

沙棘Vp粉的制备及增强免疫功能研究

李 刚^{1,2}, 何彦峰², 丁学峰¹, 周小魏¹, 索有瑞², 王振华¹, 王洪伦^{2,*}

(1.烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005; 2.中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要:目的: 研究沙棘Vp粉增强免疫功能的作用。方法: 将沙棘原汁通过高温瞬时灭菌和喷雾干燥等技术制得沙棘Vp粉, 分别采用全自动氨基酸分析仪和高效液相色谱法检测沙棘Vp粉中氨基酸以及水溶性维生素的含量。利用环磷酸腺苷注射造成免疫力低下小鼠实验模型, 实验分组为正常对照组、模型组、黄芪精阳性对照组、沙棘Vp粉低、高剂量组。分别检测小鼠胸腺指数、脾脏指数、全血分析、巨噬细胞吞噬功能、血清溶血素水平和脾细胞增殖能力等指标。结果: 沙棘Vp粉含有多种人体必需氨基酸, 且VC含量高达 $(18\ 266.4 \pm 201.1)$ mg/kg。沙棘Vp粉(1.0、2.0 g/kg)能不同程度地提高小鼠胸腺指数、脾脏指数($P < 0.01$); 增加白细胞数量, 降低淋巴细胞比例($P < 0.05$); 增强小鼠单核-巨噬细胞的吞噬系数($P < 0.01$)和血清溶血素水平($P < 0.01$); 提高脾淋巴细胞的转化能力。结论: 沙棘Vp粉具有明显增强小鼠免疫力的作用。

关键词: 沙棘Vp粉; 免疫功能; 环磷酸腺苷; 小鼠

Preparation of Seabuckthorn Vp Powder and Its Immunomodulatory Activity in Mice

LI Gang^{1,2}, HE Yan-feng², DING Xue-feng¹, ZHOU Xiao-wei¹, SUO You-rui², WANG Zhen-hua¹, WANG Hong-lun^{2,*}

(1. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: In this study, we prepared seabuckthorn Vp powder from seabuckthorn juice through high-temperature sterilization and subsequent spray drying. The contents of amino acids and vitamins in the Vp powder were detected. In order to investigate its immuno-enhancing effect in mice, immunity-deficiency mouse models were induced by intraperitoneal injection of cyclophosphamide. The thymus and spleen indices, routine blood parameters, macrophage phagocytosis, serum hemolysis level and spleen cell proliferation ability were measured. Results showed that seabuckthorn Vp powder contained a variety of essential amino acids, and vitamin C content was as high as $(18\ 266.4 \pm 201.1)$ mg/kg. Compared with the model group, the Vp powder (1.0 and 2.0 g/kg) could significantly enhance thymus and spleen indexes in mice ($P < 0.01$), increase the amount of white blood cells, reduce the proportion of lymphocytes ($P < 0.05$), enhance the phagocytic index of mononuclear macrophages ($P < 0.01$) and serum hemolysis level ($P < 0.01$), and improve spleen lymphocyte transformation. In conclusion, seabuckthorn Vp powder can obviously enhance the immune function of mice.

Key words: seabuckthorn Vp powder; immune function; cyclophosphamide; mice

中图分类号: TQ619.8

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 21-0229-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201421045

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是一种对高温、低温、干旱、风沙、贫瘠等恶劣环境适应性很强的灌木, 在青海省海东、西宁及海北地区有大量分布, 同时也是一种重要的生态经济林浆果^[1]。长期严酷多变的生态变迁和对逆境的生理适应, 使沙棘果实中积累了丰富的活性成分和营养成分, 如多种维生素、黄酮、卵磷脂、脑

磷脂、不饱和脂肪酸、氨基酸和微量元素等^[2]。中国科学院西北高原生物研究所近10年来, 从资源分布、营养成分、功能作用和开发利用等方面对青藏高原沙棘资源进行了比较系统的研究^[3-6]。国外学者对沙棘的研究报道也日益增多, 目前主要集中于其黄酮、籽油、色素等方面, 生物活性包括抗氧化^[7-9]、降血脂^[10-12]、抗炎^[13-15]等。

