

◇ 药学研究 ◇

橙皮苷衍生物 Y-12 对免疫低下小鼠免疫功能的影响

李小枫, 李俊, 黄成, 田远耀, 石静波, 王欠欠, 胡婷婷

摘要 目的 研究橙皮苷衍生物 Y-12 (HY-12) 对免疫低下小鼠的免疫功能的影响。方法 以连续 2 d 腹腔注射给药环磷酸胺 (50 mg/kg), 建立小鼠免疫低下模型, 同时分别用 IgG 和 IgM 测量试验、巨噬细胞吞噬碳试验和迟发性超敏反应, 观测 HY-12 不同浓度对免疫低下小鼠免疫系统的影响。结果 巨噬细胞吞噬碳试验中, 环磷酸胺诱免疫低下模型小鼠的廓清指数 (K) 和巨噬细胞的吞噬指数 (α) 能被 HY-12 (100、200、400 mg/kg) 组增加; 溶血素试验中, HY-12 (200、400 mg/kg) 组不仅能增多免疫低下模型小鼠血清中 IgG 和 IgM, 同时脾细胞溶血素也被增多; HY-12 (200、400 mg/kg) 组可明显有助于免疫低下模型小鼠 DTH 反应; 并能提高脾

淋巴细胞 IL-22 含量; HY-12 (100、200、400 mg/kg) 能提高 CD4⁺、CD8⁺ 细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值。结论 HY-12 能普遍增强模型小鼠的免疫系统反应, 对免疫低下模型小鼠的免疫功能有很好的提高作用。

关键词 5'-硝基乙酰化橙皮苷; 体液免疫; 非特异性免疫; 细胞免疫; 环磷酸胺

中图分类号 R 285.5; R 392.5; R 965; R 967; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1413-05

橙皮苷 (hesperidin, HDN) 是黄酮类化合物的一种, 来源广泛, 特别是柑桔属植物中含量较多。已经证实 HDN 对炎症和病痛^[1-2] 和肿瘤生长^[3] 都有很好的抑制作用。李荣等^[4] 还发现其对继发性炎症有良好的治疗作用。但是, 影响其在医药领域应用狭小的主要原因是 HDN 水溶性和生物利用度较低^[4-6]。为此, 通过化学修饰的方法改变 HDN 的水溶性和生物利用度, 从而为 HDN 的应用提供依据。该课题组前期从陈皮中纯化出 HDN, 并做了一系列不同的基团修饰来提高水溶性和生物利用度并得到

2014-05-30 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 1206C0805026)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 安徽省天然药物活性研究重点实验室, 安徽省天然药物活性成分工程技术研究中心, 合肥 230032

作者简介: 李小枫, 男, 硕士研究生;

李俊, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

Analysis of VOCs in the headspace of SHI-1 acute mononuclear leukemia cell

Wang Juan, Xia Hailong

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To find out the impact of SHI-1 cells on VOCs in the headspace, and to assess the feasibility of VOCs analysis in leukemia patients or with other tumors in the differential diagnosis by determining VOCs in the headspace of acute mononuclear leukemia cells (SHI-1). **Methods** The air samples from the headspace of SHI-1, Human macrophages cells and medium control were collected by syringes, and then determined by means of solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in order to have a better understanding of the concentration distributions and changes of VOCs in SHI-1 cells' headspace. **Results** Using Mann-Whitney U test, we found that eight kinds of VOCs were different among them. They were 2,4-dimethyl heptanes, 4-methyl octane, chloroform, benzene, 3,7-dimethyl dodecanese, hexanol, cyclohexanol, cetane. And alkane, benzene were significantly higher than the control group ($P < 0.05$), alcohol decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** SHI-1 cells have an impact on the concentration distributions of VOCs in their headspace. The most outstanding VOCs are alkanes, alcohol and benzene compared with the blank control group. They may be potential markers characteristic of leukemia cells.

