

槲皮苷联合电针疗法对免疫抑制小鼠免疫功能和抗氧化能力的影响

陈龙云, 周艳艳, 陈会敏, 徐安莉, 徐建民, 赵敏

(湖北中医药大学 基础医学院, 武汉 430000)

摘要: 为探讨槲皮苷(quercitrin, QI)联合电针(electroacupuncture, EA)刺激对免疫抑制小鼠免疫功能的影响, 将实验小鼠随机分为对照组(Control)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)模型组、QI组和QI+EA联合治疗组。用CTX建立免疫抑制小鼠模型后, 第2 d起各组分别给予生理盐水、QI灌胃及QI灌胃联合EA刺激, 连续治疗14 d。治疗结束后, 称重法测定胸腺及脾脏指数; HE染色法观察脾脏组织学变化, 吉姆萨染色法测定腹腔巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数; ELISA检测小鼠血浆IgG和IgM、IL-2和IL-4水平以及抗氧化相关指标如超氧化物歧化酶(superoxide diamutase, SOD)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)水平; FACS检测脾脏CD4⁺、CD8⁺T细胞亚群以及组织活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平; Western blotting检测脾脏组织Nrf2总蛋白及核蛋白、总NQO1、HO-1蛋白、NF- κ B p65及TLR2蛋白的表达水平。结果显示, CTX组的免疫器官指数、巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数、IgG、IgM、IL-2、IL-4、SOD、CAT及CD4⁺、CD8⁺T细胞亚群等指标均较对照组明显降低($P < 0.05$), 而脾脏组织损伤程度、MDA、ROS及Nrf2、NQO1、HO-1、NF- κ B p65、TLR2水平则均显著升高($P < 0.0001$); 相较于CTX组, QI组小鼠免疫功能相关指标及SOD、CAT水平和Nrf2、NQO1、HO-1蛋白水平均显著升高($P < 0.05$), 而脾脏组织损伤程度、MDA、ROS及NF- κ B p65、TLR2蛋白水平均显著下降($P < 0.05$); 联合EA可进一步加强QI的上述作用($P < 0.0001$)。由此, EA联合QI对免疫抑制小鼠有保护作用, 可通过提高免疫器官功能及抗氧化水平促进小鼠的免疫力, 具体作用机制可能是通过激活抗氧化应激Nrf2/ARE通路而起到提高免疫力的作用。

关键词: 电针; 槲皮苷; 环磷酰胺; 免疫抑制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)05-0361-09

槲皮苷(quercitrin, QI)是黄酮类化合物, 在各种中草药如鱼腥草^[1]、乌药叶^[2]、金线莲^[3]等中均存在。其作为天然产物来源广泛, 具有多种药理活性且几乎无毒副作用, 因此有较高的开发应用价值。近些年, 针对QI的生物活性研究也证实其具有非常广泛的药理活性, 如中枢抑制作用、心血管及肝脏保护作用、抗氧化、镇痛、消炎、抗病毒、抗肿瘤、抗抑郁以及降血糖血脂作用等^[4-5]。李廷利等^[6]的研究表明QI的镇静催眠作用可能与免疫调节机制有关。然而, 目前关于QI对免疫力低下机体影响的相关研究较少。

针灸作为传统的医学治疗手段, 具有疏通经络、调和阴阳、扶正祛邪的作用。电针(electroacu-

puncture, EA)刺激是针灸的疗法之一, 能够改善多种慢性疾病的临床症状, 如改善慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)肌营养不良模型大鼠呼吸功能, 减轻膈肌萎缩^[7]; 辨阴阳经证EA治疗社区中风偏瘫获得了较为满意的疗效^[8]。另外, 大量研究证实针刺不同穴位可提高免疫功能。最新研究表明, EA刺激四关穴可抑制炎症反应及肾上腺应激并增强老年髋关节置换术患者的免疫功能^[9]。EA刺激足三里穴可作为一种替代疗法治疗过敏性炎症及Th1介导的炎症反应^[10], 提高荷瘤小鼠脾脏指数, 增强小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力, 从而增强肿瘤小鼠的免疫功能^[11]。

课题组就QI联合EA对环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导的免疫力低下小鼠的免疫功能的影响进行研究, 为改善人体免疫力低下、提高机体免疫功能提供科学参考。

收稿日期: 2018-12-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31700152); 2016湖北中医药大学青苗计划(2016ZZX023)

作者简介: 陈龙云(1988—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中医基础理论研究

通信作者: 赵敏(E-mail: 44592734@qq.com)

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 QI 购自上海源叶生物科技有限公司; 注射级 CTX, 购自浙江海正药业股份有限公司; IgG、IgM、IL-2、IL-4、超氧化物歧化酶(superoxide diamutase, SOD)及过氧化氢酶(catalase, CAT)等的 ELISA 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司; 丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 细胞 SOD 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; 抗鼠 CD4-FITC、CD8-PE 单抗购自 BioLegend 公司; 胞质核蛋白提取试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司; 蛋白标记物购自北京全式金生物技术有限公司; 小鼠抗 β -actin 单抗、兔抗 NQO1 单抗、羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗、羊抗兔 IgG-HRP 二抗、兔抗组蛋白 H3 多抗、兔抗 HO-1 多抗、兔抗 Nrf2 多抗、兔抗 NF- κ B p65 多抗、兔抗 TLR2 多抗均购自 Affinity 公司。

