

杨梅素对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫功能影响

宋博翠*, 陈倩, 李宇琦, 李爽, 申雪, 佟春玉*

黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319

摘要: 黄酮类化合物杨梅素 (myricetin, MYR) 具有抗肿瘤、抗氧化等多种药理作用, 但在免疫调节方面的作用尚未完全了解, 因此本实验通过建立环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 免疫低下小鼠模型来研究 MYR 对免疫功能的影响。通过称重小鼠脾脏和胸腺以及计算指数评价 MYR 对模型小鼠症状的缓解程度, 用 MTT 法、溶血试验、酶联免疫吸附法等免疫学相关实验技术检测 T、B 淋巴细胞增殖, T 细胞亚群分布情况, 血清溶血素含量, 抗体形成细胞数以及细胞因子白介素-2、白介素-4、白介素-6、干扰素- γ 的分泌水平。实验数据表明, MYR 能提高小鼠免疫器官脾脏、胸腺指数, 促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的分泌, 提高细胞因子水平和抗体形成细胞数量。结果表明 MYR 能在免疫反应中起积极作用, 调节免疫细胞和细胞因子之间的相互作用恢复机体免疫力的平衡, 改善免疫力低下的症状。

关键词: 免疫抑制; 杨梅素; 环磷酰胺; 淋巴细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)1-0033-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.1.004

Effect of myricetin on the immune function of cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice

SONG Bo-cui*, CHEN Qian, LI Yu-qi, LI Shuang, SHEN Xue, TONG Chun-yu*

College of Life Science & Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: The flavonoid myricetin (MYR) has antitumor, antioxidant and other pharmacological effects, but its role in immune regulation is not fully understood. Therefore, the effect of MYR on immune function was investigated by establishing a immune mouse model of cyclophosphamide (CTX). The relief degree of symptoms of myricetin was evaluated by weighing spleen and thymus and calculation index. The proliferation of T and B lymphocytes, the distribution of T cell subpopulations, the content of serum hemolysin, the number of antibody forming cells and the secretion levels of cytokines interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, interferon- γ were detected by MTT assay, hemolysis test, enzyme-linked immunosorbent assay and other immunological techniques. Experimental data show that myricetin can improve the mouse immune organ spleen, thymus index, promote the secretion of T lymphocytes and B lymphocyte cells, improve the level of cytokines and antibody forming cells. The results show that myricetin plays a positive role in the immune response, regulate the interaction between immune cells and cytokines to restore the balance of immunity, improve the symptoms of low immunity.

Key words: immunoregulatory; myricetin; cyclophosphamide; lymphocyte

免疫系统可以保护生物体免受由病原体引发的感染来维持生物体体内平衡, 保持身体健康。免疫抑制是一种长期或暂时性的免疫功能障碍。由于免疫系统受损, 使生物体对病原体更加敏感, 抵抗力

低, 平时不在意的细微病原体都容易造成感染。目前, 许多临床使用的免疫调节剂都有一些副作用, 如左旋咪唑和细小棒状杆菌。因此, 仍需研究与开发新的免疫调节剂为治疗免疫抑制相关疾病提供帮助。

十八世纪晚期, 人们从杨梅科 (Myricaceae) 杨梅的树皮中提取出一种浅黄色晶体——杨梅素 (myricetin, MYR) (见图 1)。MYR 是一种存在于水果、蔬菜、茶叶、葡萄酒中的黄酮类化合物, 是许多食品中的重要活性成分和添加剂^[1,2]。现代药理研究

收稿日期: 2022-09-01 接受日期: 2022-12-20

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划 (XC2022034); 黑龙江省博士后启动基金计划 (LBH-Q21158); 黑龙江八一农垦大学校培育课题 (XDB-2016-22); 黑龙江省重点研发计划 (GZ20210101)

* 通信作者 Tel: 86-015164570030; E-mail: songbocui66@163.com, tongchunyu@126.com

表明,MYR 对多种疾病具有治疗作用,包括不同类型的癌症、炎症性疾病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和病原微生物感染^[3-9]。然而,这种黄酮类化合物的功能仍未完全了解,特别是在对免疫系统调节的功能。