Key words acute mononuclear leukemia cells SHI-1; tumors; VOCs; SPME-GC/MS

了各种不同 HDN 衍生物,通过 RAW164.7 细胞的筛选,发现橙皮苷衍生物 Y-12 (hesperidin Y-12, HY-12) 具有较强抗炎活性。对此,该研究将探讨 HY-12 对免疫低下模型小鼠免疫功能的影响,为进一步研究和应用 HY-12 提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物 豚鼠, (300 ± 20) g, ♂; 昆明种小鼠, (20 ± 2) g, ♂ ♀ 各半; BALB/c 小鼠, (18 ± 2) g, ♂ ♀ 各半; 以上动物均由安徽省实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 HY-12 与 HDN 均由安徽医科大学药学院石静波合成并测定含量 (>99%), 使用时用 0.5% 羧甲基纤维素钠配成混悬液。盐酸左旋咪唑片, 山东仁和堂药业有限公司, 批号: 120507; 注射用环磷酰胺, 德国 Baxter Oncology GmbH 公司, 批号: 3A686A; 印度墨水, 北京索莱宝科技有限公司; 绵羊红细胞 (sensitization red blood cell, SRBC), 郑州百基生物科技有限公司; 2,4-二硝基氟苯, 西亚试剂公司, 批号: Z8925; FITC-CD4-Ab 和 PE-CD8-Ab, 北京博奥森生物技术有限公司; 羊抗鼠 IgG, 北京中杉金桥生物技术有限公司; IL-22 试剂盒, 北京康为世纪生物技术有限公司; Con A, 美国 Sigma 公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; DMEM 高糖培养基, 美国 Hyclone 公司。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪, 荷兰雷勃公司产品; SW-CJ-1F 型超净工作台, 江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品; NAPCO-6100 型细胞培养箱, 美国杜邦公司产品; 分光光度计 722S, 上海精密科学仪器有限公司产品; COULTZER EPICS XL-MCL 流式细胞仪, 美国 Beckman Counter 公司产品。

1.4 方法

1.4.1 制备免疫低下小鼠模型 每组每天腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg, 除正常组外, 连续 2 d。

1.4.2 HY-12 对免疫器官的影响 昆明种小鼠 70 只, ♂ ♀ 各半, 随机分为正常组、模型组、HY-12 (100、200、400 mg/kg) 组和阳性药 (HDN 120 mg/kg, 盐酸左旋咪唑片 30 mg/kg) 组, 共 7 组。小鼠每天灌胃给药 1 次, 连续 7 d, 而正常组和模型组给予相应的羧甲基纤维素钠。第 7 天称取小鼠体重、脾脏和胸腺。脾脏和胸腺指数分别用脾重 (mg) / 体重 (10 g) 与胸腺重 (mg) / 体重 (10 g) 表示。

1.4.3 HY-12 对巨噬细胞吞噬功能影响^[7] 分组和给药方法同 1.4.2。第 7 天, 小鼠尾静脉注入

50% 的印度墨汁 (0.10 ml/10 g), 在第 2 min (T1) 和第 10 min (T2) 分别采用眼眶取血法取血, 并用 0.1% NaHCO₃ 溶液稀释成 100 倍。使用 722 分光光度计测 OD 值 (600 nm)。另外称取小鼠肝、脾重量和体重, 按下列公式计算出碳廓清指数 (K) 与吞噬指数 (α)。

$$K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (T_2 - T_1)$$

$$\alpha = 3 \sqrt{K} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

1.4.4 HY-12 对机体体液免疫功能的影响^[7-8]

1.4.4.1 HY-12 对免疫低下小鼠血清中 IgM 的影响 昆明种小鼠 70 只, ♂ ♀ 各半, 分组同 1.4.2。小鼠每天灌胃给药 1 次, 连续 7 d, 而正常组和模型组给予相应羧甲基纤维素钠。第 3 天给腹腔注射 10% 的 SRBC 0.1 ml/10 g 进行致敏。给药第 7 天, 每组小鼠眼眶取血。取稀释 800 倍后的血清 0.5 ml, 分别加入 10% SRBC、1:10 豚鼠血清和生理盐水 0.5 ml, 空白管采用生理盐水替代豚鼠血清, 37 °C 孵育 1 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min, 使用 722 分光光度计测上清液 OD 值 (540 nm)。

1.4.4.2 HY-12 对脾溶血素生成的影响 分组及致敏同 1.4.4.1。给药第 7 天, 每组小鼠取脾并用 Gey's 红细胞裂解液制作脾细胞悬液 (5 × 10⁹ /L), 取脾细胞悬液 0.5 ml, 并分别加入现配的 0.2% SRBC 和 1:10 豚鼠血清 0.5 ml, 空白管采用生理盐水替代豚鼠血清。37 °C 孵育 1 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min, 使用 722 分光光度计测上清液 OD 值 (413 nm)。

