

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.01.009

不同工艺制备的白术多糖对小鼠血清中细胞因子的影响^①

陈红伟, 何 俭, 黄庆洲, 刘 娟,
吴俊伟, 魏述永, 张志强

西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 402460

摘要: 研究白术在不同制备工艺条件下得到的白术多糖(PAM)对小鼠血清中细胞因子的影响, 采用传统水提和超声法提取白术多糖(PAM), 以苯酚硫酸比色法测定多糖含量. 通过腹腔注射环磷酰胺, 建立免疫抑制模型, 将提取的 PAM 连续灌胃小白鼠 14 d, 观察 PAM 对小白鼠血清中 IL-2, IL-4 和 IFN- γ 含量的影响. 结果发现, 两种方法提取的 PAM 对小鼠日增质量和免疫器官指数的影响不明显, 但均能极显著提高免疫低下小鼠血清中 IL-4 的含量. 结果表明, 传统水提和超声法提取的 PAM 均能在不影响生长性能的基础上, 促进小鼠血清中细胞因子 IL-4 的表达, 缓解免疫应激, 提高机体免疫功能, 但水提法优于超声提取法.

关键词: 白术多糖; 细胞因子; 小白鼠; 制备工艺

中图分类号: Q949.783.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)01-0060-05

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koedz 的干燥根茎, 是著名的“浙八味”之一, 为最常用的补益中药, 有“南术北参”美称, 具有健脾益气、益胃、燥湿利水、和中、止汗、安胎之功效^[1]. 白术多糖(polysaccharide of *Atractylodes macrocephala*, PAM)^[2] 系白术植物原料中提取的水溶性多糖, 目前 PAM 的提取方法主要有水提法、超声提取法、酶法等^[3-5]. PAM 对动物免疫功能的影响早有报道^[1, 6-8], 也是其药用价值之所在. 但 PAM 提取工艺的筛选多采用多糖的得率或含量来作为评价指标, 而实际上这些多糖多为粗品, 不同提取方法得到的 PAM 对机体免疫功能的影响是否存在差异鲜有报道, 而以免疫学指标作为评价指标来指导 PAM 制备工艺的研究尚未见报道. 本文拟采用水提和超声提取法提取白术多糖, 并通过比较其对小白鼠生长性能、免疫器官指数、血清中细胞因子水平等指标来综合评价该制备工艺.

1 材料与方 法

1.1 主要药品与试剂

白术: 重庆腾马中药饮片厂, 相对湿度为 45%~75%; 小鼠 IL-2, IL-4 和 IFN- γ 检测试剂盒为 BOSTER 公司产品; 环磷酰胺: 江苏恒瑞医药股份有限公司生产; 试验日粮: 武汉市万千佳兴生物科技有限公司.

1.2 主要仪器

酶联免疫检测仪(BIO-RAD 公司、美国 BLO-RHD); 天平(上海越平科学仪器); 超声机(宁波新芝生

① 收稿日期: 2013-07-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金(XDJK2012C099); 重庆市科委自然科学基金(CSTC2012JJA80013); 公益性行业(农业)科研专项经费(201303040-05).

作者简介: 陈红伟(1980-), 男, 四川宜宾人, 博士, 副教授, 主要从事新兽药研究.

物科技股份有限公司)等。

1.3 试验动物

断奶 KM 小白鼠(西南大学荣昌校区实验动物科提供),雌、雄各半,体质量 8~12 g。

1.4 试验方法

1.4.1 水提法

选取白术材料粉碎成粗颗粒,准确称取 100 g,加 25 倍量的水,提取时间 4 h(每次 2 h),提取次数 2 次,合并煎煮液、加 10% ZnSO₄ 约(20 mL)和饱和 Ba(OH)₂(约 150 mL)以沉淀蛋白、振摇静止,上清液加几滴 Ba(OH)₂ 直至无沉淀产生,过滤,滤液浓缩至 200 mL,静置 12 h,再除去沉淀,加 4 倍量 95% 乙醇,静置 12 h,抽滤,再用 95% 乙醇洗涤,减压抽滤,真空干燥即得白术粗多糖^[3]。