环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)是一种免疫抑制的诱导剂,已被广泛用作化疗和疾病修饰剂,以对抗某些实体肿瘤、淋巴瘤和一些自身免疫性疾病。CTX 可以损伤正常细胞的 DNA,这种功能是它能够进行免疫抑制的原因之一,目前也作为免疫抑制剂在临床范围内使用^[10]。CTX 也是各个实验室构建理想的免疫低下动物模型的常用造模药物^[11,12]。

因此我们用 CTX 对小鼠进行腹腔注射降低其免疫力建立免疫抑制模型小鼠,使用 MYR 治疗模型小鼠,通过观察小鼠的脾脏及胸腺指数、脾淋巴细胞的增殖能力、血清血溶素水平、抗体形成细胞的能力以及血清细胞因子白介素-2(interleukin-2,IL-2)、干扰素- γ (interferon- γ ,IFN- γ)、白介素-4(interleukin-4,IL-4)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)分泌水平等指标进行评估,以便将 MYR 开发为新的免疫调节剂。

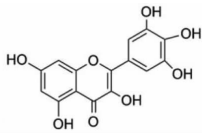


图 1 MYR 的分子式

Fig. 1 Chemical structures of myricetin

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验小鼠

由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司购置 7 周龄的 BALB/c 健康小鼠,雄雌各半(20 ± 2 g),动物生产许可证号:SCXK(吉)-2020-0002。将其饲养于温度 23 ± 2 °C、湿度 45% ~ 80% 的洁净鼠房中,光照时间达 12 h,在饲养期间自由接受标准颗粒饲料和饮用。本实验经过黑龙江八一农垦大学动物伦理委员会批准实施,伦理审批号:SMKXJSXY2022008。

1.1.2 实验试剂与仪器

杨梅素标准品(MYR,纯度 $\geq 98\%$,批号:72576,美国 Sigma 公司);环磷酰胺(CTX,纯度 $\geq 93.5\%$,生产批号:20180911,上海安谱科技股份有限公司);脂多糖(LPS,冻干粉,美国 HyClone 公

司);刀豆蛋白 A(ConA,IV 型,冻干粉,北京 Solarbio 公司);二甲基亚砜(DMSO,纯度 $\geq 99.5\%$,美国 Sigma-Aldrich 公司);Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 培养基(美国 HyClone 公司)、ELISA 试剂盒(美国 Biologend 公司);胎牛血清(FBS,美国 HyClone 公司);2% 绵羊红细胞、10% 冻干豚鼠血清(北京 TaKaRa 公司);生理盐水、无水乙醇(广州博盈生物)。全波长酶标仪(奥地利 Tecan Austria GmbH 公司,型号:Infinite 200PRO);CO₂ 培养箱(德国 ThermoFisher Scientific 公司,型号:3111);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号:CytoFLEX S)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药方法

实验用鼠按 10 只一组随机分成 5 组,分别命名为空白对照组(control,Con)、模型组(model,Mod)以及 MYR 低、中、高剂量(MYR-L、MYR-M、MYR-H)组。从第 1 d 至第 7 d,小鼠每日灌胃如下:Con 组:生理盐水;Mod 组:生理盐水;MYR 三组:10、20、40 mg/kg 的 MYR。从第四次灌胃开始,小鼠每日腹腔注射如下:Con 组:生理盐水;Mod 以及 MYR 三组:50 mg/kg 的 CTX,至第七次灌胃结束即腹腔注射结束。溶血素含量测定以及抗体形成细胞检测实验将小鼠 10 只一组随机分成 5 组,每日灌胃和腹腔注射同上述方法,同时用 2% 的新鲜绵羊红细胞悬浮液注射到各组小鼠的腹腔内建立过敏模型。

1.2.2 测定小鼠的胸腺脾脏指数

在用药的第 7 d,末次使用药物 24 h 后,称重并处死小鼠,立即取脾、胸腺进行称量,根据公式(脾脏或胸腺的毫克数除以小鼠的体重克数)计算出脾、胸腺指数。

1.2.3 脾脏淋巴细胞悬液的制备

在无菌条件下分离小鼠脾脏,将 200 目筛网放在装有培养液的一次性器皿上,用一次性活塞在筛网研磨脾脏。过滤混合物,离心管配平后离心 5 min,转速为 1 800 r/min。吸弃离心管中的液体,加入裂解液重悬沉淀,再次按上述条件离心。弃上层液体,培养液重悬细胞后离心,重复操作两次后,加入 8 mL 含胎牛血清、青/链霉素的培养基重悬,细胞计数板上观察红细胞数量是否达到 95%。稀释并调整细胞浓度,待用。

