

文章编号 :1009-038X(2001)06-0588-06

白首乌总甙对小鼠免疫功能的影响

宋俊梅¹, 王增兰², 丁霄霖³

(1. 山东轻工业学院 食品工程系, 山东 济南 250100 ; 2. 山东师范大学 生物系, 山东 济南 250014 ;
3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究了白首乌总甙对小鼠免疫器官称重的影响,对小鼠腹腔巨噬细胞(MΦ)的形态、吞噬消化功能、酸性磷酸酶(Acpase)活性以及与同体胸腺细胞结合的能力等指标进行了研究.结果表明,白首乌总甙对小鼠免疫器官的称重没有影响,能激活小鼠腹腔 MΦ,显著提高其吞噬消化功能,从而提高小鼠的非特异性免疫力,能显著提高 MΦ 提呈抗原的能力,从而提高机体的特异性免疫作用.

关键词 :白首乌 ;总甙 ;巨噬细胞 ;免疫功能

中图分类号 :Q 946.83

文献标识码 :A

Effect of General-glycosides in Baishouwu on Murine Immunity

SONG Jun-mei¹, WANG Zeng-lan², DING Xiao-lin³

(1. Department of Food Science and Technology, Shangdong Institute of Light Industry, Jinan 250100, China ; 2. College of life Science, Jinan 250004, China ; 3. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : The effects of general-glycosides in Baishouwu on murine weights of immune organs, murine peritoneal macrophages in the form, phagocytosis, activity of Acpase, and macrophage-thymocyte interaction, were studied. The experimental results indicate that general-glycosides have no effect on the weights of immuneorgans. But it can activate peritoneal macrophages and greatly increase their phagocytosis, which suggests that the non-specific immunity is promoted. In addition, it can raise the ability for macrophages to present antigens, which suggests that the specific immunity is enhanced. Accordingly, general-glycosides in Baishouwu can improve murine immunological function, which is probably one of the major benefit mechanism of Baishouwu.

Key words : Baishouwu ; general-glycosides ; macrophages ; immunological function

白首乌(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的块根)是祖国医学中传统的补益药,其主要活性成分白首乌总甙,具有多方面的药理功能^[1]. 体外实验证明,白首乌提取液具有清除氧自由基的

功能^[2],且进一步的实验表明,清除自由基的活性成分主要是针对 C₂₁ 甙中的各种甙元^[3]. 动物实验也证明,白首乌总甙对 N-乙酰苯肼(Acetylphenylhydrazine, APH)所致的溶血性贫血具

有一定的保健作用^[4],能降低血清胆固醇和心肌耗氧量^[5],抑制心肌和肝脏的脂质过氧化^[6];对体外培养的小鼠肿瘤^[7]和小鼠体内的移植肿瘤^[8]具有抑制作用.但关于白首乌总甙对小鼠免疫功能影响的研究,还未见系统报道.本研究从白首乌总甙对小鼠免疫功能的影响方面,探讨白首乌对人体的补益作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物及给药方法

昆明种健康雄性小白鼠,体重(20±2)g,购自山东省实验动物中心;白首乌总甙以江苏省滨海县首乌制品厂生产的首乌饮片制得^[3],用蒸馏水分别配制成质量浓度为 10 g/L 和质量浓度为 20 g/L 的总甙溶液.

小鼠随机分为对照组、低剂量组和高剂量组.对照组按体重每日灌胃生理盐水 5 mL/kg;低剂量组按体重每日灌胃质量浓度 10 g/L 的总甙溶液 5 mL/kg(相当于总甙 50 mg/kg);高剂量组按体重每日灌胃质量浓度 20 g/L 的总甙溶液 5 mL/kg(相当于总甙 100 mg/kg).每日 1 次,连续 20 d.于末次给药后 24 h 测试各指标.

1.2 试剂配制及鸡红细胞悬液的制备

1.2.1 细胞培养液 1.04% 的 RPMI1640 用无菌双蒸水配制,pH 7.2~7.4,现配现用.

