

文章编号: 1673 1689(2011)01-0037-07

营养型鸡精对拘束应激小鼠免疫功能的改善作用

李怡芳, 曾怀苇, 陈邦添, 何蓉蓉, 栗原博*

(暨南大学 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 作者研究了营养型鸡精对拘束负荷小鼠免疫功能的改善作用。将小鼠随机分为正常对照组, 拘束应激组, 25 mg/kg RU 486(糖皮质激素受体拮抗剂组), 1 mL/hg BEC(营养型鸡精)组及 2 mL/hg BEC 组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组连续灌胃给药 5 d 后拘束负荷 18 h, 拘束恢复 3 d 后取血取脾脏测定相关指标。结果显示: BEC 不仅可以明显改善拘束应激对小鼠脾脏的损伤, 提高脾淋巴细胞总数, 而且能显著降低应激小鼠血浆中皮质酮的含量, 抑制相关凋亡因子的基因表达, 提高线粒体膜电位, 减少细胞色素 C 的释放。BEC 可以通过抑制应激小鼠脾淋巴细胞的凋亡来维护脾淋巴细胞数目和功能, 改善应激负荷引起的免疫抑制作用。

关键词: 拘束应激; 免疫功能; 皮质酮; 细胞凋亡; 线粒体膜电位; 细胞色素 C

中图分类号: R 392.1

文献标识码: A

Effects of Chicken Essence on Immune Activity in Restraint Stressed Mice

LI Yifang, ZENG Huaiwei, CHEN Bangtian, HE Rongrong, KURIHARA Hiroshi*
(Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This study aims to study the effect of BEC (BRANDS Chicken Essence, BEC) on immune system in restraint stressed mice. Mice were randomly divided into 5 groups with 10 mice each group: normal control group, restraint control group, 25 mg/kg RU 486 (GR antagonist) group, 1 mL/100 g BEC and 2 mL/100 g BEC. The treatment groups were orally administrated with BEC or RU 486 for consecutive 5 days, while normal control and stress control groups were given the same volume of water. On the 5th day, all mice were restraint for 18 h except normal group. After 3 days recovery, mice were sacrificed. Blood was distilled and spleens were received to prepare lymphocytes for following tests. The results showed that BEC not only could protect the reduced spleen index and spleen lymphocytes, but also could inhibit the elevated content of corticosterone in plasma. RT-PCR analysis showed that BEC also could recover GR mRNA, Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in spleen lymphocytes nearly to normal. Meantime, the mitochondrion membrane potential ($\Delta\Psi_{mt}$), the content of CytC in cytoplasm or mitochondrion of spleen lymphocytes were also recovered to normal when compared to stressed mice. All of these results indicated that BEC could protect spleen lymphocytes against apoptosis and improve the immune function in restraint stressed mice.

收稿日期: 2010-03-06

作者简介: 李怡芳 (1985-), 女, 江西抚州人, 生物医药工程博士研究生, 主要从事天然产物药理活性研究。

Email: liyifangkele@sina.com

* 通信作者: 栗原博 (1954-), 男, 辽宁沈阳人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药及天然产物药理活性研究。Email: Hiroshi_Kurihara@163.com

Key words: chicken essence, restraint stress, immune activity, corticosterone, apoptosis, mitochondrion membrane potential, CytC

应激反应涉及神经、内分泌及免疫等多方面的生理功能,对于机体的影响是广泛的。作者将小鼠放置在狭窄的拘束环境中,限制自由运动,使其烦躁和焦虑来模拟心理应激状态。采用拘束负荷诱发小鼠氧化应激是目前被广泛采用的一种模拟心理压力的应激模型。研究结果表明,拘束应激能明显影响机体的免疫功能,显著改变淋巴细胞数目和活性^[1-7]。前期实验结果提示小鼠拘束负荷后会引引起免疫担当细胞数量和机能的下降,T 淋巴细胞亚群 CD4/CD8 比例失调及 NK 细胞活性降低等现象,且这种免疫抑制作用持续到拘束负荷后 3 天时最为显著。因此,利用小鼠拘束负荷模型评价抗应激活性物质对免疫系统的影响,探讨其作用机制。

