

桦木酸对小鼠淋巴细胞及巨噬细胞的影响分析

易金娥^{1*}, 袁莉芸¹, 文利新¹, B Obminska-Mrukowicz², 袁慧^{1*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128;

2. 弗罗兹瓦夫环境与生命科学大学动物医学院, 弗罗兹瓦夫 50-375, 波兰)

摘要: 为了研究桦木酸对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞的影响。从白桦树皮中提取桦木醇,经琼斯试剂氧化制备中间产物桦木酮酸后,用硼氢化钠还原合成桦木酸;取 6 周龄 KM 小鼠 168 只,随机分为 4 组,按 0、0.25、0.5 和 1 mg · kg⁻¹ 体质量连续灌胃 14 d,检测桦木酸对淋巴细胞的增殖,脾和胸腺淋巴细胞亚群以及脾淋巴细胞的溶血空斑数和巨噬细胞的吞噬能力的影响。结果表明,桦木酸能提高小鼠的免疫器官指数,协同促进 ConA 或 LPS 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖活性,提高胸腺淋巴细胞 CD4⁺ 百分率,脾淋巴细胞的 CD19⁺ 百分率以及 CD4⁺ / CD8⁺ 的百分比;桦木酸增加 SRBC 免疫小鼠溶血空斑数,还能显著增强腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力。结果提示,桦木酸具有一定的免疫调节作用,对小鼠的细胞免疫、体液免疫功能和非特异免疫有明显的增强作用。

关键词: 桦木酸;淋巴细胞;巨噬细胞

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)01-0124-07

Effects of Betulinic Acid on Lymphocyte and Macrophage in Mice

YI Jin-e^{1*}, YUAN Li-yun¹, WEN Li-xin¹, B Obminska-Mrukowicz², YUAN Hui^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Faculty of Veterinary Medicine, Wroclaw University of Environment and Life Science, Wroclaw 50-375, Poland)

Abstract: This study aimed to observe the effects of betulinic acid (BA) on the lymphocyte and macrophage in mice. BA was synthesized by oxidizing betulin from the bark of the white birch with Jones' reagent, followed by selective oxidation of the resulting betulonic acid with NaBH₄. 168 KM mice (6 weeks old) were orally administered the BA for 14 days with the dose of 0, 0.25, 0.5 and 1 mg · kg⁻¹ body weight. The effect of BA on the lymphocytes proliferation, thymocyte and splenocyte subsets, the number of plaque forming cells (PFC) and the phagocytic activity of the macrophages were evaluated. Oral administration of BA was found to significantly increase the thymus and spleen indices, lymphocytes proliferation induced by Concanavalin A or lipopolysaccharide, the percentage of CD4⁺ cells in thymus as well as the percentage of CD19⁺ B cells and the ratios of CD4⁺ / CD8⁺ cells in spleens. The number of PFC and the macrophage phagocytic activity was also enhanced. The results suggest that BA enhances mouse cellular immunity, humoral immunity, and activity of macrophages.

Key words: betulinic acid; lymphocyte; macrophage

桦木酸(Betulinic Acid, BA)属于羽扇豆烷型五环三萜,存在于多种植物中。1995 年发现 BA 抑

制 H9 淋巴细胞中 HIV 复制,对黑素瘤细胞具有极强的选择性毒性^[1-2],随后发现 BA 具有抗肿瘤、抗

收稿日期:2010-07-14

基金项目:湖南省教育厅资助项目(08C433);湖南省研究生创新项目(14)

作者简介:易金娥(1976-),女,土家族,湖南石门人,博士,副教授,主要从事免疫药理学与免疫毒理学研究

* 通讯作者:袁慧, E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn; 易金娥, E-mail: yibinzheng@163.com

微生物、抗炎、抗寄生虫、抗溃疡及抗疟疾等多种较强的生物活性^[3-4],且毒性低,安全指数大,使得 BA 应用更为广泛。目前 BA 的研究主要集中在对肿瘤细胞的凋亡,而对正常细胞的作用仍未见系统研究。BA 药理作用的发挥有可能是调节机体免疫功能,不一定直接作用于感染或肿瘤细胞,而且很多从植物中提取的三萜类化合物都具有免疫调控的能力。因此,本试验采用体内给药途径,探讨 BA 对正常小鼠淋巴细胞和巨噬细胞的影响,为其免疫研究提供理论依据,对 BA 的临床应用与开发具有重要实际意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 动物 KM 小鼠,体质量 18~22 g, 5~6 周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物公司。