1.2.2 Alserver 液 383.04 Pa,20 min 灭菌,4℃保存鸡红细胞.详见参考文献[9].

1.2.3 鸡红细胞(CRBC)悬液的制备 从健康成年鸡的翼静脉采血,肝素抗凝,用无菌生理盐水离心洗涤去除血清,保存于 Alserver 液中,4℃存放.临用前再用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,最后用 RPMI640 配成浓度为 1×10⁷ mL⁻¹ 的 CRBC 悬液.

1.2.4 0.1% 的台盼蓝(trypan blue)溶液 以生理盐水配制.

1.3 动物实验方法

小鼠摘眼球采血,用于制备自体血清.然后颈椎脱臼法处死小鼠,称体重,摘出胸腺及脾脏称重.腹腔注射 RPMI640 培养液 2 mL,轻揉小鼠腹部,取出腹水,用 RPMI640 培养液调巨噬细胞(MΦ)浓度为 1×10⁶ mL⁻¹,分别用于 MΦ 形态的观察、MΦ 酸性磷酸酶(Acpase)活性的测定,以及 MΦ 与同体胸腺细胞结合能力的测定.

1)免疫器官胸腺、脾脏重量的测定:以胸腺或脾脏质量(mg)与体重(g)之比,即胸腺或脾指数来进行比较.

2)腹腔形态的观察、Acpase 活性的测定、吞噬活性的测定方法见前文^[10],与同体胸腺细胞结合能力的测定也见前文^[11].

2 实验结果

2.1 总甙对小鼠免疫器官称重的影响

总甙对小鼠胸腺指数和脾指数的影响见表 1.可见,无论是低剂量组还是高剂量组,其胸腺指数和脾指数与对照组比较均无显著性差异,说明总甙对健康小鼠的免疫器官称重没有影响.

2.2 总甙对小鼠腹腔形态的影响

如图 1 和图 2 所示,对照组小鼠腹腔 MΦ 贴壁后多为圆形,只有少数变形为梭形或星状.而实验组 MΦ 贴壁后,几乎全部变形,表明其向外延展的能力显著增强,是 MΦ 活化的标志.

2.3 总甙对小鼠腹腔 MΦ 吞噬活性的影响

总甙对小鼠腹腔 MΦ 吞噬活性的影响分别如图 3~5 及表 2 所示.

表 1 总甙对小鼠胸腺指数和脾指数的影响

Tab.1 Effect of general glycosides on the index of thymus and spleen of murine

组别	动物数量/只	胸腺指数(胸腺称重/体重)(mg/g) 及与对照组比较的 P 值	脾指数(脾脏称重/体重)(mg/g) 及与对照组比较的 P 值
对照组	7	2.23±0.47	4.62±1.06
低剂量组	7	2.15±0.34 P>0.05	4.96±1.03 P>0.05
高剂量组	7	2.10±0.23 P>0.05	4.12±0.65 P>0.05

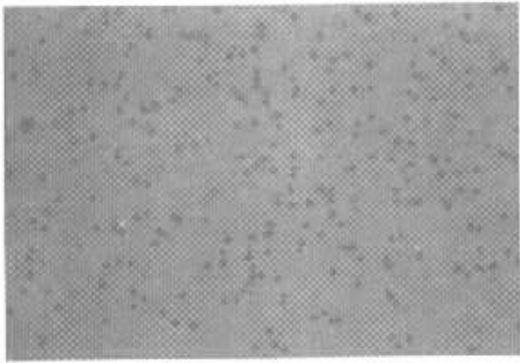


图 1 对照组腹腔 MΦ 的形态(3500×)
Fig.1 Form of peritoneal MΦ (control group = C)
(3500×)

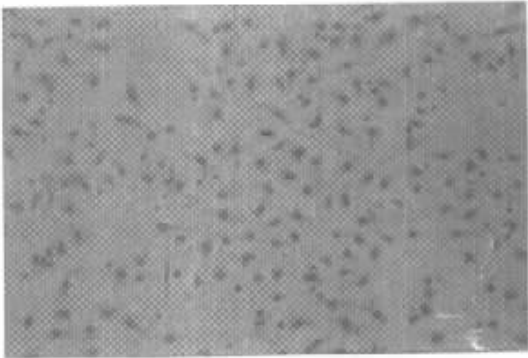


图 2 实验组腹腔 MΦ 的形态(3500×)
Fig.2 Form of peritoneal MΦ (experimental group = E) (3500×)

