

青蒿多糖对小鼠血清中 IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ 水平的影响^①

帅学宏¹, 陈吉轩¹, 施 君², 黄庆洲¹, 伍 莉¹

1. 西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460; 2. 广西大学 动物科学技术学院, 南宁 530005

摘要: 为观察青蒿多糖(*Herba Artemisiae Annuae* polysaccharides, HAAP)对小鼠免疫功能的影响, 采用木瓜蛋白酶法提取青蒿多糖, 将 50 只昆明种小鼠随机分成 5 组进行试验. 第 I 组为对照组, 腹腔注射生理盐水; 第 II 组到第 V 组为青蒿多糖组, 分别按 25, 50, 100, 150 mg/kg 剂量腹腔注射青蒿多糖, 连续给药 7 d. 分离血清测定 IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ 质量浓度. 结果显示 50 mg/kg 青蒿多糖能提高血清中 IL-1 β , IL-2 和 IFN- γ 质量浓度($p < 0.01$); 25 mg/kg 青蒿多糖也能提高血清中 IL-6 和 IFN- γ 质量浓度($p < 0.01$); 100 mg/kg 青蒿多糖对 IL-2 有升高作用, 对 IL-6 和 IFN- γ 有降低作用($p < 0.01$). 结果表明青蒿多糖对小鼠血清中这 4 种细胞因子有调节作用. 提示适当质量浓度的青蒿多糖可能对 Th1/Th2 的平衡有调节作用.

关键词: 青蒿多糖; 理化性质; 小鼠; 细胞因子

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)07-0011-06

青蒿具有清热解暑, 除蒸, 截疟的功能, 常用于暑邪发热, 阴虚发热, 夜热早凉, 骨蒸劳热, 疟疾寒热和湿热黄疸^[1], 其化学成分包括异蒿酮、桉油精、青蒿素等^[2], 多糖也是其成分之一. 研究表明中草药多糖具有免疫增强作用, 对机体的非特异性和特异性免疫功能具有显著的增强作用^[3]. 青蒿多糖在体外能够有效地诱导淋巴细胞增殖转化, 能够有效地促进淋巴细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ , 在体内青蒿多糖能够明显地抑制小鼠 S180 瘤体生长, 刺激低下的免疫功能和器官质量恢复到正常水平^[4]. 本试验采用木瓜蛋白酶提取青蒿多糖, 对其总糖质量分数及理化性质进行检测, 并对青蒿多糖在小鼠体内的免疫调节作用进行初步探究.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂

青蒿(广西太华药业有限公司), 木瓜蛋白酶(沃凯国药集团化学试剂有限公司), 小鼠的 IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ 检测试剂盒(购自上海联硕生物科技有限公司).

① 收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 西南大学博士基金(2010BSR03); 国家自然科学基金(31260619).

作者简介: 帅学宏(1978-), 男, 陕西咸阳人, 博士, 讲师, 主要从事中药免疫学研究.

1.1.2 主要仪器

喷雾干燥仪器(常州,双环);DK-98-II 水浴锅(天津,泰斯特);TD-5A 台式低速离心机(湖南,凯达);Uvmini1240 紫外分光光度计(日本,岛津). AB104-L 分析天平(瑞士,梅特勒),iMark 全自动酶标仪(美国,Bio-Rad),1-14 型微量离心机(美国,Sigma),WP25 台式电热恒温培养箱(天津,泰斯特).

1.1.3 动物

昆明种小鼠 50 只,SPF 级,18~22 g,健康,雌、雄各半,购自广西医科大学动物实验中心.

1.2 方法

1.2.1 青蒿多糖的制备

参照以前所确定的方法^[5]提取青蒿多糖并对其进行质量分数测定和理化性质分析.

1.2.2 青蒿多糖总糖质量分数测定

用葡聚糖作为对照品,蒽酮-硫酸法测定青蒿多糖总糖质量分数^[6].

