

# 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞功能的影响

张晶<sup>1,2</sup>, 赵伟杰<sup>1,2</sup>

(1. 台州职业技术学院生化制药研发中心, 浙江台州 318000;  
2. 台州职业技术学院生物与化工学院, 浙江台州 318000)

**[摘要]** 目的: 探讨半枝莲多糖增强荷瘤小鼠红细胞膜流动性及其红细胞免疫调节机制。方法: 健康雄性小鼠 48 只, 按体重随机分为正常对照组、模型对照组、黄芪多糖对照组 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、半枝莲多糖低、中、高剂量组 ( $50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。用荧光分光光度计检测荷瘤小鼠红细胞膜流动性; 用紫外分光光度计检测红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力、唾液酸 (SA) 含量、抗氧化酶系的活力。结果: 与模型对照组比较, 半枝莲多糖各剂量组可明显提高 S180 荷瘤小鼠红细胞膜流动性 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 可明显提高红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )、及抗氧化酶系的活力 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 低、中剂量组可增加红细胞膜表面唾液酸含量 ( $P < 0.01$ )。结论: 半枝莲多糖可能通过改善 S180 荷瘤小鼠红细胞膜的功能状态, 提高膜的流动性, 增强红细胞的免疫功能, 从而发挥其抗肿瘤作用。

**[关键词]** 半枝莲多糖; 抗肿瘤; 红细胞膜流动性; 抗氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0265-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013220265

## Effect of *Scutellaria barbata* Polysaccharide on the Function of Erythrocyte Membrane in S180 Tumor-bearing Mice

ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHAO Wei-jie<sup>1,2</sup>

(1. R&D Centre of Biochemistry Pharmacy, Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China;  
2. Department of Biological & Chemical Engineering, Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of *Scutellaria barbata* polysaccharide on the fluidity of

**[收稿日期]** 20130424 (017)

**[第一作者]** 张晶, 硕士, 助教, 从事药物有效成分和活性研究, Tel: 15712693630, E-mail: zwjzj2000@126.com

- [13] 杨国锋, 王鲁宁, 纪建国, 等. Tau 蛋白病的蛋白质研究[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(5): 374.
- [14] 安明, 赵国君. 阿尔茨海默病与炎症[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(6): 680.
- [15] Alvarez X A, Franco A, Fernandez-Novoa L, et al. Blood levels of histamine, IL-1beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer's disease [J]. Mol Chem Neuropathol. 1996; 29(2/3): 237.
- [16] 杜泽英, 李晓玉. 阿尔采末病与免疫炎症反应的相关性[J]. 生理科学进展, 1998, 29(3): 253.
- [17] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group1 protein (HMGB1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. Exp Med, 2000, 192(4): 565.
- [18] Park J S, Arcaroli J, Yum H K, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box1 protein [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(4): C870.
- [19] Messmer D, Yang H, Telusma G, et al. High mobility group box protein1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and the polarization [J]. J Immunol, 2004, 173(1): 307.
- [20] Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Role of high mobility group protein-1 (HMGB1) in amyloid-beta homeostasis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(3): 699.

[责任编辑 李玉洁]

erythrocyte membrane and its mechanism of red cell immune regulation. **Method:** Fourty eight mice were randomly divided into six groups: normal control group, model control group, *Astragalus* polysaccharide group ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), *S. barbata* polysaccharide Dou low, middle, and high dose group ( $50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The membrane fluidity of erythrocytes in tumor-bearing mice was determined by fluorescence spectrophotometry; the erythrocyte membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity sialic acid (SA) content, antioxidant enzymes activity were detected by UV spectrophotometer. **Result:** Compared with the modle group, *S. barbata* polysaccharide low dose, middle dose, high group could obviously improve the fluidity of erythrocyte membrane in S180 tumor-bearing mice ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), obviously increase the red cell membrane  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity ( $P < 0.01, P < 0.05$ ) and antioxidant enzymes activity ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); low, middle group increased sialic acid content of red cell membrane surface ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *S. barbata* polysaccharide can increase the fluidity of erythrocyte membrane and enhance the immune function of erythrocyte in S180 tumor-bearing mice, thus it may exert aiti-tumor effect by improving the function of erythrocyte membrane.