收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 青海省国际合作项目 (2013-H-802); 青海省科技创新能力促进计划项目 (2014-ZJ-765);

烟台大学实验室开放项目 (2014-41)

作者简介: 李刚 (1978—), 男, 副教授, 博士, 主要从事天然产物活性与机制研究。E-mail: ligang@ytu.edu.cn

*通信作者: 王洪伦 (1979—), 男, 研究员, 博士, 主要从事青藏高原特色生物资源及中藏药的研究与开发。

E-mail: hlwang@nwipb.cas.cn

沙棘果汁含有鲜果中最有价值的成分,但是存在运输和保存不方便的缺陷,沙棘Vp粉是将沙棘原汁通过高温瞬时灭菌后,经喷雾干燥制得,便于运输与贮藏,同时可作为药品载体、食品、保健食品以及化妆品的原料和辅料。研究表明,沙棘Vp粉富含维生素、多酚类及黄酮类化合物^[16],具有较好的抗氧化性能,能有效清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基和亚硝酸盐^[17]。本实验在制备沙棘Vp粉并分析其氨基酸和水溶性维生素含量的基础上,以环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)造成免疫力低下小鼠实验模型^[18],考察沙棘Vp粉对小鼠非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘Vp粉 中国科学院西北高原生物研究所;黄芪精口服液 扬子江药业集团有限公司。

环磷酰胺 山西晋德药业股份有限公司;印度墨汁 北京化学试剂公司;都氏试剂、伴刀豆球蛋白A(concanavalin A, ConA) 美国Sigma公司;绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC) 山东烟台安禾生物科技有限公司;巴比妥酸(barbital acid, SA)缓冲液、豚鼠血清 实验室自行制备。

1.2 仪器与设备

B-290真空喷雾干燥机 瑞士Büchi公司;L-8900全自动氨基酸分析仪 日本Hitachi公司;Alliance 2695高效液相色谱仪、2487紫外检测器、Empower色谱管理系统 美国Waters公司;Sysmex XT-1800i血细胞分析仪 日本东亚Sysmex公司;SpectraMax® Paradigm®多功能酶标仪 美国MD公司;MCO-15AC细胞培养箱 日本Sanyo公司;HC-3018R高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 沙棘Vp粉的生产工艺

将洗净的沙棘果榨汁后高温瞬时灭菌(100~110℃, 30 s),然后迅速降温到30℃以下。沉降澄清的沙棘原汁,用200目滤布过滤,至贮罐(温度-3~5℃),按1:1(V/V)比例加入辅料麦芽糊精(60~80℃),搅拌2~4 h至辅料完全溶解,采用200目滤布进行过滤。利用真空喷雾干燥机进行干燥,工艺参数如下:干燥机热风进口温度为180~220℃,出口温度为80~105℃,真空度为10~50 Pa。

1.3.2 沙棘Vp粉的主要成分分析

采用全自动氨基酸分析仪测定样品中的氨基酸含量。色谱条件:分析时间30 min;离子交换柱:磺酸型

阳离子树脂(4.6 mm×60 mm, 3 μm);柱温57℃;反应温度135℃;分离缓冲液流速0.40 mL/min;茚三酮反应液流速0.35 mL/min;检测波长570、440 nm。采用高效液相色谱法检测沙棘Vp粉中水溶性维生素种类及含量,色谱柱为Waters Symmetry C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温为30℃;流动相流速为1.0 mL/min;检测器为双通道紫外检测器,VB₁₂测定波长为360 nm,其余测定波长为280 nm;进样体积为10 μL;流动相:在1 000 mL容量瓶中加入700 mL超纯水后,加入50 mg乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、1.1 g庚烷磺酸钠溶解,加入25 mL冰乙酸、5 mL三乙胺,调节pH 3.4,定容至刻度,过0.22 μm滤膜。取820 mL上述溶液与180 mL甲醇混合,超声波脱气即得到流动相。