1.2.3 青蒿多糖理化性质分析

采用 Molish 反应,碘-碘化钾和茚三酮反应检测青蒿多糖理化性质^[7].

1.2.4 试验设计

将 50 只昆明种小鼠随机分成 5 组,每组 10 只.待小鼠适应 3 d 后进行正式试验.第 I 组为对照组,腹腔注射生理盐水;第 II 组到第 V 组为青蒿多糖组,分别腹腔注射青蒿多糖,剂量分别为 25,50,100,150 mg/kg,连续给药 7 d.于末次给药后次日,眼眶采血,分离血清,用试剂盒 ELISA 法检测血清中 IL-1 β ,IL-2,IL-6 和 IFN- γ 质量浓度.

1.2.5 数据处理

用 SPSS17.0 软件对结果进行统计学分析,单因素方差分析检验差异的统计学意义, $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $p < 0.01$ 表示差异极具有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 青蒿多糖质量分数测定

以葡聚糖作为对照品作标准曲线,得到回归方程 $y = 152.81x + 2.7574 (R^2 = 0.9958)$,见图 1.测得精制的青蒿精多糖管吸光度为 0.0629,经计算其质量分数为 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$.

2.2 青蒿多糖理化性质分析

Molish 反应后青蒿多糖管中在糖液和浓硫酸的液面间形成紫色环,碘-碘化钾反应后青蒿多糖管中无颜色变化,茚三酮反应后青蒿多糖试管中颜色无变化.

2.3 青蒿多糖对小鼠血清中细胞因子水平的影响

2.3.1 青蒿多糖对小鼠血清中 IL-1 β 水平的影响

与对照组相比,50 mg/kg 青蒿多糖组中 IL-1 β 的水平升高极具有统计学意义($p < 0.01$),100 mg/kg 青蒿多糖组的 IL-1 β 水平均有提高,但是差异不具有统计学意义.而与对照组相比,25 mg/kg,150 mg/kg 青蒿多糖组中 IL-1 β 的水平有所降低,但与对照组相比差异不具有统计学意义(图 2).

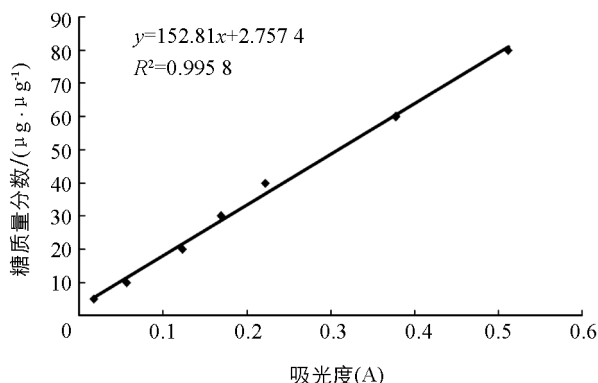
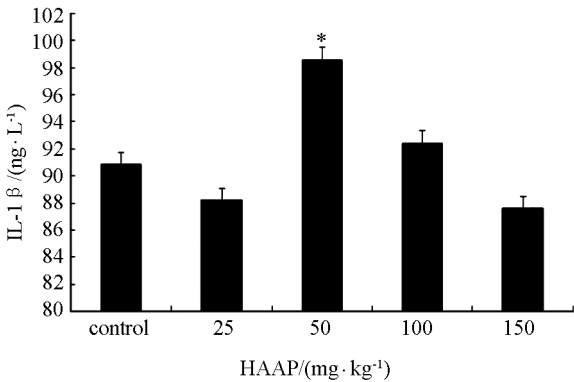