1.4.4.3 HY-12 对血清中 IgG 的影响 分组及致敏同 1.4.4.1。给药第 7 天, 用 10% 的 SRBC 0.1 ml/10 g 再次致敏, 第 8 天每鼠眼眶取血。取血清和等量 2-巯基乙醇 37 °C 孵育 30 min 后稀释 800 倍。取处理后血清 0.5 ml, 分别加入 5% 的 SRBC、羊抗小鼠 IgG、1:10 豚鼠血清各 0.5 ml, 空白管采用生理盐水替代豚鼠血清。37 °C 孵育 1 h 后, 离心 (3 000 r/min) 5 min, 使用 722 分光光度计测上清液 OD 值 (540 nm)。

溶血素含量 (hemolysin concentration, HC) 计算:

$$HC_{IgM} = \text{样本稀释血清的 OD 值} \times \text{稀释倍数}$$

$$HC_{IgG} = 2\text{-巯基乙醇处理样本血清的 OD 值} \times \text{稀释倍数}$$

1.4.5 HY-12 对迟发型超敏反应 (delayed type hypersensitivity, DTH) 小鼠的影响^[7,9] BALB/c 小鼠 70 只, ♀、♂ 各半, 随机分为正常组、模型组、HY-12

(100、200、400 mg/kg) 组和阳性药 (HDN 120 mg/kg 盐酸左旋咪唑片 30 mg/kg) 组。给药组每天灌胃给药 1 次, 连续 9 d。第 3 天 除对照组外, 每鼠腹部给予诱敏, 涂 1% 的 2,4-二硝基氟苯丙酮麻油溶液 (50 μl/只) 来诱敏 (范围 3 cm × 3 cm), 同时腹腔注射 50 mg/kg 环磷酰胺, 连续 2 d。第 8 天, 每组小鼠右耳 (两面) 涂抹 1% DNFB 溶液。24 h 后称取打孔器 (直径 9 mm) 打下的圆耳片重量。左右耳片之差 (Δmg) 作为肿胀度。

1.4.5.1 HY-12 对 DTH 小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的影响 分组及给药方法同 1.4.5。第 9 天处死小鼠并制备脾细胞悬液并裂解红细胞, 取脾细胞悬液 (5 × 10⁸ ~ 5 × 10⁹ /L) 10 μl 和 PBS 1 ml 混匀, 并离心 (1 000 r/min) 5 min 去上清液。每管分别加入 FITC-CD4⁺ Ab 与 PE-CD8⁺ Ab 各 10 μl 混匀, 避光孵育 30 min 后, 流式细胞仪测定 CD4⁺ 和 CD8⁺ 数。

1.4.5.2 HY-12 对 DTH 小鼠的脾细胞 IL-22 生成的影响 分组及给药方法同 1.4.5。第 9 天处死小鼠并用 10% 的胎牛血清制备脾细胞悬液, 在 24 孔培养板中每孔分别加脾细胞悬液 (5 × 10⁹ /L) 和 ConA (5 mg/L) 各 0.5 ml, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 离心并收集上清液, 按 ELISA 试剂盒按说明书方法进行 IL-22 测定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, 所有检验均为双侧检验。

2 结果

2.1 HY-12 对免疫器官的影响 与模型组比较, HY-12 (200、400 mg/kg) 组可提高免疫低下小鼠的脾脏和胸腺指数 (脾脏指数: $F = 19.30$; 胸腺指数: $F = 13.19$)。见表 1。

表 1 HY-12 对免疫低下小鼠免疫器官的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	脾脏指数	胸腺指数
正常	-	5.48 ± 1.14	4.92 ± 1.20
模型	-	2.90 ± 0.93**	2.83 ± 0.74**
HY-12	100	3.11 ± 1.31	2.98 ± 0.97
	200	3.59 ± 0.75 [#]	3.46 ± 0.82 [#]
	400	3.91 ± 1.03 ^{##}	3.71 ± 0.91 ^{##}
HDN	120	3.40 ± 0.80 [#]	3.42 ± 0.84 [#]
盐酸左旋咪唑片	30	4.00 ± 0.97 ^{##}	3.86 ± 1.03 ^{##}