1.3.3 小鼠分组与模型建立

SPF级健康小鼠90只,雌性,体质量(20±2)g,山东绿叶制药有限公司动物研究中心提供,合格证号:SCXK(鲁)2009-0009。

90只小鼠随机分为5组,依次为正常对照组、模型组、黄芪精组(1.6 g/kg)、沙棘Vp粉高(2.0 g/kg)、低(1.0 g/kg)剂量组,正常对照组和模型组按体质量灌胃等量生理盐水,持续21 d。

除正常对照组外,其余4组小鼠均于给药后第15天腹腔注射CTX 80 mg/kg,连续3 d,造成CTX致免疫力低下小鼠模型。

1.3.4 指标检测

参考文献[19]方法进行操作。

1.3.4.1 胸腺和脾脏指数检测

末次给药24 h后,称质量,脱臼处死小鼠,称取胸腺和脾脏。分别按照式(1)、(2)计算胸腺指数和脾脏指数。

$$\text{胸腺指数}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{胸腺质量}/\text{mg}}{\text{体质量}/\text{g}} \quad (1)$$

$$\text{脾脏指数}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{脾脏质量}/\text{mg}}{\text{体质量}/\text{g}} \quad (2)$$

1.3.4.2 全血分析

小鼠眼内眦静脉采集全血,EDTA-K₂抗凝,不断混匀血液与抗凝剂。利用全血分析仪对血样进行血常规检测,包括白细胞、红细胞数量及淋巴细胞和中性粒细胞比率等。

1.3.4.3 测定巨噬细胞吞噬功能(碳廓清实验)

末次给药后24 h后,称质量,尾静脉注射印度墨汁(1:5稀释,0.45 μm微孔滤膜过滤,0.1 mL/10 g),于注射后2、10 min,从眼内眦静脉取血20 μL,加入到2 mL质量分数0.1% Na₂CO₃溶液中,混匀,在600 nm波长处测定其吸光度A。末次取血后,立即脱臼处死小鼠,称取肝

脏和脾脏质量。分别按照公式(3)、(4)计算廓清指数 K 及吞噬指数 α 。

$$K = \frac{\lg A_1 - \lg A_2}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

$$\alpha = \frac{\text{脾脏质量/g}}{\text{脾脏质量/g} + \text{肝脏质量/g}} \times K^{1/3} \quad (4)$$

式中： A_1 、 A_2 分别为2、10 min时样品的吸光度； t_1 、 t_2 分别为2、10 min。

1.3.4.4 检测血清溶血素水平

采集豚鼠血液，分离出血清，将1 mL压积SRBC加入到5 mL豚鼠血清中，置于4 °C冰箱30 min，经常振荡，离心取上清液，得补体分装，-70 °C保存。用时以SA缓冲液按1:8 (V/V) 稀释。

给药第18天时，小鼠腹腔注射2% SRBC悬液0.2 mL致敏，末次给药后24 h后摘眼球取血，室温放置30 min后，3 000 r/min离心10 min收集血清。采用全自动酶标仪测定血清溶血素水平。具体步骤如下：设样品孔和空白对照孔，样品孔：取血清10 μ L，用1 mL 1:5 (V/V) 稀释的SA缓冲液进行稀释，每孔加入稀释后的血清100 μ L；空白对照孔：每孔加入100 μ L 1:5稀释的SA缓冲液。再依次加入体积分数10% SRBC 50 μ L、补体100 μ L (用SA溶液1:8稀释)，置37 °C恒温水浴中保温30 min，1 500 r/min离心10 min。样品孔和空白对照孔各取上清液50 μ L加入另一96孔培养板内，加都氏试剂150 μ L。同时设半数溶血孔，加入体积分数10% SRBC 12.5 μ L，再加都氏试剂至200 μ L。用震荡器充分混匀，放置10 min后，于540 nm波长处用全自动酶标仪测定各孔吸光度 A 。按照公式(5)计算血清溶血素水平(HC₅₀)。

$$HC_{50} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{半数溶液}} - A_{\text{空白}}} \times \text{稀释倍数} \quad (5)$$