图 1 葡聚糖质量分数标准曲线

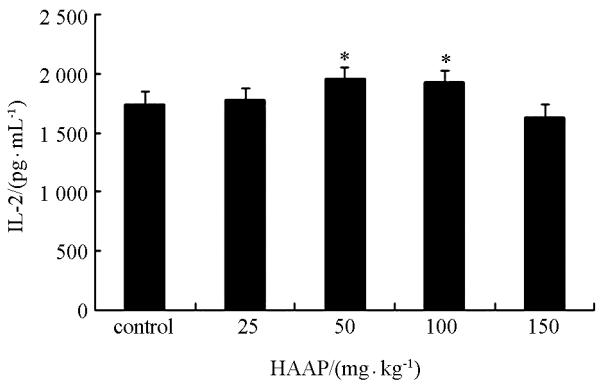
2.3.2 青蒿多糖对小鼠血清中 IL-2 水平的影响

与对照组相比, 50 mg/kg, 100 mg/kg 青蒿多糖组中 IL-2 的水平均升高极具统计学意义($p<0.01$). 而与对照组相比, 150 mg/kg 剂量的青蒿多糖组 IL-2 的水平有所降低, 但差异不具有统计学意义. 25 mg/kg 剂量青蒿多糖组可提高 IL-2 的水平, 但差异不具有统计学意义(图 3).



* $p<0.01$, 与对照组相比.

图 2 青蒿多糖对小鼠 IL-1 β 水平的影响



* $p<0.01$, 与对照组相比.

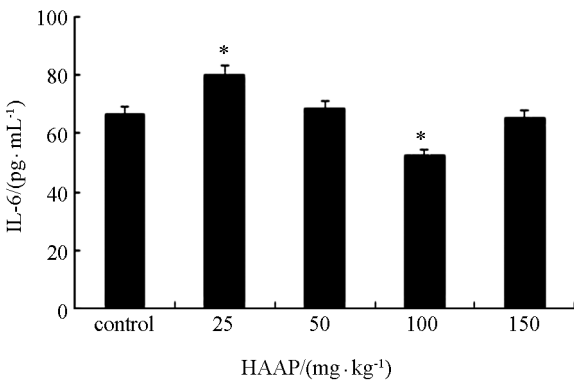
图 3 青蒿多糖对小鼠 IL-2 水平的影响

2.3.3 青蒿多糖对小鼠血清中 IL-6 水平的影响

与对照组相比, 25 mg/kg 青蒿多糖组可提高血清中 IL-6 的水平, 差异极具统计学意义($p<0.01$), 50 mg/kg 青蒿多糖组有所升高, 但差异不具有统计学意义. 100 mg/kg 剂量的青蒿多糖组则可降低 IL-6 的水平, 与对照组相比差异极具统计学意义($p<0.01$). 150 mg/kg 剂量的青蒿多糖组则可降低 IL-6 的水平, 但与对照组相比差异不具有统计学意义(图 4).

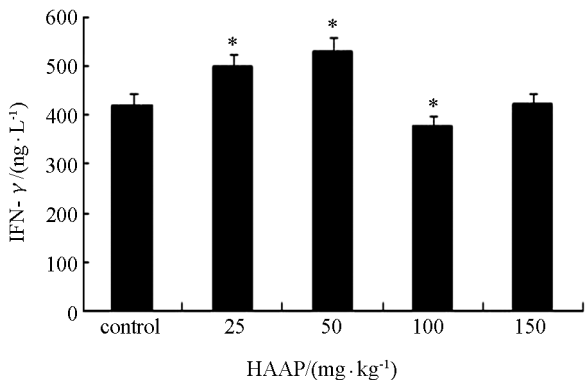
2.3.4 青蒿多糖对小鼠血清中 IFN- γ 水平的影响

与对照组相比, 25 mg/kg 和 50 mg/kg 剂量的青蒿多糖可升高血清中 IFN- γ 的水平, 且差异极具统计学意义($p<0.01$). 而 100 mg/kg 青蒿多糖组则可极显著降低 IFN- γ 的水平($p<0.01$). 150 mg/kg 剂量的青蒿多糖对 IFN- γ 的水平无显著影响(图 5).



* $p<0.01$, 与对照组相比.

图 4 青蒿多糖对小鼠 IL-6 水平的影响



* $p<0.01$, 与对照组相比.

