

不同分子量段黄芪多糖对整体及黏膜免疫功能的影响

吴瑕, 杨薇, 张磊*, 李东晓

(四川省中医药科学院, 中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 成都 610041)

[摘要] 目的: 研究具有不同重均相对分子质量的黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 免疫调节作用的差异。方法: 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CY) $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sc}$ 给予复制整体免疫低下小鼠模型, 重均相对分子质量分别为 $(157.7, 69.9, 22.4, 13.2, 1.4) \times 10^3$ 的 APS 按 $139 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续 ig 给予 14 d, 分别检测小鼠血清溶血素水平、2,4 二硝基氟苯 (DNFB) 所致小鼠迟发型超敏反应耳肿胀度、腹腔巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 以表征不同相对分子质量段样品对细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫的影响; CY 按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sc}$ 给予复制黏膜免疫低下小鼠模型, 同上药物处置, 检测小肠和肺灌洗液中分泌型免疫球蛋白 A (secreted immunoglobulin A, sIgA) 水平, 小肠 Peyer's 结变化, 以表征样品对黏膜免疫的影响。结果: 总 APS 及 157.7×10^3 , 69.9×10^3 APS 均可不同程度提高吞噬指数、吞噬率、耳肿胀度和溶血素水平, 促进肠道及肺 sIgA 分泌, 且在同等剂量下, 具有较大相对分子质量的 157.7×10^3 APS 作用强于总 APS 及较小相对分子质量的组分。结论: 较大相对分子质量 APS 可促进免疫低下小鼠整体及黏膜免疫功能, 可能是黄芪免疫药理作用的主要物质基础。

[关键词] 黄芪多糖; 黏膜免疫; 环磷酰胺; 细胞免疫; 体液免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)18-0169-04

Effect of Astragalus Polysaccharide Segments with Different Molecular Weight on Systemic/Mucosal Immunization in Immunodepressive Mice

WU Xia, YANG Wei, ZHANG Lei*, LI Dong-xiao

(Sichuan Provincial Key Laboratory of Quality & Innovation Research for Chinese Materia Medica, Sichuan Academy of Chinese Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** The investigate effects of astragalus polysaccharide (APS) segments with different molecular weight (Mw) on immunoregulation. **Method:** The systematic immunodepressive mice were prepared through subcutaneous injection of cyclophosphamide (CY) at the dose of $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and APS segments with different Mw ($157.7, 69.9, 22.4, 13.2, 1.4 \times 10^3$) were then ig administrated for 14 days by the dose of $139 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Serum hemolysin, DNFB induced mice ear edema and the phagocytosis of peritoneal macrophage were used to characterize the effects of samples on cellular immunity, humoral immunity and non-specific immunity respectively. Mucosal immunodepressive mice were prepared through subcutaneous injection of CY ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and were administrated with the same samples as above. Secreted immunoglobulin A (sIgA) in lung and intestine irrigating solution, alteration of peyer's patches in intestine were observed to study the effect of samples on mucosal immunity. **Result:** Phagocytosis index, phagocytosis rate, ear edema, serum hemolysin level and sIgA level in intestine and lung were increased by total APS and samples with larger Mw to different extent, and the 157.7×10^3 APS behaved the strongest effects for most indicators. **Conclusion:** APS with larger molecule weight could improve both systemic and mucosal immunity in immunodepressive mouse, and its effects were stronger than APS with

[收稿日期] 20110301(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801537);四川省杰出青年学术技术带头人培育计划项目(2010JQ0057)

[第一作者] 吴瑕, 助理研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: romeobox@163.com

[通讯作者] * 张磊, 博士, 副研究员, Tel: 13980902655, E-mail: okok5151@163.com

lower molecular weight. This molecular segment of polysaccharide might be the main active substances of astragalus responsible for its immunomodulatory effect.

[**Key words**] astragalus polysaccharide; mucosal immunity; cyclophosphamide; cellular immunity; humoral immunity

黄芪的免疫药理作用涉及大部分免疫器官及主要的免疫相关细胞;既可影响特异性免疫,亦可影响非特异性免疫;既可影响免疫细胞自身代谢,亦可影响其功能^[1]。这些报道为研究黄芪的药理作用提供了较多实验基础,但对相关机制仍了解甚少,尤其是对这些作用的具体物质基础及相应始动因素缺乏认识。我们的前期研究表明,黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是黄芪免疫增强作用的主要药效成分,尤其在增强黏膜免疫方面具有独特作用,可上调肠道及呼吸道分泌型免疫球蛋白 A (secreted immunoglobulin A, sIgA) 分泌,且具有一定的时序性,即先出现肠道 sIgA 分泌增加,而呼吸道的表现较为缓慢但更持久^[2-4]。由于 APS 是一系列不同相对分子质量或不同结构的多糖组成的复杂混合物,为进一步明确其免疫增强的物质基础及相应机制,我们采用分步醇沉联合凝胶层析获得了具有较均一相对分子质量的不同相对分子质量 APS^[5]。本研究将就不同相对分子质量段 APS 对整体及黏膜免疫功能的影响进行研究,并与总 APS 和具有较明确整体免疫增强作用的云芝多糖进行对比,以期为后续针对黏膜免疫的深入研究提供更宽泛的实验基础。

