

文章编号: 1673-1689(2006)05-0103-04

## 金丝小枣多糖的生物活性

李进伟, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**对金丝小枣多糖生物活性进行了研究。经过鼠脾、鼠腹腔细胞增殖等试验表明,金丝小枣多糖与对照组相比,在30~200 μg/mL剂量范围内显著地促进鼠脾淋巴细胞的增殖( $P < 0.01$ ),且显示出明显的剂量—活性关系( $R^2 = 0.9489$ );金丝小枣多糖也可促进腹腔巨噬细胞的增殖,在30~100 μg/mL剂量范围内,金丝小枣多糖与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ );金丝小枣多糖在体外有明显的抗补体活性。

**关键词:** 金丝小枣多糖; 细胞增殖; 抗补体

中图分类号: TS 201.23

文献标识码: A

## Study on Biological Vitality for *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* Polysaccharides

LI Jin-wei, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Biologically function of polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. was studied. The results showed that the polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* had a promoted effect on proliferation of mouse spleen cell. in a concentration - dependent manner( $R^2 = 0.9489$ ), and compared with that of the control, polysaccharides exhibited a significant promoted effect in the concentration range of 30 ~ 200 μg/mL( $P < 0.01$ ). Polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* were also showed to promote the proliferation of mouse macrophage cell in the range of 50 ~ 100 μg/mL( $P < 0.05$ ). Further more, polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* also had a marked anti-complement action in vitro.

**Key words:** *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* polysaccharide; proliferation of cell; anti-complement

枣(*ZiZyphus Jujuba* cv.)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属植物,在我国有悠久的食用和药用历史,其资源十分丰富,总量占世界资源的90%以上<sup>[1]</sup>。医学研究发现,红枣具有健脾养胃,补中益气,滋肺强肾,缓解药毒,抑制癌细胞增殖的保健功效<sup>[2]</sup>。红枣除含有丰富的维生素及Ca、P、Fe等矿物质元素外,还含有活性多糖。

多糖有促进多种免疫缺损疾病、抗肿瘤、抗补体、降低血糖血脂等功能<sup>[3-6]</sup>。作者研究金丝小枣(*ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*)多糖对脾淋巴细胞、腹腔巨噬细胞的增殖以及金丝小枣多糖的抗补体活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

金丝小枣多糖从金丝小枣中分离提取,经冷冻干燥后获得,样品易溶于水。

3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基-四唑氢溴酸盐(MTT) Sigma公司产品;RPMI-1640 GIBCO公司产品;小牛血清:杭州四季青生物工程公司产品;台盼蓝 Sigma公司产品;绵羊红细胞(SRBC):无锡市汇生试剂有限公司产品;溶血素(抗绵羊红细胞抗体):浙江省玉环县南方试剂厂产品;谷氨酰胺(进口分装):中国医药上海化学试剂公司产品;二甲亚砜(DMSO)天津化学试剂一厂产品。

RPMI-1640完全培养液:10%灭活小牛血清,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素,1%谷氨酰胺,4℃保存备用。

抗补体缓冲溶液(7.4):取75 g NaCl溶于700 mL蒸馏水中,再加入177 mL的1 mol/L HCl和28 mL三乙醇胺。将1.0 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O和0.2 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O分别用2 mL蒸馏水溶解后,逐一加入,再用蒸馏水加至1 000 mL,4℃保存备用。使用前取上述溶液1份加9份蒸馏水。

### 1.2 主要实验仪器

CO<sub>2</sub>培养箱:美国 Thermo 公司制造;超净工作台:苏净集团安泰公司制造;台式离心机:上海精密仪器有限公司制造;DG-3022A酶联免疫检测仪:华东电子管厂制造;752紫外-可见分光光度计:上海精密仪器有限公司制造。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 金丝小枣多糖对细胞增殖实验