图 5 青蒿多糖对小鼠 IFN- γ 水平的影响

3 讨 论

酶辅助提取法是利用酶反应的高度专一性将植物细胞壁降解, 使得多糖被释放, 从而被提取, 此方法多糖提取率高. 但是酶辅助提取法对实验条件要求高, 需要考虑最适温度, pH 值, 最适作用时间, 酶浓度

等因素^[8]. 蒽酮-硫酸比色法测定多糖的质量分数, 方法稳定, 几乎可以测定所有的碳水化合物, 但要新鲜配制, 蒽酮溶解于硫酸一次加入即可, 简化了操作步骤, 减少了产生误差的因素, 且该方法所需仪器简单, 可在常规试验条件下检测^[9-11]. 而且此方法简单快速, 具有灵敏度、精确度和准确性高、重现性好等优点^[12]. 本试验采用木瓜蛋白酶法提取青蒿多糖后, 使用蒽酮-硫酸比色法测定出青蒿精多糖的总糖质量分数为 $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{g}$, 与前期研究结果相似^[5]. Molish 反应后青蒿多糖管中在糖液和浓硫酸的液面间形成浅紫色环, 表明所提物质中有糖成分存在, 碘-碘化钾反应后青蒿多糖管中无颜色变化, 表明所提物质中不含淀粉, 茚三酮反应后青蒿多糖试管中颜色无变化, 表明所提物质中不含蛋白质或氨基酸.

IL-1 β 与 IL-1 α 无种属特异性, IL-1 在免疫方面参与 NK 细胞识别或溶解肿瘤的过程; 通过诱导合成 IFN 并可与 IFN 协同作用于 NK 细胞, 诱导前 B 细胞分化和表面 IgM 刺激的 B 细胞 DNA 合成, 还可通过增加 IL-2, IL-6, IFN- γ 的合成或调节其受体而间接增强 B 细胞功能, 促进抗体产生. IL-1 还可通过诱生 IL-2 和其他细胞因子而间接扩大杀伤性 T 细胞的功能. IL-1 还能刺激单核/巨噬细胞合成较高水平的 IL-6 和 IL-4, 在机体的炎症过种中起重要作用^[13]. 据报道, 一定剂量的黄芪、防风、地黄、蒲公英和板蓝根等中药多糖含药血清对 IL-1 β 具有调节作用^[14]. 本研究表明 50 mg/kg 青蒿多糖能够提高小鼠体内的 IL-1 β , 从而起到免疫调节作用.

IL-2 具有广谱的免疫增强活性, 可诱导 T 与 B 细胞增殖分化, 促进细胞毒性 T 前体细胞分化为细胞毒性 T 细胞, 并增强其杀伤效应, 并可促进 NK 功能及释放免疫干扰素, 具有显著的抗肿瘤作用, 并能抵御病毒性感染^[15]. 有报道指出枸杞多糖和马尾藻多糖分别对鸡和猪的 IL-2 分泌有调节作用^[16-17]. 本试验表明适当剂量 (50 mg/kg , 100 mg/kg) 的青蒿多糖可显著升高小鼠体内的 IL-2 水平, 并由此可见青蒿多糖能通过调节 IL-2 的水平, 从而调节机体免疫功能.

IL-6 可诱导 B 细胞增殖分化并产生抗体, 主要作用于成熟的 B 细胞, 产生免疫球蛋白 IgM, IgG, IgA, 还可促进 PHA 或 conA 激活的 T 细胞增殖生长^[18]. 已有的研究表明杨桃多糖可提高小鼠脾细胞 IL-6 水平^[19], 黄芪杂多糖可调节猪血清中 IL-6 水平^[20]. Th2 细胞产生的主要细胞因子就包括 IL-6, 用 25 mg/kg 的多糖处理后 IL-6 浓度最高, 其可能原因是刺激了 Th2 细胞分泌增强所致, 随着多糖浓度的增加, 对 Th2 细胞活性可能起到抑制作用, 故 IL-6 质量浓度随着青蒿多糖浓度的增加而降低.

