

山药多糖对正常小鼠与实邪证模型小鼠免疫功能的影响

曾祥海*(铜仁市第二人民医院药剂科, 贵州 铜仁 554300)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2125-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.05

摘要 目的:研究山药多糖对正常小鼠与实邪证模型小鼠免疫功能的影响。方法:40只ICR小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组与山药多糖高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组;40只实邪证模型小鼠随机均分为实邪证模型(等容生理盐水)组与山药多糖高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组,另以10只ICR小鼠为正常对照(等容生理盐水)组,均灌胃给药,每天1次,连续4周。进行碳粒廓清实验,绵羊红细胞诱导小鼠迟发型变态反应,测定小鼠血清白细胞介素(IL)-2含量。结果:与正常对照组比较,山药多糖高、中剂量组小鼠廓清指数(K)、吞噬指数(α)、足肿胀程度、血清IL-2含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与实邪证模型组比较,山药多糖高剂量组小鼠 K 、 α 、足肿胀程度、血清IL-2含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:山药多糖对正常小鼠免疫力有促进作用,但对实邪证模型小鼠免疫力则有削弱作用。因此,临床用药时应注意具体情况,以免起到相反效果。

关键词 山药多糖;实邪证;廓清指数;吞噬指数;绵羊红细胞;迟发型变态反应;白细胞介素2

Effects of *Dioscorea opposita* Polysaccharides on Immune Function in Normal Mice and Mice with Dampness and Blood-stasis Syndrome

ZENG Xiang-hai (Dept. of Pharmacy, Tongren Municipal Second People's Hospital, Guizhou Tongren 554300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the influence of *Dioscorea opposita* polysaccharide on immune function in normal mice and mice with dampness and blood-stasis syndrome. METHODS: ICR mice were randomized into normal control group (constant volume of normal saline), *D. opposita* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups (400, 200, 100 mg/kg); 40 mice with dampness and blood-stasis syndrome were randomized into model group (constant volume of normal saline), *D. opposita* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups (400, 200, 100 mg/kg); other ICR mice were included in normal control group. they were given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 4 weeks. Carbon clearance test was conducted, and sheep red blood cell induced delayed hypersensitivity reaction in mice. The serum level of IL-2 in mice was determined. RESULTS: Compared with normal control group, clearance index (K), phagocytic count (α), mice foot swelling degree and the content of serum IL-2 increased in *D. opposita* polysaccharide high-dose and medium-dose groups; there was statistical significance ($P < 0.05$). Compared with model group, K , the value of α , mice foot swelling degree, the serum level of IL-2 decreased in *D. opposita* polysaccharide high-dose group; there was statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: *D. opposita* polysaccharide promotes immune function in normal mice but weaken immune function of mice with dampness and blood-stasis syndrome. Therefore, we should pay attention to the specific circumstances of patients in clinical medication, so as to avoid the opposite effect.

KEYWORDS *Dioscorea opposita* polysaccharide; Dampness and blood-stasis syndrome; Clearance index; Phagocytic count; Sheep red blood cells; Hypersensitivity reaction; IL-2

山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb 的干燥根茎。其性平,味甘,具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效^[1]。其含有多种有效成分,目前国内外研究最多的是山药多糖,含量约为山药的21.15%~21.92%,由甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成。研究表明,山药多糖具有多种药理作用,如降血糖、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗突变等^[2-6],而对动物免疫功能的调节方面报道较少。笔者通过不同剂量的山药多糖作用于正常小鼠与实邪证模型小鼠,测定碳粒廓清指数(K)、脾脏指数(α)、迟发型变态反应(DTH)、白细胞介素(IL)-2,以阐明其对上述小鼠免疫功能的调节作用。

1 材料

* 主管药师。研究方向:中药学。电话:0856-5200161。E-mail: zengxianghai11@163.com

1.1 仪器

Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司);T6型紫外-可见分光光度计(杭州瑞析科技有限公司产品);CO₂恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

