

刺五加多糖对小鼠淋巴细胞转化率及 外周血淋巴细胞亚群的影响

罗 强¹, 任 鸿², 孙 黎¹, 杨翠军¹

(1. 河北北方学院 生命科学研究中心, 河北 张家口 075000;

2. 河北北方学院附属第一医院 神经内科, 河北 张家口 075000)

摘要: 为研究刺五加多糖对小鼠免疫功能的影响, 提取刺五加多糖, 分 25、50、100 mg/kg 3 个不同剂量给小鼠灌胃, 观察其对小鼠脾指数、脾淋巴细胞增殖指数、淋巴细胞转化率及外周血淋巴细胞亚群的影响。结果显示, 与对照组(灌服生理盐水)相比, 刺五加多糖各剂量组均可极显著提高小鼠淋巴细胞转化率($P < 0.01$); 小鼠脾指数均极显著增加($P < 0.01$); 高剂量组小鼠 $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 比值极显著提高($P < 0.01$)。结果表明, 刺五加多糖可以促进小鼠脾淋巴细胞的增殖, 提高 $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ 的比值, 且效果与灌服药物剂量呈正相关。

关键词: 刺五加多糖; 脾指数; 淋巴细胞转化率; 淋巴细胞亚群

中图分类号: S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0137-04

Effects of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide on Lymphocyte Transformation Rate and Peripheral Lymphocyte Subsets in Normal Mice

LUO Qiang¹, REN Hong², SUN Li¹, YANG Cui-jun¹

(1. Life Sciences Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Department of Internal Medicine, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: To investigate the effects of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide on mice immunological function, the polysaccharides were extracted and the mice were fed by intra gastric administration with three different doses (25, 50, 100 mg/kg). The spleen index, spleen lymphocyte proliferation index, lymphocyte transformation rate and lymphocyte subsets were calculated and the results showed that *Acanthopanax senticosus* polysaccharide improved mice lymphocyte transformation rate ($P < 0.01$) in all these dose groups, the proliferation index of mice spleen cells had a significant increase ($P < 0.01$). Accompanied with the increasing of dose, the ratio between $CD3^+ CD4^+$ and $CD3^+ CD8^+$ increased ($P < 0.01$). *Acanthopanax senticosus* polysaccharide improved the mice immunologic function by promoting the proliferation of mice spleen cells and increasing the ratio of $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ of lymphocyte subsets, positively correlated to drug dose.

Key words: *Acanthopanax senticosus* polysaccharide; spleen index; lymphocyte transformation rate; lymphocyte subsets

刺五加系五加科植物, 主要成分为刺五加多糖
(*Acanthopanax senticosus* polysaccharide, ASPS)。其主

要分布在我国黑龙江、吉林、辽宁、河北等省, 是我国
东北地区典型的药用植物^[1]。刺五加的药理作用与

收稿日期: 2013-05-02

基金项目: 河北中医药管理局基金项目(2006025)

作者简介: 罗 强(1977-), 男, 北京人, 实验师, 本科, 主要从事细胞生物学及抗肿瘤机制研究。

E-mail: mengk0209@hotmail.com

人参相似,可增强机体的免疫力和抗癌作用,且几乎无毒性,即使长期服用也不会出现不良反应^[2]。本研究通过对正常小鼠灌注不同剂量的 ASPS,观察小鼠脾指数、脾细胞增殖指数、淋巴细胞转化率及外周血淋巴细胞亚群的变化,以探讨 ASPS 对正常小鼠免疫功能的影响,为药材刺五加的进一步开发和应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试剂

刺五加多糖,自制;FITC-anti-mouse CD3、PE-anti-mouse CD4、PE-anti-mouse CD8、碘化丙啶(PI)、溶血素,美国 BD 公司生产;刀豆蛋白 A(ConA),Sigma 公司生产;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

电子天平(1/100 000,型号为 GR-202),日本 A&D 公司生产;显微镜(型号为 CH30),Olympas 公司生产;流式细胞仪(型号为 FACS Aria),美国 BD 公司生产。

1.3 供试动物

选取昆明鼠 40 只,体质量 20~25 g,雌雄各半,分笼饲养,由河北北方学院动物中心提供。常规饲养,自由进食饮水,光照时间为自然日照时长,适应环境 7 d 后开始试验。