目前,营养型鸡精被已被国内外多家研究机构确认含有苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸及色氨酸等人体所需的 8 种必须氨基酸在内的多种氨基酸^[8-9],也富含相当比例的游离氨基酸^[10]。当然,成年人必须的组氨酸和婴幼儿需要的精氨酸也都富含在其中。此外,营养型鸡精还含有多种矿物质、微量元素和维生素^[9],及肌肽(carnosine)、鹅肌肽(anserine)和牛磺酸等营养元素。营养型鸡精主要用于病人恢复健康,补充营养,促进新陈代谢水平,提高运动员身体素质,也被用于恢复精神及体力疲劳和增强大脑反应能力及提高学习记忆效果等方面^[11-15]。可以看出,营养型鸡精具有一定的抗应激作用,但有关鸡精对免疫系统的作用研究甚少,因此,作者利用拘束负荷小鼠模型探讨营养型鸡精的免疫赋活作用,旨在为营养型鸡精作为保健品的广泛应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

7 周龄雄性清洁级昆明种小鼠:购自广东省医学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤) 2008-0003。饲养温度 23 ± 2 °C,照明时间每天 12 h (7: 00~19: 00),用普通饲料饲养 1 周后用于实验。

1.2 试剂与仪器

营养型鸡精(BRAND' s chicken essence, BEC):新加坡食益补太平洋有限公司提供;皮质酮(corticosterone)标准品、氢化可的松(cortisol)标准

品及罗丹明 123(rodamine123):美国 Sigma 公司产品;RU486:购于浙江仙居药厂;MgCl₂、联二亚硫酸钠及正铁氰化钾:购于天津市福晨试剂厂;10xPCR buffer、5 × cDNA 合成缓冲液(5 × first strand buffer)、6 × DNA loading buffer、DNA marker I、dNTPs、M-MLV 反转录酶、Oligo (dT)₂₀、Rnase-Free ddH₂O、Taq DNA 多聚酶及 TRIzol:北京 Tiangen 公司产品;氯仿、异丙醇及无水乙醇:购于山东禹王试剂公司;琼脂糖 Agarose:英国 Oxoid 公司产品。

Coulter XL 流式细胞仪:美国 Beckman 公司产品;荧光显微镜:日本 Olympus 公司产品;2720 型 PCR 仪:美国 APPLIEDBIOSYSTEMS 公司产品;电泳成像系统:美国 Bio-Rad 公司产品;超级纯水仪:美国 Millipore 公司产品;电泳仪及水平电泳槽:日本 Mupid 公司产品;组织匀浆机:德国 IKA Labortechnik 公司产品;高速冷冻离心机及电子分析天平:德国 Sartorius 公司产品;漩涡混合器:太仓市科教器材厂产品;高效液相色谱系统:日本 H F-TACHI 公司产品。

1.3 动物分组及拘束应激模型建立

实验将小鼠随机分为正常对照组,拘束应激组, RU486 组(糖皮质激素受体拮抗剂, 25 mg/kg), 低剂量 BEC 组(1 mL / hg) 及高剂量 BEC 组(2 mL / hg), 共 5 组, 每组 10 只动物。实验方案如图 1 所示。

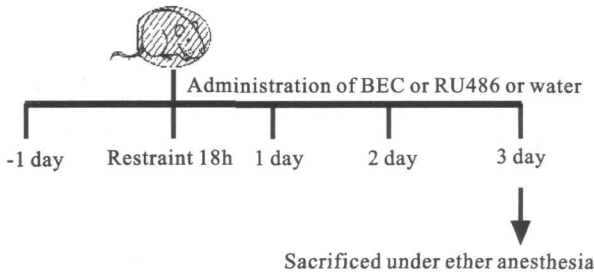


图 1 小鼠拘束负荷及给药方法

Fig. 1 Experimental schedule for mice exposed to restraint stress

实验组每天给药一次连续给药 5 d, 正常对照组与拘束应激组给予等容量水溶液。除正常对照组外, 其余各组给药 5 d 后拘束负荷 18 h, 拘束恢复 3 d 后测定相关实验指标。小鼠拘束装置为通风良好的 50 mL 尖底聚丙烯塑料离心管, 给予一次性拘

束 18 h (15:00–9:00), 拘束期间小鼠不能进食饮水, 正常对照组小鼠为非拘束禁食禁水小鼠^[16]。

1.4 脾脏指数的测定及淋巴细胞悬液制备

小鼠称重后乙醚麻醉并取出脾脏, 按公式计算脾脏指数。脾脏指数 = 脾脏质量 (g) / 小鼠体重 (g) × 100% 计算脾脏指数。

淋巴细胞制备方法为, 将脾脏置于玻璃匀浆器中添加 2 mL PBS 溶液后研磨, 200 目网过滤, 取细胞悬液在显微镜下观察, 计算脾细胞总数。4 ℃ 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入红细胞裂解液 1 mL, 混匀, 静置 2 min 后加 PBS 溶液 3 mL 终止裂解反应, 4 ℃ 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 10 mL PBS 溶液洗两次后, 加 0.5 mL PBS 溶液混匀后在显微镜下细胞计数, 按不同指标的测定要求调整脾淋巴细胞悬液浓度。