1.3.4.5 检测脾细胞增殖能力

利用ConA诱导淋巴细胞转化实验检测脾细胞增殖能力。无菌条件下取出脾脏，磷酸缓冲液洗涤后研磨，经200目筛网过滤，磷酸缓冲液洗涤2次，1 000 r/min离心10 min，制得脾细胞悬液。计数后调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。将细胞悬液加入96孔培养板中，100 μ L/孔，设对照孔和ConA孔。ConA孔于接种2 h后加入ConA，终质量浓度7.5 μ g/mL，置于5% CO₂、37 °C的CO₂培养箱中培养72 h。培养结束前4 h，加入噻唑蓝(5 mg/mL) 10 μ L/孔，继续培养4 h。培养结束后，弃去培养上清液，每孔加入二甲基亚砜150 μ L，溶解紫色结晶。用酶标仪检测570 nm波长处吸光度。

1.4 统计分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 20.0软件进行

t 检验及单因素方差分析，或者Mann-Whitney U检验和Kruskal-Wallis非参数检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 沙棘Vp粉的主要成分分析

表1 沙棘Vp粉氨基酸含量
Table 1 Amino acid contents of seabuckthorn Vp powder

氨基酸种类	含量/(g/100 g)	氨基酸种类	含量/(g/100 g)
天冬氨酸	0.537±0.006	酪氨酸	0.069±0.001
苏氨酸	0.080±0.001	赖氨酸	0.011±0.001
丝氨酸	0.102±0.001	组氨酸	0.073±0.006
谷氨酸	0.161±0.010	精氨酸	0.022±0.001
甘氨酸	0.043±0.003	脯氨酸	0.013±0.006
丙氨酸	0.052±0.002	胱氨酸	0.137±0.010
蛋氨酸	0.039±0.001	苯丙氨酸	0.00
亮氨酸	0.033±0.001	缬氨酸	0.00
异亮氨酸	0.007±0.001		

如表1所示，沙棘Vp粉中含天冬氨酸、谷氨酸、蛋氨酸等15种氨基酸，其中谷氨酸含量达(0.161±0.010) g/100g。同时，沙棘Vp粉中，VC含量高达(18 266.4±201.1) mg/kg，VB₁含量为(8.5±0.2) mg/kg，未检出VB₂、VB₆、VB₁₂、烟酸和叶酸。

2.2 沙棘Vp粉对小鼠胸腺指数、脾脏指数的影响

表2 小鼠体质量的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n=18$)
Table 2 Effect of seabuckthorn Vp powder on body weight changes in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	体质量/g					
	1 d	5 d	10 d	15 d	18 d	20 d
正常对照组	22.5±1.5	22.5±1.6	23.8±1.9	24.2±2.1	24.3±1.9	23.8±2.1
模型组	22.4±1.4	23.2±1.5	24.5±1.8	25.3±2.0	23.5±2.3	22.2±2.0
黄芪精组	22.7±1.7	22.9±1.8	23.8±2.0	24.5±2.2	23.4±2.3	21.9±2.3
沙棘Vp粉低剂量组	23.3±1.6	23.2±1.8	24.7±1.9	25.6±2.0	24.2±2.1	22.3±2.2
沙棘Vp粉高剂量组	22.3±1.5	22.5±1.7	24.3±1.9	25.5±2.1	24.2±2.0	22.6±2.2

表3 小鼠免疫脏器指数测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=18$)
Table 3 Effect of seabuckthorn Vp powder on thymus index and spleen index in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	胸腺指数/(mg/g)	脾脏指数/(mg/g)
正常对照组	2.74±0.25	7.46±0.52
模型组	0.78±0.12 ^{△△}	2.32±0.18 ^{△△}
黄芪精组	1.10±0.23*	5.51±0.41*
沙棘Vp粉低剂量组	1.33±0.15**	5.99±0.44*
沙棘Vp粉高剂量组	0.94±0.07*	8.04±0.49**

注：△△：与正常对照组相比，差异极显著($P < 0.01$)；*：与模型组相比，差异显著($P < 0.05$)；**：与模型组相比，差异极显著($P < 0.01$)。下同。