1 材料

1.1 药物 提取 APS 所用黄芪为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge., 本院舒光明研究员鉴定为正品;总 APS (本院制剂室提供, TAPS, 含量 66%);不同浓度醇沉分段 APS (中国科学院成都生物研究所提供,重均相对分子质量分别为 157.7, 69.9, 13.2, 6.8, 1.4×10^3 的 5 种样品,含量 95%);云芝多糖 (coriolus versicolor polysaccharide, CVPS, 含量 50%), 购于陕西秦光生物化工有限责任公司,批号 100504X。

1.2 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 (20 ± 2) g, SPF 级,四川省中医药科学院实验动物研究室提供,实验动物生产许可证号 SCXK(川)2005-19 号。

1.3 试剂 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CY), 上海华联制药有限公司,批号 20100103;2,4 二硝基氟苯 (DNFB), Sigma; 羧甲基纤维素钠

(carboxymethylcellulose sodium, CMC), 成都科龙化工试剂厂,批号 090216。

1.4 仪器 722 分光光度计, Nihon Kohden; 光学显微镜, Olympus。

2 方法

2.1 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 小鼠 100 只,按体重 (18 ~ 22 g) 分层随机均分为 10 组,分别为:空白对照组、混悬剂对照组 (0.5% CMC)、模型对照组 (0.5% CMC)、TAPS 组 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);不同相对分子质量段 APS 组 ($139 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 包括重均相对分子质量分别为 (157.7, 69.9, 22.4, 13.2, 1.4×10^3) 的 5 种样品);CVPS 对照组 ($264 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。不同相对分子质量段 APS 和 CVPS 剂量系根据 TAPS 总多糖含量折算,使各给药组给予试验药物的总多糖含量一致。ig 给予试验药物或 0.5% CMC, 每日 1 次,连续 14 d。除空白对照组和混悬剂对照组外,给药第 8, 10, 12 天按 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc 给予环磷酰胺,造成免疫低下。第 13, 14 天分别 ip 6% 淀粉溶液 1 mL;至第 14 天末次给药后 1 h, ip 5% 鸡红细胞生理盐水悬液 1 mL/只, 30 min 后,颈椎脱臼处死动物, ip 生理盐水 2 mL, 并轻揉腹部。1 min 后剪开腹部,吸取腹腔液 1 mL, 平均分滴于 2 片载玻片上,放入湿盒内, 37 °C 温育 30 min。后于生理盐水中漂洗, 晾干, 并以 1:1 丙酮-甲醇溶液固定, 4% Giemsa-PBS 染色 3 min, 蒸馏水漂洗晾干, 镜检, 计算吞噬率和吞噬指数。

2.2 对 DNFB 致小鼠迟发型超敏反应的影响 动物分组、给药及造模同 2.1。给药第 9 天以 1% DNFB 溶液 (取 100 mg DNFB 加入到 1:1 的丙酮-植物油混合物中混匀, 定容至 10 mL) 25 μL 涂抹小鼠腹部。至第 13 天给药后 1 h, 取 10 μL 1% DNFB 溶液涂抹于小鼠左耳;涂抹后 24 h, 即末次给药后 1 h 颈椎脱臼处死动物, 耳片称重, 计算耳肿胀度。

2.3 对小鼠血清溶血素生成的影响 动物分组、给药及免疫低下造模同 2.1。给药第 9 天 ip 给予 5% 鸡红细胞生理盐水悬液, 末次给药后 1 h 眼眶取血 20 μL , 加入 1 mL 生理盐水中。随后加入 10% 豚鼠

血清和4%鸡红细胞生理盐水悬液,轻摇混匀,37℃温育30min,离心取上清1mL,加入3mL血红蛋白稀释液,540nm测定吸光度(A)。

2.4 对小鼠小肠及呼吸道sIgA分泌和小肠P氏结(Peyer's Patch,PP)数量的影响 动物分组、给药同**2.1**。除空白对照组和混悬剂对照组外,给药第8,9天按50mg·kg⁻¹sc连续给予环磷酰胺,造成肠道sIgA分泌减少的黏膜免疫低下模型。第14d末次给药后次日处死动物,取小肠肠道和呼吸道以0.9%生理盐水常规灌洗,离心取上清,ELISA测定sIgA浓度;小肠灌洗后计数其中PP数量及所有PP的面积总和(直径以最长径和最短径的均值计)。