1.5 血浆皮质酮含量测定

取小鼠全血置于肝素处理过的离心管中, 以 5 000 r/min 离心 5 min 分离血浆。取 0.5 mL 血浆, 并添加入 2 mL 乙酸乙酯振荡萃取, 分离得到上层乙酸乙酯液, 下层水液再用乙酸乙酯萃取一遍, 合并乙酸乙酯液后用 0.1 mL NaOH 洗一次, 再用蒸馏水洗 2 次。乙酸乙酯液置于氮气下挥发吹干后加入 100 μ L 流动相 ($V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 38:72$) 溶解即得皮质酮分析样品溶液。按 Woodward 等人的方法, 采用 HPLC 内标法 (内标物为 cortisol) 测定血浆中皮质酮含量^[17]。检测条件为: 紫外检测, 检测波长为 254 nm; 色谱柱: 5C18 ($D4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 38:72$; 流量: 1 mL/min。

1.6 脾脏淋巴细胞线粒体膜电位的测定

罗丹明 123 (Rh 123) 是一种细胞通透性的、阳离子的荧光探针, 容易被有活性的线粒体摄取, 没有细胞毒性。Rh 123 透过细胞膜在活细胞的线粒体内聚集, 发出黄绿色荧光, 可用于对很多种活细胞进行染色, 容易观察和分析线粒体的形态变化。作者将小鼠脾淋巴细胞悬液调至浓度为 5×10^6 个/mL 的单细胞悬液, 吸取 100 μ L 的细胞悬液于流式管中, 加入的 Rh 123 溶液 (终浓度为 6.8 $\mu\text{mol/L}$), 室温孵育 15 min 后用探针与细胞充分接触。用 PBS (pH 7.4) 洗涤细胞 2 次, 以充分除去细胞外荧光物质, 流式细胞仪在 485 nm 光激发下, 525 nm 的发射光条件下进行检测。

1.7 脾脏线粒体细胞色素 C (CytC) 含量测定

脾脏淋巴细胞胞浆中 CytC 的提取方法为, 取制备好的 1×10^6 个/mL 以 1 000 r/min 离心 5

min, 沉淀后添加 1 mL 预冷的细胞裂解液冰浴 20 min, 12 号针头吹打均匀, 12 000 r/min 离心 30 min, 上清部分蛋白定量后用于细胞浆 CytC 含量的检测^[18]。

对于脾脏淋巴细胞线粒体中 CytC 的检测, 实验将小鼠心脏采血后迅速取下脾脏, 称重后按 1 g : 9 mL 比例加入预冷的分离介质 (蔗糖 250 mmol/L, EDTA 0.15 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.4) 置于玻璃匀浆器中冰浴条件下匀浆。组织匀浆液在 3 000 r/min, 离心 3 min 后取上清液, 以 11 000 r/min 离心 8 min。仔细将沉淀物悬置于 Ficoll 梯度中, 10 000 r/min 离心 30 min。弃除上清液后, 将沉淀物用匀浆液悬浮, 并以 11 000 r/min 离心 8 min, 回收沉淀的线粒体, 以上所有操作均在 4 ℃ 条件下进行, 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定线粒体悬液的蛋白含量^[19–20]。线粒体蛋白悬液分装后 -70 ℃ 保存以待用线粒体中 CytC 的测定。

Cyt 含量按 Schenider. H 等^[21–22]的方法测定, 采用氧化还原差光谱 (联二亚硫酸钠还原减去正铁氰化钾氧化的差光谱), 扫描范围是 630~500 nm, 求得 4 个波长段的消光值, 代入下列公式计算出细胞色素 C 的含量: $\text{Cyt c} = 4913 (A_{550} \sim A_{535}) - 2719 (A_{554} \sim A_{540}) + 1518 (A_{563} \sim A_{557})$

1.8 脾脏淋巴细胞中 GR、Bax 及 Bcl-2 mRNA 基因表达水平的测定

收集脾脏淋巴细胞约 5×10^7 个, 离心倒尽培养基, 加入 1 mL 细胞裂解液 Trizol 试剂, 并按 Tiar-gen 说明书操作逐步提取得到总 RNA。cDNA 第一链合成体系为 25 mL, 每份取总 RNA 3 μ g, 用逆转录酶 M-MLV、oligo dT、dNTP 以及相关试剂按说明配成适当浓度, 合成 cDNA。