1.4 方法

1.4.1 刺五加多糖的提取 将刺五加进行清洗,低温烘干,去梗后粉碎,取 5.0 g 放入圆底烧瓶中,加 250 mL 水振荡混匀,浸泡 1 h 后,置于 90 °C 恒温水浴箱中,固体与液体按照 1:20 的比例,回流提取。按此方法重复提取 1 次,将 2 次提取出的液体混匀,浓缩至 250 mL,即为 20 g/L 的刺五加多糖贮存液,115 °C 高压灭菌 20 min,置于 4 °C 保存,给小鼠灌服前使用生理盐水稀释至工作浓度。

1.4.2 试验设计 将小鼠随机分为 4 组,设置对照组和不同剂量药物组,药物剂量分别为 25、50、100 mg/kg,对小鼠灌胃,对照组给予同等体积的生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。

1.4.3 ASPS 对小鼠脾指数和脾细胞周期的影响测定 对照组和药物组内随机选取小鼠,每组选 5 只共 20 只,在最后一次给药 1 h 后,称取体质量,以颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下取出小鼠脾脏并称质量。脾指数=小鼠脾质量(mg)/小鼠终体质量(g)。

将称量后的脾脏用盐水冲洗,置于培养皿中,用玻璃棒研磨,制成细胞悬液,再将悬液经 0.075 mm

的筛网过滤,去除组织块,离心收集细胞,调整细胞数量至 1×10^6 个/mL,加入 PI 染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。细胞增殖指数(PI 值) = $(S + G_2M) / (G_0G_1 + S + G_2M) \times 100\%$ 。

1.4.4 ASPS 对小鼠淋巴细胞转化率的影响测定

各组选取小鼠 5 只,颈椎脱臼法处死小鼠后,无菌条件下取出脾脏。将脾脏置于预冷的 PBS 缓冲液中研磨成细胞悬液,1 500 r/min 离心 7 min,弃上清,加入 7 mL 红细胞裂解液,37 °C 水浴 10 min,再使用 PBS 清洗 2 遍,用 RPMI 1640 培养基将细胞重悬并计数,调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μ L,药物组再加入 50 μ L ConA(相当于 5 μ g/mL),对照组加入 50 μ L RPMI 1640 培养基,每组设 4 个重复孔,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 72 h。培养 68 h 时,将每孔上清弃去,加入 200 μ L RPMI 1640 维持液(不含小牛血清),每孔再加入 MTT(5 mg/mL)20 μ L,继续培养。培养结束后,每孔加 DMSO 100 μ L,混匀,20 min 后,应用 SpectraMax M2/M2e 仪器检测吸光度。

1.4.5 ASPS 对小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺CD4⁺和 CD3⁺CD8⁺的影响测定 每组选取 5 只小鼠,给药完毕后 1 h,挖眼球采血,并抗凝,每只小鼠采血 1.0~1.5 mL,各标本取 300 μ L 抗凝血,分别加入抗 CD3、CD4 抗体或抗 CD3、CD8 抗体,室温条件下避光放置 30 min 后,分别加入 2 mL 溶血素,振荡混匀,再置于室温下避光 10 min,1 500 r/min 离心 7 min,弃上清,使用 PBS 缓冲液清洗 2 遍,最后将细胞重悬于 1.5 mL PBS 中,流式细胞仪检测。

1.5 数据处理

使用 CELLQUEST 和 SPSS 19 软件处理数据,各指标以平均数±标准差表示,各组间差异比较选用方差分析 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 ASPS 对小鼠脾指数和脾淋巴细胞周期的影响

由表 1 可知,ASPS 药物组脾指数均极显著高于对照组($P < 0.01$),中、高剂量药物组间比较,差异不显著($P > 0.05$)。ASPS 药物组的 G₀G₁ 期细胞比例均低于对照组,但 50 mg/kg 与 100 mg/kg 药物组间差异不显著($P > 0.05$)。而 S 期、G₂M 期细胞比例及 PI 值均极显著高于对照组($P < 0.01$),其中,50 mg/kg 与 100 mg/kg 药物组间 PI 值差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 ASPS 对小鼠脾指数和脾淋巴细胞增殖指数的影响