干扰素是重要的免疫调节分子, IFN- γ 具有抗病毒、抑制细胞生长及诱导 II 类主要组织相容性复合体抗原分子表达的作用, 是细胞免疫的主要参与者, 也是调节机体免疫功能重要的细胞因子, 在调节机体免疫功能方面发挥着重要作用^[21]. 研究表明灵芝多糖和当归多糖均明显促进外周血 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ ^[22], 合适剂量的黄芪多糖、板蓝根多糖、山药多糖、牛膝多糖均能提高淋巴细胞 IFN- γ 的 mRNA 表达水平^[23]. 本试验结果表明 25 mg/kg , 50 mg/kg 的青蒿多糖可提高小鼠体内的 IFN- γ 质量浓度, 而 100 mg/kg 的青蒿多糖对其有下调作用, 可见青蒿多糖可通过调节 IFN- γ 质量浓度而对机体免疫功能加以调节.

Th1 细胞主要产生 Th1 类细胞因子 IL-2, TNF- β 和 IFN- γ ; Th2 细胞主要产生 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 和 IL-13. 正常情况下, 机体中 Th1/Th2 细胞处于相对平衡状态, 但机体发生功能异常时常表现出平衡偏向其中一方, 此即为“Th1/Th2 平衡漂移”. 通过研究 Th1/Th2 细胞亚群漂移状态与人类疾病的关系及其发生机制, 我们能够选择性地调节 Th1 或 Th2 细胞的水平, 逆转其漂移状态, 从而达到治疗某些特定疾病的目的^[24]. 从诸多报道中可见, 中药对 Th1/Th2 的平衡有一定的调节作用, 并通过这一机制达到治疗疾病的目的^[25]. 本试验结果显示 50 mg/kg 的青蒿多糖能显著提高 IL-2 和 IFN- γ , 对 IL-6 有一定的降低作用, 提示青蒿多糖可能从调节 Th1/Th2 的平衡方面对机体的免疫功能起到调节作用.

4 结 论

用木瓜蛋白酶法提取的青蒿多糖条件温和,所提多糖中不含淀粉、蛋白质及氨基酸,精制后总糖质量分数较高.青蒿多糖对小鼠体内部分细胞因子的质量浓度影响与其使用剂量有关,在小鼠体内可对血清中 IL-2,IFN- γ ,IL-6 等细胞因子质量浓度起到调节作用,而这 3 种细胞因子主要是由 Th1 或 Th2 细胞产生,其质量浓度的改变提示青蒿多糖可能从调节 Th1/Th2 的平衡方面对机体的免疫功能起到调节作用.

参考文献:

- [1] 沈连生. 中药图典 [M]. 北京: 华夏出版社, 2006.
- [2] 李 清. 青蒿研究及应用概况 [J]. 中国医药导报, 2008, 36(5): 25.
- [3] 封海波, 樊 静, 刘 娟, 等. 4 种多糖对口蹄疫疫苗免疫反应的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(11): 27—36.
- [4] 姜晓东. 青蒿多糖的超声提取及免疫活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [5] 帅学宏, 杨 燕, 黄庆洲, 等. 木瓜蛋白酶法提取青蒿多糖的工艺研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 273—275.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [7] 帅学宏. 鬼臼多糖分离提取及免疫药理作用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [8] 王如涛, 吴绵斌, 林建平, 等. 植物多糖分离提取技术的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 118—123.
- [9] 唐丽琴, 李 矗, 刘 圣, 等. 蒽酮-硫酸比色法测定麦冬多糖的含量 [J]. 安徽医药, 2003, 7(1): 39—40.
- [10] 刘晓涵, 陈永刚, 林 励, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定枸杞子中多糖含量的比较 [J]. 食品科技, 2009, 34(9): 270—272.
- [11] 朱 伟. 蒽酮-硫酸比色法测定香菇多糖含量 [J]. 北方药学, 2011, 8(8): 8—9.
- [12] 涂永勤, 朱华李, 曾 纬, 等. 人工增殖冬虫夏草多糖的含量测定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(11): 163—166.
- [13] 侯 建, 王东星, 胥军民. 人类细胞因子手册 [M]. 上海: 同济大学出版社, 1996.
- [14] 陈 育, 吴晓勇, 张智伟, 等. 九种中药多糖含药血清对小鼠腹腔巨噬细胞释放细胞因子的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(15): 3659—3662.
- [15] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- [16] 徐占云, 秦睿玲, 褚耀诚. 等. 枸杞多糖对雏鸡淋巴细胞体外增殖及分泌 IL-2 的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 322—328.
- [17] 韦英益, 胡庭俊, 苏子杰, 等. 马尾藻多糖对猪脾细胞免疫活性及其抗病毒活性的影响 [J]. 南京农业大学学报(自然科学版), 2012, 35(2): 120—124.
- [18] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1996.
- [19] 朱银玲, 谭竹钧, 徐美奕. 杨桃多糖的免疫活性研究 [J]. 化工世界, 2013, 54(10): 589—592.
- [20] 范阔海, 李娟娟, 张 蓓, 等. 黄芪杂多糖对仔猪 IL-6 和 PR-39 表达的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2): 1—5.
- [21] 李 强, 梁秀军, 王永为, 等. 丝胶对 2 型糖尿病大鼠脾脏 IFN- γ 表达的作用 [J]. 承德医学院学报, 2014, 31(2): 95—97.
- [22] 耿卫朴, 徐 曼, 罗 玮, 等. 灵芝多糖和当归多糖促进人外周血 T 淋巴细胞增殖和分泌 IFN- γ [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5): 655—658.
- [23] 邱 妍, 崔保安, 胡元亮, 等. 4 种多糖对鸡淋巴细胞中 IL-4、IFN- γ mRNA 表达的影响 [J]. 江苏农业科学, 2009, 37(2): 32—35.

- [24] 姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2597—2600.
- [25] 袁 颖, 金素安, 何世民, 等. 中药对 Th1/Th2 细胞因子平衡调节作用的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(5): 90—92.

Effect of *Herba Artemisiae Annuae* Polysaccharides on IL-1 β , IL-2, IL-6 and IFN- γ Levels in the Serum of Mice

SHUAI Xue-hong¹, CHEN Ji-xuan¹, SHI Jun²,
HUANG Qing-zhou¹, WU Li¹

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

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: In order to observe the effects of HAAP (*Herba Artemisiae Annuae* polysaccharides) on immune function in mice, HAAP were extracted with papain. Fifty mice were randomly divided into 5 groups. Group I was the control group, in which the animals were intraperitoneally injected with physiological saline; From Group II to Group V, the animals were intraperitoneally injected with HAAP at 25, 50, 100 and 150 mg/kg, respectively, for 7 successive days. The levels of IL-1 β , IL-2, IL-6 and IFN- γ from the separated serum were measured. The results showed that there were no starch, protein or amine acid in HAAP, and the content of total sugar was 24.74%. Compared with the control, HAAP at 50 mg/kg increased the serum levels of IL-1 β , IL-2 and IFN- γ ($p < 0.01$); HAAP at 25 mg/kg increased the serum levels of IL-6 and IFN- γ ($p < 0.01$); and HAAP at 100 mg/kg increased the level of IL-2 but reduced the levels of IL-6 and IFN- γ ($p < 0.01$). The above results indicated that HAAP had a regulating effect on the four cytokines in the serum of mice, and suggested that HAAP, at a proper concentration, might probably adjust Th1/Th2 balance.

Key words: *Herba Artemisiae Annuae* polysaccharide; physical and chemical properties; mouse; cytokine

责任编辑 夏 娟

