

和脂质过氧化、线粒体损伤、遗传等多个方面,可损害肝脏各种细胞器和酶的结构功能,并能刺激免疫系统,诱发免疫性肝损害<sup>[9]</sup>。其中氧应激和脂质过氧化可能是酒精引起肝损伤的起始因素之一。在氧化和抗氧化体系中,MDA是脂质过氧化物的最终代谢产物,其含量的高低可间接反映机体的脂质过氧化程度,从而反映细胞损伤的程度<sup>[10]</sup>。而SOD和GSH-PX是细胞内抗脂质过氧化作用的酶性保护系统的主要成分<sup>[11]</sup>。本实验中TFLC可显著降低酒精导致的肝组织MDA含量增加,提高SOD和GSH-PX活性,表明其可通过减弱脂质过氧化反应,减轻酒精对肝细胞的损害。

很多炎症细胞因子都参与了酒精诱导的肝损伤过程。TNF- $\alpha$ 是ALD病程中多效能的前炎症因子,可诱导TNF- $\alpha$ 本身、IL-1、IL-6、IL-8等因子的大量分泌并介导肝细胞功能受损,处于肝细胞损伤的细胞因子网络的核心,在ALD发病机理尤其是炎症级联放大反应中发挥着关键作用<sup>[12]</sup>。有研究表明应用TNF- $\alpha$ 抑制剂降低TNF- $\alpha$ 水平可减轻酒精性肝损伤<sup>[13]</sup>。IL-1 $\beta$ 主要由活化的单核-吞噬细胞产生,具有广泛的生物学效应,如促进炎症介质释放,直接参与炎症过程<sup>[14]</sup>。在本研究中TFLC可显著降低急性酒精性肝损伤小鼠血清TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平,表明对该两种重要炎症细胞因子的调节也是其对急性酒精性肝损伤保护作用的机理之一。

至今临床上还没有有效防治酒精性肝病发生发展的理想药物,因此对ALD早期预防显得尤为重要。本实验提示经过现代工艺提取的TFLC可能通过提高机体抗氧化能力,抑制脂质过氧化反应以及免疫调节等作用减轻酒精诱导的肝损伤程度,具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

[1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝

病诊疗指南[J]. 中华肝病杂志, 2006, 14(3):164.

- [2] 庄辉. 酒精性肝病的流行病学[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(11):698-699.
- [3] 郁建平,叶辉. 老鹰茶(豹皮樟)天然食用色素的初步研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2):40-43.
- [4] 郁建平,古练秋. 贵州老鹰茶的化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(3):61-62.
- [5] 陈玉璞,程文明,李俊. 老鹰茶中黄酮类化学成分分析[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(1):65-67.
- [6] 王媛媛,李俊,曹琦,等. 豹皮樟总黄酮对大鼠酒精性脂肪性肝病的防治作用及部分机制[J]. 安徽医科大学学报, 2007, 42(2):179-182.
- [7] 王宪岭,刘仁慧,张影,等. 柴胡黄芩配伍抗小鼠急性酒精性肝损伤的实验研究[J]. 中药材, 2004, 27(10):756-758.
- [8] Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage[J]. *Lancet*, 2000, 355(9204):591-592.
- [9] 厉有名. 酒精性肝病的发病机制[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(11):690-691.
- [10] Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 355(1-2):61-65.
- [11] Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species[J]. *Physiol Rev*, 1994, 74(1):139-162.
- [12] Ponnappa BC, Israel Y, Aini M *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides[J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(4):569-577.
- [13] Day CP. Treatment of alcoholic liver disease[J]. *Liver Transpl*, 2007, 13(11 Suppl 2):S69-75.
- [14] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2004:72.

