SDS (0.6%) 处理 96 h 后, 对照组果蝇的中肠上皮细胞出现大量死亡, 而喂食红景天提取物的实验组中, 死亡的细胞数量明显减少 (图 2)。说明红景天提取物能明显缓解 SDS 对肠道上皮细胞造成的损伤。

### 3.3 果蝇肠道上皮细胞内 ROS 量分析

为了检测红景天提取物清除 ROS 的能力, 本

实验对果蝇进行 SDS (1.0%) 处理 48 h, 利用 DHE 染色方法分析细胞内 ROS 的量。结果表明, 对照组前中肠的大部分细胞和后中肠一半以上的细胞产生了大量的 ROS, 而喂食红景天提取物的实验组果蝇中, 中肠上皮细胞 ROS 的量明显减少 (图 3)。说明红景天提取物可以抑制肠道上皮细胞产生过量的 ROS, 保护机体免受氧化损伤。

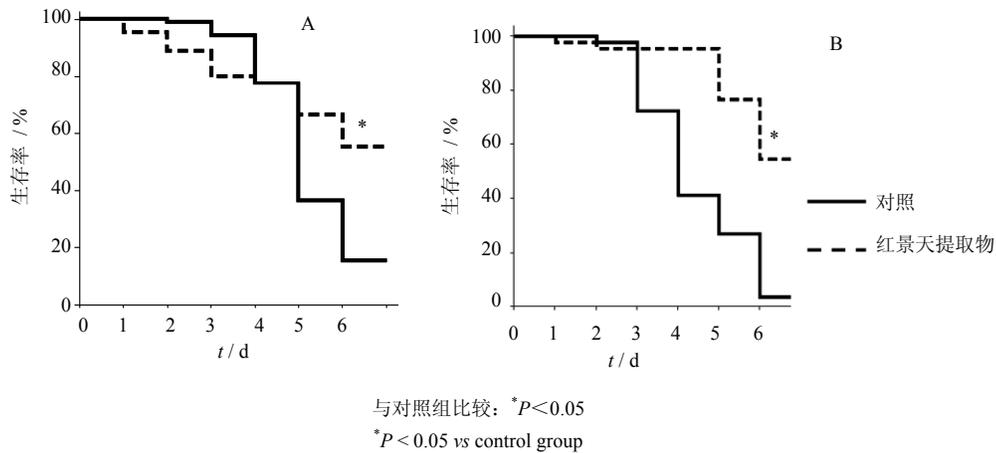


图 1 红景天提取物对真菌 *B. bassiana* (A) 和致炎因子 SDS (B) 处理后果蝇生存率的影响

Fig. 1 Effects of *R. rosea* extracts on survival rate of *D. melanogaster* treated with *B. bassiana* (A) and SDS (B)

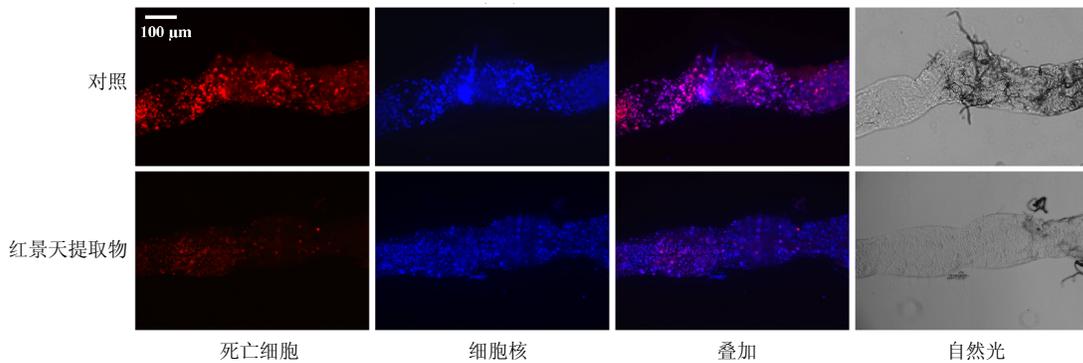


图 2 红景天提取物对 SDS 处理后果蝇肠道上皮细胞的影响

Fig. 2 Effects of *R. rosea* extracts on intestinal epithelial cells of *D. melanogaster* treated with SDS

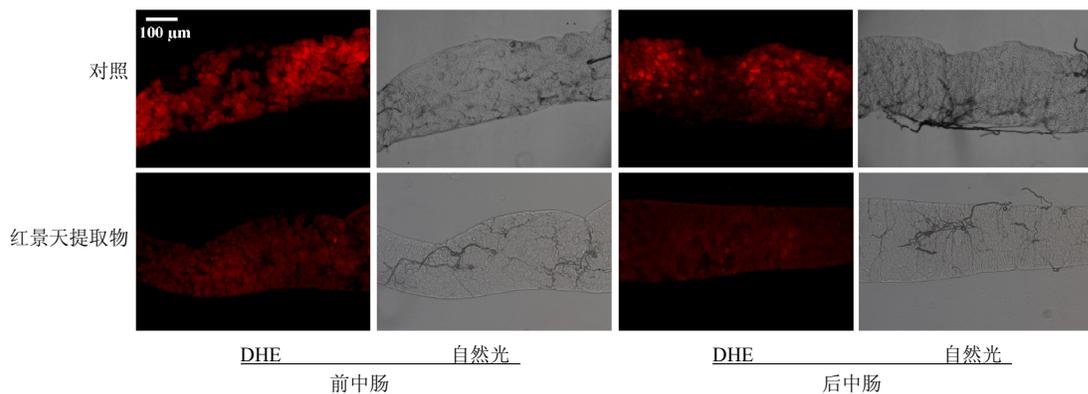


图 3 红景天提取物对 SDS 处理后果蝇肠道上皮细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 3 Effects of *R. rosea* extracts on ROS level in intestinal epithelial cells of *D. melanogaster* treated with SDS