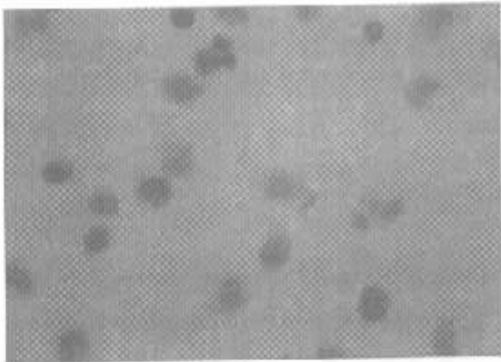


图 3 对照组 MΦ 吞噬 CRBC 的情况(7875×)
Fig.3 MΦ phaging CRBC (C) (7875×)

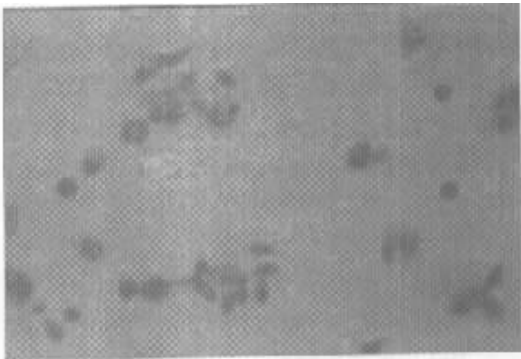


图 4 实验组 MΦ 吞噬 CRBC 的情况(7875×)
Fig.4 MΦ phaging CRBC (E) (7875×)



图 5 实验组 MΦ 消化 CRBC 的情况(17500×)
Fig.5 MΦ digesting CRBC (E) (17500×)

由表 2 可见 ,无论低剂量组还是高剂量组 ,对 CRBC 的吞噬率、吞噬指数及消化率与对照组相比 ,在统计学上均具有显著的差异 .这说明总甙不仅能提高 MΦ 的吞噬活性 ,而且也能显著增强 MΦ 的消化能力 .还可看出 ,高剂量组的吞噬率、吞噬指数和消化率都低于低剂量组 .进行统计学比较发现 ,两实验组的吞噬率差异显著($P<0.05$) ,吞噬指数差异显著($P<0.05$) ,消化率差异不显著($P>0.05$) .说明高剂量组 MΦ 的吞噬能力反而下降 ,虽然消化率还未表现出显著性差异 ,但从数据上看也有此倾向 .所以对总甙作为免疫增强剂来说 ,并不是剂量越高越好 ,合适的剂量是至关重要的 .

表 2 总甙对小鼠腹腔 MΦ 吞噬鸡红细胞的影响

Tab.2 Effect of general glycosides on the activity for murine peritoneal macrophages to phage CRBC

组别	动物数/只	吞噬率/% 与对照组比较的 P 值	吞噬指数及与对照 组比较的 P 值	消化率/% 与对照组比较的 P 值
对照组	7	25.7 ± 10.9 ——	0.51 ± 0.16 ——	3.17 ± 1.16 ——
低剂量组	7	61.5 ± 11.6 $P<0.01$	2.98 ± 0.49 $P<0.01$	25.9 ± 4.91 $P<0.01$
高剂量组	7	43.2 ± 9.8 $P<0.01$	1.84 ± 0.53 $P<0.01$	14.5 ± 2.01 $P<0.01$
万方数据				

2.4 总甙对小鼠腹腔 MΦ Acpase 活性的影响

总甙对小鼠腹腔 MΦ Acpase 活性的影响情况如表 3 和图 6~8 所示.