取 1 mL 反转录合成 cDNA, 反应条件为: 预变性 94 ℃ 5 min, 变性 94 ℃ 30 s, 退火 30 s, 延伸 72 ℃ 45 s, 进行 30 次循环, 最后 72 ℃ 延伸 7 min, 以 18 S 为内参进行 PCR 扩增。PCR 产物经质量分数 10% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-rad 凝胶成像系统记录结果, Bandscan 软件进行灰度分析。结果以目的基因和内参照物 18 S 扩增片段的灰度值比较表示。引物根据 GeneBank 提供的基因序列使用 primer design 软件进行引物设计, 均由英韦创津公司合成 (如表 1)。

1.9 统计学处理

实验数据以 mean $\pm$ S.E.M 表示, 采用 SPSS13.0 软件, 利用 ANOVA 检验和 Dunnett's 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

表 1 引物基因序列及退火温度
Tab.1 Sequences of primers and annealing temperatures

基因名	GenBank 序列号	引物 序列	扩增片 段/ bp	退火 温度/℃
18S	K013364	Forward Primer (5'- 3): AGGGGAGAGCGGTAAGAGA Reverse Primer (5'- 3): GGACAAGGACTAGGCGGAACA	241	60
GR	X04435	Forward Primer (5'- 3): TGGTGTGCTCCGATGA Reverse Primer (5'- 3): AGGGT AGGGGT AAGC	294	60
Bax	NM007527	Forward Primer (5'- 3): CGCACCCGGCGAGAGG ReversePrimer(5'- 3): CCAAGGCAGAGG GAGG	358	55
Bcl- 2	NM009741	Forward Primer (5'- 3): CTGGAGGT CT GAAGCG Reverse Primer (5'- 3): AT GAATCGGGAGTT GG	301	55

2 实验结果

2 1 BEC对拘束应激小鼠脾脏指数与脾淋巴细胞数影响

如表 2 所示, 与正常对照组小鼠相比, 拘束负荷小鼠脾脏指数显著降低($P < 0.05$), 与拘束负荷小鼠相比, RU486 和 BEC 给药小鼠均不同程度改善脾脏指数, 且呈一定的剂量依赖性关系。在这一实验中, 注意到拘束负荷小鼠脾细胞显著降低($P < 0.01$), 与拘束负荷小鼠相比, RU486 和 BEC 给药小鼠均不同程度改善脾细胞数。结果说明拘束负荷小鼠脾脏的萎缩是因应激反应诱发脾脏细胞数目减少而引起的, 且这种作用可能与糖皮质激素及其受体有关。

表 2 BEC 对拘束应激小鼠脾脏指数和脾淋巴细胞数的影响

Tab.2 Effect of BEC on spleen index and spleen lymphocytes counts in restraint stressed mice

组别	脾脏指数/%	脾淋巴细胞数/ $\times 10^6$
正常对照组	0.23 $\pm$ 0.16	16.9 $\pm$ 3.6*
拘束应激对照组	0.11 $\pm$ 0.07#	6.6 $\pm$ 2.1##
RU486	0.22 $\pm$ 0.04**	13.2 $\pm$ 2.5**
BEC-L	0.20 $\pm$ 0.09*	10.2 $\pm$ 3.9*
BEC-H	0.25 $\pm$ 0.05**	14.3 $\pm$ 3.7*

注: 与 normal control 相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 stress control 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2 2 BEC对拘束应激小鼠血浆皮质酮含量的影响

如图 2 所示, 与正常对照组相比, 拘束应激小鼠血浆中皮质酮的含量显著升高($P < 0.01$), BEC 给药小鼠明显改善血浆中皮质酮含量, 且呈一定的剂量依赖性关系。与模型组相比, RU486 给药小鼠

没有明显变化。

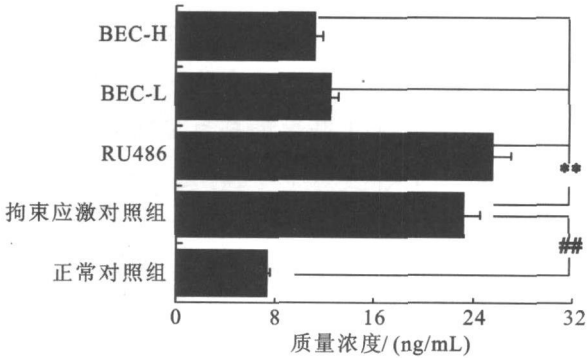


图 2 BEC 对拘束应激小鼠血浆皮质酮含量的影响
Fig.2 Effect of BEC on corticosteronelevel in plasma in restraint stressed mice