[ **Key words** ] *Scutellaria barbata* polysaccharides; anti-tumor; fluidity of erythrocyte membrane; antioxidant activity

多糖是继黄酮类、多酚类、皂苷类及鞣质类之后从天然动植物中发现的又一类抗氧化活性成分,是来自于高等植物、动物细胞膜、微生物细胞壁中的天然大分子物质,具有广泛的生物活性,如抗肿瘤、抗炎、抗凝血、抗病毒、降血糖、抗辐射、降血脂等功效,并且作为免疫调节剂,具有激活免疫细胞、改善机体免疫功能等作用<sup>[1]</sup>。红细胞免疫作用是免疫系统中的一个子系统,其作用是其他免疫功能不可代替的,是中药抗肿瘤免疫调节作用研究的一个重要内容<sup>[2]</sup>。因此,作者在研究半枝莲多糖抗肿瘤作用的基础上<sup>[3]</sup>,初步探讨半枝莲多糖与红细胞免疫功能的关系,为进一步阐述半枝莲多糖的抗肿瘤作用机制提供免疫学依据。

## 1 材料

**1.1 药品** 30% 半枝莲多糖 (SBP, 徐州弘康科技有限公司, 批号 20070807), 黄芪多糖 (APS, 由哈尔滨商业大学博士后工作站自制), 考马斯亮蓝蛋白测试盒 (批号 20071106), ATP 酶测试盒 (批号 20071101)、唾液酸 (SA) 测试盒 (批号 20070910)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒 (批号 20071010)、过氧化氢酶 (CAT) 测试盒 (批号 20071101)、丙二醛 (MDA) 测试盒 (批号 20071103)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测试盒 (批号 20070909), 均为南京建成生物工程研究所提供。

**1.2 仪器** Avanti™ 68 型低温高速离心机 (Beckman Coulter), HH-4 型电热恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), RF-540 型荧光分光光度计 (日本岛津公司), 752 型紫外-可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司)。

**1.3 动物和瘤株** 昆明种清洁级健康雄性小鼠, 体重 ( $20 \pm 2.0$ ) g; S180 (肉瘤) 细胞株, 均购自哈尔滨医科大学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK (黑) 20020002。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 小鼠随机分成 6 组, 每组 8 只, 半枝莲多糖低、中、高剂量组 ( $50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、阳性对照组黄芪多糖 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、正常对照组和模型对照组 (同体积生理盐水)。于接种 24 h 后开始无菌操作 ip 给药, 1 次/d, 连续 10 d。

**2.2 动物模型制作** 无菌条件下抽取接种第 7 天的生长良好的 S180 荷瘤小鼠腹水 (活瘤细胞数  $> 97\%$ ), 无菌生理盐水 1:3 稀释, 按  $0.2 \text{ mL}/\text{只}$  (细胞密度约  $2 \times 10^7$  个/mL), 小鼠右前腋皮下接种。

**2.3 红细胞膜的制备** 停药次日眼球后采血, 新鲜血液  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清液, 加 PBS  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 洗涤 3 次, 再以 1:1 悬浮于 PBS 制成红细胞悬液, 血球计数板计数。红细胞悬液加入  $5 \text{ mL } 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ pH } 7.4$  Tris-HCl 溶液, 同时加入蛋白酶抑制剂对甲苯磺酰氟 (PMSF),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  溶血 12 h, 将所得红细胞溶血液以  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 15 min, 弃上清,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ pH } 7.4$  Tris-HCl 溶液洗涤 3 次, 同上离心, 吸取白色沉淀物, 最后 1:1 悬浮在 pH 7.4 PBS 缓冲液中<sup>[4]</sup>。

**2.4 S180 荷瘤小鼠红细胞膜流动性的测定** 使用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 按照说明书, 应用紫外分光光度计测定红细胞膜 (制备方法同 2.3) 总蛋白 A 值, 根据公式计算出红细胞膜总蛋白的含量, 再稀释红细胞膜悬液使其蛋白终质量浓度相同 ( $0.1 \text{ g} \cdot$

$L^{-1}$ )。取 1 mL 新配制的  $2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  荧光探针 1,6-二苯基 1,3,5 己三烯 (DPH, Sigma 公司) 标记液分别加入到 0.5 mL 红细胞膜缓冲液中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  温浴 30 min,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 用 PBS 液洗涤 1 次, 最后将细胞悬浮于 4 mL PBS 液中, 测荧光偏振度。检测方法及计算方法参照文献[5-6], 并根据公式分别计算偏振度 (P)、微黏度 ( $\eta$ ) 和红细胞膜膜脂流动性 (LFU)。

**2.5** S180 荷瘤小鼠红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力的测定 按照 2.3 方法制备红细胞膜泡影, 并按 2.4 方法测定总蛋白含量 (膜蛋白终质量浓度  $0.1 \text{ g} \cdot L^{-1}$ )。按照试剂盒要求测定  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力。