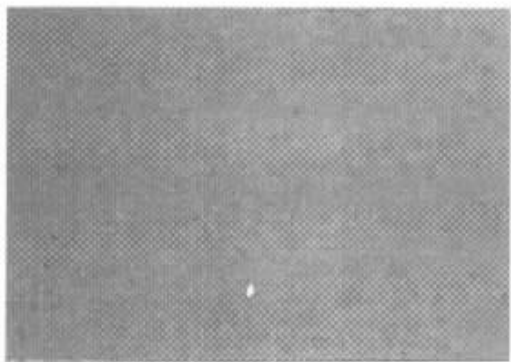


图 6 对照组 MΦ Acpase 的活性 (3500 ×)
Fig.6 Acpase activity of MΦ (C)(3500 ×)

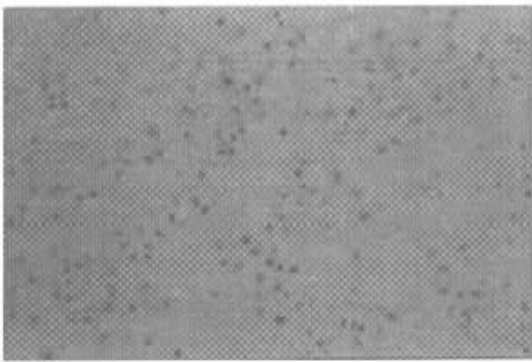


图 7 实验组 MΦ Acpase 的活性 (3500 ×)
Fig.7 Acpase activity of MΦ (E)(3500 ×)

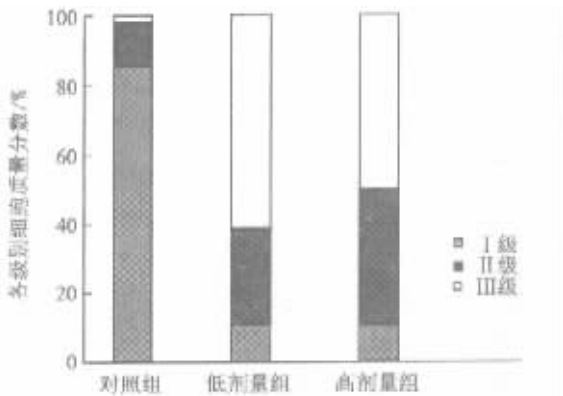


图 8 各组动物 MΦ Acpase 活力分布情况的比较
Fig.8 Three animal groups ' comparison of MΦ Acpase activity

比较图 6 和图 7 ,后者的棕黑色颗粒的大小和数量明显高于前者 ,说明实验组的 MΦ Acpase 活力显著高于对照组 .由统计结果表 3 和图 8 也可看出 ,对照组小鼠腹腔 MΦ 86 %左右的 Acpase 活性较弱 ,处于 I 级水平 ,II 级的只占 12 % ,III 级的几乎没有 ;而两实验组的情况恰好相反 ,Acpase 活力达 III 级的

已占 50 %左右 ,II 级的也有 30 %左右 ,I 级的只占 11 %左右 .低剂量组和高剂量组两个实验组相比 ,I 级所占百分率相近 ,低剂量组的 II 级少于高剂量组 ,而 III 级多于高剂量组 .进行统计学检验发现 ,两实验组的 II 级之间和 III 级之间均具显著性差异($P < 0.05$).说明剂量太高对 MΦ Acpase 活性的提高也是无益的 .因此 ,合适的剂量对 MΦ Acpase 的活性也是必要的 .

2.5 总甙对小鼠腹腔 MΦ 与同体胸腺细胞结合能力的影响

由图 9 和图 10 可以看出 ,实验组的 MΦ 与同体胸腺细胞的结合能力显著高于对照组 .

