



猫爪草多糖免疫调节及抗氧化活性研究

吕小华^{1*}, 王会敏², 韩红霞³, 吕世静³, 覃冬云¹

(1. 广东医学院药理学教研室, 广东湛江 524023;

2. 广东医学院临床免疫学教研室, 广东湛江 524023;

3. 广东省中医院二沙岛分院检验科, 广东广州 510105)

[摘要] 目的:探讨猫爪草多糖(polysaccharide of Radix Ranunculi Ternati, PRT)对小鼠免疫功能的调节及抗氧化活性研究。方法:用MTT法检测PRT对小鼠胸腺细胞、脾脏淋巴细胞和腹腔巨噬细胞增殖活性的影响;用中性红比色法检测PRT对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响;采用普鲁士兰法测定PRT的还原能力;水杨酸捕捉法测定PRT对·OH的清除能力;邻苯三酚自氧化法测定PRT对O₂⁻的清除能力。结果:25~400 mg·L⁻¹PRT呈剂量依赖式增强小鼠胸腺细胞和脾脏淋巴细胞增殖功能以及巨噬细胞的吞噬功能;PRT在200 mg·L⁻¹时,对巨噬细胞增殖作用最强;在不同浓度梯度,PRT均表现出一定的还原能力;PRT在8 g·L⁻¹时,接近同浓度Vit C对·OH自由基的清除作用;PRT在800 mg·L⁻¹时,对O₂⁻的清除率达到95.39%。结论:PRT能增强小鼠胸腺细胞、脾脏淋巴细胞和腹腔巨噬细胞增殖能力,且对巨噬细胞有一最佳作用浓度;PRT能增强巨噬细胞的吞噬功能,并呈剂量-效应关系;PRT具有一定的还原能力,具有较强的清除·OH和O₂⁻的能力。

[关键词] 猫爪草多糖;免疫功能;抗氧化;细胞增殖

多糖是来自于高等植物、动物细胞膜、微生物的细胞壁中的天然大分子物质,是所有生命有机体的重要组成成分,并与维持生命所必须的多种功能有关。多糖不仅能激活T细胞、B细胞、巨噬细胞、NK细胞、细胞毒性T细胞、淋巴细胞激活的杀伤细胞等免疫细胞,还能促进细胞因子生成,活化补体,对免疫系统发挥多方面的免疫调节作用。猫爪草甘、辛,温,入肝、肺经,具有清热解毒、软坚化痰、散结消肿、截疟等功效^[1]。临床上主要用于淋巴结核、淋巴结核、肺结核、疟疾、咽喉炎及多种肿瘤的治疗。本研究探讨了猫爪草多糖(polysaccharide of Radix Ranunculi Ternati, PRT)对小鼠免疫功能的调节及抗氧化活性,为进一步研究和开发猫爪草天然植物提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与动物 猫爪草为毛茛科毛茛属植物小毛茛的干燥块根,购于广东省大参林药房,并经作者鉴定为正品,经乙醇回流脱脂、水提取、浓缩、醇

沉、除蛋白、透析、醇沉、真空干燥等程序,得到PRT;KM小鼠,雄性,8周龄,体重(20±2)g,由广东医学院动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2008A028。

1.2 仪器 ELx800全自动酶标仪(美国BIO-TEK公司);752紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂);DELTA 320 PH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.3 试剂 脂多糖(LPS),刀豆蛋白A(ConA, Sigma公司);RPMI1640培养基(GIBCO公司);新生小牛血清(杭州四季青生物工程研究所);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司);其余试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 PRT对小鼠胸腺细胞(脾细胞)增殖的影响 参考文献[2],用0.4%台盼蓝染色计数细胞的活细胞率为95%以上。用RPMI-1640完全培养液稀释细胞悬液,调整细胞至2×10⁶个/mL。将胸腺细胞(脾细胞)悬液接种于96孔培养板,100 μL/孔,按要求分别加入25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹ PRT 100 μL/孔,阴性对照加RPMI-1640完全培养液100 μL/孔,阳性对照加5 mg·L⁻¹ ConA 100 μL/孔(脾细胞阳性对照加10 mg·L⁻¹ LPS 100 μL/孔),6复孔培养,于37℃,5% CO₂培养箱中培养72 h后,加入5 mg·L⁻¹ MTT 10 μL/孔,继续培养4 h,再加入

[稿件编号] 20100107010

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2007009940)

