

# 黄芪毛状根多糖与黄芪多糖化学组成及免疫活性的比较

单俊杰<sup>1</sup>, 王 易<sup>2</sup>, 翁颖琦<sup>1</sup>, 谢长宜<sup>2</sup>, 刘 涤<sup>1</sup>, 胡之璧<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 200032; 2. 上海第二医科大学免疫研究所, 上海 200025)

**摘要:** 目的 比较生物技术培养的黄芪毛状根中多糖与栽培黄芪中多糖的化学组成和免疫活性。方法 采用乙醇分级沉淀和凝胶渗透柱层析分离纯化多糖; 硫酸-苯酚法测定多糖含量; 完全酸水解、乙酰化、气相色谱测定单糖组成; 采用免疫器官重量、腹腔巨噬细胞吞噬功能、溶血素生成、 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入、诱生 IFN- $\gamma$  的含量测定等方法研究免疫活性。结果 黄芪毛状根中多糖为 1.83%, 黄芪中多糖为 2.61%。黄芪毛状根多糖 (HAPS) 由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成, 摩尔比为 1: 2.26: 0.21: 0.74: 2.49: 19.47。黄芪多糖 (APS) 组成与 HAPS 相同, 摩尔比为 1: 4.34: 3.92: 1.95: 11.41: 20.52。采用乙醇分级沉淀各自获得 3 个部分多糖, 经 DEAE-Sephrose FF 柱层析表明: HAPS I 和 APS I, HAPS II 和 APS II 图谱相似, HAPS III 与 APS III 有一定的差异。HAPS 和 APS 均能显著增加小鼠脾脏重量, HAPS 能提高小鼠胸腺重量; 二者均增加小鼠腹腔巨噬细胞数量, APS 显著促进小鼠腹腔巨噬细胞巨噬功能; HAPS 和 APS 均抑制小鼠溶血素生成; 促进小鼠脾淋巴细胞增殖; APS 使脾淋巴细胞诱生 IFN- $\gamma$  的作用高于 HAPS。结论 HAPS 和 APS 化学组成相似, 二者具有相同的免疫活性, 只是强度略有差异。

**关键词:** 黄芪毛状根; 黄芪; 多糖; 免疫活性; IFN- $\gamma$

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1096-04

## Comparing compositions and immunoactivities of polysaccharide in hair root of *Astragalus membranaceus* and cultivated *A. membranaceus*

SHAN Jun-jie<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, WENG Ying-qi<sup>1</sup>, XIE Chang-yi<sup>2</sup>, LIU Di<sup>1</sup>, HU Zhi-bi<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Immunology, Shanghai Second University of Medical Science, Shanghai 200025, China)

**Abstract** **Object** To compare the compositions and the immunoactivities of polysaccharide in hair root of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (HAPS), which was cultivated by biotechnology, with the polysaccharide in *A. membranaceus* (APS), to prove the similar properties both of them. **Methods** Sulphuric acid-phenol method was used to analyze the polysaccharide contents; completely acid hydrolysis, aditol acetate derivative and GC were used to determine the polysaccharides; the weight of spleen and thymus; phagocytosis function of macrophage; hemolysin production and  $[^3\text{H}]$ -TdR incorporation ELISA kit assays were used to evaluate the immunoactivities in mice. **Results** The polysaccharides of the hair root were 1.83%, that of *A. membranaceus* were 2.61%. Both of HAPS and APS had the same monosaccharide composition, but the molar ratio of them was different. HAPS and APS were divided into three parts by different ethanol concentration. The homogeneity was verified by DEAE-Sephrose FF chromatography. HAPS I and APS I were similar, HAPS II and APS II were also similar, HAPS III and APS III were different. HAPS and APS increased the weight of mouse spleen, APS increased the weight of thymus. Both of them increased phagocytosis function of macrophage and inhibited the hemolysin production in mice. HAPS and APS significantly stimulated lymphocyte proliferation of spleen and secreted IFN- $\gamma$ . **Conclusion** The results confirmed that HAPS and APS had similar chemical compositions and immunoactivities, but the intensity showed slightly difference.