1.1.2 试剂及仪器 rat antimouse CD4; FITC / CD8; RPE, rat antimouse CD19; FITC / CD3; RPE 购自 BD 公司; RPMI-1640, 胎牛血清(FBS) 购自 Hyclone 公司;刀豆蛋白 A (ConA), 噻唑蓝 (MTT), 脂多糖 (LPS) 购自 Sigma 公司;其余为分析纯试剂。高效液相色谱仪(德国, Waters), 质谱仪(Agilent 1100 Series LC/MSD, 美国), 核磁共振仪(Varian INOVA-300, 美国), CO₂ 细胞培养箱(Sanyo, 日本), 微量移液器(Eppendorf), 倒置显微镜(Olympus), 流式细胞仪(FACSCalibur, BD)。

1.1.3 植物来源 白桦木的树皮来源于波兰弗罗兹瓦夫, 2009 年春季收集。经 60 °C 烘干, 贮藏在黑暗、干燥处。

1.2 试验方法

1.2.1 白桦树中桦木醇的提取与桦木酸的合成

称取白桦树皮粉末 15 g, 用 200 mL 甲醇 70 °C 加热回流 3 h, 减压干燥, 加 2 mol · L⁻¹ NaOH 搅拌, 收集下层液, 减压蒸干并用乙醚溶解, 加适量的水充分摇匀, 收集上层液, 减压干燥得粗品 3.452 g; 称取 0.6 g 粗品, 硅胶柱层析, 减压干燥得桦木醇纯品 0.56 g, 纯度为 98.86%。

采用桦木酮酸为中间体合成桦木酸的方法。称取桦木醇 1 g, 丙酮溶解并快速搅拌, 冷却至 5~10 °C 后, 逐滴加入新制的琼斯试剂(桦木醇:琼斯试剂 = 1:6), 20 °C 反应 3 h, 过滤除去墨绿色沉淀, 减压蒸干丙酮, 残液用乙酸乙酯萃取, 水洗, 10%

NaHCO₃ 洗涤, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 得淡黄色固体为桦木酮酸粗品。粗品用乙醚溶解, 快速柱色谱分离, 减压干燥, 得桦木酮酸纯品 0.81 g。取桦木酮酸 50 mg, 用硼氢化钠/四氢呋喃(NaBH₄/THF) 还原, 将所得固体溶于 20 mL 甲醇并煮沸 15~20 min, 冷却重结晶得桦木酸纯品 46 mg。

1.2.2 桦木酸的结构鉴定 IR, HPLC-MS 联用以及¹H-NMR, ¹³C-NMR 鉴定桦木酸结构。HPLC 条件:液相色谱柱型号为:Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 mm × 15 cm, 流动相:甲醇:水(4 g · L⁻¹ 甲铵) = 40 : 60, 流速:1.0 mL · min⁻¹, 波长:210 nm, 柱温为室温;MS 条件:离子源:大气压化学电离源(APCI);扫描范围:50~1 000 amu (atomic mass unit);扫描方式:全扫描;碰撞诱导解离电压:100 eV;离子模式:Positive (negative);干燥气流速:5 L · min⁻¹;干燥气温度:350 °C;雾化压力:60 psi(相当于 413.4 kPa)。

1.2.3 试验分组及处理 将 168 只 KM 小鼠放置在 21~25 °C, 相对湿度为 60% 的饲养房中饲养 1 周后, 随机分为 4 组, 第 1 组为对照组, 第 2、3、4 组为 BA 组, 将 BA 混悬于 1% 的可溶性淀粉中, 分别按 0.25、0.5、1.0 mg · kg⁻¹ 灌胃, 对照组每天灌 1% 可溶性淀粉, 0.2 mL · 只⁻¹, 通过预试验确定连续灌胃 2 周。