2.5 结果统计 试验结果均以SPSS 16.0进行单

因素方差分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠整体免疫功能的影响 结果如表1所示。环磷酰胺可致小鼠特异性及非特异性免疫功能均呈低下状态,表现为腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数、DNFB所致耳肿胀反应及鸡红细胞所致溶血素生成反应均明显降低。TAPS及重均分子量(69.9,157.7)×10³的分段APS连续ig给予14d,均可不同程度提高上述指标的反应程度,且以分子量最大的157.7×10³APS作用最强,其对吞噬指数及溶血程度2指标的增强作用优于等总多糖含量的TAPS。

表1 不同相对分子质量段APS对环磷酰胺所致免疫低下小鼠整体免疫功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	吞噬率/%	吞噬指数	耳肿胀度/mg	溶血程度/A
空白对照	-	0.38 ± 0.06 ²⁾	1.13 ± 0.21 ²⁾	10.02 ± 1.64 ²⁾	0.202 ± 0.041 ²⁾
混悬剂对照	-	0.40 ± 0.09 ²⁾	1.08 ± 0.18 ²⁾	10.33 ± 1.07 ²⁾	0.194 ± 0.031
模型对照	-	0.17 ± 0.07	0.46 ± 0.11	5.93 ± 0.61	0.070 ± 0.015
TAPS	200	0.25 ± 0.11	0.61 ± 0.13 ¹⁾	7.11 ± 1.09 ¹⁾	0.086 ± 0.022
APS/157.7 × 10 ³	139	0.32 ± 0.10 ²⁾	0.75 ± 0.13 ²⁾	8.04 ± 1.55 ²⁾	0.129 ± 0.030 ²⁾
APS/69.9 × 10 ³	139	0.26 ± 0.08 ²⁾	0.64 ± 0.17 ¹⁾	7.31 ± 1.06 ¹⁾	0.098 ± 0.029 ¹⁾
APS/22.4 × 10 ³	139	0.22 ± 0.11	0.45 ± 0.19	7.14 ± 1.72	0.081 ± 0.032
APS/13.2 × 10 ³	139	0.21 ± 0.07	0.40 ± 0.11	5.10 ± 0.82	0.070 ± 0.019
APS/1.4 × 10 ³	139	0.24 ± 0.12	0.47 ± 0.18	5.28 ± 1.51	0.065 ± 0.029
CVPS	264	0.36 ± 0.11 ²⁾	0.82 ± 0.23 ²⁾	7.02 ± 1.82 ²⁾	0.082 ± 0.015

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.2 对小鼠黏膜免疫功能的影响 结果如表1所示。环磷酰胺可致肠道及呼吸道黏膜免疫功能低下,可表现为PP数量及大小的降低、主要效应分子

sIgA分泌减少。TAPS及157.7×10³APS连续ig给予14d,可提高小肠sIgA水平,增加PP总面积,后者尚可见提高呼吸道sIgA水平。

表2 不同相对分子质量段APS对环磷酰胺所致免疫低下小鼠黏膜免疫功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	小肠sIgA/μg·L ⁻¹	呼吸道sIgA/μg·L ⁻¹	PP数量/个	PP总面积/mm ²
空白对照	-	377 ± 63.5 ²⁾	296 ± 46.5 ²⁾	11.5 ± 3.7 ¹⁾	29.9 ± 4.4 ²⁾
混悬剂对照	-	352 ± 78.7 ²⁾	311 ± 65.3 ²⁾	12.1 ± 3.1 ²⁾	30.8 ± 4.2 ²⁾
模型对照	-	132 ± 28.8	181 ± 32.1	7.3 ± 2.1	12.7 ± 4.1
TAPS	200	205 ± 24.9 ²⁾	207 ± 47.7	8.5 ± 2.6	17.3 ± 3.8 ¹⁾
APS/157.7 × 10 ³	139	241 ± 32.1 ²⁾	226 ± 34.8 ¹⁾	9.3 ± 3.0	22.0 ± 5.9 ²⁾
APS/69.9 × 10 ³	139	226 ± 26.7 ²⁾	210 ± 38.4	7.9 ± 2.3	16.5 ± 3.6
APS/22.4 × 10 ³	139	147 ± 31.5	195 ± 48.3	7.1 ± 2.8	14.2 ± 3.7
APS/13.2 × 10 ³	139	122 ± 34.8	187 ± 38.1	7.9 ± 2.8	12.9 ± 2.8
APS/1.4 × 10 ³	139	134 ± 35.5	176 ± 46.2	7.2 ± 3.1	13.1 ± 3.3
CVPS	264	148 ± 30.6	182 ± 40.8	7.5 ± 2.4	13.9 ± 2.7