1.4.2 超声法

选取白术材料并粉碎成细颗粒,准确称取 100 g,加 20 倍量的水,在 50 °C 条件下超声 45 min,收集提取液,过滤得到滤液,按 sevag 法(氯仿:正丁醇=5:1)30 mL 脱蛋白,加入 3 倍量的 95% 乙醇,静置 12 h,过滤取沉淀,用丙酮和乙醚洗涤,干燥,得灰白色粉末状白术粗多糖^[5]。

1.4.3 白术多糖的鉴别—纸色谱法

精密称取多糖 10.7 mg,放置小烧杯中,同时精密称取葡萄糖标准品 10.65 mg,放置另一个小烧杯中,向两烧杯中同时加入 2 mol/L H₂SO₄ 3 mL,将其同时置 110 °C 烘箱中烘 8 h,水解多糖,得单糖,向两烧杯中加入约 0.2 g BaCO₃,中和硫酸,离心,得上清液,然后做纸层析实验^[9]。

点样:用两毛细管分别取烧杯中的上清液,点在已画好基线的纸层析滤纸上。

展开:取正丁醇、丙酮、水(4:1:5)的展开剂,置纸层析展缸中,将滤纸放进展缸,展开。取出,放干。

显色:现配显色剂苯胺—邻苯二甲酸试剂,取 0.93 g 苯胺及 1.66 g 邻苯二甲酸溶于 100 mL 水饱和的正丁醇中,混匀。应用:将显色剂喷在滤纸上后,105 °C 加热 5 min,两斑点均显棕色或桃红色,说明实验为阳性。

1.4.4 苯酚—硫酸法测定含量^[10]

(1) 标准溶液的制备

取经 105 °C 干燥至恒定质量的葡萄糖 100 mg,置 100 mL 容量瓶中加水溶解,并稀释至刻度,摇匀。精密量取 10 mL,置 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,配成 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液^[11]。

(2) 标准曲线的绘制

准确吸取葡萄糖标准溶液 0.1~0.6 mL 共 6 份,分别置于试管中,加蒸馏水补充至 2 mL,再加 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速加浓硫酸 5.0 mL,摇匀,放置 50 min,置 80 °C 水浴中加热 15 min,取出,迅速冷却至室温^[12]。另以 2.0 mL 的蒸馏水作空白对照,在 590 nm 波长处测定吸光度,以浓度(C)为横坐标,以吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,求出回归方程为

$$y = 14.637x - 0.0022, r^2 = 0.9982 (n = 6)$$

(3) 白术多糖含量的测定

称取提取后并干燥至恒定质量的白术粗多糖 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,准确吸取 10 mL,置于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,配成 0.1 mg/mL 的溶液。取上述溶液 0.5 mL 按标准曲线绘制时的方法处理,并测出吸光度,将吸光度带入回归方程求出其含量。

1.5 试验动物与试验设计

本试验采用完全随机区组设计,将 30 只体质量相近、健康的断奶 KM 小白鼠,按体质量随机分为 4 个处理组:超声提取组、水提组、空白生理盐水对照组、环磷酰胺处理的模型组,每个组 6 只小鼠,剩余 6 只作 0 d 对照,试验期 14 d,各试验组小鼠每日定时灌胃 1 次,根据粗品中多糖含量进行计算,按每 kg 体质量灌胃 PAM 40 mg,灌胃量均为 10 mL/kg。在灌胃第 2 天除空白对照组外,各组小鼠均腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg,1 次/d,连续 5 d,制备免疫低下小鼠模型^[13]。与此同时,空白对照组和模型组均按相同剂量灌胃生理盐水。试验第 0,14 天称质量,每个处理组共 6 只小白鼠,末次给药 12 h 后眼球采血致死,称脾和胸

腺质量, 取血清测定细胞因子 IL-2, IL-4 和 IFN- γ 的含量.

1.6 试验动物饲养管理

舍内温度控制在 22~26 °C, 保持通风, 严格控制光照(12 h 光照, 12 h 黑暗), 自由饮水, 试验日粮按第一周 4 g/d/只, 第二周 5 g/d/只连续饲养 2 周.