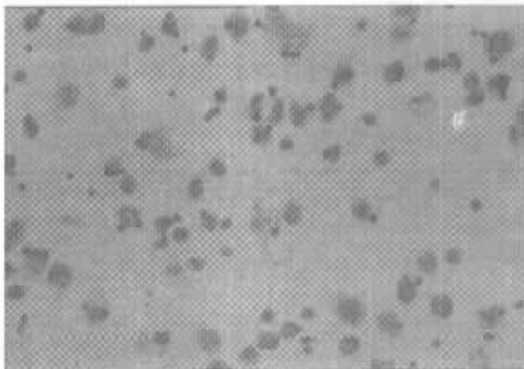


图 9 对照组 MΦ 与胸腺细胞的结合 (3500 ×)
Fig.9 MΦ binding thymocytes (C)(3500 ×)

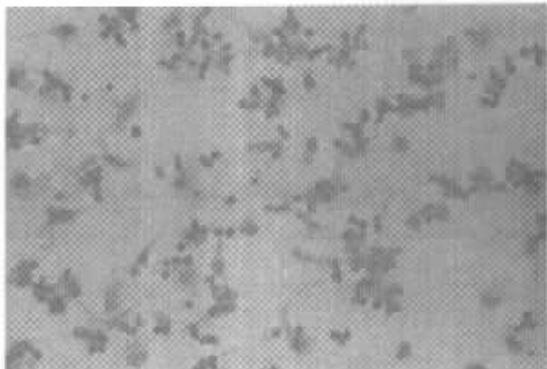


图 10 实验组 MΦ 与胸腺细胞的结合 (3500 ×)
Fig.10 MΦ binding thymocytes (E)(3500 ×)

自表 4 可知 ,低剂量组和高剂量组两个实验组与对照组相比 ,在成花百分率、结合指数和成花指数三个方面均具有极其显著的差异 .说明总甙能极其显著地增强小鼠腹腔 MΦ 与同体胸腺细胞的结合能力 .低剂量组与高剂量组相比 ,成花百分率和结合指数具有显著性差异($P < 0.05$),成花指数差异不显著($P > 0.05$).说明总甙合适剂量的选择对小鼠腹腔 MΦ 与同体胸腺细胞的结合能力的提高也是必要的 .

表 3 总甙对小鼠腹腔 MΦ 的 Acpase 活性的影响
Tab.3 Effect of general glycosides on the Acpase activity of murine peritoneal macrophages

组别	动物数/只	Acpase 各活性级别 MΦ 所占百分率及与对照组比较的 P 值		
		I 级	Ⅱ 级	Ⅲ 级
对照组	7	(86.01 ± 1.56)%	(12.06 ± 1.47)%	(1.93 ± 0.34)%
低剂量组	7	(11.45 ± 1.59)%	(27.32 ± 1.09)%	(61.23 ± 2.01)%
		P<0.01	P<0.01	P<0.01
高剂量组	7	(11.11 ± 2.34)%	(38.45 ± 1.37)%	(50.44 ± 1.59)%
		P<0.01	P<0.01	P<0.01

注 :MΦ Acpase 活性的三级百分数 ,是通过每张显微制片数 200 个细胞 ,看各个级别细胞所占的百分数而得出.

表 4 总甙对小鼠腹腔 MΦ 与同体胸腺细胞结合能力的影响
Tab.4 Effect of general glycosides on the ability of murine peritoneal macrophages binding syngeneic thymocytes

组别	动物数/只	成花百分率/%	结合指数及与对照组	成花指数及与对照组
		与对照组比较的 P 值	比较的 P 值	比较的 P 值
对照组	7	25.06 ± 7.23	1.19 ± 0.42	3.59 ± 0.32
低剂量组	7	73.16 ± 8.65	4.98 ± 0.85	7.13 ± 0.86
		P<0.01	P<0.01	P<0.01
高剂量组	7	59.47 ± 8.21	3.22 ± 0.31	5.94 ± 0.45
		P<0.01	P<0.01	P<0.01

注 :同 Acpase 镜检方法 ,数据由每张显微制片数 200 个细胞的情况而得出.