2 3 BEC对拘束应激小鼠脾淋巴细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响

如图 3 所示, 与正常对照组小鼠相比, 拘束负荷小鼠脾淋巴细胞膜电位显著降低($P < 0.01$); 与拘束应激小鼠相比, RU486 和 BEC 高低剂量给药小鼠膜电位均有显著提高。

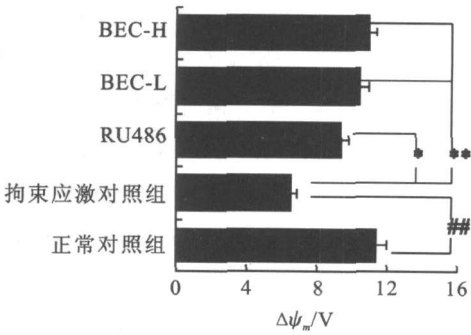


图 3 BEC 对拘束应激小鼠脾淋巴细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响
Fig.3 Effect of BEC on mitochondria membrane potentials of spleen lymphocytes in restraint stressed mice

2 4 BEC 对拘束应激小鼠脾脏淋巴细胞胞浆中 CytC 和线粒体中 CytC 含量的影响

如表 3 所示, 与正常对照组小鼠相比, 线粒体中 CytC 含量显著降低($P < 0.01$), 胞浆中 CytC 含量显著升高($P < 0.01$); 与拘束应激小鼠相比, RU486 和 BEC 高低剂量组显著改善线粒体中 CytC 含量, 并且明显降低胞浆中 CytC 含量。

表 3 BEC 对拘束应激小鼠脾脏淋巴细胞胞浆中 CytC 和线粒体中 CytC 含量的影响

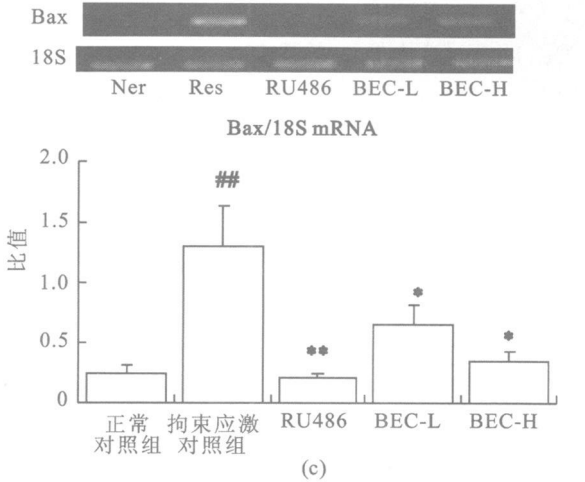
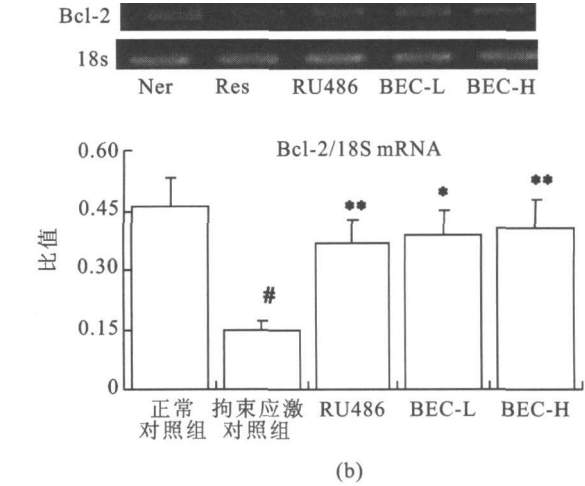
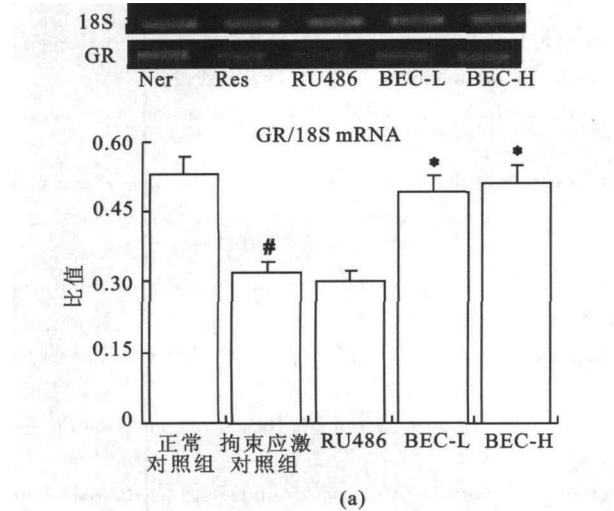
Tab. 3 Effect of BEC on CytC contents in cytoplasm and mitochondria of spleen lymphocytes in restraint stressed mice