FCM(CytoFLEX, Beckman Coulter 公司); 倒置显微镜(IX51, OLYMPUS 公司); 低速离心机(5702R, Eppendorf 公司); 酶标仪(Multiskan Spectrum, Thermo Scientific 公司); 凝胶成像仪(BioSpectrum, UVP 公司)。

1.2 动物分组和造模 64 只 BALB/c 小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 6 周龄, 体质量 18~22 g, 购自武汉大学动物实验中心。于恒温(21~25 °C)、恒湿(40%~65%)条件下饲养, 自由饮食饮水。小鼠随机分为对照组、CTX 模型组、QI(80 mg/kg)^[12]组和 EA+QI(80 mg/kg)联合治疗组, 每组 16 只。小鼠适应性喂养 7 d 后开始造模。CTX 组一次性腹腔注射 CTX 200 mg/kg 后, 第 2 d 开始每日生理盐水灌胃(4 mL/kg); 对照组每日给予等体积生理盐水注射及灌胃; QI(80 mg/kg)组于 CTX 注射次日起 QI 灌胃(80 mg/kg); 联合治疗组同时采用 EA 刺激(取双侧足三里穴, EA 波型为疏密波, 输出电流 1 mA, 频率 4 Hz/20 Hz, 强度以局部肌肉颤动为宜, 留针 30 min, 1 次/d, 连续 14 d)和 QI(80 mg/kg)灌胃治疗。所有治疗持续 14 d。

1.3 小鼠免疫器官指数测定 脱颈椎处死 40 只小鼠(每组 10 只)并立即称取体质量; 无菌条件下迅速取出小鼠脾脏和胸腺洗净并称重, 计算脾脏指数和胸腺指数。

脾脏指数=脾脏重量(mg)/小鼠体质量(g)×100%
胸腺指数=胸腺重量(mg)/小鼠体质量(g)×100%

1.4 小鼠脾脏组织学观察 将 1.3 步骤中称重后的脾脏放入波恩固定液中固定, 再以梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋并切 5 μ m 薄片。脱蜡并行 HE 染色, 风干后中性树脂封片, 光学显微镜下观察并摄片。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能检测 12 只小鼠(3 只/组)末次给药后腹腔注射含 1% 鸡血红细胞的生理盐水 0.5 mL, 并轻揉小鼠腹部使其分散。1 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 剪开腹部, 暴露腹膜并注入 200 μ L PBS, 反复晃动混匀后吸取腹腔液均匀涂片, 置于 37 °C 湿盒中孵育。30 min 后用生理盐水洗去未吸附的鸡红细胞, 晾干玻片并用丙酮-甲醇溶液固定 5 min, 吉姆萨染色 15 min 后镜检, 每片计数 200 个巨噬细胞, 分别计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数×100%

吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞总数/计数的巨噬细胞数×100%

1.6 小鼠血浆 IgG、IgM、IL-2、IL-4 水平测定 对各组小鼠(每组 10 只)眼眶取血, 离心取血浆, 并将血浆样品于一 80 °C 冰箱保存。小鼠血浆中 IgG、IgM、IL-2、IL-4 含量的测定根据 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.7 小鼠脾脏淋巴细胞亚群检测 脱颈椎处死各组小鼠(每组 12 只), 无菌条件下取脾脏; 取干净注射器用其按压处的末端碾压组织, 经 100 目细胞筛过滤之后, 悬浮于含 RPMI 1640 培养液的培养皿中; 用 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 mL 红细胞裂解液, 37 °C 静置 2 min; 待红细胞完全溶解后, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。以 RPMI 1640 培养液洗涤并离心弃上清, 制成小鼠脾脏细胞混悬液(1×10^7 个/mL); 各取 100 μ L 加入 FACS 检测管, 分别加入抗 CD4-FITC、CD8-PE 抗体各 1 μ L, 振荡混匀后 4 °C 避光孵育 30 min; 以含 0.5% BSA 的 PBS 清洗 1 遍, 弃上清, 再加入 200 μ L 含 0.5% BSA 的 PBS 重悬细胞后上机检测, FlowJo 软件分析。

1.8 小鼠脾脏细胞 ROS 水平检测 取 1.7 步骤中的小鼠脾脏细胞悬液(1×10^7 个/mL), 各取 100

μL加入FACS检测管,按照DCFH-DA细胞ROS检测试剂盒操作说明进行。上机检测后以FlowJo软件分析。

1.9 小鼠血浆SOD、MDA及CAT水平测定 取1.6步骤中保存的血浆样品,SOD、MDA及CAT含量的测定根据生化检测试剂盒说明书进行。

1.10 Western blotting检测脾脏组织中相关蛋白表达 脱颈椎处死各组小鼠(每组12只),无菌条件下取脾脏,按照试剂盒说明书分别提取各组脾脏组织的细胞核、细胞质蛋白。将剪碎的脾脏组织加入800 μL低温缓冲液A于自动匀浆机中匀浆,4℃振荡裂解25 min,涡旋振荡10 s并于冰上静置5 min,低温离心机12 000 r/min离心3 min,收集到的上层清液即为细胞质蛋白。将下层沉淀物加入400 μL预冷的缓冲液B,振荡混匀,4℃振荡裂解25 min后,低温离心机12 000 r/min离心10 min,上层清液即为细胞核蛋白。BCA法测定相应蛋白质浓度,取等量样品以12% SDS-PAGE分离并转到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的PBST缓冲液室温封闭2 h后,经兔抗Nrf2多抗(1:500)、

