

## 番木瓜籽水部位小鼠体内免疫活性研究

赵珂<sup>1</sup>, 李泽友<sup>1\*</sup>, 何梦雪<sup>1</sup>, 王勇<sup>1</sup>, 张芳<sup>1</sup>, 张一云<sup>2</sup><sup>1</sup>海南医学院药学院, 海口 571199; <sup>2</sup>海南省药物研究所, 海口 570314

**摘要:** 本实验以番木瓜籽水部位中 BG 的含量为给药剂量指标, 研究其水部位对小鼠免疫功能的调节作用。根据卫生部《免疫-保健食品检验与评价技术规范》的要求, 考察番木瓜籽水部位对小鼠细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫、NK 细胞活性以及免疫脏器指数的影响。结果表明, 番木瓜籽水部位高、中剂量组能显著提高小鼠的胸腺指数、促进血清溶血素的生成以及增强腹腔巨噬细胞吞噬功能, 但对淋巴细胞增殖的能力和 NK 细胞活性影响较小。表明了番木瓜籽水部位具有增强机体免疫的功能, 对进一步开发番木瓜籽有一定的参考价值。

**关键词:** 番木瓜籽; 水部位; 苜基硫代葡萄糖苷; 免疫活性

中图分类号: R967

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.005

## Immunological Activity of Water Fraction from Papaya Seeds on Mice *in vivo*

ZHAO Ke<sup>1</sup>, LI Ze-you<sup>1\*</sup>, HE Meng-xue<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>, ZHANG Fang<sup>1</sup>, ZHANG Yi-yun<sup>2</sup><sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;<sup>2</sup>Pharmaceutical Institute of Hainan Province, Haikou 570314, China

**Abstract:** In this study, the content of benzyl glucosinolate (BG) in water fraction of papaya seeds was used as the dose index to study the immune function regulation of water fraction on mice. According to the requirements of immunization-health food inspection and evaluation technology, the effects of cellular immunity, humoral immunity, non-specific immunity, NK cell activity and immune organ index water fraction of papaya seeds on mice were investigated. The results showed that high and middle doses of water fraction of papaya seeds can significantly increase the thymus index of mice, promote the production of serum hemolysin and enhance phagocytosis of peritoneal macrophages, but have less impact on the ability of lymphocyte proliferation and NK cell activity. It indicated that water fraction of papaya seeds can enhance immune function of the body, which could be a reference for the further development of papaya seeds.

**Key words:** papaya seeds; water fraction; benzyl glucosinolate; immunological activity

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 又名万寿果, 为番木瓜科植物的果实, 在我国广东、广西、海南、云南、福建等省广泛种植<sup>[1]</sup>。研究表明<sup>[2]</sup>, 番木瓜果实含有番木瓜碱、木瓜蛋白酶、凝乳酶、胡萝卜素等, 同时还含有 17 种以上氨基酸及多种营养元素, 具有护肝、抗炎抑菌、降低血脂等功效。番木瓜中含有丰富的苜基硫代葡萄糖苷 (benzyl glucosinolate, BG), 尤其番木瓜籽中含量最高<sup>[3,4]</sup>, 此物质在硫苷酶或者肠道菌的作用下水解成具芳香烷侧链的异硫氰酸酯—异硫氰酸苜酯 (benzyl isothiocyanate, BITC)<sup>[5]</sup>。已有研究表明<sup>[6]</sup>, BITC 对肝癌、前列腺癌、乳腺癌、宫

颈癌、肺癌、胰腺癌和卵巢癌等肿瘤细胞均具有较好的抗肿瘤作用。目前暂未发现免疫活性方面报道, 本实验根据卫生部《免疫-保健食品检验与评价技术规范》的要求, 采用番木瓜籽水部位为研究对象, 以水部位中 BG 的含量为给药剂量指标, 以确定是否具有免疫活性, 研究其免疫调节功能。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

番木瓜籽, 从水果市场搜集所得, 放入烘箱, 于 110 °C 灭酶活 1 h, 水洗后 40 °C 烘干, 粉碎, 过筛, 放入密封袋储藏备用。

苜基硫代葡萄糖苷 (BG) 对照品 (批号: 12030606, 购买于 ITW Company); 抗凝羊血 (鸿泉生物); 小鼠淋巴瘤细胞 YAC-1 (博士伦生物); SA 缓