1.2.4 脾脏淋巴细胞增殖情况的测定

各加入 100 μ L 的 ConA(5 μ g/mL)、100 μ L 的 LPS(20 μ g/mL)分别刺激如上述方法制备好的淋巴

细胞,均设复孔。培养箱放置 44 h,各孔分别加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 继续培养。4 h 后去除孔内液体,取 150 μL 的 DMSO 添加至每个小孔,震荡孵育 10 min,当溶液颜色产生变化后即可用酶标仪在 570 nm 处检测淋巴细胞表达水平。

1.2.5 流式细胞术检测 T 细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞比例

将小鼠脾淋巴细胞悬液每孔 2 mL 加入到 24 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,离心弃上清。PBS 洗涤,再次离心沉淀细胞,此过程重复两次。用 500 μL 的 PBS 重悬后,加入荧光标记抗体 PerCP/Cy5. 5-anti-CD3、FITC-anti-CD4、PE-anti-CD8,将其放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光反应 30 min。PBS 洗涤,离心弃上清,500 μL 的 PBS 重悬后过 200 目筛网,流式细胞仪上机检测。每管样品检测至少 10 000 个细胞。使用 Cell Quest 软件分析 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞含量。

1.2.6 溶血素含量测定以及抗体形成细胞检测

用药的第 3 日,除了对照组,分别用 0.2 mL,2% 的新鲜绵羊红细胞悬浮液注射到各组小鼠的腹腔,引起小鼠过敏反应。最后一次用药的 24 h 后取小鼠眼眶外周血,通过离心得到小鼠血清。取一部分稀释 200 倍的血清和 10% 冻干豚鼠血清以及 2% 绵羊红细胞 (SRBC) 混合均匀 (10% 冻干豚鼠血清体积与血清体积等量,2% 绵羊红细胞体积为血清体积的一半)。将混合物放置在培养箱中,0.5 h 后转移至冰上结束反应。离心 10 min,转速 3 000 r/min,取其上清液,540 nm 下测 OD 值,该数值间接反映小鼠溶血素水平。为检测小鼠抗体形成细胞水平,将同等体积的细胞悬液,10% 冻干豚鼠血清和 2% SRBC 混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min,置于冰中结束反应。3 000 r/min 下进行 10 min 离心,分离上清液,570 nm 波长下测定样品 OD 值。

1.2.7 免疫抑制小鼠血清细胞因子含量的检测

ELISA 板每孔中均加入 100 μL 稀释 200 倍后的一抗,置于培养箱内等待 2 h,每组需要重复设置三个孔以减小误差。2 h 后取出,在已恢复至室温的酶标板中,加入 200 μL 洗液,以洗去包被抗体保护剂,使包被抗体处于最佳活性状态,静置 1 min。移除洗液、去除残留水分,共需清洗 6 次。在 ELISA 酶标板内加入每孔 200 μL 样品稀释液,移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内放置 1 h 后,重复上述洗板操作。每孔各加入待测样品 100 μL ,同时加入标准品建立浓

度梯度制作标准曲线,常温振荡孵育 2 h 后,重复上述洗板操作。加入 100 μL 二抗 (IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6) (已稀释至 200 \times),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 1 h 后洗板 6 次,移除洗液。取 HRP (已稀释至 1000 \times),振荡混匀备用。每孔中均加入 100 μL 稀释后的 HRP,培养箱中放置 30 min 后洗板。取底物 A、B 等比例避光混合均匀,每孔加入 TMB 混合液 100 μL ,锡纸包裹酶标板后放入培养箱内 15 min。发现孔内出现明显梯度变化,此时可终止反应。按照显色液加样顺序,各孔加入终止液 100 μL ,此时液体出现颜色变化,表明终止反应。酶标仪在 450 nm 下测 OD 值。