兔抗HO-1多抗(1:500)、兔抗NQO1单抗(1:2 000)、兔抗NF-κB p65多抗(1:2 000)、兔抗TLR2多抗(1:1 000)、抗β-actin单抗(1:1 000)、兔抗组蛋白H3多抗(1:500)等一抗4℃静置孵育过夜并充分洗涤后,再以相应IgG-HRP二抗封闭液37℃摇床孵育2 h,ECL化学发光显影。采用美国UVP分析仪器扫描胶片,系统自动生成灰度值进行分析。

1.11 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 t 检验分析处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 QI及EA对免疫抑制小鼠免疫器官指数的影响 CTX模型组小鼠的胸腺指数和脾脏指数均较对照组明显降低($P < 0.05$);与CTX模型组相比,QI组小鼠的脾脏指数和胸腺指数明显升高($P < 0.05$),而QI联合EA刺激组小鼠的免疫器官指数也显著升高($P < 0.05$)。(表1)

表1 各组处理对免疫抑制小鼠免疫器官指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	胸腺指数(mg/g)	脾脏指数(mg/g)
Control		6.655±0.879	4.043±0.684
CTX	200	5.989±0.982 [#]	2.887±0.566 [#]
QI+CTX	80	6.326±0.910 [*]	3.364±0.491 [*]
QI+EA+CTX	80	6.321±0.983 [*]	3.987±0.533 [*]

注:与Control组比较,[#] $P < 0.05$;与CTX组比较,^{*} $P < 0.05$

2.2 QI及EA对免疫抑制小鼠脾脏组织的影响 对照组小鼠脾脏结构清晰,脾小体较大,淋巴细胞密集且数量较多(图1A1、1B1);CTX模型组小鼠脾脏组织红、白髓分界不清晰,脾小体数量减少且体积缩小,形态不规则(图1A2、1B2);QI及联合EA治疗组的脾脏红、白髓分界变得清晰,脾小体结构完整、数量增多,体积较模型组大,淋巴细胞较CTX模型组更为密集且形态规则(图1A3、1B3,图1A4、1B4)。

2.3 QI、EA对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 吉姆萨染色见巨噬细胞吞噬鸡血红细胞

呈现不同的阶段:未被消化的鸡血红细胞呈粉红色,散在分布且离巨噬细胞较远;部分鸡血红细胞聚集在巨噬细胞周围;一部分已被巨噬细胞吞入,整体形状不规则;有的巨噬细胞已吞入多个红细胞,体积增大且呈紫黑色(图2)。统计发现CTX模型组的腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数均显著低于对照组($P < 0.05$);QI组的吞噬百分率和吞噬指数均高于CTX模型组($P < 0.05$);而QI联合EA刺激组的吞噬百分率和吞噬指数均显著高于CTX模型组($P < 0.05$)(表2)。

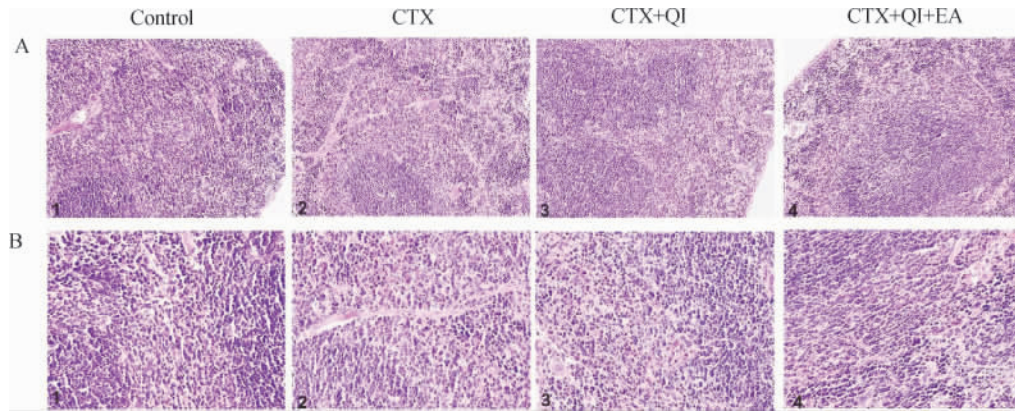


图1 小鼠免疫器官组织学观察

注：A. 200×低倍镜下脾脏组织的 HE 染色结果；B. 400×高倍镜下脾脏组织的 HE 染色结果。细胞核呈蓝色，胞质、肌纤维及胶原纤维、红细胞等呈不同程度红染