如表2、3所示，小鼠在注射环磷酰胺之后，体质量均明显下降(表2)，同时能够引起免疫脏器指数明显降低(表3)。胸腺和脾脏是动物体内重要的免疫器官，免

疫器官的质量是反映免疫细胞功能状况的重要而直观的指标,胸腺指数和脾脏指数能够比较客观地反映机体的非特异性免疫能力^[20]。黄芪精口服液及沙棘Vp粉均能不同程度地提高小鼠的胸腺指数和脾脏指数。统计分析表明,沙棘Vp粉对CTX所致小鼠免疫器官指数下降有明显的拮抗作用。

2.3 沙棘Vp粉对小鼠血液学指标的影响

表4 小鼠全血分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Effect of seabuckthorn Vp powder on routine blood parameters of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	红细胞个数/ ($10^{12}/L$)	白细胞个数/ ($10^9/L$)	淋巴细胞 比例/%	中性粒细胞 比例/%
正常对照组	10.95±1.75	9.21±1.24	78.01±9.52	12.61±1.55
模型组	10.67±1.89	6.07±1.09 [△]	37.35±4.39 ^{△△}	35.28±3.89 ^{△△}
黄芪精组	9.98±2.02	9.06±1.32*	44.52±5.47*	25.52±3.14*
沙棘Vp粉低剂量组	9.68±1.95	6.84±0.95	39.45±4.64	32.97±3.62
沙棘Vp粉高剂量组	9.94±2.17	8.43±1.17*	43.05±5.06*	24.63±3.36*

注:△.与正常对照组相比,差异显著($P<0.05$)。下同。

如表4所示,与正常对照组相比,模型组CTX能够显著或极显著降低白细胞数量,减少淋巴细胞比例,同时提高中性粒细胞比例,但红细胞数量没有明显变化。高剂量Vp粉(2 g/kg)能够显著抵制CTX引起白细胞的数量减少,提高淋巴细胞比例并减少中性粒细胞比例($P<0.05$)。

2.4 沙棘Vp粉对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

巨噬细胞具有吞噬异物、处理抗原等多种功能,当静脉注入一定大小的惰性碳后,即可被肝脏、脾脏内的巨噬细胞及整个单核-巨噬细胞系统的其他巨噬细胞迅速吞噬而从血液中廓清,因此单核-巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标之一^[21]。如表5所示,碳廓清实验表明,与模型组相比,沙棘Vp粉能够极显著提高实验小鼠巨噬细胞的吞噬功能($P<0.01$)。

表5 小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Effect of seabuckthorn Vp powder on monocyte and macrophage phagocytosis function of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	廓清指数K	吞噬指数a
正常对照组	0.031±0.004	6.25±0.55
模型组	0.025±0.003 [△]	4.83±0.50 [△]
黄芪精组	0.031±0.002*	5.99±0.52*
沙棘Vp粉低剂量组	0.035±0.005**	5.49±0.65**
沙棘Vp粉高剂量组	0.037±0.004**	5.73±0.68**

2.5 沙棘Vp粉对小鼠血清溶血素的影响

用SRBC免疫小鼠后,可产生抗SRBC抗体(溶血素),在补体参与下,与SRBC一起孵育,可发生溶血反应,释放血红蛋白。血清溶血素的水平反映了B细胞的增殖分化以及与补体结合后向体液中分泌溶血素的能力,可用于评价受试物对机体的体液免疫功能^[22]。如表6所示,血清溶血素实验结果表明,沙棘Vp粉能够显著提高

血清HC₅₀值,与模型组相比,沙棘Vp粉低、高剂量组可分别提高45%($P<0.05$)和67.5%($P<0.01$)。

表6 小鼠血清溶血素测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Effect of seabuckthorn Vp powder on serum hemolysis in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	血清HC ₅₀ 值
正常对照组	0.85±0.04
模型组	0.40±0.02 ^{△△}
黄芪精组	0.69±0.03**
沙棘Vp粉低剂量组	0.58±0.03*
沙棘Vp粉高剂量组	0.67±0.04**