1)鼠脾细胞增殖实验:取(20±2)g的小鼠,颈椎脱臼杀死,70%酒精浸泡消毒。在无菌条件下,取小鼠脾脏,用预冷无血清的培养液洗涤、剪碎,用针栓研磨,过筛,预冷的无血清培养液冲洗筛网,在4℃的条件下,冲洗液冷冻离心(400 g)5 min。弃上清液,细胞沉淀用0.83% Tris-NH<sub>4</sub>Cl重悬,裂解红细胞。再在4℃冷冻离心(300 g)5 min,弃上清液,细胞沉淀经几次不同的培养液重悬,得单个脾细胞悬液。台盼蓝染色计数,活细胞大于95%,调节细胞浓度为1×10<sup>6</sup>个/mL,加入96孔圆底培养板,每孔加100 μL细胞悬液,然后加入20 μL不同浓度的金丝小枣多糖液和80 μL RPMI-1640完全培养液,每个多糖浓度设8个复孔。对照组每孔加100 μL细胞悬液和RPMI-1640完全培养液100 μL。

在37℃,95% O<sub>2</sub>,5% CO<sub>2</sub>条件下培养72 h,MTT法测定结果。培养结束前4 h时,每孔加入5 mg/mL MTT 20 μL,再培养4 h,1 000 r/min离心5 min。弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL,振荡使紫色结晶溶解,酶联免疫仪于570 nm测OD值。不同浓度的加药组与空白组之间均值用t检验进行比较,淋巴细胞增殖率按下式计算。

$$\text{淋巴细胞增殖率}(\%) = \frac{(\text{样品 OD 值} - \text{对照 OD 值})}{\text{对照 OD 值}} \times 100\%$$

2)鼠腹腔巨噬细胞增殖实验:取(20±2)g的小鼠,颈椎脱臼杀死小鼠,70%酒精浸泡消毒。将小鼠置于手术台上,固定四肢,切开腹部暴露腹膜壁。用注射器注入腹腔10 mL无血清RPMI-1640培养液,轻揉两侧腹膜壁,用针头将腹腔中液体收集于试管内。小心拔出针头,把液体注入离心管中,在4℃的条件下,冲洗液冷冻离心(250 g)10 min,去上清液,用含10%小牛血清的RPMI-1640完全培养液重悬细胞,调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>个/mL。分组后MTT法测定结果。

#### 1.3.2 抗补体活性ITCH<sub>50</sub>测定

1)血清总补体溶血活性(TCH<sub>50</sub>)测定:取健康人血清0.2 mL,加入缓冲液3.8 mL,配成1:20稀释血清,按表1所示加入各试剂,混匀,将试管置于37℃水浴30 min。然后将各试管以2 500 r/min离心5 min,取上清液与50%溶血标准管目视比较,观察溶血程度。取与50%溶血标准管相接近的两管,在分光光度计(542 nm)上分别读取光密度值(0.5 cm比色杯,以缓冲液作为空白调零),以最接近50%溶血标准管的一管为准,按下列公式计算TCH<sub>50</sub>。

$$\text{TCH}_{50} = \frac{1}{\text{引起 50\% 溶血管的血清量}(\text{mL})} \times 20(\text{稀释倍数})$$

表1 测定TCH<sub>50</sub>所需试剂量表

Tab.1 The reagent amount for determination TCH<sub>50</sub>

试管编号	1:20稀释血清量/mL	缓冲液量/mL	致敏SRBC量/mL
1	0.10	1.40	1.0
2	0.15	1.35	1.0
3	0.20	1.30	1.0
4	0.25	1.25	1.0
5	0.30	1.20	1.0
6	0.35	1.15	1.0
7	0.40	1.10	1.0
8	0.45	1.05	1.0
9	0.50	1.00	1.0
10	-	1.50	1.0

2) 抗补体活性  $ITCH_{50}$  测定: 样品溶解于缓冲液中, 配成所需浓度, 将不同浓度的样品与健康人血清于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴  $30\text{ min}$ , 缓冲液作为对照, 抗补体活性以血清总补体溶血活性 ( $TCH_{50}$ ) 与对照相比的抑制百分率计算。

$$ITCH_{50} = \frac{TCH_{50}(\text{对照}) - TCH_{50}(\text{样品})}{TCH_{50}(\text{对照})}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 金丝小枣多糖对细胞增殖的影响