组别	细胞浆 CytC/ (nmol/mg)	线粒体 CytC/ (nmol/mg)
正常对照组	18.41±2.02	143.22±13.6
拘束应激对照组	42.33±8.67 ^{##}	111.71±12.1 ^{##}
RU486	29.23±5.04 ^{**}	150.76±9.8 [*]
BEC-L	30.67±6.17 ^{**}	121.93±9.12 [*]
BEC-H	25.08±5.45 [*]	119.32±8.91 [*]

注: 与正常对照组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与拘束应激对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2 5 BEC 对拘束应激小鼠脾淋巴细胞中 GR, Bax 及 Bcl-2 mRNA 基因表达的影响

如图 4 所示, 与正常对照组小鼠相比, 拘束负荷小鼠 GR mRNA 与 Bcl-2 mRNA 基因表达显著减弱($P < 0.05$), Bax mRNA 基因表达显著增强($P < 0.05$); 与拘束负荷小鼠相比, BEC 给药小鼠的 GR mRNA 与 Bcl-2 mRNA 基因表达均能明显地增强, Bax mRNA 基因表达显著减弱。与拘束负荷小鼠模型组相比, RU486 给药小鼠有效的缓解 Bax mRNA Bcl-2 mRNA 水平, 但对 GR mRNA 表达没有明显的影响。



注: (a) GR mRNA 基因表达水平; (b) Bcl-2 mRNA 基因表达水平; (c) Bax mRNA 基因表达水平; 与正常对照组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与拘束应激对照组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

图 4 BEC 对拘束应激小鼠脾淋巴细胞中 GR, Bax 及 Bcl-2 mRNA 基因表达的影响

Fig. 4 Effect of BEC on gene expression of GR, Bax and Bcl-2 mRNAs on spleen lymphocytes in restraint stressed mice

3 结 语

富含成熟淋巴细胞的脾脏是机体最大的免疫器官之一, 在维护机体正常免疫功能上发挥着至关重要的作用。因此, 脾脏指数与脾脏淋巴细胞总数作为免疫指标被广泛用于药效评价。实验中发现拘束负荷 18 h 不仅使小鼠脾脏指数明显下降, 同时脾脏淋巴细胞总数显著减少, 拘束应激明显抑制小鼠免疫功能。前期实验已证明, 拘束应激诱发的这种免疫抑制作用在拘束负荷后 3 天最为明显^[16, 23-24]。在实验中确认, BEC 给药明显改善因拘束负荷减少的小鼠脾脏指数和脾脏淋巴细胞总数,

提示 BEC 能够缓解拘束负荷小鼠的免疫功能。

Sang 等人对脾脏超微结构观察中发现, 应激负荷能破坏脾脏的正常结构, 导致免疫细胞凋亡^[25]; Tarcie 等人在研究中确认应激状态下脾脏重量显著降低和胸腺萎缩, 并提示这种作用可能与血浆中的糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 增多, 继而对免疫细胞产生直接损伤和导致免疫细胞凋亡有关^[26-27]。在实验中也观察到糖皮质激素受体拮抗剂 RU 486 能够改善拘束负荷小鼠脾脏指数及脾脏淋巴细胞数, 表明应激负荷对糖皮质激素水平及其受体的影响可能是脾脏指数及脾脏淋巴数目减少的重要原因。因此, 作者以小鼠血浆中皮质酮的含量及受体 GR mRNA 在脾淋巴细胞中的表达水平为指标探讨应激负荷的影响。实验结果发现, 拘束应激显著增多小鼠血浆中皮质酮的含量, 反馈性地下调 GR mRNA 的表达, 提示拘束负荷激活了 HPA 轴, 使 GC 分泌增多, 作用于脾脏, 导致脾脏淋巴细胞的减少。在探讨脾脏淋巴细胞的减少是否起因于淋巴细胞的凋亡时, 发现拘束应激明显提高小鼠 Bax mRNA 基因表达水平的同时, 显著减低了 Bcl2 mRNA 的表达, 影响了 Bax/ Bcl2 mRNA 的平衡。实验结果显示, RU486 能够有效的调节因拘束负荷影响的小鼠脾淋巴细胞 Bax mRNA 和 Bcl2 mRNA 基因表达。确认应激负荷小鼠脾淋巴数目的减少与 GC 诱导淋巴细胞发生凋亡相关。至今为止的研究证明, GC 分泌增多能够激活 GR 向细胞核转移, 并与 DNA 上反应元件结合后, 诱导相关凋亡基因表达发生变化引起脾淋巴细胞发生凋亡。此外, 在实验中注意到拘束应激显著下降脾淋巴细