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.2 HY-12 对巨噬细胞吞噬功能的影响 与模型

组比较, HY-12 (100、200、400 mg/kg) 组可提高环磷酰胺致免疫低下小鼠的 α 值和 K 值, 提高免疫低下小鼠的巨噬细胞吞噬功能 ($F_K = 14.51$; $F_\alpha = 19.37$)。见表 2。

表 2 HY-12 对免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	K (× 10 ⁻²) 值	α 值
正常	-	4.80 ± 0.92	6.58 ± 1.01
模型	-	2.28 ± 0.83**	4.39 ± 0.84**
HY-12	100	2.93 ± 1.03 [#]	4.91 ± 0.72 [#]
	200	3.49 ± 0.83 ^{##}	5.53 ± 0.68 ^{##}
	400	3.76 ± 1.02 ^{##}	5.98 ± 0.96 ^{##}
HDN	120	3.39 ± 0.82 ^{##}	5.42 ± 0.94 ^{##}
盐酸左旋咪唑片	30	3.81 ± 0.97 ^{##}	6.16 ± 1.01 ^{##}

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.3 HY-12 对血清中 IgM、IgG 与脾细胞溶血素的影响 与模型组比较, HY-12 (200、400 mg/kg) 组可增加免疫低下模型小鼠中 IgM 和 IgG 水平; 同时, 脾细胞中溶血素也被增加 (HC_{IgM} : $F = 21.29$; HC_{IgG} : $F = 26.38$; 脾溶血素空斑数: $F = 11.56$)。见表 3。

表 3 HY-12 对血清中 IgM、IgG 与脾细胞溶血素的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	HC_{IgM}	HC_{IgG}	溶血空斑数/ 5 × 10 ⁶
正常	-	49.93 ± 3.65	90.24 ± 6.48	0.56 ± 0.05
模型	-	30.83 ± 3.94**	54.38 ± 5.42**	0.32 ± 0.03**
HY-12	100	32.37 ± 3.41	50.93 ± 5.88	0.38 ± 0.03
	200	35.93 ± 2.92 [#]	65.84 ± 4.39 [#]	0.40 ± 0.04 [#]
	400	41.28 ± 3.47 ^{##}	80.59 ± 4.75 ^{##}	0.45 ± 0.03 ^{##}
HDN	120	36.15 ± 3.25 [#]	68.30 ± 5.31 [#]	0.41 ± 0.02 ^{##}
盐酸左旋咪唑片	30	42.84 ± 3.42 ^{##}	80.01 ± 4.23 ^{##}	0.48 ± 0.02 ^{##}

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.4 HY-12 对 DTH 小鼠反应的影响 与正常组比较, 环磷酰胺模型组小鼠耳炎症肿胀程度得到减轻; 与模型组比较, HY-12 (200、400 mg/kg) 组可促进免疫低下小鼠 DTH 反应 ($F = 12.79$)。见表 4。

2.5 HY-12 对 DTH 小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 的影响 与正常组比较, 环磷酰胺模型组小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 水平以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值降低; 与模型组比较, HY-12 (100、200、400 mg/kg) 组能明显提升 CD4⁺、CD8⁺ 细胞数以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值 (CD4⁺: $F = 29.67$; CD8⁺: $F = 25.89$; CD4⁺/CD8⁺: $F = 1.15$)。见表 5。

表4 HY-12对DTH小鼠反应的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	肿胀度 (Δ mg)
正常	-	3.01 ± 0.32
模型	-	1.52 ± 0.33**
HY-12	100	1.88 ± 0.49
	200	2.37 ± 0.41 [#]
	400	2.81 ± 0.21 ^{##}
HDN	120	2.35 ± 0.38 [#]
盐酸左旋咪唑片	30	2.82 ± 0.29 ^{##}