1.2.4 BA 对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响

给药 14 d 后, 将供试小鼠称重, 断颈处死, 取脾脏和胸腺用预冷生理盐水漂洗, 滤纸吸干水分, 称重(精确至 0.000 1)。根据下列公式计算免疫器官指数(脾指数和胸腺指数)。

$$\text{免疫器官指数} = \frac{\text{免疫器官质量(mg)}}{\text{体质量(mg)}} \times 100$$

1.2.5 小鼠脾淋巴细胞增殖试验 小鼠引颈处死, 置于 75% 酒精中浸泡 2~3 min。无菌条件下按常规制备脾淋巴细胞悬液, 细胞悬浮于 1 mL 的 RPMI-1640 完全培养液中(含 10% FBS, 20 mmol · L⁻¹ 谷氨酰胺, 100 U · mL⁻¹ 青霉素和 100 μg · L⁻¹ 链霉素), 用台盼蓝染色计数活细胞数在 95% 以上, 调整细胞浓度为 5 × 10⁶ 个 · mL⁻¹。将细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL, 试验设空白对照组(只加细胞悬液), ConA 组(加终浓度为 5 μg · mL⁻¹ Con A 和细胞悬液)和 LPS 组(加终浓度为 10 μg · mL⁻¹ LPS 和细胞悬液), 每组设 3 个复孔。置 37 °C, 5%

CO₂ 孵箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,吸去培养液,补充不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 200 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,同时每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 15 μL ,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解,用酶标仪在 490 nm 波长测定光密度值。

1.2.6 溶血空斑细胞(Plaque Forming Cell, PFC)的检测 取 20% 绵羊红细胞(Sheep Red Blood Cell, SRBC)腹腔注射 0.2 mL 进行免疫,免疫后第 4 天,无菌摘取脾脏,用 PBS 制成 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,用台盼蓝拒染法,细胞活度在 95% 以上。将表层培养基(1 g 琼脂糖加双蒸水至 100 mL)加热溶解后,放 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温,与等量 Hank's 液混合,分装小试管,每管 0.5 mL,再向管内加 10% SRBC 100 μL ,脾细胞悬液 100 μL ,迅速混匀,倾倒入已刷琼脂糖薄层的玻片上,做平行片,待琼脂凝固后,将玻片水平扣放在片架上,放入 CO₂ 培养箱中温育 1~1.5 h,然后用 Hank's 缓冲液稀释的补体(1:8)加入到玻片架凹槽内,继续温育 1~1.5 h 后,计数 PFC。

1.2.7 淋巴细胞 T、B 细胞亚群的测定 无菌取脾和胸腺,置于预冷的 PBS 中,制成单个细胞悬液,并用淋巴细胞分离液收集淋巴细胞,用含有 1% 牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的 PBS 液洗 2 次,每次离心 8 min($1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。然后将细胞悬浮于含有 1% BSA 的 PBS 液中,用台盼蓝染色计数活细胞数(应在 95% 以上),调整细胞浓度为 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

脾淋巴细胞加入抗鼠 CD4:FITC / CD8:RPE 或 CD19:FITC / CD3:RPE 单抗 10 μL ,胸腺淋巴细胞加入抗鼠 CD4:FITC / CD8:RPE 单抗 10 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育 30 min,以 PBS 缓冲液洗去游离抗体,恢复 1 mL 体积,以 FACS 检测荧光标记阳性细胞百分率,得出散点图,用 Cellquest 软件分析散点图。

1.2.8 巨噬细胞吞噬能力的测定 试验前 3 d,腹腔注射 5% 可溶性淀粉 0.5 mL。小鼠脱颈椎处死,75% 酒精浸泡后,用注射器腹腔注入 10 mL 无菌预冷的 PBS 缓冲液,轻柔腹部 3 min 后吸取腹腔液于离心管中, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,弃去上清,用 10% FBS-RPMI 1640 培养液(含 10% FBS,

20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺,100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)洗涤 2 次,重悬调整浓度至 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。将细胞悬液按每孔 200 μL 接种到 96 孔培养板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中贴壁 3 h 后弃上清,用 PBS 冲洗 3 次,纯化巨噬细胞。再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,弃上清,每孔加入 0.1% 的中性红生理盐水溶液 200 μL ,继续培养 4 h,取出,弃中性红。用预温的 PBS 清洗 96 孔培养板 3 次,弃上清液。加入细胞裂解液 200 μL ,静置过夜,在酶标仪上测定 490 nm 的吸光度。