山药多糖(陕西天地源生物公司,纯度:20%);MTT(美国Amresco公司);刀豆蛋白A(ConA,美国Sigma公司);改良型RPMI-1640培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);IL-2测试盒(北京方程生物科技有限公司)。

1.3 动物与细胞

清洁级ICR小鼠,♂,体质量20~22 g,由遵义医学院实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(黔)

2013-0005]。绵羊红细胞(SRBC, 郑州百基生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 实邪证模型小鼠的制备

将小鼠放于人工气候箱中, 设定空气中实际含量占同样温度条件下饱和含水量百分比为(90±4)%、温度为(6±2)℃, 每天8 h, 连续30 d以复制小鼠实邪证模型。

2.2 分组与给药

40只ICR小鼠随机均分为4组, 即正常对照(等容生理盐水)组与山药多糖高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组; 40只实邪证模型小鼠随机均分为4组, 即实邪证模型(等容生理盐水)组与山药多糖高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组, 另以10只ICR小鼠为正常对照(等容生理盐水)组, 均ig给药, 每天1次, 连续4周。

2.3 小鼠碳粒廓清实验^[7]

末次给药1 h后, 小鼠尾iv印度墨汁(生理盐水稀释4倍)0.1 ml/10 g, 分别在注射后1、5 min时小鼠眼球取血20 μl, 肝素抗凝, 溶于2 ml 0.1% Na₂CO₃溶液中摇匀, 于600 nm波长处测定吸光度(A)。取血后颈椎脱臼处死小鼠, 摘取肝脏、脾脏, 分别称定质量, 按下式计算廓清指数(K)、吞噬指数(α)。K=lgA₁-lgA₂/(t₂-t₁); α=K^{1/3}×体质量/(肝质量+脾质量)。式中, K为吞噬速率; α为碳廓清能力; A₁、A₂为在时间点t₁、t₂时所取血样的A; t₂-t₁为取两血样的时间差。

2.4 SRBC诱导小鼠DTH

末次给药1 h后, 每只小鼠ip 0.2 ml 2% SRBC免疫。免疫4 d后, 用游标卡尺测量于小鼠左后足跖部厚度, 于同一位置ih 20% SRBC(20 μl/只)。注射后于24、48 h用游标卡尺测量小鼠左后足跖部厚度, 减去初始厚度, 为小鼠足跖肿胀度, 同一部位测量3次。

2.5 小鼠血清IL-2含量的测定

末次给药1 h后, 小鼠眼球取血, 静置1 h, 4℃下以离心半径为13.5 cm、1 000 r/min离心10 min收集血清。用ELISA法测定血清中IL-2的含量, 操作方法按试剂盒说明书进行。

2.6 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布, 后以LSD法进行统计。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠碳粒廓清实验结果

3.1.1 山药多糖对正常小鼠碳粒廓清实验的影响 与正常对照组比较, 山药多糖高、中剂量组小鼠K、α升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。山药多糖对正常小鼠碳粒廓清实验的影响见表1。

表1 山药多糖对正常小鼠碳粒廓清实验的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Effect of carbon clearance test in normal mice treated with *D. opposita* polysaccharide($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, mg/kg	K	α
正常对照组		0.026 1±0.003 7	4.375 8±0.264 9
山药多糖低剂量组	100	0.033 5±0.018 4	4.981 3±0.756 1
山药多糖中剂量组	200	0.042 9±0.025 1*	5.736 2±0.934 5*
山药多糖高剂量组	400	0.056 3±0.020 6*	6.865 9±0.642 8*

与正常对照组比较: *P<0.05
vs. normal control group: *P<0.05

3.1.2 山药多糖对实邪证模型小鼠碳粒廓清实验的影响 与正常对照组比较, 模型组小鼠K、α升高, 差异有统计学意义(P<0.05); 与模型组比较, 山药多糖高剂量组小鼠, 差异有统计学意义(P<0.05)。山药多糖对实邪证模型小鼠碳粒廓清实验的影响见表2。

