

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.02.003

大蒜素对小鼠胸腺 T 淋巴细胞亚群的影响*

韩贵芝 王文军[△] 王裕康
(济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272067)

摘要 目的 探索大蒜素对小鼠胸腺淋巴细胞亚群分化的影响。**方法** 将 80 只清洁级昆明小鼠随机分为空白对照组和大蒜素低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 20 只, 每天灌胃 1 次, 灌胃容量为 0.1ml/10g, 连续灌胃 14d。1 周后将小鼠处死, 分离胸腺计算脏器指数并制取单细胞悬液, 用流式细胞仪检测分析大蒜素对各组小鼠胸腺淋巴细胞 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 值的影响。**结果** 空白对照组和各剂量组小鼠的胸腺指数、胸腺淋巴细胞 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞值有差异 ($F=6.82, F_{CD4^+}=14.12, F_{CD8^+}=8.27, P<0.05$), 经两两比较空白组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 4 组之间小鼠的胸腺指数、胸腺淋巴细胞 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ 细胞值均有较显著差异 ($P<0.05$), 各剂量组之间的 CD4⁺/CD8⁺ 值无差异 ($F=2.44, P>0.05$)。**结论** 大蒜素使小鼠的胸腺指数、胸腺淋巴细胞 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞比例均升高, 且存在剂量依赖性, 对小鼠免疫力具有正向调节作用。

关键词 大蒜素; CD4⁺ T 细胞; CD8⁺ T 细胞; 胸腺指数; CD4⁺/CD8⁺ 值

中图分类号: R392.11 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2016)04-087-04

The Effects of Allicin on Immunity Function in Mice

HAN Guizhi, WANG Wenjun, WANG Fang
(School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272013, China)

Abstract: Objective To explore the effects of allicin on T lymphocyte subsets of thymus in mice. **Methods** Eighty healthy adult Kunming mice were randomly divided into 4 groups including control group and allicin Low-dose group, Mid-dose group, High-dose group. Each group of 20 mice were treated with allicin by gavage, 0.1ml/(10g·bw) once every day for 14 days which were killed after a week. The thymus was collected to content the organ index then making single cell suspensions. FCM was used to study the effects of allicin on the percentage of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ lymphocyte of thymus. **Results** The thymus index, thymus lymphocytes CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells of all dose groups and the control group mice were all significant differences ($F=6.82, F_{CD4^+}=14.12, F_{CD8^+}=8.27, P<0.05$). And they had significant difference among the three dose and control groups by pairwise comparisons ($P<0.05$). It had no difference effects on the percentage of CD4⁺/CD8⁺ lymphocyte of thymus ($F=2.44, P>0.05$). **Conclusion** The thymus index and thymus lymphocytes CD4⁺ T cells CD8⁺ T cells of all-dose group mice were increased in a dose-dependent effect in mice. Allicin has a positive regulation on the immunity of mice.

Keywords: Allicin; CD4⁺ T cells; CD8⁺ T cells; thymus index; CD4⁺/CD8⁺

大蒜素是我国学者于 1987 年从大蒜中分离获得的有机含硫化物, 化学名称为二烯丙基三硫化物(DATS), 分子式为 C₆H₁₀S₃。近年来研究发现大蒜素具有抗肿瘤、抑制各种肿瘤细胞的体外增

殖, 预防心脑血管疾病、抗衰老、抗微生物、抗溃疡、提高机体免疫力等多种药理作用^[1-2], 且证明其作用机制主要是阻滞细胞周期和/或诱导细胞凋亡^[3-4]。有研究表明大蒜提取物能增强巨噬细胞的功能、使免疫器官指数增加、对具有免疫抑制或免疫性肝损伤的小鼠具有免疫增强的作用^[5-8]。

* [基金项目] 济宁市科技发展计划项目(2013JNWK74)

△ [通信作者] 王文军, E-mail: wwjun1973@163.com

大蒜素的不良反应较少,使用安全,对于提高人体免疫力具有重要意义。然而,大蒜素对正常小鼠胸腺淋巴细胞亚群分化的影响研究较少。淋巴细胞在机体免疫功能中主要发挥细胞免疫的作用,根据其表面所表达 CD 分子的不同,可分为 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞两大亚群;CD4⁺/CD8⁺ 值可以反映机体的免疫失调状况。本文研究不同剂量的大蒜素对各组小鼠胸腺淋巴细胞 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 值的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物及器材