1.2.9 数据分析和处理 用 SPSS 软件进行数据处理,结果用平均数 \pm 标准差表示,组间 *t* 检验分析。

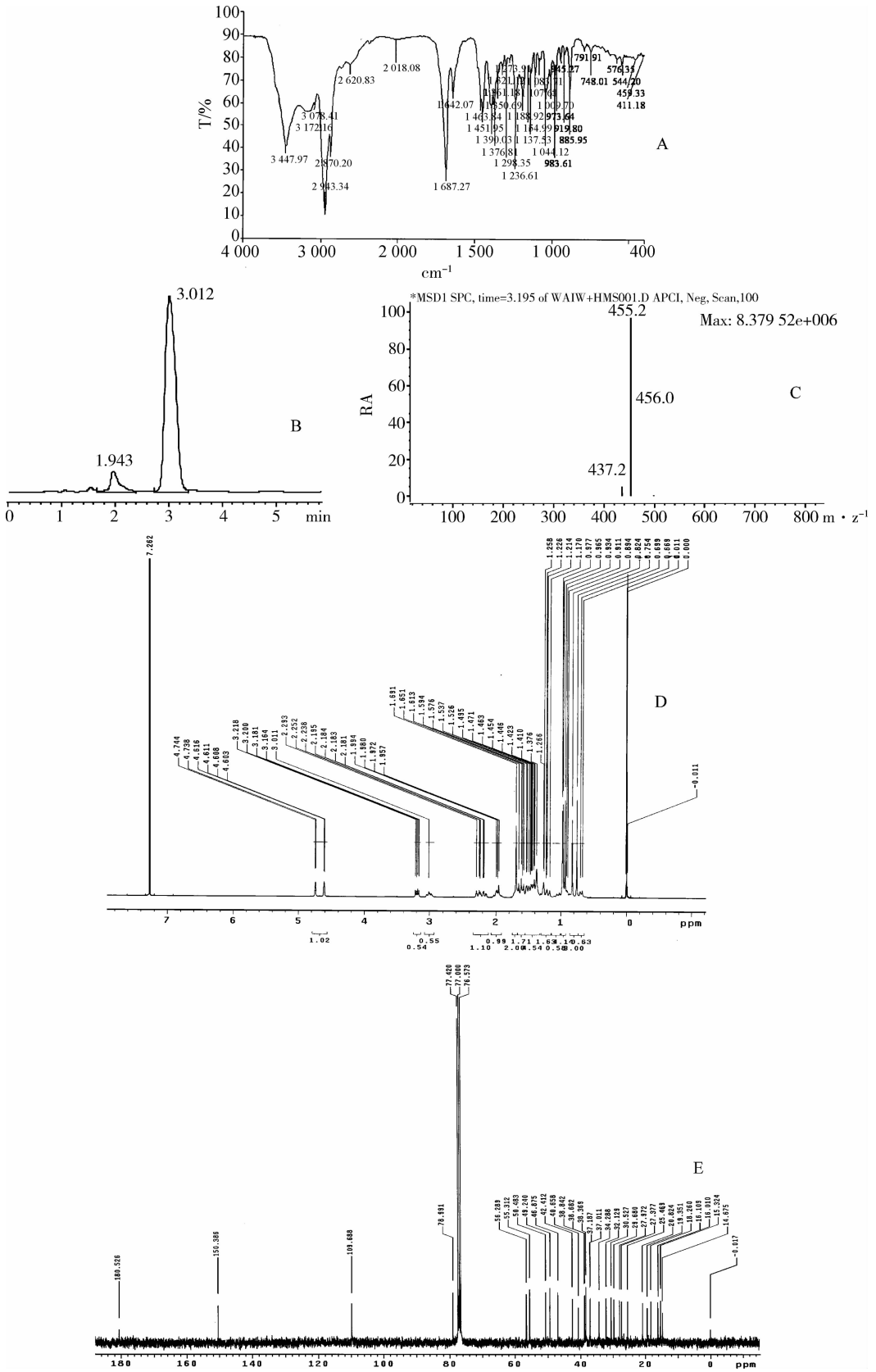
2 结果与分析

2.1 桦木酸的结构鉴定

合成的化合物为白色粉末,从图 1 可知,BA 的 IR 特征吸收:在 3 447.97 cm^{-1} 出现羟基伸缩振动吸收,1 687.27 cm^{-1} 出现羧基的强吸收峰,1 642.07 cm^{-1} 为 C=C 的伸缩振动吸收峰;甲基、亚甲基的饱和 C-H 振动吸收为 2 870.20~2 943.34 cm^{-1} ,甲基 C-H 弯曲振动吸收为 1 376.81 cm^{-1} ,非对称弯曲振动为 1 451.95 cm^{-1} 与 CH₂-的剪式振动重叠,1 044.12 cm^{-1} 为 C-O 伸缩振动吸收峰。HPLC-MS 联用分析:以峰的保留时间和分离效果为定性指标,峰面积为定量指标,桦木酸的保留效果较好,基本达到基线分离,分析时间较短,专属性良好,有利于快速分析,BA 的分子量为 455.2 [M-H]⁻(按 C₃₀ H₄₈ O₃ 计算,分子量为 456.7);¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的光谱数据与文献^[3,5-6]一致,结构确定为桦木酸。

2.2 BA 对小鼠免疫器官指数的影响

连续灌胃 14 d,小鼠未出现死亡及任何异常反应,说明该剂量的 BA 对小鼠是安全无毒的。表 1 可知,与对照组相比较,0.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BA 能提高小鼠的脾和胸腺指数,但差异不显著($P > 0.05$),0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 BA 能促进小鼠脾脏指数但对胸腺指数影响不大,1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ BA 既能促进脾脏指数也能促进胸腺指数($P < 0.05$)。



A. BA 的红外光谱图; B. BA 的高效液相色谱图; C. BA 的质谱图; D. BA 的核磁共振氢谱图; E. BA 的核磁共振碳谱图
