

高寒乳白栓菌多糖免疫调节及体外抗氧化活性研究

尚 军¹, 李建菊², 张国燕¹

1. 青海师范大学青藏高原环境与资源教育部重点实验室, 青海 西宁 810008

2. 青海黄河上游水电开发有限责任公司新能源分公司, 青海 西宁 810008

摘要: 目的 观察高寒乳白栓菌多糖 (Alpine-TLBP) 的免疫调节功能及体外抗氧化活性。方法 以 Alpine-TLBP (50、100、200 mg/kg) 口服给药, 测定正常小鼠胸腺指数、脾脏指数和腹腔巨噬细胞吞噬功能水平; 水杨酸捕捉法测定 Alpine-TLBP 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力; 邻苯三酚自氧化法测定 Alpine-TLBP 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力。结果 在 50~200 mg/L Alpine-TLBP 能显著增加正常小鼠的胸腺和脾脏的质量, 提高脏器指数, 且明显增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数; 且在 50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力, IC_{50} 分别为 142.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 203.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 呈剂量相关性。结论 Alpine-TLBP 能增强正常小鼠的免疫功能, 且具有较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力。

关键词: 高寒乳白栓菌多糖; 免疫调节; 抗氧化

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)05-0409-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.006

Effects of Alpine *Trametes lactinea* Berk. polysaccharide on immunoregulation and anti-oxidation *in vitro*

SHANG Jun¹, LI Jian-ju², ZHANG Guo-yan¹

1. Key Laboratory of Education Ministry on Environment and Resources in Qinghai and Tibet Plateau, Qinghai Normal University, Xining 810008, China

2. New Energy Branch, Qinghai Huanghe Hydropower Development Co., Ltd., Xining 810008, China

Abstract: Objective To study the effects of Alpine *Trametes lactinea* Berk. polysaccharide (Alpine-TLBP) on immunoregulation and anti-oxidation *in vitro*. **Methods** The immune functions were investigated by measuring thymus and spleen indices, celiac macrophage phagocytic index, and phagocytic rate from normal mice which were ig administered with Alpine-TLBP (50, 100, and 200 mg/kg) everyday, respectively; The clearing effect of Alpine-TLBP on hydroxyl radical was measured by salicylic acid capture method; The clearing effect of Alpine-TLBP on superoxide anion free radical was measured by pyrogallol auto oxidation method. **Results** Alpine-TLBP among 50—200 mg/L could significantly enhance thymus and spleen weight, viscera index, and celiac macrophage phagocytosis; Alpine-TLBP had a significant effect on clearing hydroxyl radical and superoxide anion radical, Alpine-TLBP among 50—500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ has dose-response relationship on the effect of clearing hydroxyl radical and superoxide anion radical, and the IC_{50} were 142.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 203.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. **Conclusion** Alpine-TLBP can enhance normal mouse immunological function, and has strong ability of clearing hydroxyl radical and superoxide anion radical.

Key words: Alpine *Trametes lactinea* Berk. polysaccharide; immunoregulation; anti-oxidation

多糖是所有生命有机体的重要组成成分, 并与维持生命所必须的多种功能有关。多糖不仅能激活 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、NK 细胞、细胞毒性 T 细胞、淋巴细胞激活的杀伤细胞等免疫细胞, 还能促进细胞因子生成, 活化补体, 对免疫系统发挥多方面的免疫调节作用^[1]。同时, 多糖可通过调节自

由基水平而影响许多疾病的发生发展^[2]。本文采用提取于青藏高原乳白栓菌 *Trametes lactinea* Berk. 的多糖为研究对象, 观察高寒乳白栓菌多糖 (Alpine *Trametes lactinea* Berk. Polysaccharide, Alpine-TLBP) 对小鼠免疫功能的影响及体外抗氧化活性, 为进一步研究和开发 Alpine-TLBP 提供一些理论参考。

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 科技部国家科技支撑项目 (2012BAC08B04)

*通信作者 尚 军 (1975—), 男, 硕士研究生, 讲师, 青海师范大学“青藏高原环境与资源教育部重点实验室”。E-mail: shjun2004@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