胞膜电位, 减少线粒体中 CytC 含量和增多细胞浆中的 CytC 水平。当给予应激负荷小鼠糖皮质激素受体拮抗剂 RU486 后, 可以有效改善膜电位和 CytC 水平, 结果提示拘束应激诱导脾淋巴细胞发生凋亡, 导致脾脏指数减小和淋巴细胞数目的减少。

在探讨 BEC 如何影响拘束负荷小鼠免疫功能时发现, BEC 不仅可以改善拘束小鼠血浆中的皮质酮含量, 同时有效的调节因应激负荷引起的脾脏淋巴细胞 GR mRNA、Bax/ Bcl2 mRNA、线粒体膜电位及 CytC 水平的改变, 提示 BEC 通过影响淋巴细胞凋亡, 改善拘束应激小鼠的免疫功能。实验结果显示营养型鸡精对小鼠免疫功能的改善作用与调节皮质酮水平, 抑制激素对其受体的激活, 维持相关凋亡基因和蛋白的正常表达相关。已有很多研究证明营养型鸡精中富含肌肽等小分子化合物是中枢组织胺神经 (histaminergic neuron system) 递质的前驱活性物质, 可以通过组胺酸等代谢途径有效的调节中枢自我意识控制的组织胺神经水平, 缓解应激源的压力^[28-29], 从整体上来调整机体内环境的稳定, 从而提高小鼠的抗应激能力, 改善拘束应激小鼠的免疫功能。此外, 营养型鸡精中富含肌肽和鹅肌肽等组胺酰二肽类化合物, 研究表明它们具有很强的抗氧化活性, 不仅能够清除拘束应激产生的自由基及防止线粒体膜脂质过氧化, 也能够有效的保护线粒体细胞膜的正常结构^[30-31], 防止脾脏淋巴细胞凋亡和维护小鼠脾脏的结构和免疫功能。当然, 鸡精中富含的氨基酸、微量元素及维生素等其他营养成分在抗应激和改善拘束负荷小鼠的免疫功能上发挥着重要作用。

参考文献 (References):

- [1] Sonia L. BREAKTHROUGHS AND VIEWS: Glucocorticoid Induced Apoptosis in Lymphocytes [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000, 279, 307- 312.
- [2] Fukui Y, Sudo N, Yu XN. The restraint stress induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production [J]. **Journal of Neuroimmunology**, 1997, 79: 211- 217.
- [3] Millan S, Giordano M, Soto L, et al. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions [J]. **Life Sciences**, 1996, 59(17): 1431- 1442.
- [4] Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, et al. Stress induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection [J]. **Brain Behavior and Immunology**, 1991, 5: 170- 192.
- [5] John H, David A, Patricia A. et al. Padgett Modulation of natural killer cell activity by restraint stress during an influenza A/PR8 infection in mice [J]. **Brain Behavior and Immunity**, 2004, 18: 526- 535.
- [6] Connie JR, Cynthia S, et al. Acute stress impairs NK cell adhesion and cytotoxicity through CD2, but not LFA-1 [J]. **Journal of Neuroimmunology**, 1999, 99: 230- 241.
- [7] Kurihara H, Tanaka T, Kiso Y, Watanabe T. The Changes of Histamine Concentrations in the Plasma and Brain in Response to Acute Stress [M]. Amsterdam: Elsevier, 2001.
- [8] Azhar MZ, Mohsin SSJ. Effect of taking chicken essence on stress and cognition of human volunteers [J]. **Malaysia Journal Nutrition**, 2003, 9: 19- 29.