 A. IR spectra of BA; B. HPLC spectra of BA; C. MS spectra of BA; D. $^1\text{H-NMR}$ spectra of BA; E. $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of BA
 图 1 BA 的结构鉴定图谱
 Fig. 1 Structure identification spectra of BA

表 1 BA 对胸腺指数和脾脏指数的影响

Table 1 Effect of BA on the weight index of the thymus and spleen

组别 Group	免疫器官指数 Immune apparatus index	
	胸腺指数 Thymus index	脾脏指数 Spleen index
Control	0.382±0.032	0.239±0.021
0.25 mg·kg ⁻¹	0.386±0.036	0.245±0.033
0.5 mg·kg ⁻¹	0.394±0.08	0.297±0.070*
1 mg·kg ⁻¹	0.446±0.068*	0.286±0.048*

与对照组相比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$ 。下同

Compared with the control, * means at $P<0.05$, ** means at $P<0.01$. The same as below

2.3 BA 对 ConA 和 LPS 诱导的淋巴细胞增殖的影响

从表 2 可知,BA 可促进 ConA 诱导的 T 淋巴细胞的增殖,随着 BA 浓度的升高,淋巴细胞的增殖呈一定的上升趋势,0.25 和 0.5 mg·kg⁻¹ BA 能显著促进淋巴细胞的增殖($P<0.05$),1 mg·kg⁻¹ BA

能极显著地增强 T 淋巴细胞的增殖($P<0.01$);同时 BA 也能促进 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖,0.25 和 0.5 mg·kg⁻¹ BA 能显著增强 B 淋巴细胞的增殖($P<0.05$),1 mg·kg⁻¹ BA 能增强 B 淋巴细胞的增殖,但差异不显著($P>0.05$)。