1.2.8 统计与分析

采集的所有数据都进行了至少三个独立的实验,使用 SPSS 20.0 统计软件进行显著性分析,所有统计结果以平均 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均采用 ANOVA 方差分析和 Dunnett 检验以确定各组间的统计学意义。

2 实验结果

2.1 胸腺和脾脏指数

免疫器官指标主要用于反映人体免疫反应的水平。由表 1 可知,Con 组小鼠脾脏、胸腺指数明显高于 Mod 组 ($P < 0.01$)。相比之下,所有 MYR 给药组均能减少 CTX 诱导的脾损伤。此外,与 Mod 组相比,低、中、高剂量的 MYR 均显著提高了胸腺指数 ($P < 0.01, P < 0.05$)。我们可以得出结论,MYR 作为治疗药物可以通过提高免疫器官指数来恢复免疫功能,缓解 CTX 对脾脏、胸腺造成的损伤。

表 1 MYR 对免疫抑制小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of MYR on thymus or spleen index in immunosuppressed mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)
Con	2.49 \pm 0.35	5.10 \pm 0.27
Mod	1.41 \pm 0.16 ^{##}	3.14 \pm 0.30 ^{##}
MYR-L	1.54 \pm 0.18	3.59 \pm 0.18 [*]
MYR-M	1.79 \pm 0.13 [*]	4.33 \pm 0.21 ^{**}
MYR-H	2.27 \pm 0.20 ^{**}	4.86 \pm 0.16 ^{**}

注:与 Con 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 Mod 组比较,^{*} $P < 0.05$;^{**} $P < 0.01$,下同。

Note:Compared with Con,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;Compared with Mod,^{*} $P < 0.05$;^{**} $P < 0.01$,the same below.

2.2 对脾淋巴细胞增殖的影响

分别用 ConA (0.5 mg/kg)、LPS (0.5 mg/kg) 对

脾细胞进行刺激,显著促进脾淋巴细胞的增殖,而 CTX 则可减轻由 ConA 或 LPS 所致的脾淋巴细胞增殖($P < 0.01$)。结果如图 2 所示,在 ConA 组中,发现中剂量组对 CTX 引起的免疫抑制有明显的改善

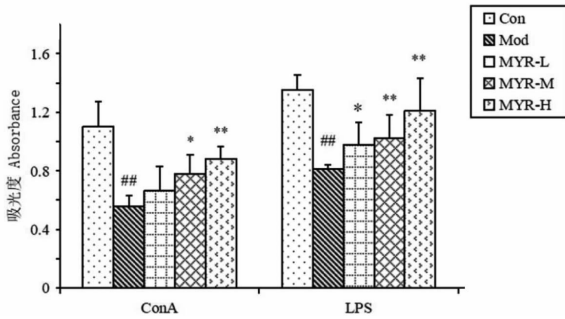


图 2 MYR 对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞体内增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 The effect of MYR in splenocyte proliferation *in vivo* in immunosuppressed mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

($P < 0.05$),高剂量组(40 mg/kg)对 CTX 引起的免疫抑制作用有更加明显的改善($P < 0.01$)。LPS 组应用低剂量可明显减轻 CTX 引起的免疫抑制($P < 0.05$),中剂量组和高剂量组两者都对 CTX 诱导的免疫抑制作用有着极其明显的改善作用($P < 0.01$)。

2.3 对 T 细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 比例的影响

结果如图 3 所示,流式细胞术检测发现,与 Con 组相比,Mod 模型组 $CD4^+$ T 细胞亚群数、 $CD8^+$ T 细胞亚群数、 $CD4^+/CD8^+$ 亚群比值均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Mod 模型组相比,MYR 中、高剂量组能显著升高 $CD4^+$ T 细胞亚群数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MYR 高剂量组能显著升高 $CD8^+$ T 细胞亚群数和 $CD4^+/CD8^+$ 亚群比值($P < 0.05$)。说明 MYR 能剂量依赖式调节免疫抑制小鼠的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 亚群数恢复到正常水平。