健康清洁级昆明小鼠 80 只(由济宁医学院实验动物中心提供),体重(20±2)g,雌雄各半。400 目尼龙网、TD5M-WS 多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、FASCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 试剂

大蒜素(吉安市青原区绿源天然香料油提炼厂);Rat Anti-Mouse CD4 FITC 标记抗体(北京科悦达生物科技有限公司);Rat Anti-Mouse CD8 PE-Cy5 标记抗体(北京科悦达生物科技有限公司);PBS 缓冲液(北京 Solarbio 生物科技有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 动物分组及处理 将 80 只小鼠随机分为 4 组,每组 20 只。空白对照组:每日按照 0.1ml/(10g·bw) 剂量灌胃生理盐水;低剂量组:每日按照 300mg/(kg·bw) 剂量灌胃大蒜素溶液;中剂量组:每日按照 600mg/(kg·bw) 剂量灌胃大蒜素溶液;高剂量组:每日按照 900mg/(kg·bw) 剂量灌胃大蒜素溶液。各组小白鼠连续灌胃 14d。灌胃结束后将小白鼠继续饲养 1 周,让其体内大蒜素充分代谢。试验中小白鼠用标准维持级饲料、自来水,饲养在济宁医学院动物房内(自然环境),在灌胃期间,小白鼠正常进食、饮水。

1.3.2 胸腺指数计算 将末次灌胃后饲养 1 周的小白鼠称重后摘眼球放血处死,放入 75% 的酒精中浸泡 5min 杀菌。杀菌结束后,在无菌条件下剪开小鼠胸腔取出胸腺,用 0.9% NS 冲洗 2 遍,再用无菌滤纸吸干表面的生理盐水后称重、计算小鼠胸腺指数。公式为:胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/小鼠体重(g)。

1.3.3 单细胞悬液的制备 将称重后的胸腺用眼

科剪剪碎,放入研钵中加入 2ml 的生理盐水研磨;将研磨液通过尼龙网(400 目)过滤,再用 10ml 生理盐水冲洗研钵,过滤、收集滤液。将滤液转移至离心管,以 1500r/min 的转速离心 5min,弃上清加入 10ml 生理盐水重悬,使悬液中细胞密度最低为 1×10^6 个/ml,冷藏备用。

1.3.4 抗体标记和信息采集 取 4 支流式管,编号 A、B、C、D,分别用微量加样器吸取 100 μ l 对照组小鼠的单细胞悬液加入流式管底,A 管不加任何抗体,B 管中加入 10 μ l CD4 FITC 标记抗体,C 管加入 10 μ l CD8 PE-Cy5 标记抗体,D 管中各加入 10 μ l CD4 FITC 标记抗体和 CD8 PE-Cy5 标记抗体;其余单细胞悬液只做双抗体标记,混匀后室温避光孵育 20min;加入 2ml PBS 洗液重悬细胞,以 1000r/min 的转速离心 5min,弃上清;加入 0.3ml PBS 洗液重悬细胞,使用流式细胞仪进行检测分析。

1.4 统计学方法

采用统计分析软件 SPSS 13.0 进行数据处理。分析各实验组和对照组之间的差异用 *F* 检验,两两比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 大蒜素对小鼠胸腺指数的影响

空白对照组和各剂量组小鼠的胸腺指数有差异($F = 6.82, P < 0.05$)。空白对照组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 4 组之间小鼠的胸腺指数经两两比较均有较显著差异($P < 0.05$),可以推断胸腺指数随大蒜素剂量增加存在剂量依赖性,结果见表 1。

表 1 大蒜素对小鼠胸腺的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·bw ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹
空白对照组	—	2.74 ± 0.39
低剂量组	300	3.08 ± 0.78 *
中剂量组	600	3.42 ± 0.71 * Δ
高剂量组	900	3.57 ± 0.74 * Δ * \star

注:与空白对照组相比*($P < 0.05$),与低剂量组相比 Δ ($P < 0.05$),与中剂量组相比 \star ($P < 0.05$)

2.2 大蒜素对小鼠胸腺淋巴细胞 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的影响

经统计学分析,空白对照组和各剂量组小鼠的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞值有差异($F_{CD4^+} = 14.12, F_{CD8^+} = 8.27, P < 0.05$),空白对照组、低剂量组、中剂量组与高剂量组 4 组之间小鼠的 CD4⁺