表 2 BA 对 LPS 和 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖的影响

Table 2 Effect of BA on lymphocyte proliferation induced by LPS or ConA

组别 Group	OD ₄₉₀ 值 Absorbance at 490 nm		
	BA	BA+ ConA	BA+ LPS
Control	0.327±0.033	0.372±0.009	0.366±0.012
0.25 mg·kg ⁻¹	0.330±0.018	0.423±0.048*	0.429±0.075*
0.5 mg·kg ⁻¹	0.339±0.012	0.408±0.039*	0.408±0.048*
1 mg·kg ⁻¹	0.351±0.012	0.477±0.045**	0.393±0.066

2.4 BA 对 SRBC 免疫小鼠 PFC 的影响

溶血空斑试验发现(图 2),BA 可增加小鼠脾淋巴细胞的 PFC,随着 BA 浓度的升高,PFC 呈一定的上升趋势,与对照组相比,PFC 分别提高了 15.9%、24.8% 和 54.3% (0.25、0.5 和 1 mg·kg⁻¹),以 1 mg·kg⁻¹ BA 差异极显著($P<0.01$)。

2.5 BA 对脾淋巴细胞和胸腺淋巴细胞亚群的影响

淋巴细胞活性增强可能与改变 T、B 淋巴细胞的数目或亚群有关,因此研究了 BA 对脾淋巴细胞和胸腺淋巴细胞亚群的影响。见表 3,BA 能显著地提高脾淋巴细胞 CD19⁺ (总 B 细胞)百分率,以 0.25 mg·kg⁻¹ 作用最强($P<0.01$)。同时,BA 降低 CD8⁺ 百分率,显著性提高 CD4⁺/CD8⁺ 的百分比,与对照组相比,低、中、高剂量组 CD4⁺/CD8⁺ 的

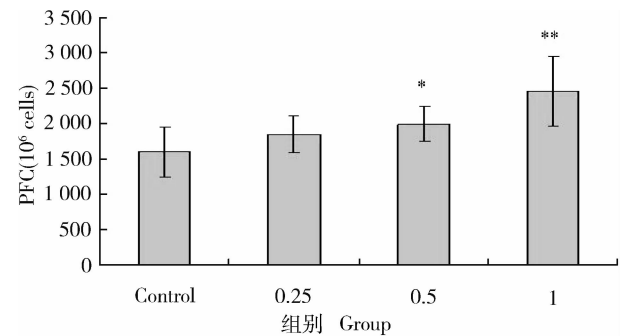


图 2 BA 对绵羊红细胞免疫小鼠 PFC 的影响

Fig. 2 Number of PFC in SRBC-immunized mice treated with betulinic acid

百分率分别提高了 26.44%、30.75% 和 38.51%。但对 CD3⁺ (总 T 细胞) 和 CD4⁺ 百分率没有影响。

表 3 BA 对脾和胸腺淋巴细胞亚群的影响

Table 3 Effects of BA on the percentage of splenocyte and thymocyte subpopulations

指标 Index	组别 Group			
	Control	0.25 mg · kg ⁻¹	0.5 mg · kg ⁻¹	1 mg · kg ⁻¹
脾淋巴细胞/% Splenocytes				
CD3 ⁺	28.94±3.20	25.88±3.58	27.23±1.48	26.86±3.54
CD4 ⁺	22.19±2.98	20.27±3.32	21.49±1.82	21.44±3.88
CD8 ⁺	6.48±0.99	4.67±0.72*	4.81±0.56*	4.62±0.86*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3.48±0.71	4.40±0.78*	4.55±0.86*	4.82±1.42*
CD19 ⁺	62.39±3.25	67.03±3.04**	65.98±1.66*	66.68±3.71*
胸腺淋巴细胞/% Thymocytes				
CD4 ⁺ CD8 ⁺	78.14±1.73	76.42±1.13*	76.56±1.67	75.11±1.38**
CD8 ⁺ CD4 ⁻	4.40±1.29	4.73±0.85	4.34±0.64	5.22±0.49
CD4 ⁺ CD8 ⁻	14.86±0.93	16.17±1.37*	16.55±1.69*	17.06±1.70**
CD8 ⁺ CD4 ⁻	2.59±0.36	2.69±0.37	2.55±0.39	2.61±0.51
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	5.79±0.55	6.11±0.94	6.65±1.48	6.79±1.64