收稿日期: 2016-11-28 接受日期: 2017-02-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260607); 海南医学院引进人才科研启动经费 (2015)

\* 通信作者 Tel: 86-898-31350722; E-mail: lzy7307@126.com

冲液(biohao);都氏试剂(美国 Sigma 公司);台盼蓝(美国 Sigma 公司);MTT(美国 Sigma 公司);刀豆蛋白 A(美国 Sigma 公司);Giemsa 染液(上海源叶生物科技有限公司);生理盐水(山东鲁抗辰欣);水为超纯水;甲酸、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher); HC-150T2 型粉碎机(永康市绿可食品机械有限公司); GZX-9240ME 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司); HH-W420 型恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂); SHZ-D(III) 型循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司); SY-180 型超声仪(上海宁商超声仪器有限公司); UV-2401PC(日本岛津); HW-3 型恒温水浴(天津天大天发); DT5-2 型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司); 3k18 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 50i 尼康光电显微镜; ST-360 型酶标仪(KHB 科华生物); SW-CJ-2FD 型双人单面超净台(苏州净化设备有限公司); AUW220D 型分析天平(日本岛津); PHSJ-5 型 pH 计(上海雷磁); MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本三洋)。

## 1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠,单一性别,体重 18~22 g,由海南省药物研究所提供,许可证号:SCXK(琼)2015-0007;豚鼠:健康豚鼠;鸡:健康家鸡。

## 2 实验方法

根据卫生部《免疫-保健食品检验与评价技术规范》的要求<sup>[7]</sup>,通过研究番木瓜籽水部位对小鼠的细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫、NK 细胞活性测定这四方面的影响考察其免疫活性。

### 2.1 番木瓜籽水部位的制备及其含量测定<sup>[8]</sup>

称取粉碎的番木瓜籽 1 kg,加入 9 倍 75% 乙醇,提取两次,50 °C 减压浓缩,浓缩液分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,水层加入乙醇除蛋白,抽滤,滤液 50 °C 浓缩至无醇味得水部位,HPLC 检测其 BG 的含量。

### 2.2 分组及给药方式

SPF 级昆明种小鼠 160 只,18~22 g,单一性别。每个实验随机分为 4 组(空白对照组、水部位低剂量组、水部位中剂量组和水部位高剂量组),每组 10 只,实验前,将所有小鼠适应性饲养 2 d,自由饮水和取食。水部位低剂量组,水部位中剂量组,水部位高剂量组给药量分别为 7.62、22.86、45.72 mg/kg(以

BG 的含量为给药剂量指标),空白对照组给予超纯水,每日 1 次,按小鼠体重给药,连续灌胃 30 d。

### 2.3 番木瓜籽水部位对小鼠细胞免疫的影响

按照 2.2 项下分组、给药,将小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,制成单细胞悬液。用台盼蓝染色计数活细胞数(95%以上),调整细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/mL。将每一份脾细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中,每孔 1 mL,一孔加 75  $\mu$ L ConA 液(相当于 7.5  $\mu$ g/mL),另一孔作为对照,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL,加入 0.7 mL 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,同时加入 MTT(5 mg/mL)50  $\mu$ L/孔,继续培养 4 h。培养结束后,每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中,每个孔作 3 个平行孔,用酶标仪,以 570 nm 波长测定光密度值。

### 2.4 番木瓜籽水部位对小鼠体液免疫的影响

采集 5 只豚鼠血,分离出血清,将 1 mL 压积 SRBC 加入到 5 mL 豚鼠血清中,放 4 °C 冰箱 30 min,经常震荡,离心取上清,制备补体,用时以 SA 液按 1:8 稀释。

按照 2.2 项下分组、给药,制备 2% 的 SRBC 细胞悬液,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 进行免疫。4 天后,摘除眼球取血、离心,用 SA 缓冲液稀释 200 倍。将稀释后的血清 1 mL 置试管内,依次加入 10% (v/v) SRBC 0.5 mL,补体 1 mL。另设不加血清的对照管。置 37 °C 恒温水浴中保温 20 min 后,冰浴终止反应,离心。取上清液 1 mL,加都氏试剂 3 mL,同时取 10% (v/v) SRBC 0.25 mL 加都氏试剂至 4 mL,充分混匀,放置 10 min 后,于 540 nm 处以对照管作空白,分别测定各管光密度值。血清溶血素的量以半数溶血值(HC<sub>50</sub>)表示,按下式公式计算:

$$HC_{50} = \frac{\text{样品光密度值}}{\text{SRBC 半数溶血时的光密度值}} \times \text{稀释倍数}$$

### 2.5 番木瓜籽水部位对小鼠非特异性免疫的影响

#### 2.5.1. 吞噬功能测定

按照 2.2 项下分组、给药,制备 20% 的鸡红细胞悬液,每只鼠腹腔注射该悬液 1 mL。间隔 30 min,颈椎脱臼处死小鼠,将其仰位固定于鼠板上,正中剪开腹壁皮肤,经腹腔注入生理盐水 2 mL,转动鼠板 1 min。然后吸出腹腔洗液 1 mL,平均分滴于 2 片载玻片上,放入垫有湿纱布的搪瓷盒内,移至 37 °C 孵箱温育 30 min。孵毕,于生理盐水中漂洗,以除

去未贴片细胞。晾干,以 1:1 丙酮甲醇溶液固定,用瑞氏染液染色 1 min,再用蒸馏水漂洗晾干。

用显微镜计数巨噬细胞,每张片计数 100 个,按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率(%) =

$$\frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}}$$

### 2.5.2 脏器指数测定

解剖取脾脏、胸腺称重,计算脏器指数。

脏器指数 = 脏器重量(mg) / 小鼠体重(g)。

## 2.6 番木瓜籽水部位对小鼠 NK 细胞活性的影响

按照 2.2 项下分组、给药,将小鼠颈椎脱臼处死,无菌取脾,制成单细胞悬液。离心,弃上清将细胞浆弹起,加入 0.5 mL 灭菌水 20 秒,裂解红细胞后再加入 1.0 mL Hank's 液,离心,用 1 mL 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液重悬,作为效应细胞。用台盼蓝染色计数活细胞数(95% 以上),最后用 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个/mL。

取靶细胞(YAC-1 细胞)和效应细胞各 100  $\mu$ L 于 96 孔培养板中,靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100  $\mu$ L,靶细胞最大释放孔加靶细胞和

2.5% Triton 各 100  $\mu$ L,上述各项均设三个平行孔,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4h,然后每孔吸取上清 100  $\mu$ L 置平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100  $\mu$ L,反应 5 min,每孔加入 1mol/L 的 HCL30  $\mu$ L,在酶标仪 490 nm 处测定光密度值(OD)。按下式计算 NK 细胞活性:

NK 细胞活性(%) =

$$\frac{\text{反应孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}}{\text{最大释放孔 OD} - \text{自然释放孔 OD}} \times 100\%$$

## 2.7 数据处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据处理、统计和分析,分析结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组与组间比较采用方差分析和 *t* 检验。

# 3 实验结果

### 3.1 番木瓜籽水部位中 BG 的含量

番木瓜籽水部位中含有 BG 的量为 13.38 mg/mL。

### 3.2 番木瓜籽水部位对小鼠细胞免疫的影响

由表 1 可知,各剂量组的淋巴细胞增殖能力与空白对照组比较均无显著性差异,表明番木瓜籽水部位对小鼠的淋巴细胞增殖能力影响较小,作用效果不明显。

表 1 番木瓜籽水部位对小鼠淋巴细胞增殖能力的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of water fraction of papaya seeds on lymphocyte proliferation in mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	淋巴细胞增殖能力 Lymphocyte proliferation
空白对照组 Control group	-	0.062 $\pm$ 0.020
低剂量组 Low-dose group	7.62	0.067 $\pm$ 0.022
中剂量组 Middle-dose group	22.86	0.083 $\pm$ 0.021
高剂量组 High-dose group	45.72	0.103 $\pm$ 0.036

### 3.3 番木瓜籽水部位对小鼠体液免疫的影响

由表 2 可知,番木瓜籽水部位可不同程度的促进小鼠的血清溶血素生成,与空白对照组相比,高、

中剂量组的半数溶血值有极显著性差异( $P < 0.01$ ),而低剂量组则无显著性差异,表明番木瓜籽水部位能显著增强小鼠的体液免疫功能。

表 2 番木瓜籽水部位对小鼠血清溶血功能的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of water fraction of papaya seeds on serum hemolysis function in mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/k)	半数溶血值(HC <sub>50</sub> ) Half hemolytic value
空白对照组 Control group	-	75.23 $\pm$ 13.75
低剂量组 Low-dose group	7.62	91.74 $\pm$ 11.34
中剂量组 Middle-dose group	22.86	132.77 $\pm$ 13.10 **
高剂量组 High-dose group	45.72	157.11 $\pm$ 10.00 **

注:与空白对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*\*  $P < 0.01$ .