**Key words** hair root of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (HAPS); *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (APS); polysaccharide; immunoactivity; IFN- $\gamma$

黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 是我国传统的中药, 具有补气升阳, 固表止汗, 利水

\* 收稿日期: 2002-03-21

基金项目: 攀登计划和“九五”攻关项目经费支持 (96-02-03-06)

作者简介: 单俊杰 (1966-), 女, 博士, 主要从事多糖化学及药理学研究, 现在中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室做博士后。Tel (021) 64163300-1300

消肿和生肌等功效。近年来研究表明黄芪中多糖是黄芪主要有效成分之一,具有较强的免疫调节活性<sup>[1]</sup>。黄芪市场需求量很大,但由于野生资源日趋减少,栽培品质下降,严重影响了黄芪的临床应用。本研究所采用生物技术培养黄芪毛状根,其生长迅速,不需要外源激素,拥有亲本植株的次级代谢途径,而且可以对有效成分合成路线进行操作,提高有效成分的产量<sup>[2]</sup>。本实验主要研究黄芪毛状根与黄芪中多糖的化学组成及免疫活性,并进行比较

## 1 材料

1.1 药材:黄芪毛状根:本所生物工程实验室培养;膜荚黄芪:购于上海药材有限公司,由上海中医药大学周秀佳教授鉴定。

1.2 试剂:DEAE-Sepharese FF (Pharmacia 公司);重蒸苯酚(华美生物工程公司);刀豆素(Con A, Sigma 公司); $[^3\text{H}]$ -甲基胸腺嘧啶核苷( $[^3\text{H}]$ -TdR,上海科学院核技术公司);RPMI1640培养基(Gibco 公司);溶血素(卫生部上海生物制品研究所);IFN $\gamma$ 试剂盒(Endogen 公司)。

1.3 仪器:高效液相色谱仪(Water 公司,600泵,410检测器);液体闪烁计数仪(WALLAC-1209, Pharmacia 公司);酶标仪(960-Meerteh, Sigma 公司)。

1.4 动物:Balb/c 纯系小鼠,8~10周,(20 $\pm$ 2)g,购于中国科学院上海实验动物中心。

1.5 细胞株:L929细胞株、Wish 细胞株、VSV 病毒均由上海第二医科大学免疫研究所王易副教授惠赠。

## 2 方法

2.1 黄芪毛状根多糖(HAPS)和黄芪多糖(APS)的提取:黄芪毛状根(或黄芪)经95%乙醇脱脂2次,空气吹干。12倍蒸馏水分2次分别浸泡1h,煎煮1h,合并水煎液,浓缩,离心。上清液加入4倍95%乙醇醇沉24h,离心,沉淀用适量蒸馏水溶解,30%三氯乙酸加入使之浓度至15%,搅拌30min,离心。上清液用2mol/L NaOH中和,蒸馏水透析72h,减压浓缩,冷冻干燥,即获得总多糖HAPS(或APS)。

2.2 黄芪毛状根和黄芪部分多糖的分离:HAPS(或APS)1g加入1L蒸馏水溶解,然后加入1L95%乙醇醇沉24h,离心。沉淀用适量蒸馏水溶解,离心,冷冻干燥,即获得HAPSI(或APSI)。上清液加入1L95%乙醇醇沉24h,沉淀同样溶解,离心,冷冻干燥,即获得HAPSII(或APSI)。上清液再加入1L95%乙醇醇沉24h,同样获得HAPSI(或

APSI)。

2.3 多糖的含量测定:硫酸苯酚法<sup>[3]</sup>。

2.4 单糖组成测定:按文献<sup>[4]</sup>。取5mg多糖样品,加入1mL2mol/L三氟乙酸(TFA),封管后120℃水解2h,减压蒸干。然后滴加甲醇再浓缩至干,重复几次,直至无酸味为止,加入1mL蒸馏水使之溶解。加入NaBH<sub>4</sub>还原后,用冰醋酸调溶液pH=5,减压蒸干。还原后的产物加入醋酸酐中,120℃乙酰化2h,不断振荡使之反应完全。加入甲苯减压蒸干,重复几次,然后GC分析。