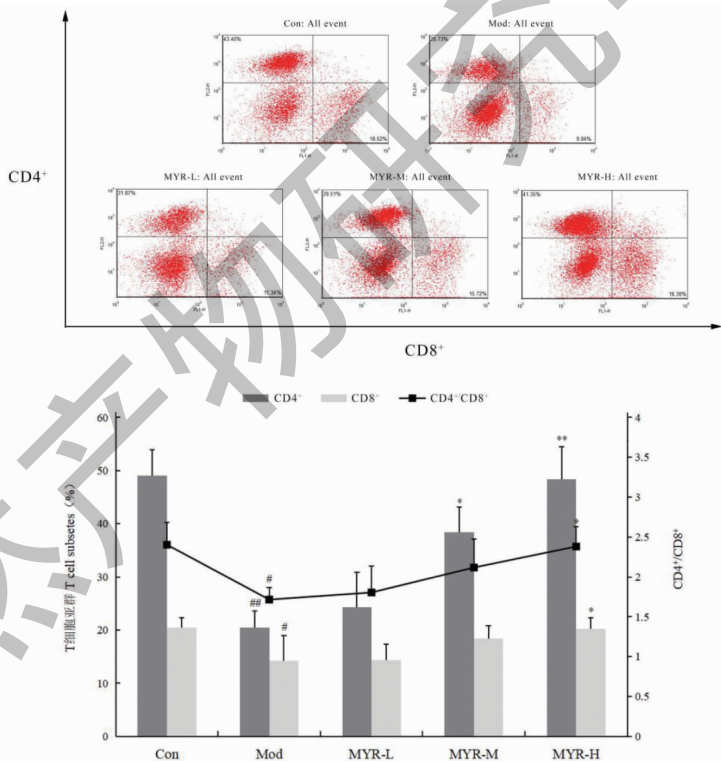


图 3 MYR 对免疫抑制小鼠 T 细胞亚群 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 比例的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 The effect of MYR on $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T cells, $CD4^+/CD8^+$ in immunosuppressed mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.4 对血清溶血素水平和抗体形成细胞的影响

为了评估 MYR 在调节体液免疫中的作用,我们比较了各组数据。结果如表 2 所示,Mod 组的溶血素和抗体形成细胞数较 Con 组均显著降低($P < 0.01$),应用 MYR 后,血清中的溶血素及抗体产生

的细胞数目均随着浓度梯度而增加,说明两者都受 MYR 的影响,且呈显著的剂量依赖性,其中低剂量组对两者均有增强趋势但作用都不太明显,中剂量组对溶血素作用效果显著($P < 0.05$)但对抗体形成细胞作用效果一般,高剂量组的 MYR 对两者的作

用效果都显著,其中溶血素水平达到极显著。

表 2 MYR 对免疫抑制小鼠血清溶血素、抗体形成细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The effect of MYR on serum hemolysin, antibody-forming cells in immunosuppressed mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	溶血素 Hemolysin (A_{540})	抗体形成细胞 Antibody-forming cells (A_{570})
Con	0.27 ± 0.06	0.77 ± 0.13
Mod	0.15 ± 0.03 ^{##}	0.51 ± 0.08 ^{##}
MYR-L	0.18 ± 0.02	0.54 ± 0.09
MYR-M	0.20 ± 0.05 [*]	0.62 ± 0.06
MYR-H	0.23 ± 0.06 ^{**}	0.74 ± 0.11 [*]