高寒乳白栓菌多糖 (Alpine-TLBP), 灰色粉末, 质量分数 75.1%, 来自于青海师范大学“青藏高原环境与资源教育部重点实验室”; 昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 分笼饲养, 购于青海省地方病研究中心, 实验动物生产许可证 SCXK (青) 2005-0001; 岛津 UV-1800 紫外可见分光光度计; 瑞氏染色液, 安徽省巢湖市弘慈医疗器械有限公司; 生理盐水, 西安京西双鹤药业有限公司; 肝素钠, 效价 100 U/mg, 上海中泰化学试剂有限公司; 75% 医用酒精, 青海万福康药业有限公司; 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 Alpine-TLBP 对小鼠免疫功能的影响

1.2.1 Alpine-TLBP 对小鼠脏器指数的影响 将 40 只小鼠随机分成 4 组, 分别为对照组和 Alpine-TLBP 低、中、高剂量组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分笼饲养。各组分别 ig 给予生理盐水 0.02 mL/g 和 Alpine-TLBP 50、100、200 mg/kg。每天给药 1 次, 连续给药 7 d。停药后 5 h, 断椎处死小鼠, 取其胸腺和脾脏用 0 °C 生理盐水漂洗, 滤纸吸干水分后称质量, 计算脾脏指数和胸腺指数。

胸腺指数 = 胸腺质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)

脾脏指数 = 脾脏质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)

1.2.2 Alpine-TLBP 对小鼠腹腔巨噬细胞系统的影响^[3-4] 将 40 只小鼠随机分成 4 组, 分别为对照组和 Alpine-TLBP 低、中、高剂量组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分笼饲养。其中空白对照组 ip 给予磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5 mL/只, Alpine-TLBP 低、中、高剂量组分别 ig 给予 Alpine-TLBP 50、100、200 mg/kg。每天给药 1 次, 连续给药 7 d。于末次给药 24 h 后 ip 5% 鸡红细胞 (CRBC) 液 1 mL, 40 min 后, ip NS 2 mL, 轻揉腹部后, 吸取腹腔液滴于载玻片上, 玻片置 37 °C 孵育箱中 30 min, 使细胞贴壁, 孵毕用生理盐水漂洗去未被吞噬的 CRBC 及其他细胞, 吹干, 用丙酮-甲醇 (1:1) 溶液固定 5 min, 瑞氏染液染色, 晾干, 油镜下观察, 计数 100 个吞噬细胞。计算吞噬 CRBC 的巨噬细胞数和被吞噬的 CRBC 数, 计算吞噬率和吞噬指数。

吞噬率 = 吞噬 CRBC 的吞噬细胞数 / 100 个巨噬细胞数

吞噬指数 = 被吞噬 CRBC / 100 个巨噬细胞数

1.3 Alpine-TLBP 的体外抗氧化活性研究

1.3.1 Alpine-TLBP 对羟基自由基 (·OH) 的清除

试验^[5] 利用 Fenton 反应体系产生羟基自由基, 依次加入 6 mmol/L FeSO₄ 溶液、6 mmol/L 水杨酸溶液各 2 mL 及 3 mL 不同浓度的 Alpine-TLBP 及 VitC (50、100、200、300、400、500 μg/mL), 最后加入 2 mL 6 mmol/L H₂O₂ 溶液启动反应, 37 °C 反应 30 min。以蒸馏水做参比; 以 6 mmol/L FeSO₄ 溶液、6 mmol/L 水杨酸溶液各 2 mL, 蒸馏水 3 mL, 6 mmol/L H₂O₂ 2 mL 做空白对照液; 以 6 mmol/L FeSO₄ 溶液、6 mmol/L 水杨酸溶液各 2 mL, 3 mL 不同浓度的 Alpine-TLBP, 蒸馏水 2 mL 做多糖的本底吸收值。在 510 nm 下测量各浓度的吸光度 (A) 值, 计算·OH 清除率。