ASPS 剂量/ (mg/kg)	脾指数	G ₀ G ₁ /%	S/%	G ₂ M/%	PI/%
0(对照)	4.59±0.23	94.66±1.97	3.52±0.21	0.94±0.20	4.49±0.21
25	6.34±0.53a	87.37±2.16a	6.60±0.82a	5.96±0.49a	11.83±0.27a
50	6.74±0.40ab	80.47±0.72ab	11.02±0.41ab	8.24±0.44ab	19.76±0.38ab
100	6.92±0.45ab	80.56±1.00ab	10.75±0.51abc	9.27±0.34abc	19.89±0.41ab

注:同列数据后 a 代表与对照组比较, b 代表与 25 mg/kg 药物组比较, c 代表与 50 mg/kg 药物组比较, 差异极显著 ($P<0.01$), 下同。

2.2 ASPS 对小鼠淋巴细胞转化率及外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

由表 2 可以看出, ASPS 可以显著提高小鼠的淋巴细胞转化率, 各药物组与对照组比较差异极显著 ($P<0.01$), 各药物组间差异极显著 ($P<0.01$)。CD3⁺CD4⁺ 细胞比例, 除 25 mg/kg 药物组低于对照组, 其余各组数值均高于对照组, 且各组间差异均

极显著 ($P<0.01$); 100 mg/kg 药物组 CD3⁺CD8⁺ 细胞比例与对照组相比较, 差异不显著 ($P>0.05$), 其余各组间差异均极显著 ($P<0.01$)。对于 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比值, 25 mg/kg 药物组极显著低于对照组 ($P<0.01$), 50 mg/kg 药物组与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$), 药物组间比较差异均极显著 ($P<0.01$)。

表 2 ASPS 对小鼠淋巴细胞转化率和外周血 T 淋巴细胞亚群的影响

ASPS 剂量/ (mg/kg)	淋巴细胞转化率 (OD 值)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
0(对照)	0.021±0.004	30.246±1.648	13.743±1.452	2.222±0.254
25	0.042±0.006a	27.919±1.478a	17.571±1.426a	1.602±0.193a
50	0.094±0.008ab	38.661±1.564ab	15.826±1.267ab	2.457±0.216b
100	0.113±0.007abc	45.556±1.486abc	13.639±1.593bc	3.381±0.411abc

3 讨论

刺五加是五加科植物刺五加的干燥根及根茎或茎, 具有抗氧化、抗应激、抗疲劳等作用^[3]。临床上广泛用于神经衰弱、糖尿病、动脉硬化等病症的治疗, 同时也被作为强身健体及增加营养的药物。ASPS 的药理作用广泛, 广泛参与人体生理功能的调节, 具有调节免疫、抗癌、抗病毒、抗衰老、抗肥胖、控制血糖、降低胆固醇、降低血脂等多种生理功能^[4-6]。ASPS 是理想的免疫增强剂, 它可以促进 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞等细胞因子的产生^[7], 还具有较强的抗氧化活性^[8]。有研究报道^[5,9], ASPS 具有提高小鼠机体免疫力、抗肿瘤的功能, 具有明显抑制小鼠体内移植瘤生长、增强小鼠细胞免疫力和抗自由基损伤的功能^[10]。

脾脏是机体重要的淋巴器官, 富含各种淋巴细胞, 其中 B 淋巴细胞约占 60%, 主要参与机体的体液免疫功能, T 淋巴细胞约占 40%, 主要参与机体的细胞免疫功能。Pellegrini 等^[11]报道, T 淋巴细胞在体内发挥重要细胞免疫功能。CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞是 T 淋巴细胞的 2 个亚群, 二者的比例直接影响体内免疫功能的平衡^[12], 当比例失调时, 免疫状态失衡, 免疫功能紊乱^[13]。故

CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞的比例, 是衡量机体免疫功能状态的重要指标。当比例增大时, 正向免疫调节占主导作用, 反之, 则负向免疫调节占主导作用^[14]。本研究发现, 灌服 ASPS 的小鼠与对照组小鼠相比, 其脾指数、淋巴细胞转化率和高剂量组的 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 的比值均不同程度的增高。