**2.6** S180 荷瘤小鼠红细胞膜唾液酸的测定 按 2.4 方法制备红细胞膜泡影, 并按 2.5 方法测定总蛋白含量 (膜蛋白终质量浓度  $0.1 \text{ g} \cdot L^{-1}$ )。按试剂盒要求测定 SA 含量。

**2.7** S180 荷瘤小鼠红细胞膜抗氧化酶系活力的测定<sup>[7]</sup>

**2.7.1** SOD 活力的测定 小鼠眼球取血, 冲入盛有生理盐水的离心管中, 离心 3 min, 弃上清, 加入冷双蒸水 0.2 mL, 混匀。加入乙醇 0.1 mL, 震荡 30 s, 加入三氯甲烷 0.1 mL 置漩涡混匀器混匀 1 min, 离心 8 min。取上清液, 按照试剂盒要求, 测定 SOD 活力。

**2.7.2** CAT 活力测定 取小鼠的新鲜血液 50  $\mu\text{L}$  加双蒸水至 2.5 mL 配成 1:49 的溶血液待测。按照试剂盒要求, 进行 CAT 活力的测定。

**2.7.3** GSH-Px 活力测定 按 2.3 方法制备红细胞膜泡影, 并按照 2.4 方法测定总蛋白含量 (膜蛋白终质量浓度  $0.1 \text{ g} \cdot L^{-1}$ )。按试剂盒要求, 测定 GSH-Px 活力。

**2.7.4** MDA 含量测定 取肝素抗凝全血 0.15 mL, 加生理盐水, 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀的红细胞加双蒸水, 在漩涡混匀器上混匀 1 min 使细胞充分溶解。得到的溶血液加无水乙醇, 在漩涡混匀器上充分混匀 30 s; 再加三氯甲烷置混匀器上混匀 1 min, 再离心 5 min。取上清液, 按照试剂盒要求, 测定 MDA 含量。

**2.8** 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析。  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜流动性的影响 与

模型组比较, 半枝莲多糖低、中、高剂量组均可明显增加膜脂流动性 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 明显降低偏振度和微黏度 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜流动性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	P / $\%$	$\eta$ / $\text{mPa} \cdot \text{s}$	LFU
正常对照	-	$0.259 \pm 0.003$	$2.579 \pm 0.061$	$3.591 \pm 0.114$
模型对照	-	$0.293 \pm 0.006$	$3.520 \pm 0.217$	$2.411 \pm 0.178$
黄芪多糖	100	$0.266 \pm 0.006^{2)}$	$2.757 \pm 0.151^{1)}$	$3.295 \pm 0.232^{2)}$
半枝莲多糖	50	$0.273 \pm 0.004^{1)}$	$2.912 \pm 0.108^{1)}$	$3.061 \pm 0.144^{2)}$
	100	$0.265 \pm 0.007^{2)}$	$2.711 \pm 0.168^{2)}$	$3.371 \pm 0.266^{2)}$
	200	$0.276 \pm 0.007^{1)}$	$3.003 \pm 0.195^{1)}$	$2.951 \pm 0.259^{1)}$

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

**3.2** 对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力和 SA 含量的影响 与模型组比较, 半枝莲多糖组、黄芪多糖各剂量组均能提高荷瘤小鼠红细胞  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力, 其中半枝莲多糖中剂量组、黄芪多糖组  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活力提高更明显 ( $P < 0.01$ ), 半枝莲多糖低、高剂量组有明显差异 ( $P < 0.05$ ); 与模型比较, 半枝莲多糖低、中剂量组能显著提高红细胞膜唾液酸含量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 高剂量组与模型组无明显差异。见表 2。

表 2 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活力和 SA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SA / $\text{mmol} \cdot L^{-1}$
正常对照	-	$0.659 \pm 0.167$	$2.14 \pm 0.496$
模型对照	-	$0.316 \pm 0.182$	$1.730 \pm 0.203$
黄芪多糖	100	$0.636 \pm 0.177^{2)}$	$1.952 \pm 0.154^{1)}$
半枝莲多糖	50	$0.561 \pm 0.161^{1)}$	$1.948 \pm 0.136^{1)}$
	100	$0.631 \pm 0.172^{2)}$	$2.024 \pm 0.134^{2)}$
	200	$0.519 \pm 0.058^{1)}$	$1.840 \pm 0.128$

**3.3** 对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜氧化酶系的检测 与模型组比较, 半枝莲多糖各剂量组、黄芪多糖组都能明显提高荷瘤小鼠红细胞 GSH-Px, SOD, CAT 活力, 其中半枝莲多糖中剂量组 GSH-Px, SOD, CAT, 低剂量组 GSH-Px 提高更明显 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 半枝莲多糖各剂量组、黄芪多糖组 MDA 的含量显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 3。