2.5 对细胞因子水平的影响

为了进一步证明 MYR 的免疫调节活性,我们

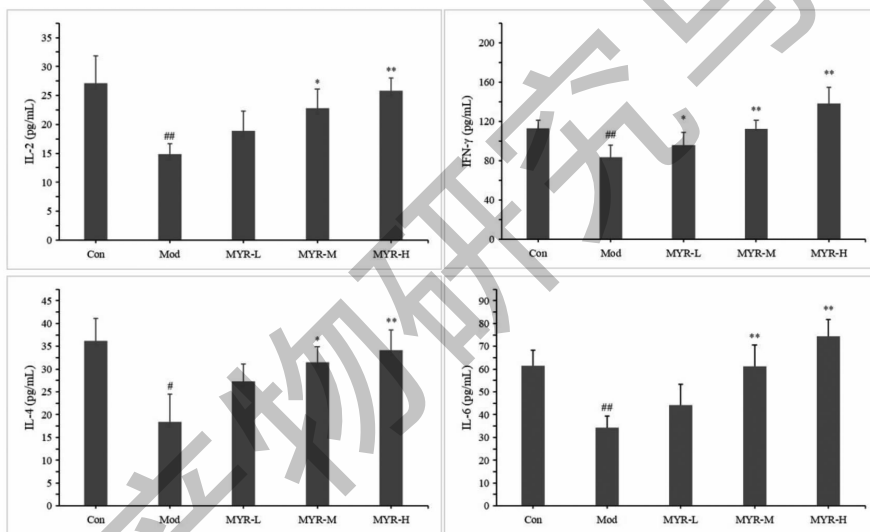


图 4 MYR 对免疫抑制小鼠血清细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 The effect of MYR on serum cytokines in immunosuppressed mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论与结论

免疫抑制是人体免疫机能失常的体现。在一个或多种因素的共同影响下,人体免疫的损伤会使其更易于感染,并产生免疫性病变。MYR 是一种存在于许多食物中的黄酮类物质,具有保肝^[13]、抗肿瘤^[3-5]、抗炎^[6]、抗血栓^[14]、抗氧化^[1]等作用,其临床前免疫调节也有不少报道。MYR 可改善钙化三醇诱导的特异性皮炎小鼠皮肤损伤症状,调节局部 Th1/Th2 平衡,修复受损的皮肤屏障。在体外实验中,Hou 等^[15]发现 MYR 对经肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)/IFN- γ 诱导的人永生角质形成细胞中的炎症因子有抑制作用,可以

测定了相关细胞因子表达情况。由图 4 可知,Mod 组较 Con 组对 IL-2、IL-6 和 IFN- γ 的抑制作用极显著($P < 0.01$),对 IL-4 也有明显的抑制作用($P < 0.05$)。与 Mod 组数据比较发现三种剂量的 MYR 均能促使本实验涉及到的四种细胞因子表达量升高。低剂量组中 IFN- γ 作用显著;中剂量组的 MYR 能显著增加细胞因子 IL-2 和 IL-4 的表达水平($P < 0.05$),极其显著增加细胞因子 IL-6 和 IFN- γ 的表达水平($P < 0.01$);高剂量组的 MYR 作用后,IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 四种细胞因子表达水平较 Mod 组均极其显著增加($P < 0.01$)。以上结果表明,MYR 对 CTX 诱导的细胞因子分泌的抑制具有拮抗作用,呈剂量依赖性。

阻断 STAT1 和 NF- κ B 信号通路。MYR 显著增加了 Treg 细胞的比例,促进了结肠炎小鼠免疫平衡的恢复^[16,17]。

CTX 是烷化剂的一种,具有广泛的抗癌性,是最早被称为“潜伏化”的广谱抗癌药物,对 T 细胞有选择性,并且可以诱导体内 DNA 损伤和修复^[18]。由于 CTX 可以治疗自身免疫性疾病,调节过强的免疫力,同时使用 CTX 造模操作便利性高,所需材料简单,是目前实验室中常用的免疫低下动物模型的诱导剂^[11-13]。本实验通过 CTX 造模以此评估 MYR 的免疫水平。通过与正常对照组相比,Mod 处理组脾脏、胸腺指数、细胞因子分泌水平等免疫反应相关

指标均明显降低,表明免疫低下小鼠模型建立成功。机体的免疫功能与脾脏、胸腺等免疫器官的功能状态息息相关、互相影响,生物体的免疫能力受到抑制时,脾脏和胸腺就会萎缩。在本研究中,MYR 可减轻因 CTX 导致的小鼠免疫器官脾脏、胸腺萎缩的情况,使免疫器官的重量增加以及指数上升均证明 MYR 在某种程度上能够加强小鼠的免疫水平。与 Mod 组数据相比,三组 MYR 治疗均显著增加了脾脏、胸腺指数,并且该趋势的上升程度说明治疗效果对药物用量存在一定的依赖性。值得注意的是应用高剂量的 MYR 后,两者数值均接近对照组水平。结果表明,MYR 可以减轻 CTX 引起的免疫器官损伤,对免疫器官有免疫增强作用。