[作者简介] *吕小华,讲师,硕士,研究方向为抗炎免疫药理学, Tel: (0759)2388588, E-mail: lvxiaohua6@tom.com



三联液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 混匀, 放置过夜, 次日用酶标仪检测各孔的吸光度 A_{570} [3]。

2.2 PRT 对小鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响 参考文献[4], 用 0.4% 台盼蓝染色计数巨噬细胞的活细胞率为 95% 以上。用 RPMI-1640 完全培养液稀释巨噬细胞悬液, 调整细胞至 2×10^6 个/ mL 。将巨噬细胞悬液接种于 96 孔培养板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 4 h, 移去培养液, 再用 RPMI-1640 完全培养液洗去未黏附细胞, 贴壁细胞即为巨噬细胞。向 96 孔培养板加入 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PRT 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 阴性对照加 RPMI-1640 完全培养液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 阳性对照加 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 6 复孔培养, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 72 h, 吸弃上清, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 继续培养 4 h, 再加入三联液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 混匀, 放置过夜, 次日用酶标仪检测各孔的吸光度 A_{570} 。

2.3 PRT 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 将上述巨噬细胞悬液接种于 96 孔培养板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 4 h, 移去培养液, 再用 RPMI-1640 完全培养液洗去未黏附细胞, 贴壁细胞即为巨噬细胞。向 96 孔培养板加入 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PRT 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 对照组加 RPMI-1640 完全培养液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 6 复孔培养, 于培养箱中培养 24 h, 吸弃上清; 加入 0.04% 中性红生理盐水溶液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 继续培养 30 min, 弃上清, 用 PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 静置过夜, 待细胞溶解后, 在酶标仪测定 A_{570} 。

2.4 PRT 还原力测定 采用普鲁士兰法 [5], 取不同浓度 PRT 溶液 1 mL, 加入 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.6 的磷酸盐缓冲液 0.25 mL 及 1% 铁氰化钾 0.25 mL, 放置 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min; 冷却至室温, 加入 0.25 mL 10% 三氯乙酸, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL 蒸馏水及 0.1% 三氯化铁溶液 0.1 mL, 充分混匀, 反应 10 min。在 700 nm 波长下测定其吸光度 (蒸馏水调零), 吸光度越高, 样品还原能力越强。

2.5 PRT 对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除试验 [6] 反应体系中加入 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 0.25 mL, 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-无水乙醇 0.25 mL, PRT 溶液 (2, 4, 6, 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.25 mL, 最后加入 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 0.25 mL 启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 以蒸馏

水做参比, 以 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 0.25 mL, 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-无水乙醇 0.25 mL, 蒸馏水 0.25 mL, 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 0.25 mL 做空白对照液, 以 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 0.25 mL, 9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-无水乙醇 0.25 mL, 不同浓度的 PRT 溶液 0.25 mL, 蒸馏水 0.25 mL, 作为多糖的本底吸收值, 在 510 nm 下测量各浓度的吸光度, 吸光度越低, 清除 $\cdot\text{OH}$ 的效果越好。

2.6 猫爪草多糖对超氧阴离子 (O_2^-) 的清除试验 [7]

在具塞试管中依次加入不同浓度 PRT 溶液 4 mL, 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.2 的 Tris-HCl 4 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 10 min, 再加入 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚-盐酸 (4:1) 溶液 1 mL, 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中以跑表计时准确反应 4 min, 立即用 6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1 mL 终止反应。冷却至室温后测定其吸光度并计算抑制率。

2.7 统计分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计分析软件计算相应的统计学参数, 进行单因素方差分析和显著性检验。

3 结果

3.1 PRT 对小鼠胸腺细胞、脾脏淋巴细胞和腹腔巨噬细胞增殖的影响 与对照组相比, 不同浓度的 PRT 能够增强小鼠胸腺细胞、脾脏淋巴细胞和巨噬细胞增殖功能, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中 PRT 对小鼠胸腺细胞和脾脏淋巴细胞的增殖作用具有剂量-效应关系, PRT 对巨噬细胞的作用在 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有一最佳作用剂量, 具有免疫调节剂的明显特征。不同浓度的 PRT 处理小鼠腹腔巨噬细胞后, 其吞噬中性红的活性与对照组相比较有明显差异。表明质量浓度为 25 ~ 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PRT 能够增强小鼠巨噬细胞吞噬功能, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 PRT 还原力测定 PRT 的抗氧化能力, 还原力随着 PRT 的浓度增加而增强, 表明 PRT 能提供电子并将自由基转变为稳定的产物而终止自由基反应链。通过与抗坏血酸比较 700 nm 处吸光度值, PRT 的还原力较抗坏血酸的弱, 但依然有一定的电子给予能力。见表 2。

