

[文章编号] 1000- 4718(2005)03- 0588- 04

蝉拟青霉多糖对大鼠免疫功能的调节作用*

杨介钻^{1, Δ}, 金丽琴², 吕建新¹, 袁 谦¹, 朱 涛¹(温州医学院¹检验医学与公共卫生学院, ²生物化学教研室, 浙江 温州 325027)

[摘要] 目的: 探讨不同剂量蝉拟青霉多糖对大鼠免疫功能的调节作用。方法: 每天给大鼠称重, 并按所称大鼠体重, 以 50、100、200 mg/kg 的蝉拟青霉多糖(PCPS) 剂量在大鼠后背部皮下注射给药半个月。处死大鼠后称脾和胸腺湿重, 并计算其湿重指数; 计数大鼠外周血白细胞(WBC) 数; 以双试剂终点法测定酸性磷酸酶(ACP)、速率法测定乳酸脱氢酶(LDH) 及测定精氨酸酶(arginase) 等活力; 进行大鼠肺泡巨噬细胞(AM ϕ) 中性红吞噬试验。结果: PCPS 组大鼠脾脏、胸腺湿重指数及白细胞计数显著高于对照组; PCPS 组大鼠肝、肾、脾、胸腺内 ACP、LDH 活力显著升高, AM ϕ 吞噬功能显著增强, AM ϕ 内 ACP、LDH、arginase 活力显著提高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 不同浓度蝉拟青霉多糖能提高大鼠外周血 WBC 数, 激活肺泡巨噬细胞, 并具有剂量依赖性。

[关键词] 蝉拟青霉; 多糖类; 巨噬细胞; 免疫功能

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

蝉拟青霉[*paecilomyces cicadidae(miquel) samson*] 为麦角菌科真菌大蝉草(*cordyceps cicadae shing*) 的分生孢子阶段, 即蝉棒束孢菌及其寄主蝉科昆虫山蝉幼虫的干燥复合体, 为我国传统中药材蝉花[*P. cicadidae*]^[1, 2]。《证类本草》谓其性味甘寒无毒, 《本草纲目》记载蝉花功同蝉蜕。陈祝安^[3]、王砚等^[4]曾对蝉拟青霉的人工培养物(菌丝体) 进行初步药理作用研究, 结果表明: 蝉拟青霉菌丝体具有镇静、镇痛、抗辐射、抗惊厥和解热作用, 而且蝉拟青霉对机体的毒性甚微。而多糖不但能治疗癌症和多种免疫缺损疾病, 还能治疗诸如风湿病之类的自身免疫病^[5]。本文拟研究蝉拟青霉菌丝体多糖(*paecilomyces cicadidae polysaccharides*, PCPS) 对大鼠脏器湿重指数、外周血白细胞(white blood cell, WBC) 数、大鼠脏器组织内酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP, EC 3, 1, 3, 2)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, EC 1, 1, 1, 27) 活力、肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM ϕ) 内 APC、LDH、精氨酸酶(arginase, argase, EC 3, 5, 3, 1) 活性及其摄取中性红能力等的影响, 以探讨不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠免疫功能的调节作用。

材 料 和 方 法

[收稿日期] 2003- 08- 25 [修回日期] 2003- 10- 14

* [基金项目] 浙江省教育厅科研基金资助项目 (No. 20020471)

Δ 现为第一军医大学分子免疫所, 广东 广州 510515

Tel: 0577- 86689751; E- mail: jlq@WZMC.net

1 蝉拟青霉多糖的制备

称取一定量干燥的蝉拟青霉菌丝体, 粉碎后脱脂、脱色素, 然后加入一定体积重的蒸馏水, 于 40 °C 下提取 24 h, 离心, 收集上清; 同样方法提取 3 次, 合并上清液, 用旋转蒸发器浓缩后加入 95% 乙醇沉淀析出多糖, 离心取多糖沉淀; 用蒸馏水溶解沉淀后按 Sevage 法脱蛋白, 再用 95% 乙醇沉淀多糖, 沉淀用无水乙醇多次洗涤, 双蒸水溶解沉淀后流水透析。最后的多糖溶液经真空冷冻干燥得蝉拟青霉多糖粉末, 多糖粉末用生理盐水(normal saline, NS) 配制成 50 g/L 溶液, 用间歇消毒法灭菌后, 分装于 10 mL 抗生素瓶冷冻保存备用。