适应性免疫系统,包括细胞和体液免疫反应,可以保护身体免受特定病原体的入侵。淋巴细胞增殖在适应性免疫的激活过程中起着关键作用,常被用于评价动物的免疫反应能力。ConA 和 LPS 可以分别使刺激 T、B 淋巴细胞增殖,为进一步证实 MYR 的免疫效应,我们在 ConA 和 LPS 的作用下对淋巴细胞分泌水平进行了检测。实验结果表明:应用 MYR 后,MYR 可以明显减轻 CTX 对淋巴细胞的抑制,并且从应用不同浓度 MYR 出现的变化来看,该变化对药物用量有一定的依赖性。研究表明,CD4⁺ T 淋巴细胞与 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例失衡对免疫功能有影响。经流式细胞术检测发现,CTX 处理后的小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 亚群数显著降低,CD4⁺/CD8⁺ 亚群比值下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明小鼠呈现免疫抑制状态。与 Mod 模型组相比,MYR 各剂量组能提高 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群数、CD4⁺/CD8⁺ 亚群比值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组尤其显著,呈现出明显的剂量依赖性。说明 MYR 可能参与影响 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞水平,调节其免疫失衡恢复到正常水平。因此表明 MYR 既可以增强细胞免疫,也可以增强体液免疫,与上述对脾脏、胸腺指数的作用得出的结论无出入。

血清溶血素的变化可以从分子水平反映机体内产生抗体的数量多少,血清溶血素的增加可以增强特异性抗体对胸腺依赖的细胞抗原的反应^[19]。通过对照实验的数据结果,我们得知,对比空白组,CTX 诱导的免疫抑制小鼠组的溶血素含量下降,抗体产生细胞数目减少,不同的剂量 MYR 均明显增加了 CTX 诱导的免疫抑制小鼠的血清溶血素的形成,对特异性抗体产生的细胞数量也有一定的增强

效果,说明了 MYR 能增强小鼠的细胞免疫功能。为了研究与这种增强的相关机制,我们从淋巴细胞和炎症因子的影响层面对 MYR 进行了更深入的体内研究。

细胞因子作为免疫系统中的元素之一,是免疫反应中细胞间的相互作用的桥梁和纽带,在协调免疫和炎症反应中起着至关重要的作用,例如增加 Th2 细胞亚群分泌的抗炎细胞因子 IL-4 可以控制炎症并改善过敏性鼻炎症状。IFN- γ 在调节免疫反应中起着重要作用,可诱导 T 细胞生成,激活巨噬细胞,交叉调控 Th1 和 Th2 细胞。IL-2 可以调控 Treg 发挥免疫抑制或者免疫刺激作用,在免疫稳态期间发挥关键作用^[20]。IL-4 具有刺激和抑制的多种免疫调节的作用,能够刺激 B 细胞增殖,是促进造血细胞发育和分化、IgG 和 IgE 类免疫球蛋白形成的重要因素。IL-6 的细胞特异性表达可导致多种生物学反应,在急性期炎症反应中起着重要的中介作用,并且能够通过削弱 IFN- γ 的产生数量来抑制效应 CD8⁺ T 细胞反应。实验结果表明,注射 CTX 后的小鼠细胞因子 IL-2 和 IL-4、IL-6、IFN- γ 表达量较对照组数据而言,呈显著下降趋势,除 IL-4 外的其他三组的数据差异更是达到了极其显著。而 MYR 可以逆转这个现象,以剂量依赖的方式使细胞因子 IL-2 和 IL-4、IL-6、IFN- γ 分泌水平接近对照组正常范围,对 CTX 诱导的小鼠免疫缺陷具有良好的调节作用。其中,高剂量药物组的 IL-6 和 TNF- γ 的浓度恢复到对照组的水平。这一结果表明,MYR 通过调节免疫细胞和细胞因子之间的相互作用恢复机体免疫力的平衡,改善免疫力低下的症状。总体来看,MYR 对 Th1 细胞亚群分泌的细胞因子 IFN- γ 产生的影响大于对 Th2 细胞亚群分泌的细胞因子 IL-4 和 IL-6 的影响,因此表明了 MYR 主要通过增强细胞免疫功能来提高免疫低下模型小鼠的免疫力。