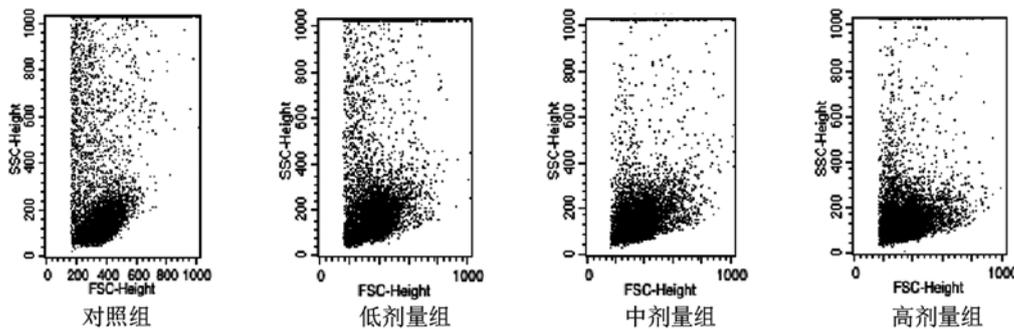
T 细胞和 CD8⁺T 细胞值经两两比较均有较显著差异($q > q_{0.05}(v, \alpha), P < 0.05$), 可以推断小鼠胸腺 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞值随

大蒜素剂量增加存在剂量依赖性, 各组样品的 CD4⁺/CD8⁺ 值无差异($F = 2.44, P > 0.05$)。结果见表 2、图 1。

表 2 大蒜素对胸腺淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹ · bw ⁻¹	CD4 ⁺ 比例/%	CD8 ⁺ 比例/%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
空白对照组	—	38.89 ± 10.02	24.48 ± 6.65	1.59 ± 4.75
低剂量组	300	41.02 ± 9.58 *	25.32 ± 7.12 *	1.62 ± 3.55
中剂量组	600	49.71 ± 10.88 *△	30.31 ± 9.02 *△	1.47 ± 7.18
高剂量组	900	54.85 ± 9.54 *△☆	33.65 ± 8.57 *△☆	1.53 ± 2.63

注:与空白对照组相比 * $P < 0.05$;与低剂量组相比△ $P < 0.05$;与中剂量组相比☆ $P < 0.05$



注: SSC-Height:CD8⁺-PE-Cy5;FSC-Height,CD4⁺-FITC

图 1 各个剂量组小鼠胸腺淋巴细胞 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞亚群分布图

3 讨论

大蒜具有多种药用、保健价值,被认为是免疫激发型中草药,可以诱生干扰素,抑制肿瘤坏死因子的生成,降低致癌物作用,有抗肿瘤、预防心脑血管疾病、抗衰老、抗微生物、抗溃疡、提高机体免疫力等多种药理作用^[1-3]。有研究表明大蒜提取物能增强巨噬细胞的功能、使免疫器官指数增加、对具有免疫抑制或免疫性肝损伤的小鼠具有免疫增强作用^[9-10]。但是对免疫中枢器官胸腺及各淋巴细胞的分化还未见相关的报道。本文采用不同剂量的大蒜素溶液对小鼠进行灌胃,建立不同剂量的动物模型,以探讨大蒜素对于胸腺以及胸腺淋巴细胞亚群分化的影响。

实验结果表明,各剂量组胸腺均较空白组有不同程度的增大,经统计学分析对照组和 3 个剂量组小鼠的胸腺指数有显著差异,经两两比较均有较显著差异,可以推断胸腺指数随大蒜素剂量增加存在剂量依赖性,此研究结果表明大蒜素有刺激中枢免疫器官胸腺的发育的功能,使胸腺指数提高,提示大蒜素具有免疫激发性。胸腺也是 T 细胞分化、