2.5 免疫器官重量测定:按文献<sup>[5]</sup>。

2.6 腹腔巨噬细胞吞噬功能测定:按文献<sup>[6]</sup>。

2.7 溶血素测定:按文献<sup>[7]</sup>。

2.8 脾淋巴细胞增殖:无菌取出Balb/c小鼠脾脏,用RPMI1640培养液制成一定浓度的脾细胞悬液。向96孔培养板每孔中分别加入脾细胞悬液、ConA及不同浓度黄芪多糖,使每孔总体积为200 $\mu$ L,脾细胞终浓度为 $2 \times 10^6$ /mL,ConA终浓度为1 $\mu$ g/mL。37℃,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱培养72h,在培养结束前16h于培养板各孔内加入1.0 $\times 10^4$ Bq<sup>3</sup>H-TdR。培养结束后收集细胞,用液体闪烁仪测定 $[^3\text{H}]$ -TdR的掺入值,以反应细胞增殖程度<sup>[8]</sup>。

2.9 体外诱生IFN $\gamma$ :取(20 $\pm$ 2)g的纯系Balb/c小鼠5只,断头处死,无菌取脾,尼龙膜150目过滤,用Hank's液制成细胞悬液,1500r/min离心10min,再用RPMI1640培养液洗涤一次,离心后用RPMI1640培养液制成浓度 $2 \times 10^6$ /mL的细胞悬液。取无菌10mL的试管,每支试管先加入2mL培养液,然后按设计方案加入一定体积的多糖样品后,每支试管最后均加入1mL制好的脾淋巴细胞悬液,细胞终浓度为 $2 \times 10^6$ /mL。放入37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育72h后,2000r/min离心10min,将上清液分成6份收集,-20℃冷冻待测IFN $\gamma$ 。

2.10 IFN $\gamma$ 含量测定:按IFN $\gamma$ 试剂盒说明操作。

## 3 结果

3.1 HAPS和APS化学组成的比较

3.1.1 黄芪毛状根与黄芪中多糖含量及单糖组成比较:HAPS含量为1.83%,APS为2.61%。HAPS由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成,摩尔比为1:2.26:0.21:0.74:2.49:19.47。APS单糖组成与HAPS相同,摩尔比为1:4.34:3.92:1.95:11.41:20.52。

3.1.2 乙醇分级沉淀的部分多糖DEAE-Sepharese FF层析结果:经乙醇分级沉淀将总多糖

按相对分子质量大小粗分为三部分, DEAE-Sepharose FF层析图谱可以看出 HAPSI和 APSI, HAPSII和 APSII组成相似, HAPSIII和 APSIII存在一定差异。各部分得率也不同。

3.2 HAPS与 APS免疫活性的比较

3.2.1 对小鼠免疫器官的影响: 取 (20± 2) g 昆明小鼠 36只, 随机分成3组。ip剂量为 100 mg/kg, 连续 7 d。末次给药次日, 将小鼠断头处死, 取胸腺、脾脏称重, 计算胸腺指数和脾脏指数, 结果见表 1。HAPS能明显增加正常小鼠的胸腺重量, APS无此作用。HAPS和 APS均显著增加小鼠脾脏重量。

表 1 HAPS和 APS对小鼠免疫器官的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 (mg/kg)	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)
对照	-	17.72± 3.24	48.38± 6.62
HAPS	100	21.44± 5.24 <sup>*</sup>	131.20± 19.85 <sup>***</sup>
APS	100	17.47± 3.25	123.00± 18.06 <sup>***</sup>

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*\*  $P < 0.001$

3.2.2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响: 给药方式同 3.2.1, 末次给药次日, 断头处死小鼠, 迅速剪开腹腔皮肤, 无菌注射 Hank's 溶液 3 mL, 轻揉腹部, 抽取腹腔液, 1 000 r/min 离心 10 min。用磷酸缓冲液定容, 加入 0.5% 鸡红细胞 0.2 mL, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育 30 min。离心推片, 用瑞氏液染色, 镜检, 计算吞噬百分数和吞噬指数, 结果见表 2。HAPS和 APS均能增加小鼠腹腔巨噬细胞的数量, APS促吞噬作用较 HAPS更显著。

表 2 HAPS和 APS对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 (mg/kg)	吞噬百分率 (%)	吞噬指数
对照	-	0.00± 0.00	0.000± 0.000
HAPS	100	0.62± 0.51 <sup>†</sup>	0.012± 0.010
APS	100	4.05± 3.91 <sup>†*</sup>	0.157± 0.263 <sup>*</sup>