1.7 测定项目与方法

1.7.1 小鼠平均日增质量(ADG)的测定

按下面公式计算小鼠日增质量:

$$\text{小鼠日增质量}(g) = [\text{杀前各组小鼠的总质量}(g) - \text{杀后各组小鼠的总质量}(g)] / (\text{小鼠只数} \times 14)$$

1.7.2 免疫器官指数的测定

小鼠连续灌胃后, 称其体质量, 眼球采血致死, 取出胸腺和脾脏, 用滤纸吸干血迹后称其质量, 算出胸腺和体质量、脾脏和体质量之间的比值.

1.7.3 小鼠血清中细胞因子含量的检测

眼球摘除法放血, 采集血液, 分离血清备用. 采用 ELISA 法测定小鼠血清中 IL-2, IL-4, IFN- γ 含量, 取 100 μ L 血清稀释 3 倍后加入酶标板, 具体操作严格按 ELISA 试剂盒说明书完成. 结果判定: 根据标准品 A 值绘制标准曲线并求出方程, 通过样本 A 值计算出 IL-2, IL-4, IFN- γ 的含量.

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS19.0 统计软件, 统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One Way ANOVA 分析, 并用 Duncan 比较各数据间的差异, $p < 0.05$ 视为 2 组数据间存在显著性差异.

2 试验结果

2.1 水提取法和超声提取法提取白术多糖经鉴别实验均为阳性反应, 多糖含量测定结果为水提法多糖含量为 12.57%, 超声提取法多糖含量为 10.52%.

2.2 白术多糖对小鼠平均日增质量的影响

数据统计结果见表 1, 与模型组比较, 超声提取、水提取的白术多糖均提高了小鼠的日增质量, 但差异均不显著.

表 1 小鼠平均日增质量统计结果 (Means \pm SD, $n = 6$)

g

组别	小鼠 14 d 平均日增质量	组别	小鼠 14 d 平均日增质量
空白组	0.55 \pm 0.151	水提组	0.57 \pm 0.108
模型组	0.51 \pm 0.125	超声组	0.53 \pm 0.114

2.3 白术多糖对小鼠免疫器官指数的影响

统计结果见表 2, 与模型组比较, 超声提取、水提取的白术多糖提高了小鼠的脾脏指数和胸腺指数, 但差异均不显著.

表 2 小鼠脾脏、胸腺指数统计结果 (Means \pm SD, $n = 6$)

mg \cdot g⁻¹

组别	脾脏指数		胸腺指数	
	第 0 天	第 14 天	第 0 天	第 14 天
空白组		2.85 \pm 1.00		1.79 \pm 1.01
模型组	3.00 \pm 0.16	2.25 \pm 0.76	4.07 \pm 0.35	1.63 \pm 0.21
水提组		3.13 \pm 1.79		2.82 \pm 0.74
超声组		2.74 \pm 1.60		2.61 \pm 0.20

2.4 白术多糖对小鼠血清 IFN- γ , IL-2 和 IL-4 水平的影响

统计结果见表 3, 与 CTX 组比较, PAM 对小鼠血清 IFN- γ , IL-2 水平均有促进作用, 但差异不显著; 与 CTX 组和 Control 组比较, 超声提取、水提取的 PAM 均极显著提高了 IL-4 的含量. 另外, 水提组对 3 种细胞因子的促进作用略高于超声组, 但差异不显著.

表 3 小鼠血清中的 γ -IFN, IL-2, IL-4 含量 (Means \pm SD, $n=6$)pg \cdot mL $^{-1}$

组 别	γ -IFN		IL-2		IL-4/(pg \cdot mL $^{-1}$)	
	第 0 天	第 14 天	第 0 天	第 14 天	第 0 天	第 14 天
空白组		464.48 \pm 56.56		109.31 \pm 6.02		95.57 \pm 6.99 $\Delta\Delta$
模型组	168.26 \pm 16.73	375.93 \pm 44.84	ND	113.04 \pm 14.24	85.09 \pm 8.47	14.71 \pm 1.99
水提组		417.83 \pm 64.60		121.22 \pm 11.30		1273.26 \pm 26.93 $\Delta\Delta^*$
超声组		390.14 \pm 92.48		116.81 \pm 17.09		1222.66 \pm 61.81 $\Delta\Delta^*$

注: ND 表示未检测到; 与空白组对照 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与环磷酰胺组对照 $\Delta p < 0.05$, $\Delta\Delta p < 0.01$.