表2 山药多糖对实邪证模型小鼠碳粒廓清实验的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effect of carbon clearance test in model mice treated with *D. opposita* polysaccharide($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量, mg/kg	K	α
正常对照组		0.028 4±0.003 2	4.312 6±0.271 4
实邪证模型组		0.014 7±0.010 9*	3.267 3±0.365 8*
山药多糖低剂量组	100	0.011 5±0.008 7	3.045 1±0.283 9
山药多糖中剂量组	200	0.009 6±0.009 4	2.896 2±0.305 2
山药多糖高剂量组	400	0.006 3±0.009 5*	2.362 7±0.290 6*

与正常对照组比较: *P<0.05; 与实邪证模型组比较: *P<0.05
vs. normal control group: *P<0.05; vs. dampness and blood-stasis syndrome model group: *P<0.05

3.2 SRBC诱导小鼠DTH结果

3.2.1 山药多糖对正常小鼠DTH的影响 与正常对照组比较, 注射24、48 h时山药多糖高、中剂量组小鼠足跖厚度增加值升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。山药多糖对正常小鼠DTH的影响见表3。

表3 山药多糖对正常小鼠DTH的影响[小鼠足跖厚度增加值(nm), $\bar{x} \pm s, n=10$]

Tab 3 Effect of delayed hypersensitivity reaction in normal mice treated with *D. opposita* polysaccharide [increase value of mice voix pedis thickness(nm), $\bar{x} \pm s, n=10$]

组别	剂量, mg/kg	24 h	48 h
正常对照组		0.125 ±0.029	0.131 ±0.028
山药多糖低剂量组	100	0.130 ±0.033	0.147 ±0.030
山药多糖中剂量组	200	0.172 ±0.038*	0.196 ±0.041*
山药多糖高剂量组	400	0.216 ±0.027*	0.242 ±0.066*

与正常对照组比较: *P<0.05
vs. normal control group: *P<0.05

3.2.2 山药多糖对实邪证模型小鼠DTH的影响 与正常对照组比较, 注射24、48 h实邪证模型小鼠足跖厚度增加值降低, 差异有统计学意义(P<0.05); 与模型组比较, 山药多糖高剂量组小鼠足跖厚度增加值降低, 差异有统计学意义(P<0.05)。山药多糖对实邪证模型小鼠DTH的影响见表4。

表4 山药多糖对实邪证模型小鼠DTH的影响[小鼠足跖厚度增加值(nm), $\bar{x} \pm s, n=10$]

Tab 4 Effect of Delayed hypersensitivity reaction in model mice treated with *D. opposita* polysaccharide[increase value of mice voix pedis thickness(nm), $\bar{x} \pm s, n=10$]

组别	剂量, mg/kg	24 h	48 h
正常对照组		1.286 ±0.027	1.347 ±0.026
实邪证模型组		0.752 ±0.031*	0.786 ±0.033*
山药多糖低剂量组	100	0.704 ±0.038	0.071 ±0.037
山药多糖中剂量组	200	0.628 ±0.040	0.640 ±0.039
山药多糖高剂量组	400	0.535 ±0.028*	0.552 ±0.029*

与正常对照组比较: *P<0.05; 与实邪证模型组比较: *P<0.05
vs. normal control group: *P<0.05; vs. dampness and blood-stasis syndrome model group: *P<0.05

3.3 小鼠血清 IL-2 含量的测定

3.3.1 山药多糖对正常小鼠血清 IL-2 含量的影响 与正常对照组比较, 山药多糖高、中剂量组小鼠 IL-2 含量增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。山药多糖对正常小鼠血清 IL-2 含量的影响见表 5。

表 5 山药多糖对正常小鼠血清 IL-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 5 Effect of *D. opposita* polysaccharide on serum level of IL-2 in normal mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	IL-2,pg/ml
正常对照组		33.08 ± 5.42
山药多糖低剂量组	100	35.36 ± 6.49
山药多糖中剂量组	200	38.44 ± 6.83*
山药多糖高剂量组	400	45.27 ± 6.25*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$

