

球花石斛多糖免疫调节作用的研究

宋宁¹, 陆瑛^{1*}, 邱明华²

(1. 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650031; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要: 本研究目的为评价球花石斛多糖对正常小鼠免疫功能的影响。球花石斛采用碱提醇沉法得到球花石斛多糖, 分别以 400、600、800 mg/kg 小鼠灌胃给药连续 10 d。通过免疫器官重量检测, 碳廓清试验, 脾脏 T、B 淋巴细胞转化试验来观察其对免疫功能的影响。结果显示低、中剂量组的脾脏指数与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), 中、高剂量组的吞噬指数、校正吞噬指数和 B 淋巴细胞增殖能力与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 表明球花石斛多糖可显著增加脾脏重量, 增强巨噬细胞的碳廓清能力和 B 淋巴细胞的增殖能力。提示球花石斛多糖具有免疫增强作用, 是一种良好的免疫调节剂。

关键词: 球花石斛; 多糖; 免疫调节; 碳廓清; 淋巴细胞转化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Studies on Immunomodulation of Polysaccharide from *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f

SONG Ning¹, LU Ying^{1*}, QIU Ming-hua²

(1. Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effects of *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f polysaccharide (DTP) on immune function in normal mice. The DTP was obtained by alkali extraction and alcohol precipitation from *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f and was administered on normal mice with 400 mg/kg, 600 mg/kg and 800 mg/kg respectively through stomach for 10 d. The weight of immune organs, engulfing carbon granula test, T, B lymphocyte transformation test of mouse spleen cell were investigated to determine the effects of DTP on immune function. The results show that the spleen index in low and middle dosage treatment was higher than that of control group ($P < 0.01$). The macrophage engulfing carbon granula ability and B lymphocyte proliferation ability in middle and high dosage treatment are higher than that of control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). These findings indicate that DTP could significantly increase spleen weight, macrophage engulfing carbon granula ability and B lymphocyte proliferation capacity. So the conclusion is that DTP could enhance the immune function in mice and would be a good immunomodulator.

Key words: *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb.f; polysaccharide; immunomodulation; engulfing carbon granula; lymphocyte transformation

石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 为兰科植物, 我国主要分布于华南及西南地区, 据《中国植物志》记载, 石斛共有 74 个种, 2 个亚种, 有药用价值的有 51 种, 其中云南共富集了 46 个种, 占全国的 60.5%, 主要分布在气候高温湿润的德宏州、思茅地区和西双版纳^[1]。石斛是一种珍贵中药, 以新鲜或干燥茎入药, 具有益胃生津、滋阴清热的功效^[2]。目前供药用的石斛属植物有 30 多种, 但中国药典 (2000 版) 仅收

载 5 种, 即环草石斛、马鞭石斛、黄草石斛、铁皮石斛和金钗石斛。石斛属植物含化学成分丰富, 药理作用广泛, 其中多糖类成分是石斛具有免疫增强作用和抗肿瘤作用的活性成分, 不同种类的石斛多糖含量及结构差异较大, 药理活性也不尽相同^[3]。自 1932 年以来, 国内外学者已对石斛属 37 种植物进行了化学成分研究, 从中分离鉴定出生物碱类、多糖类、三萜苷类以及挥发油等多种化学成分, 并对其药理活性进行了一定的研究^[4]。近年来研究表明, 石斛复方制剂能显著提高正常小鼠及环磷酰胺抑制的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 升高衰老家兔的

收稿日期: 2005-12-19 接受日期: 2006-02-05

基金项目: 云南省教育厅科研基金项目 (SJ0344C)

* 通讯作者 Tel: 86-871-5332989; E-mail: kmluying@126.com

SOD,降低 LPO 的功能,还具有促进脾淋巴细胞转化的作用^[5]。兜唇石斛多糖能使小鼠脾脏、胸腺重量增加,抗体细胞数明显增多,T、B 细胞显著增殖^[6]。铁皮石斛多糖可显著提升小白鼠外周白细胞数和促进淋巴细胞产生移动抑制因子^[7]及增强 CB-LAK 和 PB-LAK 杀伤肿瘤细胞的作用^[8]。