3 分析与讨论

白术为临床常用中药, 白术多糖对机体体液免疫、细胞免疫和细胞因子均有调节作用^[6], 毛俊浩等^[14]在小鼠的淋巴细胞上验证了 PAM 促进淋巴细胞分泌 IL-2 的作用, 并且对免疫抑制小鼠淋巴细胞的增殖能力有恢复作用. 胡晓蕾等^[15]研究证明适当添加剂量的白术及 PAM 可显著提高小鼠血清 IgG 水平, 并对 IgM, IgA 水平及血清补体 C3, C4 水平均有提高的趋势.

目前, 关于 PAM 提取方法的筛选多以多糖含量或得率作为评价指标, 而提取纯化的 PAM 多为粗多糖^[5], 并非结构确切的单体成分, 在对机体免疫力影响方面是否存在差异值得探讨, 也就是说多糖含量高或得率高的提取物并不意味着生物活性就高, 因此在筛选多糖提取方法时, 除了考察多糖含量和得率, 还需评价其生物活性. 比如, 马莉等^[16]采用了单核细胞直接细胞毒性测定法检测板蓝根多糖对小鼠脾细胞增殖反应的影响, 在免疫活性的基础上筛选物质基础, 优选板蓝根多糖制备工艺. 因此, 本文采用了常见的水提和超声提取法提取白术多糖, 并通过比较其对小白鼠生长性能、免疫器官指数、血清中细胞因子水平等指标来综合评价制备工艺.

小鼠日增质量是小鼠生长的重要指标, 从表 1 可见与环磷酰胺模型组比较, 超声提取、水提取的白术多糖均提高了小鼠的日增质量, 但差异均不显著. 这与胡晓蕾等^[15]的研究基本一致, 0.2% 白术多糖有提高小鼠日增质量的趋势, 但统计学上差异不明显. 脾脏是 T、B 淋巴细胞定居并接受抗原刺激后产生免疫的场所, 胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的场所^[7], 两者是机体最重要的免疫器官, 而器官指数作为一个反应发育情况的重要指标, 常被用于机体发育方面的研究. 本试验发现, 与模型组比较, 超声提取、水提取的白术多糖均提高了小鼠的脾脏指数和胸腺指数, 但差异均不显著. 细胞因子的产生也是机体免疫反应的一项主要指标, T 细胞亚群的区分主要是通过细胞因子的状态来区分的, Th1 细胞主要产生 IFN- γ , IL-2 和淋巴细胞毒素; 而 Th2 细胞主要产生 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13^[17]. 正常情况下, Th1 和 Th2 细胞亚群借助其分泌的细胞因子形成负反馈, 相互制约, 维持机体免疫系统的平衡^[18]. 现阶段有多种技术可用于检测细胞因子的产生, 最常用的方法是 ELISA, 其主要优点是快捷简便, 结果易分析^[19]. 本试验采用 ELISA 法检测后发现, 与空白组和模型组比较, 两种提取方法得到的 PAM 极显著提高了小鼠血清中 IL-4 的含量, 而对 IFN- γ , IL-2 的影响不显著, 推测 PAM 可能有促进 Th2 类细胞分化的作用, 这与毛俊浩等^[14]验证了 PAM 有促进小鼠淋巴细胞分泌 IL-2 作用的结论不一致, 可能的原因是在 PAM 剂量或作用时间不同的情况下, 随着 Th1 类细胞的不断分化, 在机体负反馈机制的作用下, Th2 类细胞通过分泌 IL-4 以抑制 Th1 类细胞的增殖与功能, 使 Th1/Th2 达到一定平衡, 具体机制还有待进一步研究.

传统水提和超声提取白术多糖是两种截然不同的提取方法, 经测定发现水法提取白术多糖的含量高于超声提取法, 两种提取方法得到的 PAM 均极显著提高了小鼠血清中 IL-4 的含量, 但从对小鼠日增质量、免疫器官指数、血清中细胞因子水平影响的总体趋势来看, 水提法均优于超声提取法, 因此建议白术多糖的提取可优先选择传统水提法.