4 讨论

黄芪始载于《神农本草经》，其主要药效成分包括 APS、黄酮类及皂苷类，黄酮类化合物有黄酮、异黄酮、异黄酮和紫檀烷等 4 类，皂苷类包括黄酮皂苷及大豆皂苷。其中，黄酮类主要表现为心血管活性，皂苷类主要与抗衰老和免疫调节有关，APS 则是黄芪免疫增强或调节作用的主要物质^[2, 6-8]，其效应涉及免疫系统相关的多个环节、多种免疫细胞及细胞因子。黄芪及其复方的临床应用又以其为主药的复方在临床上的许多应用，包括提高免疫力、预防上呼吸道感染、抗肿瘤等^[9]，均与免疫增强作用有关。

有较多 APS 免疫活性研究采用腹腔注射，或将 APS 直接作用于体外培养的目标细胞，虽均能在不同层面对 APS 的药理学效应提供参考，但鉴于 APS 在经口给予后代谢吸收过程复杂且并不明确，而黄芪及其复方的临床应用又以口服为主，故体内研究仍应是评价、阐释其作用及作用机制的主要途径和依据。既有文献显示在 ig 给予情况下，APS 可使免疫异常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性，T 细胞增殖及抗体分泌趋于正常，提示其对受损的整体免疫功能有一定修复作用^[2, 8, 10]。但目前相关报道仍较少，且多仅限于证明 APS 具有免疫调节作用，对具体机制则缺乏进一步研究，其直接原因之一在于 APS 本身及其体内过程的复杂性，因此对 TAPS 进行不同目标的分离将有助于明确上述药理作用的物质基础和作用机制。除单一多糖外，目前的分离目标主要有两个，一类是特定结构，另一类是特定分子量范围。已有研究表明多糖的这两个特征与其药理活性存在联系，例如由阿拉伯半乳聚糖、含有果胶的阿拉伯半乳聚糖或果胶组成的 APS 可能具有较高免疫调节活性^[11]，而不同分子量多糖也可能具有不同的药理活性^[12]。

本研究显示 APS 具有与既有报道类似的药理作用，经口给予可改善环磷酰胺所致免疫低下小鼠的整体免疫水平，包括以腹腔巨噬细胞吞噬活性表征的非特异性免疫、以血清溶血素水平表征的体液免疫、以迟发型超敏反应表征的细胞免疫，以及以 sIgA 和 PP 表征的黏膜免疫水平。与 TAPS 相比，相同总糖含量的大分子量 APS 对上述指标均显示更强或类似的活性，提示后者中含有更多改善免疫异常状态的有效成分。其具体机制目前尚不清楚，但

我们已进行的另一项研究表明，大分子量 APS 较小分子量者与肠道 PP 或 M 细胞有更多的黏附，而后者是黏膜免疫的重要诱导位点，这也是我们后续研究的重要内容和方向。

5 结论

较大分子量 APS 可促进免疫低下小鼠整体及黏膜免疫功能，可能是黄芪免疫药理作用的主要物质基础。

[参考文献]

- [1] 刘启,熊南山,程斌. 黄芪免疫药理学研究进展[J]. 中国中医药杂志, 2004(6): 321.
- [2] 张磊,吴瑕,王岚,等. 玉屏风散多糖类成分对免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2006(1): 2.
- [3] 张磊,王岚,吴瑕,等. 玉屏风散总多糖不同给药方式和时相影响小鼠免疫功能的对比研究[J]. 中药药理与临床, 2006(2): 5.
- [4] 张磊,李东晓,吴瑕. 玉屏风散总多糖影响肠道黏膜损伤小鼠肠-呼吸道 IgA 分泌研究[J]. 中药药理与临床, 2007(5): 43.
- [5] 丁海龙,何开泽,张磊,等. 黄芪多糖的提取及按相对分子质量分段分离[J]. 应用与环境生物学报, 2010,16(5): 719.
- [6] 温燕梅. 黄芪的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006(6): 879.
- [7] 梁丽娟,谢俊大,赵奎君. 黄芪中化学成分比较的研究进展[J]. 中国药房, 2009,20(36): 2877.
- [8] 梁丽娟,屠鹏飞,赵奎君. 黄芪多糖的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2010,21(43): 4113.
- [9] 陈雅,余汶华. 黄芪及其制剂的药理作用和临床应用进展[J]. 中国药业, 2006(3): 68.
- [10] 张艳,梁华平. 黄芪多糖对烧伤小鼠细胞免疫功能的作用[J]. 中国药理学通报, 1995(2): 136.
- [11] H Kiyohara, T Uchida, M Takakiwa, et al. Different contributions of side-chains in beta-D-(1→3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge [J]. *Phytochemistry*, 2009,71(2/3): 280.
- [12] M Lobner, A Walsted, R Larsen, et al. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis* [J]. *J Med Food*, 2008,11(2): 313.

[责任编辑 聂淑琴]