## 化橘红多糖对小鼠的免疫调节作用

董宏坡<sup>1,2</sup>, 江明树<sup>1</sup>, 朱伟杰<sup>1</sup>

(1. 茂名学院生物技术系, 广东 茂名 525000; 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

关键词:化橘红; 多糖; 小鼠; 免疫功能

中图分类号:R285.6

文献标识码:B

文章编号:1001-528(2010)03-0491-03

天然多糖类化合物如蘑菇、地衣和藻类多糖由于具有抗肿瘤和免疫增强的作用<sup>[1]</sup>,在医药领域已经受到人们愈来愈

多的重视。化橘红是广东名贵中药材,为芸香科植物化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮。它具有治疗风寒咳嗽,

收稿日期:2009-01-12

基金项目:广东省科技计划项目(2006B20201037)资助

作者简介:董宏坡(1978-),男,讲师,在读博士生,主要从事天然产物提取和分子机理研究。E-mail: donghongpo2001@163.com Tel: (0592)2184982

肝胃气痛 祛痰止咳作用 对慢性支气管炎、慢性阻塞性肺炎具有良好疗效。多糖是化橘红的主要成分之一,韦英杰等人通过正交试验法对化橘红提取工艺进行研究<sup>[2]</sup>。陈华萍等人测定了化橘红中多糖的含量<sup>[3]</sup>,但是对化橘红多糖免疫调节功能的研究至今未见报道。本实验从化橘红中提取出多糖,并进行了初步的纯化,进而从非特异性免疫和特异性免疫两个方面对其免疫调节活性进行了研究,旨在为开发新型的化橘红多糖免疫增强药物提供技术支持和理论依据。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 材料

化州橘红切片和甘露聚糖肽 购于广东大参林药业有限公司;昆明种小鼠(25~28 g,7~9周)购于广东省医学实验动物中心,合格证号2004A021,在标准实验室条件下饲养如室温、自由摄食和饮水。

#### 1.2 试剂与仪器

石油醚、乙醚、氯仿、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、丙酮均为国产分析纯;植物凝血素(PHA)、DEAE-Sephadex-A25 购自上海生物工程有限公司;瑞氏染色液、都氏试剂。

Alsever 溶液(鸡红细胞保存液)制备和鸡红细胞制备与保存见文献<sup>[4]</sup>。

TG16A-WS 离心机, XSP-24N 显微镜, 722N 可见分光光度计, 德国 SARTORIUS BS214D 电子天平, 苏州净化 SW-CJ-IFD 超净工作台。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和给药方法 50只小鼠被随机分为5组:空白对照组(生理盐水),3个PECP组(50 mg/kg,100 mg/kg,200 mg/kg 体重),1个阳性对照组(甘露聚糖肽25 mg/kg 体重)。PECP用生理盐水溶解,以20 mL/kg的体积灌胃给药,1次/d,连续10 d。

1.3.2 多糖对小鼠免疫器官脏器指数的影响 小鼠分组、给药见1.3.1项。第10天分别称其体重,处死,取出脾和胸腺,除去鲜血、脂肪、组织膜。用电子天平称其湿重,分别计算脾、肝和胸腺指数。

1.3.3 多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响 小鼠分组、给药同上,每组于最后1 d上午每鼠 ip 1 mL 5%的鸡红细胞混悬液,8 h后,颈推脱臼处死小鼠,消毒腹部后注入2.5 mL Hank's 液,轻揉小鼠腹部,取腹腔液于载玻片上,参照文献方法计算吞噬指数<sup>[5]</sup>。

1.3.4 多糖对小鼠溶血素的影响 小鼠分组、给药同上,给药第1天每鼠腹腔注射5%的鸡红细胞(CRBC)生理盐水混悬液0.2 mL进行免疫,于第8天给药后的2 h眼眶取血,按文献方法<sup>[6]</sup>测定血清半数溶血值 HC<sub>50</sub>。

1.3.5 多糖对小鼠淋巴细胞转化的影响 小鼠分组、给药同上,各组于给药的前3 d,每鼠每天均肌注 PHA 10 mg/kg,于第8天给药后2 h,小鼠剪尾取血,按文献方法计算<sup>[7]</sup>淋巴细胞转化百分率。

