

茯砖茶水提物对大肠杆菌感染小鼠的免疫调节作用

刘平¹, 李宗军^{1,2*}, 许爱清^{1,3}

(1. 湖南农业大学 食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术中心功能食品分中心, 湖南 长沙 410128; 3. 湖南科技大学 生命科学学院, 湖南 湘潭 411201)

摘 要: 以肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染的小鼠为模型, 研究造模后按茯砖茶水提物剂量 1、10、20 g/(kg·d)(分别记为低、中、高剂量茶汁组) 连续灌胃 10 d 后模型小鼠免疫功能的变化。结果表明, 模型组和对照组的吞噬系数、血清溶血素水平和肠道黏膜上 CD4⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞数均有显著性差异; 中剂量茶汁组小鼠胸腺指数和高剂量茶汁组小鼠血清溶血素水平均极显著高于模型组小鼠($P < 0.01$), 中剂量茶汁组小鼠血清溶血素水平和高剂量茶汁组小鼠胸腺指数以及中、高剂量茶汁组小鼠肠道黏膜上 CD4⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞数均显著高于模型组小鼠($P < 0.05$); 中、高剂量茶汁组小鼠的吞噬系数极显著高于模型组小鼠($P < 0.01$), 低剂量茶汁组小鼠的吞噬系数显著高于模型组小鼠($P < 0.05$)。

关 键 词: 小鼠; 茯砖茶水提物; 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; 免疫功能

中图分类号: R392.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)05-0537-03

Immunological effect of water extract from Fuzhuan brick-tea on mice infected with *Escherichia coli*

LIU Ping¹, LI Zong-jun^{1,2*}, XU Ai-qing^{1,3}

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha 410128, China; 3.College of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: Aimed to investigate the effect of water extract from Fuzhuan brick-tea on the immune functions of mice, one hundred and ninety mice were divided into 5 groups: control group, model group in which the mice were infected with *Escherichia coli* O157:H7, low dosage group, moderate dosage group and high dosage group in which mice were treated with low, moderate and high dosage of water extract from Fuzhuan brick-tea respectively for consecutive 10 d. Results demonstrated that there is remarkable difference in the phagocytic index, the serum hemolysin titers and the number of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in intestinal mucosa between control and model group. Compared with model group, the thymus index in moderate group and serum hemolysin titers in high dosage group are significantly higher ($P < 0.01$); the serum hemolysin titers in moderate group and the thymus index in high dosage group and the number of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in intestinal mucosa in moderate and high dosage groups increased significantly ($P < 0.05$); the phagocytic index increased significantly in low ($P < 0.05$), moderate and high ($P < 0.01$) dosage groups.

Key words: mouse; water extract from Fuzhuan brick-tea; *Escherichia coli* O157:H7; immune function

收稿日期: 2011-05-17

基金项目: 湖南省重大科技专项(2008FJ1005)

作者简介: 刘平(1981—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究; *通信作者, lizongjun@yahoo.com.cn

茯砖是一种砖形蒸压黑茶。目前,对茯砖茶功能的研究主要集中在减肥、降血脂方面^[1],而关于其对免疫系统影响的研究较少。笔者以细菌感染小鼠为模型,研究茯砖茶水提物对模型小鼠免疫功能的影响。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物

昆明种 SPF 小鼠 190 只,雌、雄各半,体质量(20±2) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号码为 SCXX(湘)2009-0004。鼠颗粒饲料由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。供试小鼠均饲养在湖南农业大学动物科学院标准动物房,适应性饲养 3 d 后开始试验。

1.1.2 茯砖茶水提物

金湘益茯砖茶由湖南益阳茶厂提供。取 100 g 茯砖茶敲碎,浸泡于 400 mL 蒸馏水中,搅拌,煮沸 15 min,静置冷却 1 h,过滤后定容至 100 mL,制成高剂量茶汁(1 g/mL),再分别用无菌生理盐水稀释至中剂量(0.5 g/mL)、低剂量(0.05 g/mL)茶汁,备用。