由于一些地道的石斛药材已濒临灭绝,故对药用价值较高的石斛药材进行保护已刻不容缓。球花石斛(*Dendrobium thyrsiflorum* Rehb. f)未见药用记载,它出现于中药市场,可追溯至 80 年代末及 90 年代初。在筛选实验中,球花石斛多糖(DTP)能显著促进骨髓抑制小鼠外周血白细胞数的回升,与已证实有确切免疫增强作用的茯苓多糖比较有显著性差异($P < 0.05$),为进一步了解球花石斛多糖的药用价值和活性作用,进行了一系列免疫学实验。本文主要报道球花石斛多糖对小鼠免疫调节作用的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品

球花石斛原药材购自云南三木集团有限公司石斛种植基地,并已由云南大学虞泓教授鉴定。球花石斛粗多糖由中科院昆明植物研究所提供,为棕褐色粉末。球花石斛多糖提取方法:风干植物材料粉碎后,加 1 mol/L NaOH 混合过夜,过滤得澄清液,加 10%醋酸中和,浓缩至一定体积,搅拌下加入 95%的乙醇,使含醇量达 80%,放置 12 h,倾出上清液,取沉淀物,无水乙醇反复洗涤,干燥后即得粗多糖,得率为 14.7%。

1.1.2 主要试剂及仪器

RPMI-1640 培养液为 GIBCO 公司产品;新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品;刀豆蛋白 A(Con-A)、脂多糖(LPS)、SDS 均为 Sigma 公司产品;MTT 为 AMRESCO 公司产品;印度墨水为北京笃信精细制剂厂产品;一次性 96 孔平底塑料板、酶标板自动读数仪、752 型紫外分光光度计。

1.1.3 实验动物

健康未交配的成年 ICR 小鼠,雌雄各半,体重 18-22 g。由昆明医学院实验动物中心提供,合格证号:2005017,发证单位:云南省动物管理委员会。

1.2 方法

1.2.1 免疫器官重量及脏器指数

取 40 只 ICR 小鼠,随机分成 4 组,每组 10 只,

雌雄各半,即对照组、球花石斛多糖低、中、高剂量组。每组均按 20 mL/kg 体重等容量灌胃,对照组给予蒸馏水,给药组用蒸馏水溶解稀释球花石斛多糖,配制成黄褐色的混悬液,低、中、高剂量组的浓度分别为 40 mg/mL、60 mg/mL、80 mg/mL,即给药剂量分别为 400 mg/kg 体重、600 mg/kg 体重、800 mg/kg 体重,每日 1 次,连续 10 d。各剂量组动物给药 10 d 后,股动脉放血处死,取出动物的脾脏、胸腺称重,并计算脏器指数^[9]。

脏器指数(%) = 脏器重量(g) ÷ 动物体重(g) × 100

1.2.2 小鼠碳粒廓清试验

实验动物的分组及给药处理同上一试验。连续给药 10 d 后,按 0.1 mL/10g 体重计算,小鼠尾静脉注射印度墨汁(将印度墨汁原液用生理盐水稀释 5 倍),分别在注射后 2 min、10 min 从眼眶静脉丛取血 20 μ L,加入到 2 mL 0.1% Na₂CO₃ 溶液中,以 Na₂CO₃ 溶液作空白,600 nm 波长比色测 OD 值,并将小鼠处死,取肝脏、脾脏称重。计算吞噬指数(K)及校正吞噬指数(a),表示小鼠碳廓清的能力^[10]。

吞噬指数 $K = (\log A_1 - \log A_2) \div (t_1 - t_2)$

校正吞噬指数 $a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \sqrt{K}$

K:直线斜率,可表示吞噬速率;a:反映每单位组织重量的吞噬活性

1.2.3 小鼠脾淋巴细胞转化试验(改良 MTT 法)