1.3.6 统计学分析 所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS

11.5 中 One-way ANOVA 进行统计学分析,两组间比较采用

*t* 检验  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 多糖的提取和纯化

采用水提醇沉法,我们从100 g 化橘红切片中获得了9.95 g 粗多糖(ECP),产率为9.95%。粗多糖经过 DEAE-Sephadex-A25 柱纯化,得多糖 PECP,总糖含量从70.5%提高到87.3%。

### 2.2 对小鼠免疫器官脏器指数的影响

由表1可知,甘露聚糖肽阳性组和3个橘红多糖组均可显著提高正常小鼠的脾脏指数和胸腺指数,与对照组相比,差异显著( $P < 0.05$ );橘红多糖组呈现一定的剂量依赖性,但在200 mg/kg 以内,没有达到极显著差异。

表1 多糖 PECP 对小鼠免疫器官脏器指数的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	Doses / (mg/kg)	脾脏指数 / (mg/g)	胸腺指数 / (mg/g)
正常对照组	—	5.34 ± 1.13	2.19 ± 0.58
甘露聚糖肽阳性组	25	5.83 ± 1.41*	2.72 ± 0.62*
橘红多糖(低)	50	5.50 ± 1.08*	2.53 ± 0.88*
橘红多糖(中)	100	5.65 ± 1.51*	2.44 ± 0.49*
橘红多糖(高)	200	5.76 ± 1.37*	2.64 ± 0.43*

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.3 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响

腹腔巨噬细胞的吞噬功能是全身的非特异性免疫的重要指标之一,表2表明,甘露聚糖肽(25 mg/kg)对正常小鼠的吞噬指数具有显著的促进作用( $P < 0.01$ )。橘红多糖中、高剂量组巨噬细胞的吞噬能力与空白对照相比具有显著提高( $P < 0.01$ ),而低剂量组差异显著( $P < 0.05$ )。

表2 多糖 PECP 对小鼠吞噬细胞吞噬活性的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	Doses / (mg/kg)	吞噬活性
对照组	—	0.81 ± 0.15
甘露聚糖肽阳性组	25	1.58 ± 0.44**
橘红多糖低	50	1.10 ± 0.37*
橘红多糖中	100	1.49 ± 0.23**
橘红多糖高	200	1.84 ± 0.32**

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.4 对小鼠血清溶血素的影响

由表3知,25 mg/kg 甘露聚糖肽对正常小鼠的血清溶血素水平有显著影响( $P < 0.05$ ),低剂量(50 mg/kg)橘红多糖

表3 多糖 PECP 对小鼠血清溶血素水平的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	Doses / (mg/kg)	HC <sub>50</sub>
对照组	—	97.50 ± 8.33
甘露聚糖肽阳性组	25	120.50 ± 15.40*
橘红多糖低	50	99.20 ± 8.71
橘红多糖中	100	112.40 ± 16.60*
橘红多糖高	200	165.70 ± 14.90**

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

对小鼠血清溶血素含量无显著的促进作用;高剂量组多糖与对照组相比较有极显著差异( $P < 0.01$ )。

### 2.5 对小鼠淋巴细胞转化的影响

由表4可见,化橘红多糖低、中、高剂量组和甘露聚糖肽组均能有效促进淋巴细胞转化,其中高剂量组有极显著差异。

表4 多糖 PECP 对小鼠淋巴细胞转化的影响( $\bar{x} \pm s$   $n = 10$ )

组别	Doses / (mg/kg)	淋巴细胞转化率 / %
对照组	—	40.17 ± 1.45
甘露聚糖肽阳性组	25	53.80 ± 8.51*
橘红多糖低	50	48.54 ± 3.64*
橘红多糖中	100	54.75 ± 3.64*
橘红多糖高	200	62.42 ± 7.84**