$$\cdot\text{OH 清除率} = [A_0 - (A - A_{x_0})] / A_0$$

式中, A_0 为空白对照液的吸光度值; A_x 为加入样品溶液后的吸光度值; A_{x_0} 为不加 H₂O₂ 样品溶液的本底吸光度值。

1.3.2 Alpine-TLBP 对 O₂⁻ 清除试验^[5-6] 采用邻苯三酚自氧化法测定, 在具塞试管中加入不同浓度的 Alpine-TLBP 样品液 1 mL, 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 4.5 mL, 置于 25 °C 水浴中保温 20 min, 再加入 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀后于 25 °C 水浴中精确反应 5 min, 迅速加入 1 mL 8 mmol/L HCl 终止反应, 于 299 nm 处测定吸光度 (A_x) 值, 空白对照组用相同体积蒸馏水代替样品, 以 VitC 作阳性对照。每个试样做 3 个平行样, 取平均值计算 O₂⁻ 清除率。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率} = [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0$$

式中, A_0 为空白对照液吸光度值; A_x 为加入样品溶液后的吸光度值; A_{x_0} 为样品溶液本底的吸光度值。

1.4 统计分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 10.0, 对结果进行统计分析, 各组均数间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Alpine-TLBP 对小鼠免疫功能的影响

2.1.1 Alpine-TLBP 对小鼠脏器指数的影响 与对照组相比, Alpine-TLBP 在不同剂量下均能够显著提高小鼠的脾脏指数和胸腺指数, 差别具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.1.2 Alpine-TLBP 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 与对照组相比, Alpine-TLBP 在不同剂量下均能够显著提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的能力, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 2。

表1 Alpine-TLBP 对小鼠免疫器官指数的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Alpine-TLBP on spleen and thymus indexes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脾脏指数	胸腺指数
对照	—	5.15 ± 0.86	2.26 ± 0.44
Alpine-TLBP	50	6.43 ± 0.65*	2.80 ± 0.32*
	100	6.74 ± 0.63*	3.12 ± 0.20*
	200	7.38 ± 0.53*	3.30 ± 0.12*

与对照组比较: *P < 0.01

*P < 0.01 vs control group

表2 Alpine-TLBP 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Alpine-TLBP on celiac macrophage phagocytic index and phagocytic rate ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	吞噬率/%	吞噬指数
对照	—	23.1 ± 1.66	0.294 ± 0.018
Alpine-TLBP	50	24.6 ± 0.96*	0.310 ± 0.013*
	100	28.5 ± 1.65**	0.357 ± 0.050**
	200	34.7 ± 4.24**	0.382 ± 0.037**

与对照组比较: *P < 0.05, **P < 0.01

*P < 0.05, **P < 0.01 vs control group

2.2 Alpine-TLBP 的体外抗氧化活性研究结果

2.2.1 Alpine-TLBP 对·OH 清除率 Alpine-TLBP 对反应体系中由 H₂O₂ 产生的·OH 具有较强的清除作用, 且 Alpine-TLBP 在浓度 50~500 μg/mL, 清除·OH 的作用具有量-效相关关系, IC₅₀ 为 142.2 μg/mL。与阳性对照 VitC (IC₅₀ 为 183.5 μg/mL) 相比, Alpine-TLBP 清除·OH 的能力均高于同浓度的 Vit C。见表 3。

表3 Alpine-TLBP 对·OH 清除率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Alpine-TLBP on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剂量/(μg·mL ⁻¹)	清除率/%	
	Alpine-TLBP	Vit C
50	24.1 ± 0.50	20.2 ± 0.47
100	37.8 ± 0.81	30.5 ± 0.56
200	51.7 ± 1.33	41.3 ± 0.91
300	75.4 ± 0.40	50.8 ± 0.37
400	81.6 ± 0.61	60.5 ± 0.37
500	92.1 ± 0.60	69.8 ± 0.48