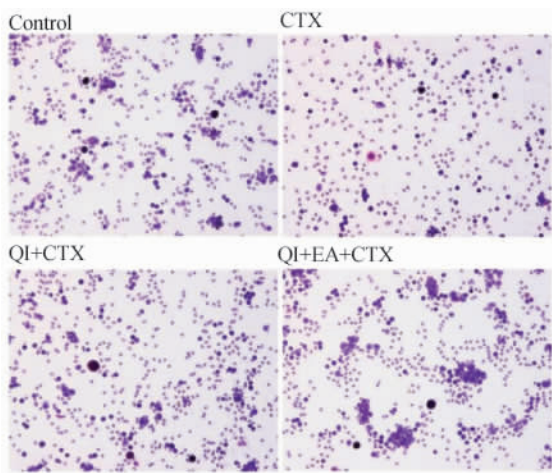


图2 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能检测

注：图2为吉姆萨染色结果，图中粉色且体积较小的为鸡血红细胞，体积较大且呈蓝色的为巨噬细胞，形状不规则且着色较深的为已吞噬鸡血红细胞的巨噬细胞

表2 各组处理对免疫抑制小鼠巨噬细胞功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量(mg/kg)	吞噬百分率(%)	吞噬指数
Control		35.0 ± 3.8	1.8 ± 0.1
CTX	200	21.7 ± 1.3 [#]	1.0 ± 0.1 [#]
QI+CTX	80	27.6 ± 1.3 [*]	1.4 ± 0.1 [*]
QI+EA+CTX	80	31.1 ± 2.7 [*]	1.5 ± 0.1 [*]

注：与 Control 组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 CTX 组比较，^{*} $P < 0.05$

2.4 QI、EA 对小鼠血浆 IgG、IgM 及 IL-2、IL-4 水平的影响 较之对照组，CTX 模型组小鼠 IL-2、IL-4 水平均显著降低($P < 0.05$)；QI 组和 QI+EA 联合组的以上细胞因子水平较 CTX 模型组均显著升高($P < 0.05$)。另外，和对照组比较，模型组 IgG、IgM 含量也均显著降低($P < 0.05$)；与模型组相比，QI 组和 QI+EA 联合组的 IgG、IgM 含量均显著升高($P < 0.05$)。(表 3)

表3 各组处理对免疫抑制小鼠血浆 IgG、IgM、IL-2 及 IL-4 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	IgM(mg/mL)	IgG(mg/mL)	IL-2(pg/mL)	IL-4(pg/mL)
Control	0.882 ± 0.145	1.783 ± 0.220	166.740 ± 16.385	34.100 ± 4.456
CTX	0.418 ± 0.063 [#]	0.824 ± 0.208 [#]	94.380 ± 9.082 [#]	17.690 ± 2.531 [#]
QI+CTX	0.646 ± 0.139 [*]	1.169 ± 0.188 [*]	124.200 ± 12.630 [*]	23.320 ± 3.733 [*]
QI+EA+CTX	0.767 ± 0.091 [*]	1.404 ± 0.209 [*]	136.000 ± 15.420 [*]	27.790 ± 3.610 [*]

注：与 Control 组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 CTX 组比较，^{*} $P < 0.05$

2.5 QI、EA 对小鼠脾脏淋巴细胞亚群的影响

CTX 模型组 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞水平和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例均显著低于对照组($P < 0.05$)；而 QI 组和 QI 联合 EA 刺激组 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞

水平和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例均显著高于 CTX 模型组($P < 0.05$)，且 QI 联合 EA 组的相应水平高于 QI 组。(图 3、表 4)