发育和成熟的场所,免疫 CD4⁺T 细胞即辅助 T 细胞,具有协助体液免疫和细胞免疫的功能,也有部分细胞具有免疫抑制和细胞毒作用;CD8⁺T 细胞即细胞毒性 T 细胞,具有细胞毒作用,能够特异杀伤靶细胞。对小鼠灌胃大蒜素后,经检测小鼠胸腺免疫细胞 CD4⁺T、CD8⁺T 百分比含量均增加,提示一定剂量的大蒜素可以促进胸腺淋巴细胞亚群的分化,提高两种 T 淋巴细胞的比例,增强体液免疫和细胞免疫的功能,加强免疫细胞对靶细胞的细胞毒作用,增强机体的免疫力。经统计学比较空白对照组和各剂量组小鼠的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞值有差异,经两两比较各组之间均有较显著差异,可以推断小鼠胸腺 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞值随大蒜素剂量增加存在剂量依赖性。各组样品的 CD4⁺/CD8⁺ 值无差异,表明小鼠的免疫功能处于稳态状态。大蒜素作用机制可能与刺激胸腺基质细胞分泌细胞因子或多种胸腺肽类分子有关,大蒜素对外周血淋巴免疫细胞的影响有待于进一步的研究。本研究为大蒜素的免疫机制的研究和对大蒜素作为免疫增强剂的开发和利用提供一定的参考。

参考文献:

[1] 徐巍, 苏乐群, 李宏建. 大蒜素的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(6): 805-807. DOI: 10. 3321/j. issn: 1001-5213. 2007. 06. 043.

[2] 李宁, 张春芝, 崔文, 王文军, 李炳辉. 大蒜素对前列腺癌 DU145 细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 济宁医学院学报, 2015, 03: 156-158. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2015. 03. 002.

[3] Balasenthil S, Rao KS, Nagini S. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of experimental hamster buccal pouch carcinogenesis by garlic [J]. J Oral Pathol Med, 2002, 31(3): 142-146.

[4] 方欢, 夏道宗, 潘东曼, 等. 大蒜提取物对小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(11): 70-71. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-9577. 2012. 11. 020.

[5] 岳丽, 王辉, 黄雪松, 等. 大蒜多糖 B 对免疫抑制小鼠免疫活性的调节[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2009, 30(6): 601-605. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9965. 2009. 06. 005.

[6] 赵骥, 郑敏, 陈红光, 等. 大蒜多糖 C 对免疫性肝损伤小鼠外周血淋巴细胞亚群的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 96-98. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-859X. 2007. 05. 046.

[7] 岳丽. 大蒜多糖 B 对免疫抑制小鼠免疫功能调节的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2010.

[8] 刘永华, 王长月, 何悦, 杨松. 大蒜多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 饲料研究, 2013, 7: 86-87. DOI: 10. 13557/j. cnki. issn1002-2813. 2013. 07. 025

[9] Kim SH, Bommarreddy A, Singh SV. Garlic constituent diallyl trisulfide suppresses x-linked inhibitor of apoptosis protein in prostate cancer cells in culture and in vivo [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2011, 4(6): 897-906. DOI: 10. 1158/1940-6207. CAPR-10-0323.

[10] Wu PP, Liu KC, Huang WW, et al. Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo [J]. Phytomedicine, 2011, 18(8/9): 672-676. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2011. 01. 006.

(收稿日期 2016-01-06)

(上接第 81 页)

[36] Fasano A, Bove F, Gabrielli MA, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease [J]. Movement Disorders, 2013, 28(9): 1241-1249. DOI: 10. 1002/mds. 25522.

[37] Dupont AW, Dupont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(9): 523-531. DOI: 10. 1038/nrgastro. 2011. 133.

[38] Rees K, Stowe R, Patel S, et al. Helicobacter pylori erad-

ication for Parkinson's disease [Z], 2011: CD008453.

[39] Lazzarini M, Martin S, Mitkovski M, et al. Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model [J]. Glia, 2013, 61(7): 1084-1100. DOI: 10. 1002/glia. 22496.

[40] Zhao L, Shen J. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare [J]. J Biotechnol, 2010, 149(3): 183-190. DOI: 10. 1016/j. jbiotec. 2010. 02. 008.

(收稿日期 2016-03-10)

· 简讯 ·

《济宁医学院学报》影响因子再一次提升

据中国科技期刊引证报告统计:2015 年《济宁医学院学报》全年载文总被引频次 616, 影响因子由 2014 年的 0.492 提升到 0.562; 中国学术期刊影响因子年报也显示:2015 年《济宁医学院学报》的影响因子由 2014 年的 0.319 提升到 0.441。

两家权威数据库的期刊评价结果均显示:《济宁医学院学报》的多项评价指标连续 5 年不断攀升。在山东省同类院校中名列前茅。

本刊编辑部