2 动物分组及处理

雌性清洁级 SD 大鼠[由本院实验动物中心提供, 10- 12 周龄, 体重(253 ± 13) g] 30 只, 随机均分为 5 组, 每组 6 只, 分笼饲养。第 1 组(I) 为 NS 对照组(NS, 2 mL/kg BW); 第 2 组(II) 为蝉拟青霉多糖低剂量组(PCPS, 50 mg/kg BW); 第 3 组(III) 为蝉拟青霉多糖中剂量组(PCPS, 100 mg/kg BW); 第 4 组(IV) 为蝉拟青霉多糖高剂量组(PCPS, 200 mg/kg BW); 第 5 组(V) 为牛膝多糖(*achyrantes bidentata polysaccharides*, ABPS) 组(ABPS, 100 mg/kg BW)。每天在规定时间内, 给大鼠称重, 并按大鼠体重于后背皮下注射给药 1 次, 于同等条件下连续给药半个月。大鼠股动脉放血处死后, 各组用常规方法采血并进行白细胞计数; 剥取大鼠的肝、肾、脾、胸腺等脏器, 称其湿重, 以大鼠最后一次称重去除各脏器, 得湿重指数。

然后各脏器经研磨,离心,弃沉淀,取匀浆上清待用。

3 肺泡巨噬细胞灌洗与培养

AM ϕ 灌洗与培养参见文献^[6]。

4 肺泡巨噬细胞的破碎

AM ϕ 的破碎参见文献^[6],制成破碎的AM ϕ 悬液,待测ACP LDH arginase活力。

5 ACP活性测定

参照文献^[7],以对硝基苯酚磷酸酯为底物全自动生化分析仪(日立7170)双试剂终点法测定。酶活性采用国际单位(U),M ϕ 悬液(含 2×10^9 cells/L)中ACP活力定义为:每升破碎的M ϕ 悬液在pH 5.0、37℃条件下每分钟水解1 μ mol对硝基苯酚磷酸酯所需的酶量为1U;组织中ACP活性定义为:每克湿组织匀浆在37℃、pH 5.0条件下每分钟水解1 μ mol对硝基苯酚磷酸酯所需的酶量为1U。

6 LDH活性测定

按试剂说明书操作。酶活性单位采用国际单位(U),M ϕ 悬液中LDH活性单位规定为:破碎的M ϕ 悬液(含 2×10^9 cells/L)在37℃、每分钟使1 μ mol乳酸转化为丙酮酸所需的酶量为1U;组织中LDH活性单位定义为:每克湿组织匀浆在37℃、每分钟使1 μ mol乳酸转化为丙酮酸所需的酶为1U。

7 Arginase活性测定

按文献^[8]的方法进行。酶活性单位定义为:每升破碎的M ϕ 悬液在37℃、pH 5.0条件下与精氨酸作用30 min产生1.0 mg鸟氨酸为1个活性单位(U)。

8 肺泡巨噬细胞摄取中性红试验

AM ϕ 摄取中性红试验按文献^[6]进行。

9 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 10.0的方差分析(One-way ANOVA)作总体差异显著性检验,各组间两两比较采用LSD法。

结 果

1 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠脾脏、胸腺湿重指数的影响

结果见表1。

2 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠WBC数的影响

结果见表2。

3 不同浓度蝉拟青霉多糖对组织匀浆上清液中ACP活性的影响

结果见表3。

4 不同浓度蝉拟青霉多糖对组织匀浆上清液中LDH活性的影响

结果见表4。

5 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠AM ϕ 内ACP、LDH及arginase活性的影响

结果见表5。

6 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响

用大鼠肺泡巨噬细胞摄取中性红后的吸光度(A)值来表示,结果见表6。

表1 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠的脾脏、胸腺湿重指数的影响

Tab 1 Effects of PCPS on the wet weight index of spleen and thymus of rats($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	Wet weight index(mg/g)	
	Spleen	Thymus
I	2.57 \pm 0.29	1.27 \pm 0.19
II	3.03 \pm 0.35*	1.31 \pm 0.32
III	3.58 \pm 0.68**	1.48 \pm 0.22*
IV	3.80 \pm 0.36**	1.31 \pm 0.36
V	0.27 \pm 0.23*	1.58 \pm 0.21*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group I.