综上所述,MYR 对免疫系统的影响是复杂的,因为它可以诱导各种淋巴细胞和炎症因子的表达变化,并调节这些因子之间的相互作用。基于本研究的结果,我们得出结论,MYR 在免疫功能中起着积极的作用,特别是在高剂量的条件下。我们已经证明了 MYR 可以逆转 CTX 诱导的免疫抑制,因此,我们的实验结果为 MYR 的免疫增强作用提供了证据,为 MYR 的进一步发展和潜在的临床应用提供了科学依据。在未来的研究中,我们希望继续探索 MYR 对由低免疫力或免疫障碍引起的一些疾病的

影响。

参考文献

- Nardini M, Garaguso I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers [J]. Food Chem, 2020, 305: 125437.
- Zhang Q, Zhao Y, Zhang M, et al. Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds [J]. J Pharm Anal, 2021, 11: 555-563.
- Han SH, Lee JH, Woo JS, et al. Myricetin induces apoptosis and autophagy in human gastric cancer cells through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Heliyon, 2022, 8: e09309.
- Anwar S, Khan S, Anjum F, et al. Myricetin inhibits breast and lung cancer cells proliferation via inhibiting MARK4 [J]. J Cell Biochem, 2022, 123: 359-374.
- Varela-Rodríguez L, Sánchez-Ramírez B, Hernández-Ramírez VI, et al. Effect of gallic acid and myricetin on ovarian cancer models: a possible alternative antitumoral treatment [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20: 110.
- Chen M, Chen Z, Huang D, et al. Myricetin inhibits TNF- α -induced inflammation in A549 cells via the SIRT1/NF- κ B pathway [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2020, 65: 102000.
- Meng Z, Wang M, Xing J, et al. Myricetin ameliorates atherosclerosis in the low-density-lipoprotein receptor knockout mice by suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells [J]. Nutr Metab, 2019, 16: 25.
- Liu M, Guo H, Li Z, et al. Molecular level insight into the benefit of myricetin and dihydromyricetin uptake in patients with Alzheimer's diseases [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 601603.
- Lv Q, Lv Y, Dou X, et al. Myricetin inhibits the type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by downregulating the *Salmonella* pathogenic island I gene regulatory pathway [J]. Microb Pathogenesis, 2021, 150: 104695.
- Bai RB, Zhang YJ, Fan J M, et al. Immune-enhancement effects of oligosaccharides from *Codonopsis pilosula* on cyclophosphamide induced immunosuppression in mice [J]. Food Funct, 2020, 11: 3306-3315.
- Chen X, Cai B, Wang J, et al. Mulberry leaf-derived polysaccharide modulates the immune response and gut microbiota composition in immunosuppressed mice [J]. J Funct Foods, 2021, 83: 104545.
- Yi WM, Chen SH, Min SM, et al. Study on the immunoprotective effects of Radix Pseudostellariae fibrous root extraction in immunosuppressed mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 837-844.
- Yao Q, Li S, Li X, et al. Myricetin modulates macrophage polarization and mitigates liver inflammation and fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Front Med-lausanne, 2020, 7: 71.
- Gaspar RS, da Silva SA, Stapleton J, et al. Myricetin, the main flavonoid in *Syzygium cumini* leaf, is a novel inhibitor of platelet thiol isomerases PDI and ERp5 [J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1678.
- Hou DD, Gu YJ, Wang DC, et al. Therapeutic effects of myricetin on atopic dermatitis *in vivo* and *in vitro* [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154200.
- Qu X, Li Q, Song Y, et al. Potential of myricetin to restore the immune balance in dextran sulfate sodium-induced acute murine ulcerative colitis [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72: 92-100.
- Chen YC, He XL, Qi L, et al. Myricetin inhibits interferon- γ -induced PD-L1 and IDO1 expression in lung cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 197: 114940.
- Deng J, Zhong YF, Wu YP, et al. Carnosine attenuates cyclophosphamide-induced bone marrow suppression by reducing oxidative DNA damage [J]. Redox Biol, 2018, 14: 1-6.
- Niu Y, Dong J, Jiang H, et al. Effects of polysaccharide from *Malus halliana* Koehne flowers in cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress on mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1603735.
- Pol JG, Caudana P, Paillet J, et al. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression [J]. J Exp Med, 2020, 217: e20191247.