- [9] 李科德, 贺鹰持. 鸡精中氨基酸含量与组分分析 [J]. 广州食品工业科技, 1995, 11: 510– 512.
LI Ke de, HE Ying tian. Study on the composition and content of amino acids in chicken essence [J]. **Guangzhou Food Science and Technology**, 1995, 11: 510– 512. (in Chinese)
- [10] Geissler C, Boroumand Naini M, Harada M, et al. Chicken extract stimulates haemoglobin restoration in iron deficient rats [J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 1996, 47: 351– 360.
- [11] Ikeda T, Nishijima Y, Kiso Y, et al. Effects of chicken essence tablets on resting metabolic rate [J]. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 2001, 65: 2083– 2086.
- [12] Geissler C, Boroumand Naini M. Large acute thermic response to chicken essence in humans [J]. **Nut Rep Inter**, 1989, 39: 547– 556.
- [13] Xu CL, Sim MK. Effects of feeding of essence of chicken on the level of 5-hydroxyindole acetic acid in the cerebrospinal fluid of the rat [J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 1997, 48: 113– 117.
- [14] Nagai H, Harada M, Nakagawa M, et al. Effects of chicken extract on the recovery from fatigue caused by mental workload [J]. **Applied Human Science**, 1996, 15: 281– 286.
- [15] 李怡芳, 栗原博, 营养性鸡精抗疲劳作用的研究现状 [J]. 今日药学, 2008, 18(6): 15– 20.
LI Yi fang, HE Rong rong, KURIHARA Hiroshi. Anti fatigue effect of nutritional essence of chicken [J]. **Pharmacy Today**, 2008, 18(6): 15– 20. (in Chinese)
- [16] Kurihara H, Koda H, Asami S. Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress [J]. **Life Science**, 2002, 70 (21) : 2509.
- [17] Woodward C, Emery PW. Determination of plasma corticosterone using high performance liquid chromatography [J]. **Chromatography**, 1988, 419: 28– 40.
- [18] Kim YH, Park JW, Lee JY, et al. Bcl 2 overexpression prevents daunorubicin induced apoptosis through inhibition of XIAP and Akt degradation [J]. **Biochemical Pharmacology**, 2003, 66 (16) : 1779– 1786.
- [19] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. **Biological Chemistry**, 1970, 245 (18) : 4724– 4731.
- [20] 冯卫红, 刘耕陶. N-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶及多巴胺体外引起大鼠脑线粒体损伤作用 [J]. 药学学报, 2000, 35 (1) : 11– 17.
FENG Wei hong, LIU Geng tao. Comparative study of the toxic effect of N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and dopamine on rat brain mitochondria invitro [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2000, 35 (1) : 11– 17. (in Chinese)
- [21] Schneider H, Lemasters JJ, Hochli M, et al. Liposome mitochondria innermembrane fusion [J]. **Biological Chemistry**, 1980, 255 (8) : 3748– 3756.
- [22] 俞超芹, 缪明永, 凌昌全, 等. 941 方对衰老大鼠肝线粒体酶活性的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(1) : 35– 37.
YU Chao qin, MIAO Ming yong, LING Chang quan, et al. Effects of 941 recipe on liver mitochondrion enzyme from aged rats [J]. **Journal of Anhui TCM College**, 2001, 20(1) : 35– 37. (in Chinese)
- [23] He RR, Yao XS, Li HY, et al. The anti stress effects of *Sarcandra glabra* extract on restraint evoked immunocompromise [J]. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, 2009, 32(2): 247– 252.
- [24] 何蓉蓉, 王敏, 李怡芳, 等. 中药九节茶对应激负荷小鼠免疫功能的改善作用 [J]. 中国中药杂志, 2009, 31(1): 25– 28.
HE Rong rong, WANG Min, LI Yi fang, et al. Effects of *Sarcandra glabra* extract on immune activity in restraint stress mice [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2009, 31(1) : 25– 28. (in Chinese)
- [25] Sang HL, Byung HJ, Sun YK, et al. The antistress effect of ginseng total saponin and ginsenoside Rg3 and Rb1 evaluated by brain polyamine level under immobilization stress [J]. **Pharmacological Research**, 2006, 54: 46– 49.
- [26] Shi YF, Devades S, Greenelch KM, et al. Stressed to death: Implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology [J]. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2003, 17: 18– 26.
- [27] Tarcic N, Ovadia H, Weiss, DW, Weidenfeld, J. Restraint stress induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids [J]. **Journal of Neuroimmunology**, 1998, 82(1): 40– 46.
- [28] Chen Z, Sakurai E, Hu W, et al. Pharmacological effects of carinine on histaminergic neurons in the brain [J]. **British Journal of Pharmacology**, 2004, 143: 573– 580.
- [29] Kurihara H, Tanaka T, Kiso Y, et al. Antistress of Chicken Essence in Food Deprived Activity Stress: Possible Involvement of Histaminergic Neurons [M]. Amsterdam: Elsevier, 2001.
- [30] Andrea Guiotto. Carnosine related antioxidants: a review [J]. **Current Medical Chemistry**, 2005 (12) : 2293– 2315.
- [31] Dalle Donne I. Protein carbonylation in human disease [J]. **Trends in Molecular Medicine**, 2003 (9) : 69– 176.