表2 不同浓度蝉拟青霉多糖对大鼠外周血白细胞数的影响

Tab 2 Effects of PCPS on the WBC counts level($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	WBC($\times 10^9/L$)
I	5.4 \pm 1.1
II	8.6 \pm 1.3**
III	9.9 \pm 3.7**
IV	9.9 \pm 2.9**
V	13.0 \pm 4.7**

** $P < 0.01$ vs group I.

表3 不同浓度蝉拟青霉多糖对肝、肾、脾、胸腺内ACP活性的影响

Tab 3 Effects of PCPS on the ACP activities in liver, kidney, spleen, thymus of rats($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	ACP(U/L)			
	Liver	Kidney	Spleen	Thymus
I	121.56 \pm 19.92	81.91 \pm 9.96	156.98 \pm 28.03	26.80 \pm 8.25
II	175.94 \pm 16.23**	102.31 \pm 8.21*	166.48 \pm 18.93	30.91 \pm 7.80
III	181.61 \pm 22.63**	103.88 \pm 12.71*	182.42 \pm 23.76	33.98 \pm 6.56*
IV	190.96 \pm 23.81**	100.75 \pm 2.94*	165.49 \pm 29.14	28.53 \pm 7.17
V	168.71 \pm 12.61**	98.49 \pm 12.73*	181.23 \pm 11.45	26.01 \pm 4.54

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group I.

表4 不同浓度蝉拟青霉多糖对肝、肾、脾、胸腺内LDH活性的影响

Tab 4 Effects of PCPS on the LDH activities in liver, kidney, spleen, thymus of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	LDH(U/L)			
	Liver	Kidney	Spleen	Thymus
I	3 478.0 ± 406.6	1 835.3 ± 310.2	1 261.7 ± 147.4	1 697.7 ± 274.2
II	4 828.2 ± 376.2**	2 339.7 ± 243.9**	1 373.0 ± 174.0	1 808.5 ± 356.0
III	5 010.2 ± 623.8**	2 268.5 ± 349.3*	1 677.3 ± 260.6*	2 030.2 ± 168.1*
IV	4 373.0 ± 331.5**	2 065.5 ± 404.8	1 437.3 ± 203.6*	1 515.5 ± 230.6
V	4 198.7 ± 497.1*	1 786.8 ± 202.5	1 413.8 ± 172.5	1 524.2 ± 225.1

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group I.

表5 不同浓度蝉拟青霉多糖对AMφ内ACP、LDH及arginase活性的影响

Tab 5 Effects of PCPS on the enzymes activity in AMφ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	AMφ		
	ACP(U)	LDH(U)	Arginase(U)
I	19.6 ± 3.1	55.5 ± 14.2	1.2 ± 0.3
II	36.2 ± 7.5**	102.8 ± 16.4**	1.1 ± 0.4
III	41.1 ± 6.8**	88.6 ± 24.5**	3.9 ± 1.1**
IV	49.7 ± 8.3**	134.9 ± 24.5**	1.5 ± 0.2*
V	42.7 ± 6.4**	115.1 ± 24.7**	1.5 ± 0.4*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group I.

表6 各组大鼠AMφ摄取中性红后的吸光度值

Tab 6 Absorbance (A) at 540 nm of neutral red in the AMφ of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	Absorbance
I	0.022 ± 0.012
II	0.114 ± 0.013** ^{△△}
III	0.458 ± 0.285**
IV	0.152 ± 0.034** ^{△△}
V	0.172 ± 0.016** ^{△△}

** $P < 0.01$ vs group I; ^{△△} $P < 0.01$ vs group III

讨 论

脾脏和胸腺都是重要的免疫器官,湿重指数可反映它们的功能状况。本实验发现:与对照组比较,蝉拟青霉多糖能使大鼠脾脏湿重指数显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); 100 mg/kg 剂量组使大鼠胸腺湿重指数显著提高($P < 0.05$)。这表明不同剂量蝉拟青霉多糖均可促进脾脏、胸腺组织细胞生长代谢,改善机体免疫功能。

外周血白细胞包括粒细胞、单核细胞和淋巴细胞,这些细胞参与机体非特异性免疫或特异性免疫。

蝉拟青霉多糖使大鼠外周血WBC数($P < 0.01$)显著升高,从而提高大鼠的免疫功能。

巨噬细胞具有重要的生物学作用,不仅参与非特异性免疫防御,而且广泛参与特异性免疫应答与免疫调节。正常情况下Mφ处于未激活状态,但可为多种免疫增强剂所激活。ACP、LDH及arginase是Mφ激活的标志酶,ACP、LDH及arginase活性随Mφ激活而升高,并随Mφ被抑制而降低^[9,10]。本实验中,各种剂量蝉拟青霉多糖使肝($P < 0.01$)、肾($P < 0.05$)、胸腺($P < 0.05$, 100 mg/kg 剂量)内ACP活性显著升高; 100 mg/kg 蝉拟青霉多糖能使肝、肾、脾、胸腺内LDH活性显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