常用测定细胞增殖的方法有细胞消化后的镜下计数、细胞克隆计数、细胞膜片面积测量和同位素掺入法。细胞计数法不能区别细胞的活性, 同位素方法需要放射性同位素仪器, 而 MTT 比色法的原理是利用活细胞中线粒体脱氢酶将染料 MTT 还原成不溶于水的蓝紫色产物——甲臜, 并沉淀在细胞中, 死细胞或红细胞没有这种功能, 甲臜产生的量与细胞数成正比, 而代谢活跃的细胞要比静止细胞产生更多甲臜<sup>[7]</sup>。二甲亚砷能溶解沉积在细胞中蓝紫色结晶物, 溶液颜色的深浅与所含的甲臜量成正比, 故可用于来测定活细胞及细胞的增殖。

2.1.1 金丝小枣多糖对脾淋巴细胞增殖的影响  
经 MTT 比色法测定可知, 金丝小枣多糖能促进鼠脾淋巴细胞的增殖 (见图 1)。由图 1 可以看出, 在  $30 \sim 200\text{ }\mu\text{g/mL}$  剂量范围内, 与对照组相比, 金丝小枣多糖显著性地促进鼠脾淋巴细胞的增殖 ( $P < 0.01$ ); 当金丝小枣多糖质量浓度为  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ , 其脾淋巴细胞增殖率达到  $118\%$ , 而且金丝小枣多糖对脾淋巴细胞增殖作用存在着明显的剂量——活性关系 ( $R^2 = 0.9489$ ), 这个结果与一些学者在植物多糖方面的研究结果相一致<sup>[8-9]</sup>。

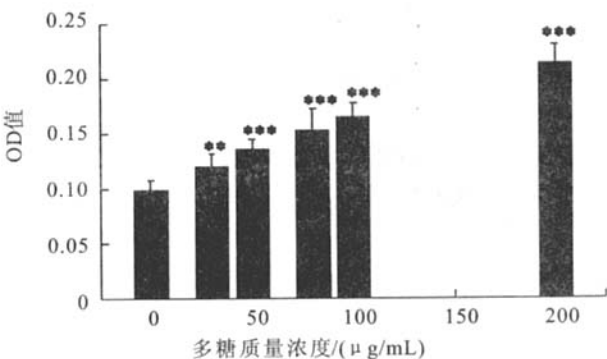


图1 金丝小枣多糖对鼠脾淋巴细胞的增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ , \*\* 为  $P < 0.01$ , \*\*\* 为  $P < 0.001$ )

Fig.1 Effect of polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* on the proliferation of mouse spleen cell

### 2.1.2 金丝小枣多糖对腹腔巨噬细胞增殖的影响

金丝小枣多糖对腹腔巨噬细胞增殖的影响见图 2。金丝小枣多糖可促进腹腔巨噬细胞的增殖, 随着金丝小枣多糖液质量浓度的增加, 其腹腔巨噬细胞增殖作用也随之增强; 在  $30 \sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$  剂量范围内, 金丝小枣多糖与对照组相比, 有显著的差异 ( $P < 0.05$ ), 而且对促进腹腔巨噬细胞增殖的作用也存在着一定的剂量——活性关系 ( $R^2 = 0.8331$ )。

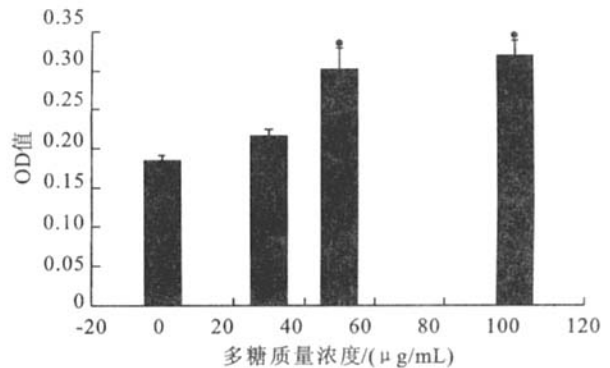


图2 金丝小枣多糖对鼠巨噬巴细胞的增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ , \* 为  $P < 0.05$ )

Fig.2 Effect of polysaccharides from *ZiZyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao* on the proliferation of mouse macrophage cell