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

化橘红为广东主产药材之一,具有散寒、燥湿、利气、消痰等功效,其多糖含量较高,粗多糖占9.95%左右。

脾和胸腺的相对重量是非特异性免疫的重要指标之一,免疫增强剂能增加脾和胸腺的重量,反之,免疫抑制剂能减少它们的重量<sup>[8]</sup>,巨噬细胞作为非特异性免疫细胞可以吞噬或杀伤癌细胞及外来异己细胞,吞噬活性是衡量机体非特异性免疫功能的重要指标。本实验发现初步纯化的化橘红多糖能显著提高正常小鼠的脾指数、胸腺指数和小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬指数。

鸡红细胞是一种T细胞依赖性抗原,在T淋巴细胞的参与下,刺激致敏的机体产生相应的抗体,小鼠溶血素含量上升,反映小鼠产生抗体能力加强。实验结果表明中、高剂量组化橘红多糖与对照组相比较,均能显著提高正常小鼠的血

清溶血素水平。

T淋巴细胞是重要的免疫细胞,能分泌多种淋巴因子,是免疫调节的主要介质之一。本研究表明化橘红多糖能明显促进小鼠T淋巴细胞的转化率,增强小鼠的细胞免疫功能。

我们选择的阳性对照甘露聚糖肽在25 mg/kg剂量时就显示了较强的免疫增强活性,其原因还有待进一步研究。

将来,我们会对PECP进一步纯化,并建立移植肿瘤的小鼠模型,研究高纯产物对带瘤小鼠的抗瘤和免疫调节作用。

### 参考文献:

[1] Leung MYK, Liu C, Koon JCM, et al. Polysaccharide biological response modifiers [J]. *Immunol Lett*, 2006, 105(2): 101-114.

[2] 韦英杰, 陈宁, 刘媛, 等. 正交试验法优化化橘红提取工艺的研究 [J]. *中成药*, 2005, 6: 734-735.

[3] 陈华萍, 吴万征, 马晓鹞, 等. 化橘红多糖含量的测定 [J]. *药品检测*, 2003, 2(12): 53-54.

[4] 杜伟锋, 王明艳, 蔡宝昌. 山茱萸炮制前后多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中药材*, 2008, 31(5): 715-717.

[5] 苗明三, 方晓燕, 杨云. 山茱萸多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. *河南中医*, 2002, 2(22): 12-13.

[6] 刘雪英, 王伟伟, 蒋永培, 等. 墨旱莲乙酸乙酯总提物对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. *中草药*, 2002, 33(4): 341-343.

[7] 李仪奎. *中药药理实验方法学* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 155-160.

[8] Ruan Z, Su J, Dai H, et al. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes* [J]. *Int J Immunopharmacol*, 2005, (5): 811-820.

## 两种唇形科植物荔枝草和夏至草 $\alpha$ -糖苷酶抑制活性研究

康文艺<sup>1,2</sup>, 张丽<sup>1,2</sup>, 陈林<sup>1,2</sup>, 苑鹏飞<sup>1,2</sup>

(1. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004; 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

关键词: 荔枝草; 夏至草;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 抑制活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2010)03-0493-03

荔枝草系唇形科鼠尾草属植物的地上部分。夏至草为唇形科夏至草属植物夏至草的全草。本文利用已建立的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外抑制模型对上述两种植物的提取物 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行检测,以评价将这两种植物开发为糖尿病治疗药物的可行性。

### 1 材料

1.1 受试物 荔枝草和夏至草于2006年5月采自河南省开封地区,经河南大学天然药物研究所李昌勤副教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物荔枝草(*Salvia plebeia* R. Br.)和夏至草属植物夏至草[*Lagopsis supine* (Steph) IK. -Gal.]。

收稿日期: 2009-01-08

基金项目: 河南省教育厅基础科学研究计划(2008A360002); 河南省教育厅青年骨干教师资助计划(2008-755)

作者简介: 康文艺(1971-),男,理学博士,副教授、硕士生导师,从事天然活性成分的研究。Tel: (0378) 3880680; E-mail: kangweny@hot-mail.com