3 讨 论

本实验的结果表明 ,总甙可激活小鼠腹腔 MΦ. 经总甙激活的 MΦ 与其它激活剂激活的 MΦ 具有同样的特征 :体积增加 ,扩展力增强 ,伪足增多 ,吞噬消化功能增强. MΦ 既要吞噬异物又要消化异物 ,两个过程的意义并不相同. 如果 MΦ 只能吞噬异物 (包括微生物)而不能或不适当地消化和降解异物 ,是不能起到细胞免疫作用的 ,这样必将有害于机体 ,引起甚至加重疾病^[12]. 只有在检测吞噬指标的同时进行溶酶体消化率的观察 ,才可能全面认识 MΦ 的功能. 为此 ,本实验设置 MΦ 消化率的观察是必要的. 结果表明 ,总甙能极其显著地提高 MΦ 对 CRBC 的消化率. MΦ 消化率的强弱主要视 MΦ 内溶酶体数量及其几十种酶含量的多少来决定 ,尤其 Acpase 是溶酶体的标志酶 ,在消化异物及细胞代谢方面起重要作用^[13] ,Acpase 活性的增强是代表 MΦ 激活的主要的一个标志. 本实验结果表明 ,总甙能显著增强 MΦ Acpase 活性. 因此 ,总甙可激活小鼠腹腔 MΦ 的活性 ,增强 MΦ 的吞噬消化功能 ,从而

提高机体的非特异性免疫力.

MΦ 与淋巴细胞之间存在着密切的相互关系 ,它们既相互协助又相互抑制. 目前大致了解到 ,在免疫诱导期 ,MΦ 除处理抗原并向淋巴细胞传递免疫信息外 ,其细胞本身或其产物又有促进或抑制淋巴细胞活性的作用 ;而在免疫效应期 ,淋巴细胞又通过其产物扩大或抑制 MΦ 的吞噬功能. 免疫应答的强弱在很大程度上与抗原的免疫原性有关. MΦ 具有摄取抗原的功能 ,而淋巴细胞不易直接摄取抗原 ,淋巴细胞的免疫应答是通过 MΦ 来传递抗原的免疫信息. MΦ 把抗原传递给 T 细胞 ,在多数情况下是通过细胞表面直接接触来完成的. MΦ 与胸腺细胞结合的现象早已发现^[14] ,并把它作为一个定量指标来研究 MΦ 的抗原提呈作用^[15]. 本实验结果表明 ,总甙极有力地促进了 MΦ 和同体胸腺细胞的结合能力 ,因而可以认为 ,总甙能提高 MΦ 处理抗原的作用 ,进而可影响到机体的特异性免疫.

综上所述 ,白首乌总甙既能提高小鼠的非特异性免疫力 ,又可提高小鼠的特异性免疫力 ,因此 ,白首乌总甙能够提高小鼠的免疫功能 ,这可能是白首乌补益作用的主要机理之一.

参考文献：

[1] 刘成娣 龚树生. 抗衰老中药白首乌研究的进展(综述) [J]. 北京中医学院学报 ,1990 ,13(1) :45~47.

[2] 宋俊梅 ,丁霄霖. 白首乌对超氧阴离子自由基清除作用的研究 [J]. 食品科学 ,1997 ,18(9) :61~64.

[3] 宋俊梅 ,丁霄霖. 白首乌中 C21 甙甙及甙甙元清除羟自由基的功能 [J]. 无锡轻工大学学报 ,1998 ,17(2) :43~46.

[4] 张颖 ,袁长恩 ,王德福等. 白首乌甙甙酯甙对溶血性贫血大鼠肝脏影响的组织化学与生物化学研究 [J]. 中国医药学报 ,1987 ,2(4) :25~28.

[5] 牛建昭 ,叶百宽 ,王德福等. 白首乌对高脂血症大白鼠肝脏保护作用的观察 [J]. 中国医药学报 ,1988 ,3(4) :26~27 43.

[6] 张晓榕 ,陈文为. 白首乌总甙甙酯甙对心脏和肝脏氧代谢的实验研究 [J]. 中国医药学报 ,1987 ,2(5) :23~25.

[7] 赵瑾. 白首乌总甙抑瘤作用的实验研究 [J]. 中国医药学报 ,1988 ,3(2) :29~32.

[8] 顾立刚 龚树生 ,陶军娣. 白首乌甙甙酯甙的抗肿瘤作用 [J]. 中国医药学报 ,1987 ,2(5) :25~26.