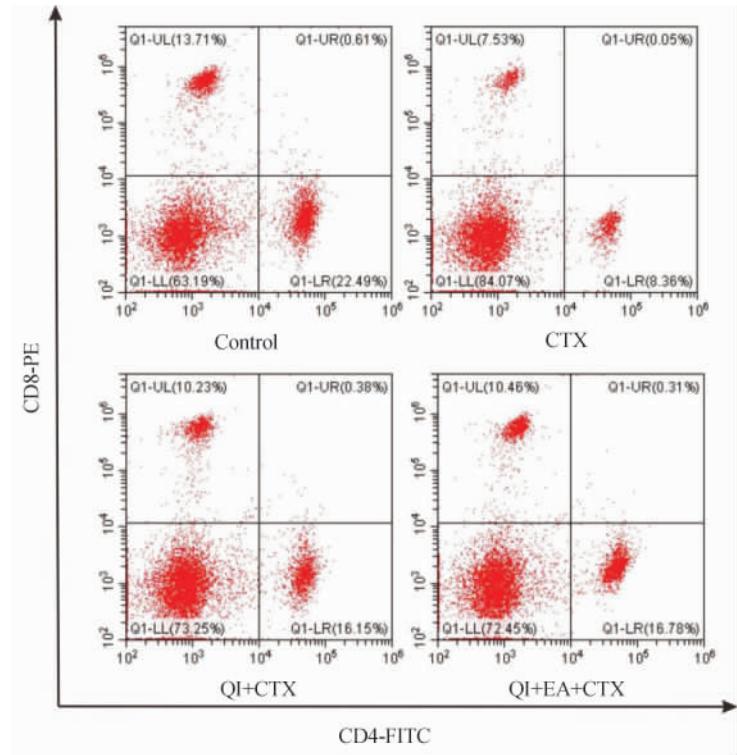


图 3 FACS 检测小鼠脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群百分比

表 4 各组处理对免疫抑制小鼠脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群百分比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	CD4 ⁺ T(%)	CD8 ⁺ T(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T
Control		22.602±1.291	13.402±0.700	1.690±0.087
CTX	200	7.938±0.741 [#]	7.396±0.535 [#]	1.073±0.058 [#]
QI+CTX	80	15.710±1.249 [*]	10.364±0.809 [*]	1.519±0.111 [*]
QI+EA+CTX	80	16.654±1.079 [*]	10.570±0.719 [*]	1.579±0.100 [*]

注：与 Control 组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 CTX 组比较，^{*} $P < 0.05$

2.6 QI、EA 对小鼠脾脏细胞 ROS 水平的影响 据 FACS 检测结果，对照组 DCF 荧光强度弱，范围为 $10^3 \sim 10^5$ ，CTX 模型组荧光强度达 $10^4 \sim 10^6$ 范围，而 QI 组和 QI 联合 EA 刺激组的荧光强度分别在 $10^4 \sim 10^6$ 范围和 $10^3 \sim 10^5$ 范围(图 4A)。因此，经统计分析可知，CTX 模型组 ROS 水平明显高于对照组($P < 0.05$)，而 QI 及其联合 EA 刺激组的 ROS 水平均显著低于 CTX 模型组($P < 0.05$)，QI 联合 EA 组的相应水平又稍低于 QI 组。(图 4B)

2.7 QI、EA 对小鼠血浆中 SOD、MDA 及 CAT 水平的影响 CTX 组小鼠血浆中 SOD 和 CAT 水平较对照组明显降低($P < 0.05$)，而 MDA 水平则显著升高($P < 0.05$)；与 CTX 组相比，QI 组和 QI 联合 EA 刺激组的 SOD 和 CAT 水平均显著升高

($P < 0.05$)，且 MDA 水平均显著低于 CTX 组($P < 0.05$)。相比于 QI 组，QI 联合 EA 刺激组的 SOD 和 CAT 水平均升高，同时 MDA 水平降低。(表 5)

2.8 Western blotting 检测脾脏组织中相关蛋白的表达 CTX 组小鼠脾脏细胞核内 Nrf2 蛋白及总 Nrf2、NQO1、HO-1、NF- κ B p65、TLR2 蛋白等的表达水平较之对照组均明显升高($P < 0.05$)；QI 干预后，除 NF- κ B p65 及 TLR2 蛋白表达显著降低($P < 0.0001$)，Nrf2 蛋白及总 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白较之 CTX 模型组均显著升高($P < 0.0001$)；当以 QI 与 EA 联合干预时，NF- κ B p65 及 TLR2 蛋白表达水平较之 CTX 组下降更显著($P < 0.0001$)，Nrf2 蛋白及总 Nrf2、NQO1、HO-1 蛋白则上升更明显($P < 0.0001$)。(图 5)