BA 能降低胸腺淋巴细胞 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 细胞百分率(表 3),显著地提高胸腺淋巴细胞 CD4⁺CD8⁻百分率,0.25、0.5、1 mg · kg⁻¹ 剂量组分别提高了 8.81%、11.37% 和 14.8%,但对 T 细胞 CD8⁺CD4⁻,CD8⁺CD4⁻ 百分率以及 CD4⁺/CD8⁺ 比率均没有影响。

2.6 BA 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

小鼠连续灌胃 BA 2 周,巨噬细胞吞噬中性红的能力见图 3,在低、中、高剂量组,BA 均可增强腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力,中性红吞噬率分别增加了 26.38%、50.92% 和 68.71%,并随着 BA 浓度的增大而增加。

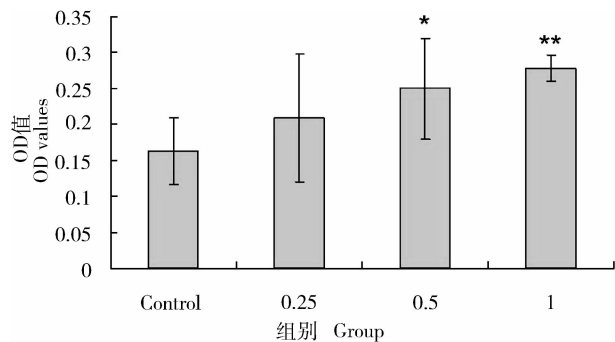


图 3 BA 对腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

Fig 3 Effect of BA on peritoneal macrophage phagocytic activity

3 讨论

3.1 白桦树中桦木醇的提取与桦木酸的合成

白桦树皮含有 20%~30% 的三萜类化合物,而桦木醇占三萜类化合物的 70% 左右,因此选用白桦树皮为桦木醇提取的原料,并以桦木醇为底物与琼

斯试剂氧化生成桦木酮酸,然后用硼氢化钠/四氢呋喃(NaBH₄/THF)还原得到 3 α 和 3 β -羟基的 BA(比例为 5 : 95)^[3,5]。由于具有生理活性的桦木酸是 β -异构体,因此需甲醇结晶析出得到 3 β -羟基产物即 BA 纯品。此方法简便易行,收率高,提取的纯度高。

3.2 BA 对免疫器官指数和脾淋巴细胞增殖能力的影响

免疫器官的脏器系数是衡量机体免疫功能的初步指标,试验发现,BA 能提高机体的免疫器官指数,并呈一定的量效关系。淋巴细胞增殖效果决定了机体免疫应答反应的强度,反映机体的细胞免疫状态^[7]。ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原,促进 T 淋巴细胞的增殖,LPS 作为 B 淋巴细胞有丝分裂原,促进 B 淋巴细胞增殖。试验结果表明,BA 可协同促进 ConA 或 LPS 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖活性,但增殖并不随浓度的增加而增强,而有一定的剂量范围。

3.3 BA 对 SRBC 免疫小鼠 PFC 的影响

抗体形成细胞数量的多少可反映机体体液免疫状态^[8]。本研究发现,BA 能提高脾细胞悬液的 PFC,且随剂量的升高而增加。这说明能释放抗 SRBC 抗体的细胞增加,即抗体形成细胞增加,表明 BA 作为抗原刺激物,活化的 B 细胞增多,B 细胞功能增强,提高机体的体液免疫功能。

3.4 BA 对小鼠淋巴细胞亚群的影响

CD4⁺ 和 CD8⁺ 这两种细胞为 T 细胞群内主要的免疫调节细胞,两者数量及其比例的正常(如 CD4⁺/CD8⁺ 的比值)是动物机体免疫系统功能正常的主要

标志^[9-12], 即 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例上升, 提示正相免疫调节占优势, CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例下降, 提示负相免疫调节占优势。本试验结果表明, BA 能提高正常小鼠脾淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的比值, 这说明 BA 能作用于 T 细胞, 在 CD3⁺ 和 CD4⁺ T 细胞变化不明显的情况下, 通过降低 CD8⁺ 细胞改变其 CD4⁺/CD8⁺ 比值水平。试验还发现, BA 使胸腺 CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞减少, CD4⁺CD8⁻ 单阳性细胞增加。这说明 BA 作用于胸腺 T 淋巴细胞, 使更多的双阳性细胞被选择分化成为 CD4⁺CD8⁻ 单阳性细胞, 促进辅助性 T 细胞的成熟。