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.001$

3.2.3 对小鼠溶血素生成的影响: 取 (20± 2) g 昆明小鼠 36只, 随机分成对照组、HAPS组和 APS组。ip连续 7 d。在给药第 3天, 每只鼠用绵羊红细胞 (SRBC) 悬液 ip免疫, 4 d后摘除小鼠眼球放血, 分离血清, 测定每个样品的半数溶血值 (HC<sub>50</sub>), 结果见表 3。HAPS和 APS均能明显抑制 SRBC特异性抗体生成。

3.2.4 对小鼠体外淋巴细胞增殖的影响: 见表 4。结果表明 HAPS和 APS能显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 但强度明显低于有丝分裂原 ConA。

3.2.5 对小鼠脾淋巴细胞体外诱生 IFN- $\gamma$  的影响: 见表 5。结果表明 HAPS和 APS均能促进小鼠脾淋巴细胞诱生 IFN- $\gamma$ , 其中 APS的作用更明显。

表 3 HAPS和 APS对小鼠溶血素生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 (mg/kg)	HC <sub>50</sub>
对照	-	13.92± 6.60
HAPS	100	8.25± 3.88 <sup>g</sup>
APS	100	5.40± 0.71 <sup>f</sup>

与对照组比较: \*  $P < 0.05$

表 4 HAPS和 APS对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 ( $\mu$ g/mL)	[ <sup>3</sup> H]-TdR (cpm)
HAPS	50	3 350± 1 089
APS	50	2 076± 681 <sup>†</sup>
Con A	1	31 923± 5 817 <sup>***</sup>
细胞对照	-	684± 161

与细胞对照比较: \*  $P < 0.05$  \*\*\*  $P < 0.001$

表 5 HAPS和 APS对小鼠脾淋巴细胞诱生 IFN- $\gamma$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 ( $\mu$ g/mL)	IFN- $\gamma$ (ng/mL)
HAPS	50	127.66± 85.97 <sup>***</sup>
APS	50	2 866.26± 980.06 <sup>***</sup>
Con A	1	407.29± 242.11 <sup>***</sup>
细胞对照	-	0.00± 0.00

与细胞对照比较: \*\*\*  $P < 0.001$

4 讨论

黄芪毛状根中总多糖比栽培黄芪中总多糖含量略低, 可能是由于培养时间短, 代谢产物积累量少。但栽培黄芪需生长两年后采集, 而毛状根只需 20 d 培养即可收获。相比较生产毛状根具有生长速度快、无污染、有效成分含量稳定等特点, 可作为中药材生产的另一途径。

采用不同浓度乙醇分级沉淀可将总多糖按相对分子质量大小粗分为 3部分, 从 DEAE-Sepharose FF层析图谱可以看出 HAPSI和 APSI, HAPSII和 APSII组成基本相似, 而 HAPSIII和 APSIII存在一定差异。

黄芪毛状根与黄芪中多糖的单糖组成相同, 但摩尔比不同, 特别是木糖和半乳糖摩尔比差异较大。总之, HAPS和 APS在化学组成上基本相似, 个别方面存在差异可能是由于黄芪和毛状根生长条件不同, 代谢产物合成途径中某些细节可能不同造成的。

HAPS和 APS均能增加小鼠胸腺重量和脾脏重量, 增加小鼠腹腔巨噬细胞的数量, APS显著促进腹腔巨噬细胞吞噬功能, 这可能是一种直接刺激作用; 促进脾淋巴细胞增殖并诱生 IFN- $\gamma$ 。HAPS和 APS均抑制小鼠溶血素生成, 提示 HAPS和 APS对免疫系统有选择性作用。HAPS和 APS与小鼠脾淋巴细胞体外培养, 具有明显促增殖作用, 但增殖能

力较有丝分裂原 Con A 明显减弱,提示 HAPS 和 APS 均有有丝分裂原样作用。

参考文献:

- [1] 单俊杰,王顺春,刘 涤,等.黄芪多糖的化学和药理学研究进展[J].上海中医药大学学报,2000,14(3): 61-64.
- [2] 刘星谐,王美英,吴厚生,等.黄芪多糖的分离及其免疫活性的研究[J].天然产物研究与开发,1994,16(1): 23-28.
- [3] Michel D. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-355.
- [4] 曹培让,吴祖道,王汝聪.金针菇 *Flammulina velutipes* (Curt.