与正常组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

表5 HY-12对DTH小鼠CD4⁺和CD8⁺的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	41.38 ± 5.38	25.31 ± 1.29	1.63 ± 0.42
模型	-	19.51 ± 4.96**	13.06 ± 1.84**	1.49 ± 0.27**
HY-12	100	28.23 ± 4.02 [#]	18.17 ± 1.33 [#]	1.55 ± 0.30 [#]
	200	31.57 ± 3.99 ^{##}	19.95 ± 2.17 ^{##}	1.58 ± 0.18 ^{##}
	400	38.81 ± 5.91 ^{##}	23.07 ± 1.90 ^{##}	1.68 ± 0.31 ^{##}
HDN	120	30.90 ± 4.75 [#]	19.26 ± 1.74 [#]	1.60 ± 0.27 ^{##}
盐酸左旋咪唑片	30	37.16 ± 5.38 ^{##}	22.17 ± 2.04 ^{##}	1.67 ± 0.26 ^{##}

与正常组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

2.6 HY-12对DTH小鼠的脾细胞IL-22的影响
与模型组比较, HY-12 (200、400 mg/kg) 组能明显促进免疫低下小鼠脾细胞生成IL-22水平。见表6。

表6 HY-12对DTH小鼠的脾细胞IL-22的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/kg)	IL-22 (μ g/L)
正常	-	1.85 ± 0.21
模型	-	0.91 ± 0.13**
HY-12	100	1.22 ± 0.36
	200	1.46 ± 0.11 [#]
	400	1.66 ± 0.19 ^{##}
HDN	120	1.38 ± 0.16 [#]
盐酸左旋咪唑片	30	1.75 ± 0.17 ^{##}

与正常组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01

3 讨论

一般认为机体免疫功能包括非特异免疫、细胞免疫和体液免疫。目前, 研究药物对免疫功能的影响一般使用免疫低下模型小鼠^[7-9]。采用烷化类化合物环磷酰胺会引起小鼠免疫低下模型, 因其能够破坏机体的淋巴细胞, 机体免疫功能降低^[10]。一般通过免疫低下模型小鼠来研究药物对免疫功能的影响^[7-9]。胸腺脾脏指数被大家公认为是评价机体免疫系统功能的基本指标。胸腺是通过参与T淋巴

细胞的合成来影响细胞免疫反应, 而脾脏是通过B淋巴细胞为主的参与体液免疫。本研究显示免疫低下模型小鼠的免疫器官指数能够被HY-12提高, 表明环磷酰胺引起免疫低下模型小鼠胸腺和脾脏萎缩, 而HY-12有可能是通过恢复这些器官的萎缩来改善免疫功能。非特异免疫的指标是通过内质网系统中巨噬细胞的K、 α 衡量的^[9]。进一步研究显示, α 值及K值可以被HY-12低、中、高3个浓度升高, 从而改善巨噬细胞功能。表明HY-12可以恢复一定免疫低下小鼠模型的非特异性免疫功能。

体液免疫是通过脾细胞分泌的溶血素HC_{IgM}和HC_{IgG}来反应的, 因为其不仅仅反映合成抗体细胞数目, 还能显示其合成抗体的能力。本研究显示免疫低下模型小鼠血清中HC_{IgM}、HC_{IgG}及脾细胞溶血素水平都处于较低水平, 而HY-12中剂量(200 mg/kg)和高剂量(400 mg/kg)均可以增加以上水平, 提示HY-12能够增强模型的体液免疫功能, 增加机体抵抗病毒能力。另外, 常见的免疫反应还包括迟发型变态反应, 其是由一种T细胞引起的免疫超敏反应, 可以通过T细胞亚群的检测来判断其程度^[11]。通常是检测CD4⁺与CD8⁺数的水平以及两者的比值。HY-12中和高(200、400 mg/kg)剂量都能明显的增强免疫低下的小鼠DTH反应, 表明HY-12可以通过提升体内DTN反应来恢复免疫低下小鼠免疫功能。同时, 本课题组还进一步测量了小鼠脾细胞中T淋巴细胞亚群水平情况。CD4⁺与CD8⁺水平可以被HY-12低中高(100、200、400 mg/kg), 且两者比值也被提升, 由此表明HY-12能通过增加迟发型变态反应提升机体免疫功能。由此猜测, T淋巴细胞还有可能是HY-12免疫调节作用中的靶细胞之一, 并且有重要作用。众所周知, IL-22与T淋巴细胞的增殖和分化有着密切关系, 其能够促进机体产生各种抗体和细胞因子, 是免疫系统中重要的细胞因子之一^[12]。HY-12能提高免疫低下模型小鼠脾淋巴细胞生成IL-22的量, 表明HY-12还有可能是参与调节IL-22, 但其作用和机制还有待进一步研究。