1.1.3 攻毒菌液

Escherichia coli O157:H7(21530)菌种购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。活化后接种 2 mL 菌悬液到 100 mL 液体培养基,37℃摇床培养 18 h。将培养好的菌液离心,用无菌生理盐水洗涤 3 次,收集菌体,加适量无菌生理盐水,据预试验结果以 $OD_{600\text{ nm}}$ 1.0 的菌液作为攻毒菌液。

1.1.4 主要试剂

主要试剂:*E. coli* O157:H7 检测试剂盒;绵羊血;印度墨汁;兔抗小鼠 CD4 和 CD8 单克隆抗体(Epitomics);Envision 二步法通用型抗小鼠免疫组化试剂盒和 DAB 显色剂试剂盒(Novocastra)。

1.2 方法

将 190 只昆明小鼠适应性饲养 3 d 后随机分成 5

组:对照组(A组)、模型组(B组)、低剂量茶汁组(1 g/(kg·d),C组)、中剂量茶汁组(10 g/(kg·d),D组)、高剂量茶汁组(20 g/(kg·d),E组)。以体质量 60 kg 的成人日消耗茯砖茶不超过 8 g 的推荐量计算,C、D、E 组的剂量分别相当于人类推荐量的 1、10、20 倍。分别给低、中、高剂量组小鼠灌胃相应剂量茶汁 3 d 后,将此 3 组和模型组小鼠灌胃 *E. coli* O157:H7 菌液造模,造模方法参照文献[2],并根据预试验结果,选取能使小鼠感染 *E. coli* O157:H7 但不致死的剂量为攻毒菌液。攻毒途径为经口灌胃。每只小鼠灌胃 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.0 的菌液 0.4 mL。攻毒后 3 h 于无菌条件下取各组小鼠粪便标本,用 *E. coli* O157 试剂盒检测粪便中的 *E. coli* O157。模型复制后,每天定时一次性给低、中、高剂量组小鼠灌胃相应剂量茶汁,给模型组灌胃生理盐水,灌胃量均为每只小鼠 0.4 mL。对照组不做任何处理。试验期间各组小鼠自由饮水和采食,连续 10 d 后处死。

1.2.1 测定指标及方法

1) 非特异性免疫功能指标的测定。免疫器官指数测定:于每组各取 10 只小鼠,用颈椎脱臼的方法将其处死后解剖,摘取脾脏和胸腺,称重,计算免疫器官指数。

免疫器官指数=免疫器官质量(mg)/体质量(g)。

单核-巨噬细胞吞噬功能^[3]检测:于每组各取 10 只小鼠,称重,按小鼠体质量的 0.1 mL/(10 g)剂量从尾静脉注入稀释 3~4 倍的印度墨汁。分别于 2、10 min(分别记为 t_1 , t_2)后从内眦静脉丛取血 20 μ L,加到 2 mL 0.1%Na₂CO₃ 溶液中,测定光密度值 $OD_{600\text{ nm}}$ (分别记为 D_1 , D_2)。将采血后小鼠处死,分别称其肝质量和脾质量,计算廓清指数和吞噬系数。

廓清指数=($\log D_1 - \log D_2$)/($t_2 - t_1$)。

吞噬系数=(体质量/肝脾总质量)×廓清指数^{1/3}。

2) 体液免疫功能检测。血清溶血素测定^[3]:取绵羊血离心后,得压积绵羊红细胞(SRBC),并配成 2%的细胞悬液。造模后 6 d,于各组随机选 10 只小鼠,在每只小鼠的腹腔注射 0.2 mL SRBC 悬液进行

免疫。4 d 后摘除小鼠的眼球，采血。用生理盐水将血清倍比稀释，将不同稀释度的血清分别置于微量血凝试验板内，每孔 100 μL ，再加入 100 μL 0.5% 的 SRBC 悬液，混匀，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 3 h，观察血球凝集程度。