### 3.4 果蝇肠道形态变化分析

肠道上皮细胞的损伤有可能引起肠道形态变化。首先, 将对照组和实验组用 SDS (0.6%) 处理 4 d 后分析果蝇肠道形态变化。对照组果蝇和只喂食蔗糖的正常果蝇相比, 长度明显缩短, 而且在中肠和后肠连接处出现了明显的黑色素瘤。而喂食红景天提取物的实验组果蝇肠道长度是对照组的 2 倍, 其肠道长度稍短于只喂食蔗糖的正常

果蝇, 并且未发现黑色素瘤 (图 4-A)。其次, 分析了 SDS (0.6%) 处理 4 d 或 6 d 后的肠道壁厚变化。处理 4 d 时, 对照组和实验组的肠道壁厚相近; 而处理 6 d 时, 对照组果蝇的肠道壁厚明显变薄, 而喂食红景天提取物的实验组果蝇肠道壁厚没有明显变化 (图 4-B)。此结果进一步证明了红景天提取物可保护肠道上皮细胞免受 SDS 诱导的炎症损伤。

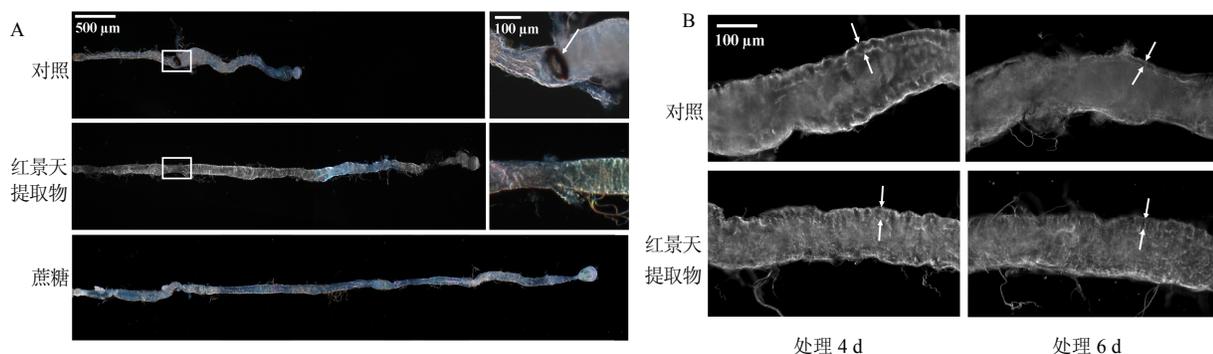


图 4 红景天提取物对 SDS 处理后果蝇肠道形态 (A) 和肠道壁厚 (B) 的影响

Fig. 4 Effects of *R. rosea* extracts on intestinal morphology (A) and wall (B) of *D. melanogaster* treated with SDS

## 4 讨论

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免疫功能开始的。果蝇与人类的肠道具有相似的结构、功能和干细胞分化机制<sup>[7-8]</sup>。所以, 可利用模式生物果蝇来研究提高肠道免疫功能相关的药用植物及其次生代谢产物。

本实验结果表明, 红景天提取物对真菌孢子和 SDS 诱导的肠道免疫损伤具有很好的缓解和保护作用。主要表现在: 红景天提取物可以明显提高真菌和 SDS 诱导后果蝇的生存率 ( $P < 0.05$ ); 在 SDS 诱导下, 红景天提取物可减少肠道上皮细胞的死亡和肠道上皮细胞内 ROS 的量, 进而维持果蝇的肠道形态和避免黑色素瘤的产生。红景天提取物降低肠道上皮细胞内 ROS 水平的结果表明, 红景天提取物可通过减少自由基的产生和减轻脂质过氧化反应来提高细胞的新陈代谢能力, 进而延缓机体的衰老<sup>[11]</sup>。另外, 只喂食 5% 蔗糖和红景天提取物时果蝇 6 d 内的生存率没有发生变化, 而且果蝇在含 25 mg/mL 红景天提取物的培养基中的生长状态与正常培养基相同, 这说明蔗糖和红景天提取物对果蝇不会造成损伤。综上所述, 红景天提取物可调节果蝇的肠道免疫功能, 增强果蝇的免疫力, 而其机制可能与自由基的清除有关。

## 参考文献

- [1] 金萍. 红景天的研究现状 [J]. 光明中医, 2011, 26(7): 1508-1511.
- [2] 关鑫. 红景天的临床功效与药理作用研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 32(7): 14.
- [3] 王国康, 张莉静. 红景天心血管系统作用机制研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(8): 152.
- [4] 谢乐斯, 刘艳丽, 董丹, 等. 红景天甙对小鼠免疫功能的影响及杀瘤效应 [J]. 大连医科大学学报, 2003, 25(1): 22-24.
- [5] 苑伟, 李士博, 马迎春, 等. 红景天纳米粉对小鼠抗缺氧和抗疲劳作用的实验研究 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 122-123.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 红景天昔及其昔元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 228-234.
- [7] Sansonetti P J. War and peace at mucosal surfaces [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(12): 953-964.
- [8] Buchon N, Broderick N A, Poidevin M, et al. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(2): 200-211.
- [9] 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.
- [10] Ryu J H, Ha E M, Oh C T, et al. An essential complementary role of NF- $\kappa$ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity [J]. *EMBO J*, 2006, 25(15): 3693-3701.
- [11] 李文佳, 刘强, 金丽华. 刺五加提取物对果蝇免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1997-2001.
- [12] 蔡漆, 石力夫, 姚斌, 等. 红景天昔及其衍生物体外清除自由基作用的研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(2): 114-116.