2.6 沙棘Vp粉对小鼠脾淋巴细胞转化能力的影响

T淋巴细胞受伴刀豆蛋白(ConA)刺激后发生母细胞增殖反应,活细胞特别是增殖细胞通过线粒体水解酶可将噻唑蓝分解为蓝紫色结晶而显色,其光密度值能反映细胞的增殖情况^[23]。由表7可知,注射CTX后,小鼠脾淋巴细胞的增殖能力极显著降低($P<0.01$),沙棘Vp粉能够显著提高脾淋巴细胞的增殖能力,并且呈剂量依赖关系。与模型组相比,沙棘Vp粉低、高剂量组可分别提高31.1%($P<0.05$)和95.0%($P<0.01$)。

表7 小鼠脾淋巴细胞转化能力 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 7 Effect of seabuckthorn Vp powder on transformation of spleen lymphocytes in mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ConA刺激脾细胞增殖率/%
正常对照组	31.14±0.25
模型组	13.31±0.16 ^{△△}
黄芪精组	21.37±0.32**
沙棘Vp粉低剂量组	17.45±0.25*
沙棘Vp粉高剂量组	25.96±0.38**

3 讨论

早在20世纪90年代,国内的学者就已发现沙棘汁和沙棘总黄酮能够增强实验动物的免疫功能^[24-25],沙棘粉能够提高小鼠的耐寒耐缺氧能力,提高免疫力并降低血清胆固醇含量^[26-27]。受加工技术的限制,当时所用的沙棘粉均是由沙棘果晒干研粉。研究表明,沙棘果富含VC、VE、VB₁、VB₂等多种维生素,素有“维生素宝库”之称,其中VC含量高达800~2 100 mg/100 g,除此之外,还富含谷氨酸、赖氨酸、蛋氨酸等多种氨基酸^[28]。常饮沙棘汁,可防暑、消食生津、止渴、强身健体、延缓衰老。但是,沙棘鲜汁含酸量高(pH 3.2~3.8),VC等营养成分易快速氧化,大大限制了沙棘果汁乃至沙棘的进一步开发。通过高温瞬时灭菌和喷雾干燥等现代生物技术和工艺制备沙棘Vp粉,能够减少营养与活性成分的损失,保证沙棘原汁的品质,并便于运输和贮藏。