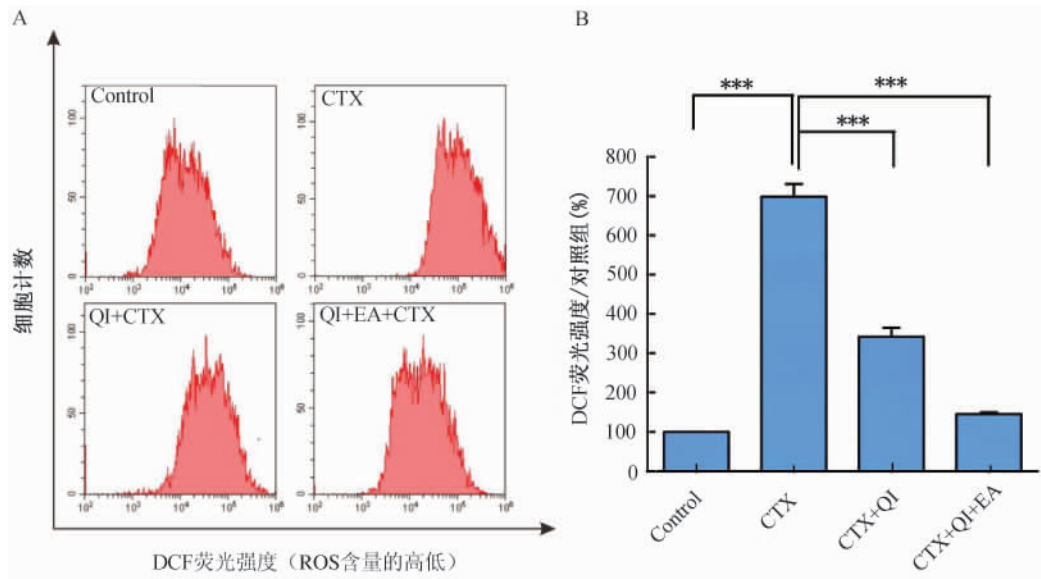


图4 小鼠脾脏细胞 ROS 水平检测

注: A. FACS 检测 ROS 水平结果; B. 相应统计结果, *** $P < 0.0001$ 表5 各组处理对免疫抑制小鼠血浆中 SOD、MDA 及 CAT 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	SOD(U/mL)	MDA(mmol/L)	CAT(U/mL)
Control		121.69 ± 12.40	3.69 ± 0.80	1.77 ± 0.23
CTX	200	81.95 ± 9.17 [#]	7.96 ± 1.24 [#]	1.14 ± 0.16 [#]
QI+CTX	80	96.12 ± 9.97 [*]	5.79 ± 1.35 [*]	1.51 ± 0.16 [*]
QI+EA+CTX	80	105.68 ± 11.47 [*]	5.31 ± 1.10 [*]	1.67 ± 0.13 [*]

注: 与 Control 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 CTX 组比较, ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

胸腺和脾脏是人体主要的免疫器官,是 T、B 细胞分化成熟的主要场所,免疫器官指数常用于反映免疫器官功能的强弱。巨噬细胞是一种多功能免疫细胞,通过吞噬参与机体固有免疫反应过程,其吞噬能力是评价免疫增强药物活性的关键指标之一^[13]。T 细胞主要通过分泌细胞因子来调节机体免疫功能,其中 CD4⁺T 细胞经抗原刺激诱导可进一步分化为 Th1 亚群和 Th2 亚群, Th1 亚群大量分泌 IL-2, Th2 亚群主要分泌 IL-4; CD8⁺T 细胞则是重要的杀伤抑制细胞和 CTL,它们的数量及比例变化和 IL-2、IL-4 含量在治疗前后的变化可一定程度反映机体免疫状态^[14-16]。另外,血浆 IgG 及 IgM 含量参与调节机体免疫功能。CTX 是制备免疫抑制动物模型的常用药物之一,可引起免疫器官体积缩小、淋巴细胞增殖及巨噬细胞功能降低^[17-18]。在本研究中,给予 QI 及其联合 EA 刺激后,免疫抑制小鼠的免疫器官指数、腹腔巨噬细胞

吞噬功能、血浆 IgG 及 IgM 含量、脾脏组织 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞含量、CD4⁺/CD8⁺T 细胞比例、血浆 IL-2 及 IL-4 含量等均较模型组显著上升,HE 染色结果显示 QI 及 QI 联合 EA 后脾脏红白髓分界清晰,脾小体结构完整,淋巴细胞增多,表明二者联合可促进淋巴细胞增殖分化并促进免疫器官修复。另外,氧化应激可能参与机体免疫防御过程。当机体 ROS 水平升高而抗氧化剂含量却较低时,氧化应激反应就会发生^[19]。研究检测抗氧化相关指标发现 QI 及其与 EA 的联合干预可较好降低免疫抑制小鼠脾脏组织的 ROS、MDA 等含量,同时提高 SOD、CAT 水平,降低细胞中脂质过氧化物对细胞造成损伤的同时提高机体的抗氧化能力。

Nrf2 是调节氧化应激的转录因子,在正常脾脏组织中含量丰富。正常情况下, Nrf2 与 Keich 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keich-like epichlorohydrin related protein 1, Keap1) 偶联并处于未激活状态。当细胞受刺激处于氧化应激状态时, Nrf2