本实验中,各种剂量蝉拟青霉多糖均能显著增强AMφ摄取中性红的能力($P < 0.01$),且以100 mg/kg蝉拟青霉多糖提高AMφ摄取中性红能力最为显著($P < 0.01$)。Arginase与ACP、LDH一样是Mφ活化的标志酶。AMφ内ACP、LDH、Arginase酶的活性显著高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),表明蝉拟青霉多糖能够激活巨噬细胞。

本实验中,我们发现不同剂量蝉拟青霉多糖激活大鼠巨噬细胞的作用有差异,以100 mg/kg剂量作用最为明显,提示应用蝉拟青霉多糖时须选择合适的剂量。

本实验还发现蝉拟青霉多糖与免疫激活剂牛膝多糖功效相似,在某些方面前者激活作用更强。牛膝多糖的免疫调节作用已得到公认^[11],并已作为商品在临床上应用。因此蝉拟青霉多糖可能有广阔的开发利用前景。

[参 考 文 献]

- [1] 马子密,傅延龄. 历代本草药性汇解[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002. 82- 83.
- [2] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1997. 354- 385.
- [3] 陈祝安. 虫草真菌蝉拟青霉的研究[J]. 真菌学报, 1991, 10(4): 280- 287.
- [4] 王 砚, 赵小京, 唐法娣. 蝉花药理作用的初步探讨[J]. 浙江中医杂志, 2001, 36(5): 219- 220.
- [5] Du G, Ma B, Zhang R, et al. Modulatory effects of compound polysaccharide erweikang on the immune function of mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2002, 22(3): 221- 223.
- [6] 陈秀芳, 金丽琴, 吕建新, 等. 蝉拟青霉多糖对大鼠腹腔及肺泡巨噬细胞的激活作用[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(6): 694- 697.

- [7] 王霞文. 临床生化检验技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995. 152– 153.
- [8] 吕建新, 陈国荣, 金丽琴, 等. 蜂花粉对小鼠腹腔巨噬细胞酶活性的影响[J]. 免疫学杂志, 1993, 9(2): 94– 95.
- [9] Schirmacher V, Bai L, Umansky V, et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 363– 373.
- [10] Garcia I, Guler R, Vesin D, et al. Lethal mycobacterium bovis bacillus calmette guerin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice: cell-mediated immunity requires nitric oxide synthase 2[J]. *Lab Invest*, 2000, 80(9): 1385– 1397.
- [11] 李宗锴, 李电东. 牛膝多糖的免疫调节作用[J]. 药学报, 1997, 32(12): 881– 887.

Immunomodulation of paecilomyces cicadidae polysaccharides on immune function of rats

YANG Jie-zuan¹, JIN Li-qin², LÜ Jian-xin¹, YUAN Qian¹, ZHU Tao¹

(¹Department of Medical Laboratory Science, ²Department of Biochemistry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To explore the immunomodulatory effect of paecilomyces cicadidae polysaccharides (PCPS). **METHODS:** Subcutaneous injection with 50, 100, 200 mg/kg of PCPS were given in the back of the rats everyday for 15 days. The number of white blood cells (WBC) was counted. The activities of acid phosphatase (ACP) and lactase dehydrogenase (LDH) in liver, kidney, spleen and thymus were detected by automatic biochemistry analyzer. The ability of devouring neutral red and activity of ACP, LDH, arginase in alveolar macrophages were also detected. The body weight of the rat everyday during experiment and weight of the spleen and thymus after the rats were killed were measured and wet weight index was calculated. **RESULTS:** The wet weight index of spleen and thymus, the activity of ACP, LDH, arginase and ability of devouring neutral red in alveolar macrophages in the test group treated with PCPS were significantly higher than those in control group. **CONCLUSION:** PCPS shows a significant immunomodulatory effect with the increasing counts of WBC and activation of alveolar macrophages in a dose-dependent manner.

[**KEY WORDS**] Paecilomyces cicadidae; Polysaccharides; Macrophages; Immune function