本实验通过腹腔注射环磷酰胺造成小鼠免疫功能低

下模型,进一步的研究结果表明,灌胃沙棘Vp粉能不同程度地提高免疫力低下小鼠的免疫功能。沙棘Vp粉特别是高剂量组(2.0 g/kg)可以从细胞免疫、体液免疫和单核巨噬细胞功能等多个方面增加免疫器官质量,提高小鼠免疫能力,其增强免疫功能的机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 张锐,孙仁艳,尹巍,等.沙棘资源综合利用概述[J].食品研究与开发,2013,34(4):229-232.
- [2] 李永海,忻耀年.沙棘产品的研究与开发[J].国际沙棘研究与开发,2008,6(3):4-9.
- [3] 张凤枰,索有瑞,王洪伦,等.毛细管气相色谱内标法测定沙棘油中的脂肪酸[J].中国粮油学报,2008,23(1):198-201.
- [4] 张凤枰,杨发树,李应东,等.青藏高原白刺、枸杞和沙棘果粉中微量元素含量比较研究[J].广东微量元素科学,2009,16(8):32-38.
- [5] 鲁长征,任蓓蕾,山永凯.沙棘籽中原花青素的分离纯化及抗氧化性的研究[J].国际沙棘研究与开发,2010,8(2):11-16.
- [6] 利毛才让,索有瑞.正交设计优化沙棘果中总酚酸的提取工艺[J].西北药学杂志,2011,26(2):83-84.
- [7] SAGGU S, KUMAR R. Effect of seabuckthorn leaf extracts on circulating energy fuels, lipid peroxidation and antioxidant parameters in rats during exposure to cold, hypoxia and restraint (C-H-R) stress and post stress recovery[J]. Phytomedicine, 2008, 15(6/7): 437-446.
- [8] ZHENG Xianyun, LONG Wenmin, LIU Gening, et al. Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*) leaf extract on the swimming endurance and exhaustive exercise-induced oxidative stress of rats[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(4): 736-742.
- [9] MAHESHWARI D T, KUMAR Y, VERMA S K, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(9): 2422-2428.
- [10] PICCHIAH P B, MOON H J, PARK J E, et al. Ethanolic extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) prevents high-fat diet-induced obesity in mice through down-regulation of adipogenic and lipogenic gene expression[J]. Nutrition Research, 2012, 32(11): 856-864.
- [11] ZHANG Wen, ZHAO Jingjing, WANG Jiesi, et al. Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(2): 228-232.
- [12] MALIK S, GOYAL S, OJHA S K, et al. Seabuckthorn attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats[J]. International Journal of Toxicology, 2011, 30(6): 671-680.
- [13] PADWAD Y, GANJU L, JAIN M, et al. Effect of leaf extract of seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages[J]. International Immunopharmacology, 2006, 6(1): 46-52.
- [14] JJAYASHANKAR B, MISHRA K P, KUMAR M S Y, et al. A supercritical CO₂ extract from seabuckthorn leaves inhibits pro-inflammatory mediators via inhibition of mitogen activated protein kinase p38 and transcription factor nuclear factor-κB[J]. International Immunopharmacology, 2012, 13(4): 461-467.
- [15] JAYASHANKAR B, MISHRA K P, GANJU L, et al. Supercritical extract of seabuckthorn leaves (SCE200ET) inhibited endotoxemia by reducing inflammatory cytokines and nitric oxide synthase 2 expression[J]. International Immunopharmacology, 2014, 20(1): 89-94.
- [16] 鲁长征,山永凯,刘洪智,等.天然维生素之王:沙棘在食品配料中的应用[J].中国食品添加剂,2008(增刊1):229-295.
- [17] 强伟,朱利娜,史俊友,等.青海沙棘果粉抗氧化活性的研究[J].中国野生植物资源,2014,33(1):24-27.
- [18] 齐丽娟,宋雁,王伟,等.用环磷酸胺建立小鼠免疫抑制动物模型[J].卫生研究,2010,39(3):313-315.
- [19] 国家食品药品监督管理局保健食品化妆品监管司.增强免疫力功能评价方法(征求意见稿)及修订说明[EB/OL].(2012-11-02). <http://www.docin.com/p-554888103.html>.
- [20] 宋媛媛,周越,孙守兵,等.丁香苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J].中药药理与临床,2013,29(2):43-46.
- [21] 尹进,彭芝配,马建中,等.松黄颗粒对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清及其抗体生成细胞的影响[J].湖南中医学院学报,2006,26(2):10-11.
- [22] MUKHERJEE D, KHATUA T N, VENKATESH P, et al. Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(2): 490-494.
- [23] 侯粉霞,杨慧芳,鱼涛.脂多糖及伴刀豆球蛋白A诱导脾淋巴细胞增殖试验方法用于免疫毒性评价的可行性研究[J].工业卫生与职业病,2007,33(6):336-338.
- [24] 王仙琴,胡庆和,刘英姿,等.沙棘对实验动物体液免疫功能的研究[J].宁夏医学杂志,1989,11(5):281-282.
- [25] 钟飞,蒋韵,吴芬芬,等.沙棘总黄酮对小鼠免疫功能的影响[J].中国药理学通报,1989,5(5):307-310.
- [26] 李丽芬,杨立志,石扣兰,等.沙棘粉对小鼠耐寒耐缺氧耐疲劳的影响[J].西北药学报,1992,7(3):18-19.
- [27] 李丽芬,石扣兰,白建平,等.沙棘粉对免疫功能和胆固醇的影响[J].西北药学报,1994,9(5):218-221.
- [28] 张凤枰,赵艳,刘耀敏,等.青藏高原白刺、枸杞和沙棘果粉中水溶性维生素含量比较分析[J].食品科学,2010,31(2):179-182.