2.2.2 Alpine-TLBP 对 O₂⁻ 清除率 Alpine-TLBP 对 O₂⁻ 具有明显的清除作用, 且清除率随多糖浓度的增大而增大, 在浓度 50~500 μg/mL, 清除 O₂⁻ 的作用呈量-效相关关系, IC₅₀ 为 203.2 μg/mL, 高于阳性对照 Vit C 的 IC₅₀ (194.1 μg/mL)。见表 4。

表4 Alpine-TLBP 对 O₂⁻ 清除率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Alpine-TLBP on superoxide anion free radical ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剂量/(μg·mL ⁻¹)	清除率/%	
	Alpine-TLBP	Vit C
50	13.2 ± 0.41	23.6 ± 0.34
100	36.1 ± 0.52	30.9 ± 0.30
200	40.5 ± 0.30	44.0 ± 0.60
300	52.6 ± 0.28	55.0 ± 0.23
400	69.7 ± 0.69	65.7 ± 0.40
500	82.0 ± 0.98	79.9 ± 1.14

3 讨论

多糖是一种免疫调节剂, 具有无细胞毒性的特点, 来源不同的多糖对机体的免疫功能具有不同程度的免疫调节作用。研究发现, Alpine-TLBP 在 50、100、200 mg/kg 3 个剂量下对小鼠非特异性免疫方面, 均可明显提高正常小鼠免疫器官质量和脏器指数, 同时亦能明显增强腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数。因此, 说明了 Alpine-TLBP 可以增强正常小鼠的非特异性免疫功能。

自由基是人体生命活动中多种生物化学反应的中间代谢产物, 其种类繁多, 包括超氧阴离子自由基、羟基自由基、过氧化氢自由基、烷氧基等。正常情况下, 人体内的自由基处于不断产生和不断消除的动态平衡中。自由基产生过多或消除过慢时, 将会加速机体衰老, 并诱发各种疾病。其中羟基自由基是毒性最大的活性氧自由基, 它几乎能与活细胞中任何生物大分子发生反应, 可导致机体组织脂质过氧化, 蛋白质聚合与解聚, 核酸断裂等生化过程, 引发组织细胞病变, 导致各种疾病的发生和加速机体衰老; 而超氧阴离子自由基能引发多种自由基的产生, 与机体衰老、肿瘤、炎症、外源物代谢等生物过程密切相关^[7]。本实验通过体外抗氧化实验来测定 Alpine-TLBP 对·OH 和 O₂⁻ 清除能力, 以维生素 C 作为阳性对照, 结果显示, Alpine-TLBP 浓度在 50~500 μg/mL 均显示了较强的清除自由基能力, 对·OH 清除率 IC₅₀ (142.2 μg/mL) 低于维生素

C对 $\cdot\text{OH}$ 清除率 IC_{50} (183.5 $\mu\text{g/mL}$);而Alpine-TLBP对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率 IC_{50} (203.2 $\mu\text{g/mL}$)略高于维生素C对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率 IC_{50} (194.1 $\mu\text{g/mL}$)。由此可见,Alpine-TLBP作为自由基清除剂,在自由基相关疾病治疗及预防方面极具研究开发潜力。

参考文献

[1] 邢效瑞,崔京春,郭海勇,等. 真菌多糖免疫调节作用研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 10: 26-28.
[2] 左玉. 自由基、活性氧与疾病 [J]. 粮食与油脂, 2011, 9: 9-11.
[3] 张卫元, 杨阳, 陈翠兰, 等. 茯苓散对免疫低下小鼠

免疫功能的影响 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(2): 283-287.
[4] 赵东贤, 胡命宝, 王军. 福寿螺多糖免疫调节作用研究 [J]. 湖北民族学院学报·医学版, 2014, 31(2): 11~13.
[5] 范巧宁, 张伟刚, 赵珮, 等. 棘托竹荪菌盖多糖的提取及体外抗氧化活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 23: 112-117.
[6] 宁慧, 李会宁, 杨培君. 玉竹多糖的抗氧化作用研究 [J]. 陕西理工学院学报(自然科学版), 2013, 29(6): 59-64.
[7] 殷晓煌. 活性氧自由基与老年疾病代谢的关系 [J]. 药物生物技术, 2013, 20(2): 183-185.