3.3 PRT 对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除试验 PRT 对反应体系中由 H_2O_2 产生的 $\cdot\text{OH}$ 具有较强的清除作用, 随着 PRT 浓度增高, 清除 $\cdot\text{OH}$ 效应也在增强, 在 PRT 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 接近同浓度抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用。见表 3。



表1 PRT对小鼠胸腺细胞、脾脏淋巴细胞和腹腔巨噬细胞增殖的影响($A, \bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg · L ⁻¹	胸腺细胞 增殖功能	脾脏淋巴细胞 增殖功能	腹腔巨噬细胞	
				增殖功能	吞噬功能
对照	-	0.107 ± 0.010	0.141 ± 0.003	0.131 ± 0.006	0.314 ± 0.006
ConA	5	0.602 ± 0.013	0.404 ± 0.011	-	-
LPS	10	-	0.593 ± 0.009	-	-
PRT	25	0.176 ± 0.007 ²⁾	0.151 ± 0.004 ¹⁾	0.173 ± 0.004 ²⁾	0.389 ± 0.008 ²⁾
	50	0.215 ± 0.003 ²⁾	0.209 ± 0.008 ²⁾	0.221 ± 0.003 ²⁾	0.441 ± 0.008 ²⁾
	100	0.300 ± 0.011 ²⁾	0.309 ± 0.010 ²⁾	0.260 ± 0.008 ²⁾	0.520 ± 0.007 ²⁾
	200	0.417 ± 0.007 ²⁾	0.450 ± 0.008 ²⁾	0.324 ± 0.008 ²⁾	0.609 ± 0.006 ²⁾
	400	0.474 ± 0.008 ²⁾	0.499 ± 0.008 ²⁾	0.275 ± 0.013 ²⁾	0.676 ± 0.009 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

表2 PRT和抗坏血酸的还原力($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量 /g · L ⁻¹	A ₇₀₀	
	PRT	Vit C
2	0.162 ± 0.011	0.588 ± 0.001
4	0.258 ± 0.005	0.613 ± 0.005
6	0.379 ± 0.008	0.650 ± 0.005
8	0.390 ± 0.002	0.684 ± 0.004
10	0.435 ± 0.013	0.711 ± 0.006

表3 PRT对·OH的清除能力($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量 /g · L ⁻¹	清除率/%	
	PRT	Vit C
2	52.93 ± 4.19	96.59 ± 0.26
4	80.13 ± 4.33	97.78 ± 0.00
6	92.26 ± 1.01	98.67 ± 0.00
8	95.08 ± 0.79	98.67 ± 0.00

3.4 PRT对超氧阴离子(O₂⁻)的清除试验

PRT对超氧阴离子(O₂⁻)具有很强的清除作用,且清除率随多糖浓度的增大而增大,在多糖为800 mg · L⁻¹时,清除率达到95.39%,见表4。

表4 PRT对O₂⁻的清除能力($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂量/mg · L ⁻¹	A ₃₂₅	清除率/%
100	0.975 ± 0.006	56.68 ± 0.57
200	0.989 ± 0.009	63.78 ± 0.82
400	0.737 ± 0.008	78.62 ± 0.75
600	0.623 ± 0.009	89.12 ± 0.85
800	0.555 ± 0.007	95.39 ± 0.23

4 讨论

多糖是一种免疫调节剂,具有无细胞毒性的特点,来源不同的多糖对机体的免疫功能具有不同程

度的免疫调节作用。PRT是一种无毒性的、由多种单糖组成水溶性杂多糖^[8],在影响小鼠非特异性免疫方面,PRT可明显提高正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数;在影响小鼠特异性体液免疫方面,可显著促进溶血素的形成并提高外周血中T淋巴细胞数。本研究通过采用水提醇沉法提取猫爪草粗多糖、三氯乙酸法去蛋白得到较纯的PRT,最后产品为灰白色粉末状,多糖含量为98.17%。为了了解本研究所提取的PRT的免疫调节作用,运用了小鼠脾淋巴细胞、胸腺细胞、腹腔巨噬细胞增殖现象和巨噬细胞吞噬现象进行观察,研究发现,25,50,100,200,400 mg · L⁻¹ PRT均能够促进小鼠脾脏淋巴细胞、胸腺细胞、腹腔巨噬细胞增殖的作用,同时也能够增强巨噬细胞吞噬中性红的功能,且呈剂量关系。因为胸腺中T细胞居多,而脾脏中B细胞占60%,因此,说明了PRT在体外能够促进巨噬细胞,T,B淋巴细胞增殖活性及增强巨噬细胞吞噬能力。