ASPS 可能通过提高小鼠脾细胞的增殖能力, 上调 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 的比值, 使机体的正向免疫调节占优势, 从而使机体的免疫功能得到提高。ASPS 提高机体的免疫功能具有剂量依赖性, 随着灌服量的增加, 各项指标均不同程度的增加。本研究表明, ASPS 可显著提高机体的免疫功能, 且具有无毒性和无副作用的优点, 值得大力推广。

参考文献:

- [1] 繁磊, 陈瑞战, 张敏, 等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 168-174.
- [2] Greenlee R T, Hill-harmon M B, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001[J]. CA Cancer J Clin, 2001, 51(1): 15-36.
- [3] 王志睿, 林敬明, 张忠义. 刺五加化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(8): 603.

- [4] 榜琴, 张建国. 癌的一种新说——多糖丢失论[J]. 中国新医药, 2004, 3(6): 19-22.
- [5] 杨书良, 王燕, 陈宁. 刺五加多糖的研究现状及进展[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(6): 452-45.
- [6] 魏凤仙, 陈亮, 胡晓飞, 等. 刺五加提取物在饲料中的应用研究进展[J]. 河南农业科学, 2010(9): 138-140.
- [7] 谢蜀生, 许士凯, 张文仁, 等. 刺五加多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1989, 11(5): 338-340.
- [8] 孟庆繁, 于笑坤, 徐睦芸, 等. 刺五加多糖的提取及其抗氧化性[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2005, 43(5): 683-686.
- [9] Bariety J, Bruneval P, Hill G, *et al.* Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(2): 261-274.
- [10] Li X L, Zhou A G. Preparation of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* and its inhibition against irradiation-induced injury of rat[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(2): 219-226.
- [11] Pellegrini J D, De A K, Kodys K, *et al.* Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma[J]. J Surg Res, 2000, 88(2): 200-206.
- [12] Wang M, Li N, Zhang Q, *et al.* Acute influence of FK506 on T-lymphocyte populations of peripheral blood and spleen in rats[J]. Transplant Proc, 2007, 39(1): 292-294.
- [13] Zeng Z C, Tang Z Y, Liu K D, *et al.* Observation of changes in peripheral T lymphocyte subsets by flow cytometry in patients with liver cancer treated with radioimmunotherapy[J]. Nucl Med Commun, 1995, 16(5): 378-385.
- [14] Pozner A, Lotem J, Xiao C, *et al.* Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis[J]. BMC Dev Biol, 2007, 7(1): 84.

(上接第 118 页)

- [13] 孙满吉, 刘彩娟, 张永根, 等. 直接饲喂酵母培养物对奶牛瘤胃发酵的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(5): 1390-1395.
- [14] 张爱忠, 卢德勋, 刘大程, 等. 酵母培养物对绒山羊机体免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2008, 20(2): 163-169.
- [15] 刘观忠, 赵国先, 安胜英, 等. YC 对蛋雏鸡生产性能、肠壁结构及免疫机能的影响[J]. 山东家禽, 2004(10): 10-13.
- [16] 武书庚, 刘质彬, 齐广海, 等. 酵母培养物对产蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(2): 365-371.
- [17] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [18] 高俊. 酵母培养物对肉仔鸡的作用及其机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [19] 周淑芹. 酵母培养物对肉仔鸡的作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [20] 张连忠. 酵母培养物对雏鸡生长性能、免疫器官发育和血清相关激素的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 33-37.
- [21] 刘观忠, 赵国先, 安胜英, 等. 高活性酵母培养物对蛋雏鸡生产性能的影响[J]. 四川畜牧兽医, 2005(1): 30-33.
- [22] Zhibin Liu, Guang Hai, Likyu Yoon. Effects of yeast culture on production parameters and intestinal microflora in laying hens[C]. Poultry Science Association 91st Annual Meeting Abstracts, 2002: 3.
- [23] 郑国清, 杨宏杰. 益康 XP YC 对蛋鸡产蛋性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(6): 50.
- [24] 于素红. 酵母培养物对肉仔鸡生产性能的影响及代谢机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [25] 吕于明. 家禽营养[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 39.