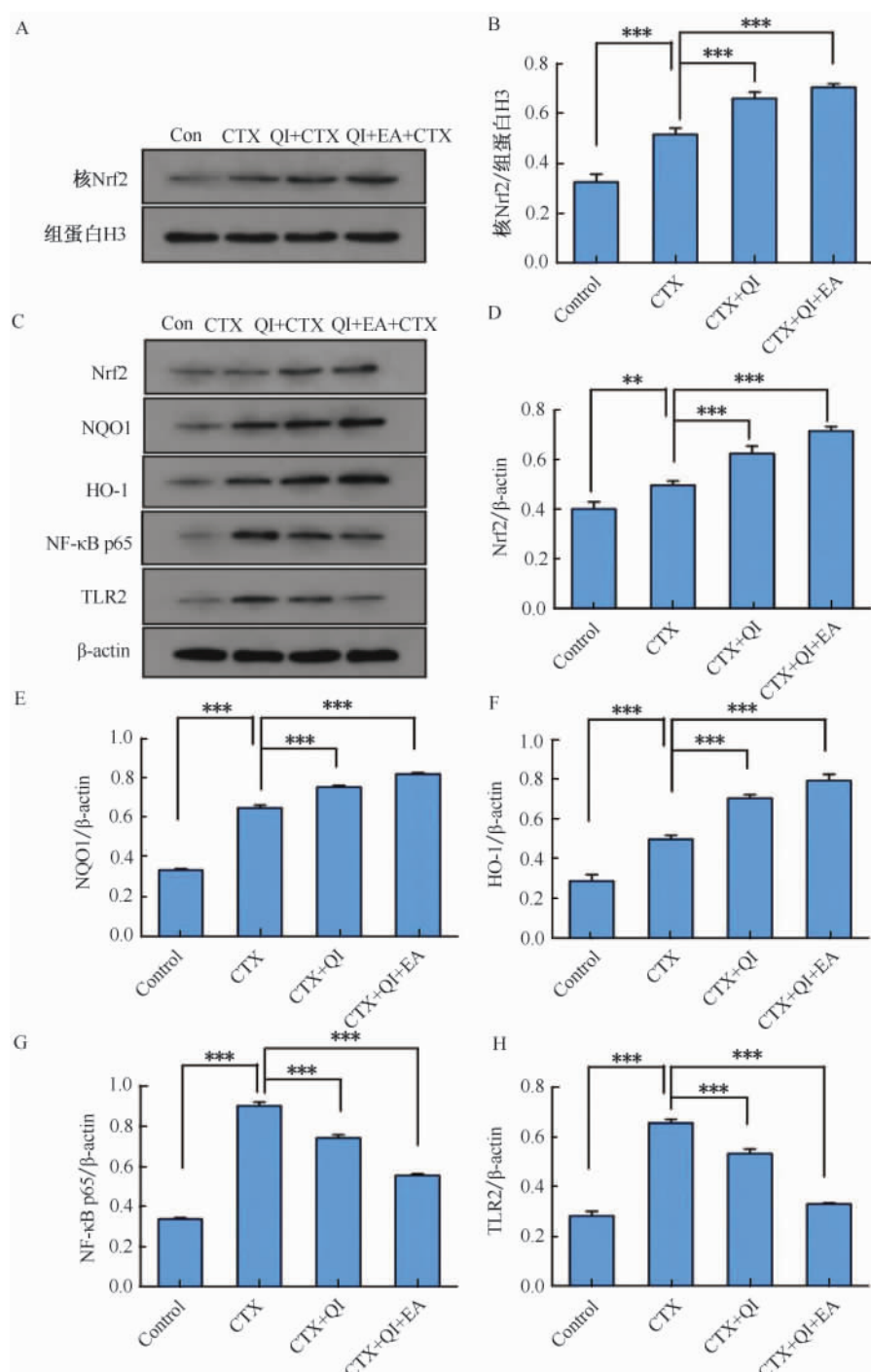


图5 Western blotting检测脾脏细胞核内Nrf2蛋白及总Nrf2、NQO1、HO-1、NF- κ B p65、TLR2蛋白表达水平

注：A. 核Nrf2蛋白条带结果；B. 核Nrf2蛋白表达水平统计结果；C. 总Nrf2、NQO1、HO-1、NF- κ B p65及TLR2蛋白条带结果；D、E、F、G、H图分别为总Nrf2、NQO1、HO-1、NF- κ B p65及TLR2蛋白表达水平的统计结果。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.0001$

被磷酸化从而与Keap1解偶连后转入细胞核内，启动抗氧化元件(antioxidant response element, ARE)调控的保护性基因的转录及表达，主要包括HO-1及NQO1等，从而提高细胞抗氧化应激能力^[20-21]。Nrf2还具有抑炎作用，可降低包括NF-

κ B在内的一系列炎症因子的表达^[21]。NF- κ B亦是氧化应激敏感的核转录因子之一，可参与调控氧化应激反应，也调控一些免疫细胞中TLR的表达及促炎因子产生。研究表明TLR2的表达依赖于NF- κ B的表达情况^[22]。因此，本研究检测抗氧化应激

Nrf2/ARE 通路相关的关键蛋白 Nrf2、HO-1、NQO1 以及 NF- κ B p65、TLR2 的表达情况。结果显示, QI 可有效提高 Nrf2 总蛋白及核蛋白的表达; 上调总 NQO1、HO-1 蛋白水平的同时下调 NF- κ B p65、TLR2 的表达, 与 Pall ML 等的报道相符^[21]。进一步联合 EA 疗法可加强 QI 的效果。上述结果表明 QI 及其联合 EA 刺激疗法能诱导免疫抑制小鼠脾脏的 Nrf2 及其下游靶蛋白 NQO1、HO-1 的表达, 同时抑制 NF- κ B p65、TLR2 蛋白的表达, 并促进 IgG、IgM、IL-2 及 IL-4 的表达从而起到保护并增强机体免疫力的作用。