CD19⁺ 细胞(总 B 细胞)在体液免疫应答中通过抗体发挥免疫效应, 在抗感染方面具有重要作用^[13]。本试验结果表明, BA 各剂量组都能显著提高小鼠脾淋巴细胞 CD19⁺ 细胞比例, 0.25 mg · kg⁻¹ BA 能极显著提高 CD19⁺ 细胞比例, 而 0.5 和 1 mg · kg⁻¹ 剂量组 CD19⁺ 细胞百分率低于 0.25 mg · kg⁻¹ 组, 可能与 Th1 细胞抑制了 Th2 细胞对 B 细胞的辅助作用, 其中的机制有待进一步研究。

3.5 BA 对巨噬细胞吞噬能力的影响

单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一^[14]。本试验采用体内给药, 体外分离纯化巨噬细胞, 测定巨噬细胞吞噬中性红的能力, 根据测定 OD 值的大小来判定 BA 对巨噬细胞吞噬能力的影响。结果发现小鼠巨噬细胞在 BA 的诱导下, 吞噬中性红的能力随着药物浓度的增加而增强。这表明 BA 能激活巨噬细胞, 从而增强巨噬细胞的吞噬能力。

4 结 论

桦木酸具有一定的免疫调节作用, 对正常小鼠的细胞免疫、体液免疫和非特异免疫功能有明显的增强作用。

参考文献:

[1] PISHA E, CHAI H, LEE I S, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis[J]. *Nat Med*, 1995, 1(10):1046-1051.

[2] FUJIOKA T, KASHIWADA Y, KILKUSKIE R E, et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platonic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of Structurally related triterpenoids [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(2): 243-247.

[3] CICHEWICZ R H, KOUZI S A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection [J]. *Med Res Rev*, 2004, 24(1):90-114.

[4] ALAKURTTI S, MAKELA T, KOSKIMIES S, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(1):1-13.

[5] FIEKHTER O B, NIGMATULLINA L R, BALTINA L A, et al. Synthesis of betulinic acid from betulin extract and study of the antiviral and antiulcer activity of some related terpenoids [J]. *Pharmaceut Chem J*, 2002, 36(9):484-487.

[6] PENG C, BODENHAUSEN G, QIU S, et al. Computer-assisted structure elucidation: Application of CISOC-SES to the resonance assignment and structure generation of betulinic acid [J]. *Magn Reson Chem*, 1998, 36(4):267-278.

[7] YUNHA Y, SHINHA H, EUNJUNG P, et al. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2003, 26(12): 1087-1095.

[8] 王 忠, 冯于明, 袁建敏, 等. 酵母 β-1, 3/1, 6-葡聚糖对断奶仔猪细胞免疫和体液免疫机能的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(12):1316-1322.

[9] 帅学宏, 胡庭俊, 陈灵然, 等. 鬼臼多糖对小鼠免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 1000-1004.

[10] OBMINSKA-MRUKOWICZ B, SZCZYPKA M. Influences of DTC and zinc supplementation on the cellular response restoration in restrained mice [J]. *J Vet Sci*, 2005, 6(1):25-32.

[11] OBMINSKA-MRUKOWICZ B, SZCZYPKA M, GAWEDA B. Modulation of murine macrophages and T lymphocytes by lysozyme dimmer [J]. *Pol J Vet Sci*, 2002, 5(4):237-241.

[12] 刘 华, 田嘉铭, 孙 犁, 等. 正常小鼠巨噬细胞及外周血淋巴细胞亚群对方风多糖干预的反应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(18):3475-3478.

[13] ITO T, HISASUE M, NEO S, et al. A case of atypical canine lymphoma with oral mass and multiple osteolysis [J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69(9):977-980.

[14] 易金娥, OBMINSKA-MRUKOWICZ B, 杜金艳, 等. 桦木酸对巨噬细胞免疫功能和抗氧化作用的研究 [J]. *营养学报*, 2010, 32(3):281-285.