本课题组前期还对HY-12在RAW164.7细胞进行研究(未发表), 发现HY-12能抑制脂多糖诱导的TNF- α 和IL-6表达, 说明HY-12具有较强的抗炎活性。这也和本研究相似, HY-12对增强小鼠的免疫系统可能与巨噬细胞有着密切的关系。

综上所述, HY-12能增强免疫功能低下模型小

鼠的免疫系统如非特异性、细胞和体液免疫,对将来进一步研究 HY-12 在肿瘤或抗炎的治疗上提供部分免疫功能理论依据,但其详细机制还不清楚。

参考文献

- [1] Ren D Y, Xu T, Li R, et al. 5,7,3'-Triacetyl hesperetin suppresses adjuvant-induced arthritis in rats through modulating JAK2/STAT3 pathway [J]. *Am J Chin Med* 2013, 41(3):601-14.
- [2] 秦 娣,李 俊,李 荣,等. 5,7,3'-三乙酰橙皮素在大鼠体内的药代动力学研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(8):940-3.
- [3] Nandakumar N, Rengarajan T, Balamurugan A, et al. Modulating effects of hesperidin on key carbohydrate-metabolizing enzymes, lipid profile, and membrane-bound adenosine triphosphatases against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced breast carcinogenesis. [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2013, 33(5):504-16.
- [4] Li R, Cai L, Xie X F, et al. 7,3'-dimethoxy hesperetin inhibits inflammation by inducing synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(1):139-46.
- [5] Garg A, Garg S, Zaneveld L J, et al. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(8):655-69.
- [6] 彭 磊,张 茜,李 荣,等. 橙皮苷衍生物抗炎活性的筛选研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(1):36-9.
- [7] 胡成穆,陈 琳,李 荣,等. 豹皮樟总黄酮对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(6):804-8.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈 修. *药理实验方法学* [M]. 3 版,北京:人民卫生出版社,2002:1433-8.
- [9] 李 荣,李 俊,胡成穆,等. 橙皮苷对免疫功能低下小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(2):169-72.
- [10] Yu Q, Nie S P, Wang J Q, et al. Chemoprotective effects of Ganoderma atrum polysaccharide in cyclophosphamide-induced mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64(1):395-401.
- [11] Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Microenviro*, 2013, 6(2):123-33.
- [12] Battaglia A, Buzzonetti A, Baranello C, et al. Interleukin-21 (IL-21) synergizes with IL-2 to enhance T-cell receptor-induced human T-cell proliferation and counteracts IL-2/transforming growth factor- β -induced regulatory T-cell development [J]. *Immunology*, 2013, 139(1):109-20.

Immunomodulatory property of HY-12 on immunosuppressive mice

Li Xiaofeng, Li Jun, Huang Cheng, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Anhui Provincial Laboratory on Bioactivity of Natural Products, Anhui Provincial Engineering Research Center on Active Components of Natural Products, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the immunomodulatory activity of HY-12 on immunosuppressive mice. **Methods** Cy (50 mg/kg) was administered by intraperitoneal (ip) injection for 2 consecutive days to induce immunosuppressive model. Carbon clearance, quantitative hemolysis and DNFB-induced delayed-type hypersensitivity were applied to assay effects of HY-12 on nonspecific immunity, humoral immunity and cellular immunity. **Results** In carbon clearance test, the clearance index (K) and values of phagocytic index (α) were elevated by HY-12 (100, 200, 400 mg/kg), indicating the phagocytosis of macrophages was enhanced in immunosuppressive mice. In quantitative hemolysis, productions of IgG and IgM and hemolysin were enhanced by HY-12 (200, 400 mg/kg). HY-12 (200, 400 mg/kg) obviously increased DTH reactivity and enhanced expression of IL-22 in immunosuppressive mice. HY-12 (100, 200, 400 mg/kg) not only increased expression of CD4⁺ and CD8⁺, but also enhanced the ratio of the two. **Conclusion** HY-12 shows significant immunomodulatory property on immunosuppressive mice through specific and nonspecific immunity.

Key words HY-12; humoral immunity; nonspecific immunity; cellular immunity; cyclophosphamide