综上所述, QI 及其联合 EA 对 CTX 所致免疫抑制小鼠的免疫功能有保护作用, 其可能和抗氧化应激 Nrf2/ARE 通路的激活有关。

参考文献

- [1] 张艳丽, 薛贵平. 鱼腥草的临床疗效分析[J]. 张家口医学院学报, 2002, 19(3): 57-57.
- [2] 肖梅, 周翔, 何国庆, 等. 高效液相色谱法测定乌药叶中槲皮苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 247-249.
- [3] 王煜, 李芹, 王玉海, 等. 金线莲液在改善环磷酰胺致免疫抑制小鼠免疫功能中的作用研究[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(22): 3293-3295.
- [4] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.
- [5] 朱学鑫, 蒋福升, 丁志山. 槲皮苷生物活性的研究进展[J]. 蛇志, 2012, 24(1): 47-50.
- [6] 刘晓岩, 王莹, 李廷利. 熊果酸与槲皮苷镇静催眠作用对 NO, IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 162-165.
- [7] 陈建雄, 刘昌盛, 何颖, 等. 电针疗法对慢性阻塞性肺疾病肌营养不良模型大鼠膈肌功能的调节机制[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(2): 265-271.
- [8] 傅勤慧, 裴建, 尤晓欣, 等. 辨阴阳经证电针疗法对社区中风偏瘫患者影响的多中心临床转化应用研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, (10): 45-49.
- [9] 刘佩蓉, 韩振祥, 张瑜, 等. 电针对老年髋关节置换术患者免疫功能、肾上腺应激和认知功能的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(8): 95-98.
- [10] 龙漫, 高义森, 陈泽斌, 等. 电针足三里对迟发型过敏反应小鼠炎症反应的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, (4): 20-23.
- [11] 张雪, 万茜, 徐天舒. 麦粒灸对 Lewis 肺癌小鼠炎性微环境中白介素-6 及信号转导蛋白和转录激活因子 3 的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(3): 235-239.
- [12] Li W, Li H, Zhang M, *et al.* Quercitrin ameliorates the development of systemic lupus erythematosus-like disease in a chronic graft-versus-host murine model[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(1): 217-226.
- [13] 杨春青, 薛庆节, 白波. 巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬与免疫调节[J]. 现代免疫学, 2017, 37(4): 350-353.
- [14] Liberman AC, Refojo D, Arzt E. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003, 51(6): 351-365.
- [15] Kojima K, Maruyama K, Inaba T, *et al.* The CD4/CD8 ratio in vitreous fluid is of high diagnostic value in sarcoidosis[J]. Ophthalmology, 2012, 119(11): 2386-2392.
- [16] 刘畅, 王红艳. CD8⁺ T 细胞活化与分化的分子机制[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 481-487.
- [17] Turk JL, Poulter LW. Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide[J]. Clin Exp Immunol, 1972, 10(2): 285-296.
- [18] Poulter LW, Turk JL. Proportional increase in the theta carrying lymphocytes in peripheral lymphoid tissue following treatment with cyclophosphamide[J]. Nat New Biol, 1972, 238(79): 17-18.
- [19] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Curr Biol, 2014, 24(10): R453-R462.
- [20] 王宁, 马慧萍, 漆欣筑, 等. Nrf2-ARE 信号通路在机体氧化应激损伤防护中的研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(12): 21-27.
- [21] Pall ML, Levine S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors[J]. Sheng Li Xue Bao, 2015, 67(1): 1-18.
- [22] Phulwani NK, Esen N, Syed MM, *et al.* TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF- α and NF- κ B dependent pathways[J]. J Immunol, 2008, 181(6): 3841-3849.

Effects of quercitrin combined with electroacupuncture therapy on immune function and antioxidant ability in immunosuppressive mice

CHEN Yun-long, ZHOU Yan-yan, CHEN Hui-min, XU An-li, XU Jian-min, ZHAO Min (*Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China*)

Abstract: To investigate the effect of quercitrin combined with electroacupuncture on immune function of immunosuppressed mice, mice were randomly divided into control group, cyclophosphamide model group, quercitrin group and quercitrin+electroacupuncture group. Immunosuppressive mice model were established by CTX, and from the next day, each group was given saline, quercitrin by gavage and quercitrin by gavage combined with electroacupuncture stimulation respectively for 14 days. After the treatment, indexes of thymus and spleen were measured by weighing method; spleen tissue was observed by HE staining; macrophage phagocytosis percentage and phagocytosis index were measured by Giemsa staining; ELISA was used to test mice serum IgG, IgM, IL-2, IL-4, SOD, MDA, CAT; FACS was used to test spleen CD4⁺, CD8⁺ T cell percentages and ROS levels; Western blotting was used to quantify spleen Nrf2, NQO1, HO-1, NF- κ B p65 and TLR2. The results showed that the indexes of the thymus and the spleen, macrophage phagocytosis percentage and phagocytosis index, IgG, IgM, IL-2, IL-4, SOD, CAT, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes in CTX group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$), while the levels of immune organ tissue injury, MDA, ROS and Nrf2, NQO1, HO-1, NF- κ B p65, TLR2 were significantly higher than those in control group ($P < 0.0001$). Compared with CTX group, immune function related indexes, the levels of SOD, CAT, Nrf2, NQO1 and HO-1 protein in quercitrin group were significantly higher ($P < 0.05$), while the degree of spleen tissue injury, the levels of MDA, ROS, Nrf2, NQO1, HO-1, NF- κ B p65 and TLR2 protein were significantly lower ($P < 0.05$). The above effects of quercitrin could be further enhanced by combined electroacupuncture therapy ($P < 0.0001$). Therefore, electroacupuncture combined with quercitrin has immunoprotective effect on immunosuppressed mice. It can improve the immune function of the immunosuppressive mice by improving the function of immune organs and enhancement of antioxidant levels. The possible mechanism may be through the activation of the Nrf2/ARE pathway of antioxidant stress, thereby enhancing immunity.

Key words: electroacupuncture; quercitrin; cyclophosphamide; immunosuppression