机体在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种活性氧自由基(主要是超氧阴离子和羟基自由基),它们独立存在,含有1个或多个不成对电子或分子,正常情况下机体各种抗氧化酶或抗氧化剂能维持活性氧代谢的平衡,一旦这种平衡打破,造成体内活性氧积聚,即可引起机体病变,人类的多种疾病,包括肿瘤、心脑血管病、糖尿病、老年痴呆症以及衰老等都与活性氧自由基有关^[9]。本实验采用还原铁氰化钾方法来测定PRT的还原力。抗氧化剂提供电子给Fe³⁺还原成Fe²⁺形式,700 nm处吸光度值大小反映Fe²⁺数量多少,还原力大小表明了给电子能力,即还原性物质与铁氰化钾反应生成亚铁氰化钾,再与三价铁离子反应生成普鲁士兰,在波长700 nm处测定的吸光度越大,其样品的还原能



力越强。本实验以维生素 C 作为阳性对照,结果显示在 PRT 为 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,接近同浓度抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用;当 PRT 浓度为 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 O_2^- 清除率达到 $(95.39 \pm 0.23)\%$ 。因此可以推断猫爪草多糖具有一定的还原能力、较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 和抑制 O_2^- 的能力,还原性与抗氧化性紧密相关。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005; 223.
 [2] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州:华南理工大学出版社,2001.
 [3] 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;1420.

- [4] 薛庆善. 体外培养的原理和技术[M]. 北京:科学出版社,2001.
 [5] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine [J]. Jpn J Nutr,1986,44:307.
 [6] Jiang Yuhua, Jiang Xiaolu. The antitumor and antioxidative activities of polysaccharides isolated from Isaria farinosa B05 [J]. Microbiol Res,2006(3):112.
 [7] 许伸鸿,杭瑚,李运平. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究与改进[J]. 化学通报,2001,64(8):516.
 [8] 张振凌,吴筱菁. 中药猫爪草有效部位的免疫活性研究[J]. 中华中医药杂志,2007,22(2):120.
 [9] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235(4788):529.

Effects of polysaccharide of Radix Ranunculi Ternati on immunomodulation and anti-oxidation

LV Xiaohua^{1*}, WANG Huimin², HAN Hongxia³, LV Shijing³, QIN Dongyun¹

(1. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical college, Zhanjiang 524023, China;

3. Ersha Island Branch, Guangdong provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510105, China)

[Abstract] **Objective:** To study effects of polysaccharide of Radix Ranunculi Ternati (PRT) on immunological function and anti-oxidation activity of mouse. **Method:** Cell proliferations of splenocyte, thymocyte and peritoneal macrophage were measured by MTT colorimetry. The phagocytic function of peritoneal macrophage was measured by neutral red colorimetric method. The disoxidation power of PRT was measured by Prussian blue method. The clearing effect of PRT on hydroxyl radical was measured by salicylic acid capture method. The clearing effect of PRT on superoxide anion free radical was measured by pyrogallol auto oxidation method. **Result:** PRT among $25\text{--}400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could enhance thymocytes and spleen lymphocyte proliferation and macrophage phagocytosis. PRT ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) has the strongest macrophage proliferation. PRT in different concentration has shown some disoxidation effects. PRT in $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ has nearly the same ability of clearing $\cdot\text{OH}$ by Vit C with the same concentration. The clearance rate of PRT on O_2^- is 95.39%. **Conclusion:** PRT can enhance the cell proliferation capability of thymocytes, spleen lymphocytes and peritoneal macrophages. PRT can enhance macrophage phagocytosis in a dose-response relationship. PRT has saome disoxidation power and strong ability of clearing $\cdot\text{OH}$ and O_2^- .

[Key words] polysaccharide of Radix Ranunculi Ternati; immunological function; anti-oxidation; cell proliferation

doi: 10.4268/cjcm20101421

[责任编辑 张宁宁]