[9] 陶义训. 临床免疫学检验 [M]. 上海 :上海科学技术出版社 ,1983.

[10] 宋俊梅 ,冯静仪. 西洋参根提取液对小鼠腹腔巨噬细胞提呈抗原作用影响的研究 [J]. 聊城师院学报(自然科学版) ,1992 ,3(3) :81~83 92.

[11] 宋俊梅 ,冯静仪. 西洋参根提取液对小鼠腹腔巨噬细胞功能影响的研究 [J]. 山东师大学报(自然科学版) ,1993 ,8(1) :74~78.

[12] 许长照. 巨噬细胞溶酶体消化力的研究 II ,体外培养下小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体消化力的形态学检测 [J]. 细胞生物学杂志 ,1985 ,7(2) :73~76.

[13] 于一 ,郭艳茹 ,孟繁菁等. 巨噬细胞在激活过程中形态和功能的改变 [J]. 解剖学杂志 ,1988 ,11(2) :85~88.

[14] LIPSKY P E , ROSENTHAL A S. Macrophage-lymphocyte interaction between immune guinea pig lymph node lymphocytes and syngeneic macrophages [J]. J Exp Med , 1975 ,141 :138~147.

[15] LIPSKY P E , ROSENTHAL A S. Macrophage-lymphocyte interaction I characteristics of the antigen-independent binding of Guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngeneic macrophages [J]. J Exp Med , 1973 ,138 :900~908.

[16] ZIEGLER H K , BELLER D I. Identification of a macrophage antigen processing event required for I -region restricted antigen presentation to T lymphocytes [J]. J Immunol , 1981 ,127 :1968~1980. (责任编辑 杨 萌 ,秦和平)

(上接第 587 页)

参考文献：

[1] 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物科属检索表 [M]. 北京 :科学出版社 ,1979.

[2] 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴补编(第二册) [M]. 北京 :科学出版社 ,1983.

[3] 谭淑宜 ,曾晓雄 ,罗泽民. 提高速溶茶品质的研究. I 酶法提取 [J]. 湖南农学院学报 ,1991 ,17(4) :708~712.

[4] 方元超 ,赵晋府. 酶技术在茶饮料生产中的应用研究 [J]. 饮料工业 ,1999 ,2(1) :12~15.

[5] 赵谋明 ,平燕超 ,邱慧霞等. 草茹抽提物最佳提取工艺条件的研究 [J]. 食品工业科技 ,1997 (2) :35~38.

[6] 谭正初. 利用外源酶提高红碎茶品质研究 [D]. 广州 :华南农业大学 ,1995.

[7] GODFREY T. The application of enzymes in industry [M]. UK :The Nature Press ,1983.

[8] KILARA A. Enzymes and their uses in the processed apple industry process [J]. Biochem ,1982 (17) :35~41.

[9] LEHMBERG G L , BALENTINE D A , HANG R S et al. Enzyme extraction process for tea [P]. US Patent :H0710 2000-03-02.

[10] MASSIOT P. Regration of carrot fibres with cell wall polysaccharide-degrading enzymes [J]. J Sci Food Agric ,1982 (49) :45~57.

[11] MIZUSAWA KI. Application of enzymes to fruit juices and tea drink [J]. Gekkan FuKemikaru ,1994 ,10(2) :36~41.

[12] NICOLAS P , RAETZ E , SAUVAGEAT J L. Preparation of a tea extract [P]. European Patent :EP0 777 972 AI ,1995-12-07.

[13] PETERSEAN B R , DENMARK C. Enzymatic method for production of instant tea [P]. USA P :4483876 ,1984-05-06.

[14] REVISHVILI T O. Effect of enzyme preparations on the tea extract yield [J]. Prikl Biokhom Microbiol ,1984 ,20(4) :556~559.

[15] VORAGEN A G J. Solubilization of apple cell wall with polysaccharide- degrading enzymes [J]. J Appl Biochem ,1980 (2) :452~469 方数据 (责任编辑 李春丽)