- Fr.) Sing. 子实体多糖 PA3DE 的分离、纯化和分离[J].生物化学与生物物理学报,1989,21(2): 152-156.
- [5] 张罗修,徐维敏,潘胜利,等.韭叶柴胡多糖对小鼠胸腺、脾脏重量、淋巴细胞增殖和空斑形成的影响[J].中国药理学报,1986,7(5): 479-483.
- [6] Ryoko G, Masashi T, Noriko S, *et al.* Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES[J]. Planta Medica, 1990, 56: 73-76.
- [7] 李先荣,康 永,牛艳艳,等.注射用黄芪多糖药理作用的研究 2 对免疫药理作用的研究[J].中成药,1989,11(5): 26-30.
- [8] 王洪斌,郑钦岳,钱定华,等.商陆多糖 I 对小鼠免疫功能的影响[J].中国药理学报,1993,14(3): 243-247.

## 菟丝子黄酮对应激大鼠卵巢内分泌的影响

王建红,王敏璋,伍庆华,闵建新,陈晓凡,欧阳栋\*

(江西中医学院,江西南昌 330006)

**摘要:**目的 观察菟丝子黄酮对心理应激引起卵巢内分泌功能降低的调节作用。方法 采用声-光-电复合应激刺激制造大鼠卵巢内分泌功能降低模型,观察菟丝子黄酮对模型大鼠血清  $E_2$ 、P 水平,肾上腺抗坏血酸含量以及垂体、卵巢、子宫重量的影响。结果 菟丝子黄酮明显提高模型大鼠血清  $E_2$ 、P 水平,增加垂体、卵巢、子宫的重量,但对肾上腺抗坏血酸含量没有明显的影响。结论 菟丝子黄酮能够明显改善卵巢内分泌功能。

**关键词:** 菟丝子黄酮;卵巢内分泌;心理应激

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)12-1099-03

## Effects of flavonoids from *Cuscuta chinensis* on ovarian endocrine in female rats exposed to psychologic stress

WANG Jian-hong, WANG Min-zhang, WU Qing-hua,

MIN Jian-xin, CHEN Xiao-fan, OUYANG Dong

(Jiangxi College of TCM, Nanchang 330006, China)

**Abstract Object** To observe the effects of the flavonoids extracted from *Cuscuta chinensis* Lam. (FC) on the ovarian endocrine functions in female rats exposed to psychologic stress. **Methods** Sound, light and electricity were combined into a stressful stimulus to induce dysfunction on ovarian endocrine functions in female rats; to observe the effects of FC on the ovarian endocrine functions in female rats exposed to psychologic stress, by determining the changes of serum  $E_2$ , P and ascorbic acid levels in adrenal gland, and by weighing the pituitaries, ovaries and uteruses. **Results** FC increased the serum  $E_2$ , P and the weight of pituitaries, ovaries and uteruses obviously, but did not increase ascorbic acid levels in adrenal gland in female rats exposed to psychologic stress. **Conclusion** FC improves the ovarian endocrine functions in female rats.

**Key words** flavonoids of *Cuscuta chinensis* Lam. (FC); ovarian endocrine; psychologic stress

菟丝子是旋花科植物 *Cuscuta chinensis* Lam. 的成熟种子,为温补肾阳的要药,在中医临床上应用广泛,尤其在治疗生殖内分泌失调类疾病方面<sup>[1]</sup>。菟丝子主要成分为黄酮类化合物<sup>[2]</sup>,本实验研究了菟

丝子总黄酮对应激大鼠卵巢内分泌的调节作用。

### 1 材料

1.1 药物:菟丝子经本院中药鉴定教研室鉴定为

\* 收稿日期: 2002-05-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39960026);江西省卫生厅资助项目(2000A21)

作者简介:王建红(1963-),女,江西南昌人,江西中医学院基础部副教授,现为生理教研室主任,硕士生导师,主要从事中药对人类生殖内分泌功能调控方面研究工作。Tel (0791) 6836406 E-mail wangjh69@hotmail.com

\* 江西中医学院 2000级研究生