参考文献:

- [1] 孙文平, 李发胜, 陈晨, 等. 白术多糖对小鼠免疫功能调节的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(10): 881—882.
- [2] 周家容, 田允波, 侯轩. 超滤膜分离白术多糖及其抗氧化活性的研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(4): 79—82.

- [3] 马 艳,杨安东,文 筱.白术多糖提取工艺研究[J].中药材,2006,29(10):1104-1106.
- [4] 寿 旦,章建民,俞忠明,等.酶法测定不同产地白术中的多糖含量[J].浙江中医杂志,2010,45(2):142-143.
- [5] 刘胜姿,邱细敏.超声提取白术多糖的工艺研究[J].企业技术开发,2010,29(9):32-35.
- [6] 田允波,许丹宁,黄运茂,等.白术多糖免疫调控作用的研究进展[J].畜牧与兽医,2010,42(9):98-100.
- [7] 彭新国,邱世翠,李彩玉,等.白术对小鼠免疫功能影响的实验研究[J].时珍国医国药,2001,12(5):396-397.
- [8] 汤新慧.白术多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中医研究,1998,11(2):9-11.
- [9] 王 晋,刘 涛,高建萍,等.多叶棘豆中多糖的提取、鉴别及含量测定[J].内蒙古医学院学报,2007,29(6):416-418.
- [10] 叶姜瑜,谈 锋.紫芝多糖的纯化及组分分析[J].西南师范大学学报:自然科学版,2002,27(6):945-949.
- [11] 徐晓飞,陈 健.多糖含量测定的研究进展[J].食品科学,2009,30(21):443-448.
- [12] 朱道玉.板蓝根多糖对中华鳖肾脏抗氧化性的影响[J].西南师范大学学报:自然科学版,2009,34(4):98-101.
- [13] 桂曼曼,张李峰,李雪嫣,等.同一复方用黄芪与用红芪对小鼠免疫功能影响的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):203-206.
- [14] 毛俊浩,吕志良,曾群力,等.白术多糖对小鼠淋巴细胞功能的调节[J].免疫学杂志,1996,12(4):21-24.
- [15] 胡晓蕾,胡迎利,汪以真.白术及白术多糖对SD大鼠生长性能和免疫功能的影响[J].中国兽药杂志,2006,40(1):2-6.
- [16] 马 莉,冯少华,唐健元,等.不同制备工艺板蓝根多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响[J].中国药房,2007,18(3):169-171.
- [17] 牛明福.富含不同阳离子氨基酸抗菌肽的表达及其生物学活性研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- [18] 张世栋,王东升,李世宏,等.苓连液与白虎汤对气分证家兔T细胞亚群和6种细胞因子的影响[J].畜牧与兽医,2012,44(9):65-68.
- [19] 高 伟,胡怀东,胡 鹏,等.佛波酯对外周血CD4⁺T细胞产生IL-17的影响[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(4):51-56.

Influence of *Atractylodes macrocephala* Polysaccharides Produced by Different Preparation Technologies on Cytokines of Mouse Serum

CHEN Hong-wei, HE Jian, HUANG Qing-zhou, LIU Juan,
WU Jun-wei, WEI Shu-yong, ZHAN Zhi-qiang

Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Chongqing 402460, China

Abstract: To study the influence of *Atractylodes macrocephala* polysaccharides produced by different preparation technologies on cytokines of mouse serum. PAM extracted by the traditional water extraction and ultrasonic extraction, which's content were detected by the phenol sulfuric acid colorimetric. Immuno-compromised mouse model were prepared by intraperitoneal injection of cyclophosphamide, the influence of PAM on IL-2, IL-4 and IFN- γ in mouse serum was observed by administering orally in the following 14 days. It was found that the ADG and Organ index of each experimental group mice were similar to the control and model group, but can significantly improve the immunocompromised mouse serum IL-4 levels. The results show that, PAM by traditional water extraction and ultrasonic extraction can promote mouse serum cytokines IL-4 expression, alleviate immune stress, and improve immune function, water extraction is better than ultrasonic extraction.

Key words: *Atractylodes macrocephala* polysaccharide; cytokines; mice; preparation process