3) 肠道局部免疫功能检测。用免疫组化方法显示肠黏膜上 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 细胞和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 细胞抗原分子的表达并计数。于各组各取 10 只小鼠处死后，将其十二指肠、回肠、结肠组织固定于 10% 的甲醛溶液中，脱水，用常规石蜡包埋、切片，脱蜡至水。将切片置于 0.3% H_2O_2 液中 15 min。加入相应一抗于湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。滴加二抗，室温孵育 1 h，用 DAB 显色，苏木素复染，中性树胶封片。以 PBS 代替一抗，用相同方法做对照试验。在光学显微镜下，在每只小鼠的十二指肠、回肠、结肠各取 4 个区域，统计 4 个高倍镜视野下肠黏膜上 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 细胞和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 细胞的数目。

1.3 数据处理

用 Excel 2003 和 SPSS 11.5 软件对试验数据进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠的临床表现

试验期间，A 组(对照组)小鼠活泼好动，毛色正常，抓尾反抗力强，无明显临床症状；B~E 组小鼠都存在毛发蓬松、活动减少、抓尾反抗力弱等现象。经检测，B~E 组小鼠粪便的 *E. coli* O157:H7 阳性率为 100%，A 组小鼠均为阴性，表明造模成功。在攻毒 3 d 后，C~E 组小鼠的临床症状有不同程度改善，小鼠毛色渐趋正常，活动增多，抓尾反抗力增强。

2.2 小鼠的免疫器官指数和碳廓清试验结果

由表 1 可见，茶汁中、高剂量组胸腺指数均显著高于模型组($P < 0.05$)，且中剂量组与模型组差异极显著($P < 0.01$)。脾指数各组差异不显著。

表 1 各组小鼠的免疫器官指数

Table1 Immune organ indexes of in mice

组别	胸腺指数	脾指数
对照组	2.75±0.39	3.67±0.97
模型组	(2.47±0.87)aA	3.69±0.91
茶汁低剂量组	(2.99±0.89)a	4.02±0.75
茶汁中剂量组	(3.38±0.76)bB	3.96±0.85
茶汁高剂量组	(3.16±0.64)b	3.80±0.79

碳廓清试验结果显示，模型组、对照组的吞噬系数分别为 3.93、5.07，二者差异极显著($P < 0.01$)；茶汁低剂量组吞噬系数为 4.92，与模型组差异显著($P < 0.05$)，中、高剂量组吞噬系数分别为 5.31、5.27，均与模型组差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 小鼠的血清溶血素试验结果

试验结果显示，模型组、对照组小鼠的血清溶血素抗体积数分别为 37.2、44.6，二者差异显著($P < 0.05$)；茶汁中剂量组血清溶血素抗体积数为 45.5，显著高于模型组($P < 0.05$)；高剂量组血清溶血素抗体积数为 46.7，极显著高于模型组($P < 0.01$)。

2.4 小鼠肠道黏膜上 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 细胞的表达

免疫组织化学法显示，在小鼠的十二指肠、回肠、结肠均有 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞的表达。 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞主要位于肠黏膜固有层，上皮内也有少量。 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞主要位于肠黏膜上皮细胞基层，在肠黏膜固有层也有表达。模型组 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞的数量显著低于对照组($P < 0.05$)。茶汁中、高剂量组的细胞数目显著高于模型组($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠的 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 和 $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 淋巴细胞

Table 2 CD4^{+} and CD8^{+} T-lymphocytes in mice

组别	$\text{CD4}^{+}\text{T}$ 细胞数	$\text{CD8}^{+}\text{T}$ 细胞数
对照组	(203.50±28.32)a	(144.80±23.93)a
模型组	(167.00±35.00)b	(117.10±22.69)b
茶汁低剂量组	(186.30±34.70)a	(133.30±24.49)a
茶汁中剂量组	(211.90±50.49)a	(150.20±39.54)a
茶汁高剂量组	(206.60±40.48)a	(145.90±31.67)a

3 结论与讨论

本研究结果表明：茯砖茶能提高小鼠的免疫功能
(下转第 566 页)