### 4 讨论

细胞膜的流动性是指生物膜具有类似于液体那

表 3 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜氧化酶系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	CAT/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·L <sup>-1</sup>
正常对照	-	11.809 ± 0.466	84.397 ± 3.331	268.134 ± 22.026	3.459 ± 0.133
模型对照	-	8.756 ± 0.348	62.182 ± 1.764	213.909 ± 7.258	6.530 ± 0.170
黄芪多糖	100	10.011 ± 0.739 <sup>2)</sup>	67.122 ± 4.242 <sup>1)</sup>	248.856 ± 3.387 <sup>2)</sup>	3.979 ± 0.200 <sup>2)</sup>
半枝莲多糖	50	10.307 ± 0.575	66.881 ± 3.809 <sup>1)</sup>	248.680 ± 15.879 <sup>2)</sup>	6.303 ± 0.148 <sup>1)</sup>
	100	10.910 ± 0.341 <sup>2)</sup>	72.721 ± 5.213 <sup>2)</sup>	245.423 ± 12.798 <sup>2)</sup>	3.971 ± 0.134 <sup>2)</sup>
	200	9.339 ± 0.443 <sup>1)</sup>	65.568 ± 3.048 <sup>1)</sup>	222.535 ± 3.669 <sup>1)</sup>	5.403 ± 0.219 <sup>2)</sup>

样流动的物理特性,是细胞膜的重要动力学特性,也是生物膜的主要特征,通常是指细胞或胞器膜上膜脂质的运动,是维持生物膜正常功能的必要条件,适宜的膜流动性对维持膜的生理功能(如膜上酶的活性、膜的通透性、物质转运、能量转换、信息传递等)具有重要的作用<sup>[8]</sup>。大量实验证明,许多疾病与生物膜脂流动性的变化有关,疾病条件下及药物作用后细胞膜都会有流动性的变化,而且发现许多疾病除实质器官的细胞膜脂病变外,常伴有红细胞膜的异常<sup>[9]</sup>。

红细胞的氧化易造成红细胞的衰老,使细胞膜的流动性降低,导致红细胞的死亡,降低红细胞的免疫功能,加速肿瘤细胞的增殖,所以增强红细胞的抗氧化能力有助于提高机体的抗肿瘤作用。另外,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 作为第二信使和细胞功能的重要调节者,对维护机体的生理功能有重要的作用。在正常情况下,红细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 含量极微(48 μmol·L<sup>-1</sup>),细胞外的浓度(10 ~ 15 mmol·L<sup>-1</sup>)要高得多。若 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的活力降低,则细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 将积聚过多,过多积累的 Ca<sup>2+</sup> 会引起红细胞膜骨架网络和表面电荷减少(SA 是红细胞表面负电荷的主要来源,参与红细胞膜的许多生物学现象),膜脂流动性降低,使细胞的通透性下降,有害物质容易进入细胞,营养物质也容易流出细胞,红细胞的生理功能发生混乱,而使红细胞天然免疫黏附肿瘤细胞的能力下降<sup>[11]</sup>。

本实验结果显示,半枝莲多糖能够改善 S180 荷瘤小鼠红细胞的生理功能,参与抗肿瘤作用的可能机制是:增强红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的活力,维持胞内低 Ca<sup>2+</sup> 稳态,提高红细胞抗氧化能力,改

善红细胞膜的流动性,恢复红细胞表面带电性能,有利于其表面免疫黏附肿瘤细胞的功能,而发挥间接抗肿瘤作用。

### [参考文献]

[1] 李循,孔繁智,朱婉萍. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(2):113.

[2] 甘慧,孙萍. 红细胞免疫研究的历史、现状和前景[J]. 国外医学:免疫学分册,2005, 28(4):227.

[3] 张秀娟,张丽娟,张晶,等. 半枝莲多糖的纯化及对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(1):6.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:769.

[5] 季宇彬,汲晨鋒,邹翔,等. 2 种仙人掌多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞膜蛋白和膜脂流动性影响的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(10):967.

[6] 陈云华,孙建宇. 当归补血汤对急性缺氧小鼠红细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(10):41.

[7] 徐颖,刘春芳,杨滨,等. 黄连对正常小鼠红细胞的影响及其抗氧化属性研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(21):3288.

[8] 李新毅,穆俊霞. 椎-基底动脉缺血性眩晕患者红细胞膜流动性改变的临床观察[J]. 中国中医急症, 2006, 15(4):350.

[9] 刘洁,李智,刘蔚,等. 北豆根水提物对小鼠红细胞膜流动性和血常规的影响[J]. 解放军药学学报, 2007, 23(3):170.

[10] 姚伟娟,谢利德,喀蔚波,等. 钙离子对红细胞流变特性的影响及其微观机制分析[J]. 北京生物医学工程,1999,18(4):249.

[责任编辑 李玉洁]