### 2.2 金丝小枣多糖的抗补体活性研究

补体能使溶血素 (抗绵羊红细胞补体) 致敏的绵羊红细胞 (SRBC) 发生溶血, 当绵羊红细胞 (SRBC) 浓度恒定时, 溶血程度与补体含量和活性呈正比例关系, 因此, 将新鲜待检血清做不同稀释后, 与致敏绵羊红细胞 (SRBC) 反应, 可测定补体总溶血活性。在接近  $50\%$  溶血素时, 二者之间呈近似直线关系, 故以  $50\%$  溶血作为最敏感的判定终点。作者采用最灵敏、最经典的溶血实验对金丝小枣多糖抗补体活性进行考察。

通过目视比较可知, 第 2、3 管与  $50\%$  溶血标准管接近。经分光光度计在  $542\text{ nm}$  测定可知, 第二管光密度值最接近  $50\%$  溶血标准管, 故以第二管作为考察抗补体活性的  $TCH_{50}$  值 (见表 2)。

金丝小枣多糖在体外有明显的抗补体活性, 随着多糖质量浓度的增大而抗补体活性不断增强 (见图 3)。当金丝小枣多糖质量浓度为  $25, 125\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 其抗补体活性分别为  $22\%$  和  $72\%$ ; 当质量浓度大于  $125\text{ }\mu\text{g/mL}$  时, 其抗补体活性增强的趋势变缓。

表2 TCH<sub>50</sub>法测定总补体活性Tab.2 Determination of 50% complement hemolysis TCH<sub>50</sub>

试管编号	TCH <sub>50</sub> 法测总补体活性/(U/mL)
1	200
2	133
3	100
4	80
5	66.6
6	57.1
7	50
8	44.4
9	40
10	-

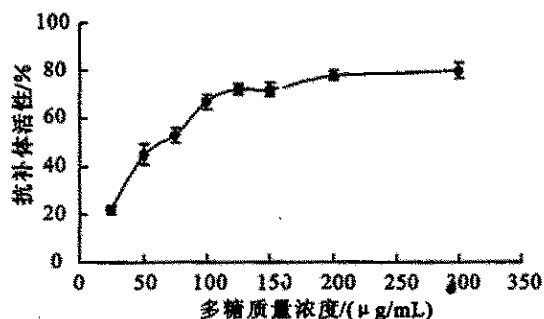


图3 金丝小枣多糖的抗补体活性

Fig.3 Anti-complementary activities of polysaccharides from *Zizyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*

### 3 讨论

由于作者采用的是金丝小枣多糖和细胞共同体外培养的方法来推测金丝小枣多糖对细胞增殖的作用,这有助于对金丝小枣多糖的进一步纯化和结构鉴定,进而搞清它们的构效关系。

补体系统是一个具有精密调控机制的复杂的蛋白质反应系统,可通过经典途径、旁路途径、凝集

素途径这三条既独立又交叉的途径激活。本实验表明,金丝小枣多糖在体外有明显的抗补体活性,但通过哪种途径激活补体系统有待进一步探讨。

金丝小枣属于药食同源植物中免疫调节类,金丝小枣多糖对脾淋巴细胞、腹腔巨噬细胞的增殖以及在体外的抗补体活性为其免疫调节提供了间接依据。

### 参考文献:

- [1] 魏玉君. 近十年中国枣文献浅析[J]. 农业图书情报学刊, 2005, 17(4): 138-142.
- [2] 超予. 红枣保健新功用[J]. 家庭中医药, 2000(3): 7-8.
- [3] Hong-Xi X, Spencer H S, Song F, et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*[J]. *Antiviral Research*, 1999, 44: 43-54.
- [4] Jinyou D, Xuesong W, Qun D, et al. Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*[J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 1291-1297.
- [5] Kulicke W M, Lerrau A I, Thielking H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different[J]. *Carbohydrate Research*, 1997, 297: 135-143.
- [6] H Yamada, K S Ra, H Kiyohara, et al. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L.[J]. *Carbohydrate Research*, 1989, 189: 209-226.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *Journal of Immunobiology Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [8] 单俊杰, 王易, 王顺春, 等. 当归多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生 IFN- $\gamma$  的影响[J]. 药学报, 2002, 37(7): 497-500.
- [9] 詹林盛, 张新生, 吴晓红, 等. 海带多糖的免疫调节作用[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(3): 116-118.

(责任编辑:李春丽)