### 3.4 番木瓜籽水部位对小鼠非特异性免疫的影响

光学显微镜下鸡红细胞被吞噬的情况如图 1 所示。由表 3 可知,与空白对照组相比,番木瓜籽水部位高剂量组和中剂量组的吞噬率有极显著性差异

( $P < 0.01$ ),吞噬指数有显著性差异( $P < 0.05$ ),表明番木瓜籽水部位高、中剂量组可明显提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数,可增强小鼠的非特异性免疫。

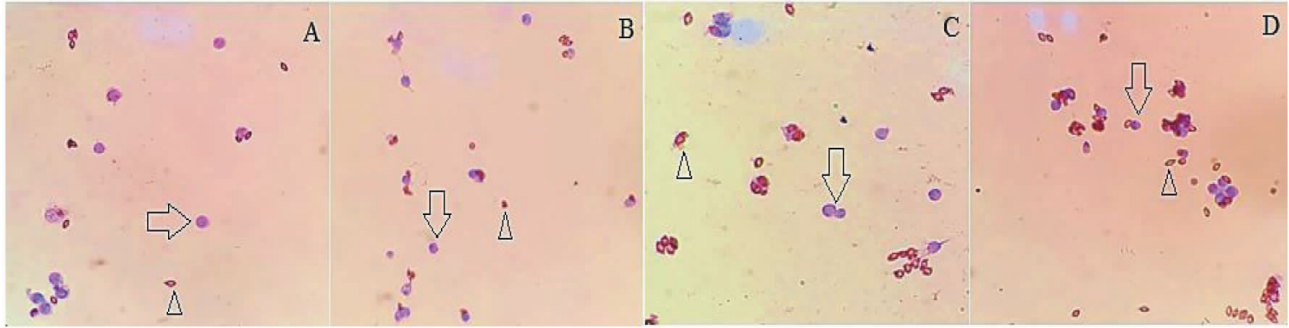


图 1 光学显微镜下对照组(A)、低剂量组(B)、中剂量组(C)及高剂量组(D)红细胞被吞噬的情况(100×)

Fig. 1 The engulfed red blood cells in control group (A), low-dose group (B), middle-dose group (C) and high-dose group (D) under an optical microscope (100 ×)

注:箭头标示为吞噬细胞,三角形标示为红细胞

Note: Arrow point to phagocytic cell, triangle point to red blood cell

表 3 番木瓜籽水部位对小鼠吞噬率和吞噬指数的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of water fraction of papaya seeds on phagocytic rate and index in mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	吞噬率 Phagocytic rate (%)	吞噬指数 Phagocytic index
空白对照组 Control group	-	52.503 ± 5.883	1.075 ± 0.261
低剂量组 Low-dose group	7.62	52.651 ± 6.109	1.082 ± 0.098
中剂量组 Middle-dose group	22.86	64.835 ± 8.019 **	1.713 ± 0.418 *
高剂量组 High-dose group	45.72	66.512 ± 6.413 **	1.749 ± 0.330 *

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 3.5 番木瓜籽水部位对小鼠免疫器官指数的影响

由表 4 可知,与空白对照组相比,番木瓜籽水部位高、中剂量组能明显提高小鼠的胸腺指数,具有显

著性差异( $P < 0.05$ ),而体重和脾脏指数则没有明显差异。表明该水部位高剂量组和中剂量组使胸腺指数明显增加,可能有增强小鼠免疫的功能。

表 4 番木瓜籽水部位对小鼠体重和免疫器官指数的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of water fraction of papaya seeds on spleen index and thymus index in mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	体重 Weight (g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)	胸腺指数 Thymus index (mg/g)
空白对照组 Control group	-	24.98 ± 2.38	3.29 ± 1.30	1.37 ± 0.56
低剂量组 Low-dose group	7.62	24.93 ± 2.67	3.06 ± 0.81	1.66 ± 0.87
中剂量组 Middle-dose group	22.86	26.06 ± 4.25	3.27 ± 1.26	2.25 ± 0.81 *
高剂量组 High-dose group	45.72	24.05 ± 2.89	3.52 ± 2.61	2.30 ± 0.69 *

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ .

### 3.6 番木瓜籽水部位对小鼠 NK 细胞活性的影响

NK 细胞的测定结果如表 5 所示,各剂量组与

对照组比较均无显著性差异,表明番木瓜籽水部位对小鼠 NK 细胞活性影响较小,作用效果不明显。

表5 番木瓜籽水部位对小鼠NK细胞活性的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )Table 5 Effect of water fraction of papaya seeds on NK cell activity in mice( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	$f$ (%)	X
空白对照组 Control group	-	21.21 ± 6.97	0.221 ± 0.031
低剂量组 Low-dose group	7.62	24.60 ± 7.04	0.204 ± 0.024
中剂量组 Middle-dose group	22.86	25.84 ± 8.04	0.203 ± 0.039
高剂量组 High-dose group	45.72	26.74 ± 6.41	0.195 ± 0.021

注: $f$ 为NK细胞活性, $X = \text{Sin}^{-1} \bar{f}$ 。

Note: $f$  was activity of NK cell, $X = \text{Sin}^{-1} \bar{f}$ .

## 4 讨论与结论

本文以番木瓜籽水部位为研究对象,以其中BG的含量为给药剂量指标,研究其对小鼠免疫活性的影响,为番木瓜的现代利用提供科学依据。因苜基硫代葡萄糖苷极性大,较难分离到单体,故本实验依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取番木瓜籽提取液,经HPLC检测发现苜基硫代葡萄糖苷存在于水部位,计算含量,研究其体内免疫活性。

本文考察了番木瓜籽水部位对正常小鼠细胞免疫、体液免疫、非特异性免疫以及NK细胞活性测定的影响,并计算其脏器指数,结果表明番木瓜籽水部位高剂量组和中剂量组能明显促进小鼠血清溶血素的生成,并且可以显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数,表明番木瓜籽水部位对小鼠的体液免疫和非特异性免疫有直接的影响,起到了免疫兴奋作用。胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官,其脏器指数在一定程度上可反映机体免疫功能的强弱。实验结果表明,番木瓜籽水部位能显著提高小鼠的胸腺指数,对机体免疫有一定的促进作用,具体原因有待进一步研究。但是对淋巴细胞增殖的能力和NK细胞活性效果不明显,这可能是对细胞免疫和NK细胞活性无影响作用。

番木瓜在我国南方广泛种植,人们通常食用番木瓜果肉,而木瓜籽通常是废弃物,因此,对番木瓜种子中BG进行研究,是变废为宝、提升番木瓜产业的一种途径,而且对进一步开发番木瓜籽有一定的参考价值。

### 参考文献

1 Deng CJ(邓楚津), Dong Q(董强), Zhang L(张良), *et al.*

Basic components and nutritional value of papaya seed. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2012, 33(6):185-188.

- Zhou L(周骊), Li ZY(李泽友), Shen WT(沈文涛), *et al.* Test of tumor-inhibition of benzyl isothiocyanate (BITC) in papaya seed. *J Tropi Organ* (热带生物学报), 2012, 3(2):130-134.
- Li ZY(李泽友), Shen WT(沈文涛), Yan P(言普), *et al.* Analysis of benzyl isothiocyanate and its precursor-benzyl glucosinolate in *Caricapapaya* L. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, 31:678-681.
- Nakamura Y, Yoshimoto M, Murata Y, *et al.* Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:4407-4413.
- Li ZY, Wang Y, Shen WT, *et al.* Content determination of benzyl glucosinolate and anti-cancer activity of its hydrolysis product in *Carica papaya* L. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5(3):231-233.
- Zhu MY(朱明月), Li W(李伟), Lu Y(鲁琰), *et al.* Benzyl isothiocyanate induces apoptosis of hepatocarcinoma cells. *World J Chin Digest* (世界华人消化杂志), 2014, 22:2277-2284.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. immunization-health food inspection and evaluation technology. 2003:697-708.
- Zhao K(赵珂), Wang Y(王勇), Jiang YX(姜月霞), *et al.* Optimization of the extraction of benzyl glucosinolate from the seeds of *Carica papaya* L. by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:735-740.