3.3.2 山药多糖对实邪证模型小鼠血清 IL-2 含量的影响 与正常对照组比较, 实邪证模型组小鼠血清 IL-2 含量减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 山药多糖高剂量组小鼠 IL-2 含量减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。山药多糖对实邪证模型小鼠血清 IL-2 含量的影响见表 6。

表 6 山药多糖对实邪证模型小鼠血清 IL-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 6 Effect of *D. opposita* polysaccharide on serum level of IL-2 in model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	IL-2, pg/ml
正常对照组		33.62 ± 5.61
实邪证模型组		24.35 ± 5.03*
山药多糖低剂量组	100	23.74 ± 6.37
山药多糖中剂量组	200	21.59 ± 6.05
山药多糖高剂量组	400	18.22 ± 5.72*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与实邪证模型组比较: * $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. dampness and blood-stasis syndrome model group: * $P < 0.05$

4 讨论

单核巨噬细胞系统即网状内皮系统 (RES) 是机体非特异性免疫系统的重要组成部分, 单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一。当颗粒状异物注入血液后, 主要迅速被在肝和脾脏的单核巨噬细胞所清除。小鼠碳粒廓清实验中所测得的 K 可以反映 RES 的吞噬功能, α 可以反映单核巨噬细胞的吞噬能力, 因此有助于观察机体健康状况^[8]。本研究中, 高、中剂量山药多糖可升高正常小鼠的 K 、 α , 而高、中、低剂量山药多糖可降低实邪证模型小鼠 K 、 α , 其中山

药多糖高剂量组与实邪证模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明山药多糖在正常状态下对其机体非特异性免疫功能有促进作用, 但在实邪证状态下对小鼠则加重其非特异性免疫功能紊乱程度。

SRBC 可以刺激 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞, 4 d 后, 当再以 SRBC 攻击时, 攻击部位出现肿胀, 其肿胀程度可以反映迟发型变态反应程度。本研究中, 高、中剂量山药多糖可增强正常小鼠 24、48 h 内的 DTH 程度, 而高剂量山药多糖可明显减弱实邪证模型小鼠 24、48 h 内的 DTH 程度。表明山药多糖在正常状态下对免疫力有促进作用, 但在实邪证状态下对小鼠则削弱其正常免疫力。

IL-2 是免疫应答过程中重要的细胞因子, 可刺激 T 淋巴细胞生长、分化及增强细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 的功能, 在胸腺细胞分化过程中起着重要作用。本研究中, 高、中剂量山药多糖可增加正常小鼠血清 IL-2 含量, 而高剂量山药多糖可明显减少实邪证模型小鼠血清 IL-2 含量。表明山药多糖在正常状态下对机体免疫应答过程有积极作用, 但在实邪证状态下对小鼠则削弱其机体的正常免疫应答过程。

综上所述, 山药多糖对正常小鼠免疫力有促进作用, 但对实邪证模型小鼠的免疫力则有削弱作用。因此, 临床用药时应注意患者的具体情况, 以免起到相反效果。

参考文献

- [1] Chen HL, Wang CH, Chang CT, et al. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb Var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice[J]. *Nutrition*, 2003, 19(7): 646.
- [2] 何云. 山药多糖降血糖作用的实验研究[J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10(4): 448.
- [3] 王丽霞, 刘安军, 舒媛, 等. 山药蛋白多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2): 242.
- [4] 相湘. 山药的抗衰老作用研究[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(24): 109.
- [5] 赵国华, 李志孝, 陈宗道. 山药多糖 RDPS-I 的结构分析及抗肿瘤活性[J]. 药学学报, 2003, 38(1): 37.
- [6] 王洪新, 王远辉. 山药多糖研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 321.
- [7] 覃容贵, 傅平, 吴建伟, 等. 蝇蛆蛋白粉对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2007, 30(6): 635.
- [8] 覃筱燕, 黎荣昌, 唐丽, 等. 红药提取物对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(6): 931.

(收稿日期: 2014-03-03 修回日期: 2014-04-17)