实验动物的分组及给药处理同上一实验。给药末期无菌条件下取出各只动物脾脏,研碎,200 目细胞筛网过滤,用 Hanks 液洗 3 次,调整细胞悬液浓度为 2×10^6 个/mL,加入 96 孔培养板,每只动物的细胞悬液分别加 12 个孔,1~4 孔为对照孔,加入 90 μ L 脾细胞悬液,10 μ L RPMI-1640 培养液;5~8 孔为加 ConA 孔,加入 90 μ L 脾细胞悬液,50 μ g/mL 的 ConA 液 10 μ L;9~12 孔为加 LPS 孔,加入 90 μ L 脾细胞悬液,100 μ g/mL 的 LPS 液 10 μ L,置 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养,于培养第 68 h,每孔加入 MTT 液 10 μ L,继续培养 4 h 后,每孔加入 100 μ L 三联液静置 12 h,紫色结晶完全溶解后用酶联免疫检测仪以 570 nm(主)/630 nm(次)波长测定 OD 值,用加 ConA 孔的 OD 值减去不加 ConA 孔的 OD 值代表 T 淋巴细胞的增殖能力,用加 LPS 孔的 OD 值减去不加 LPS 孔的 OD 值代表 B 淋巴细胞的增殖能力。

1.3 统计处理

用 SPSS 软件包采用单因素方差分析或秩和检验对试验结果进行统计,比较各给药组与对照组之间的差异。

2 结果

给药末期结果显示 DTP 对胸腺重量影响不明显,给药组与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$),低、中剂量组的脾脏指数与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$),说明 DTP 可显著增加小鼠脾脏指数;

中、高剂量组的吞噬指数和校正吞噬指数与对照组比较均有显著性差异($P < 0.01/P < 0.05$),表明 DTP 能增强巨噬细胞的吞噬功能,加速碳粒的清除;用 ConA 刺激的 T 淋巴细胞增殖试验中,各组间比较无显著性差异($P > 0.05$),但有一定的增长趋势,而用 LPS 刺激的 B 淋巴细胞增殖试验中,中、高剂量组的 LPS 差值与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),说明 DTP 具有显著的刺激 B 淋巴细胞增殖的作用。见表 1,2,3,4。

表 1 球花石斛多糖对小鼠免疫器官重量及脏器指数的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of DTP on the weight and index of immune organs in mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	胸腺重量 Weight of thymus(g)	胸腺指数 Thymic index(%)	脾脏 Weight of spleen(g)	脾脏指数 Spleen index(%)
对照组 Control group	蒸馏水 Distilled water	0.053 ± 0.012	0.22 ± 0.061	0.093 ± 0.018	0.38 ± 0.090
低剂量组 Low dose group	400	0.047 ± 0.019	0.21 ± 0.090	0.114 ± 0.031	$0.49 \pm 0.011^{**}$
中剂量组 Middle dose group	600	0.044 ± 0.013	0.20 ± 0.063	0.107 ± 0.018	$0.49 \pm 0.010^{**}$
高剂量组 High dose group	800	0.050 ± 0.018	0.22 ± 0.076	0.107 ± 0.020	0.46 ± 0.068

注: ** 与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。*。Compared with control group($P < 0.01$)。*

表 2 球花石斛多糖对小鼠碳廓清能力的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of DTP on engulfing carbon granula ability in mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	吞噬指数(k) Phagocytosis index	校正吞噬指数(a) Revised phagocytosis index
对照组 Control group	蒸馏水 Distilled water	0.0052 ± 0.0034	3.17 ± 0.76
低剂量组 Low dose group	400	0.0097 ± 0.0060	3.62 ± 1.25
中剂量组 Middle dose group	600	$0.1264 \pm 0.0046^{**}$	$4.15 \pm 0.78^{*}$
高剂量组 High dose group	800	$0.0119 \pm 0.0059^{**}$	$4.11 \pm 0.95^{*}$

注: */** 与对照组比较有显著性差异($P < 0.05/P < 0.01$)。*/。Compared with control group, ($P < 0.05/P < 0.01$)。

表 3 球花石斛多糖对小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of DTP on proliferation of mouse spleen T lymphocyte in vitro($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	OD(未加 ConA) OD(ConA absence)	OD(加 ConA) OD(ConA)	OD(ConA 差) OD(Difference of ConA)
对照组 Control group	蒸馏水 Distilled water	0.090 ± 0.005	0.102 ± 0.0052	0.0118 ± 0.0059
低剂量组 Low dose group	400	0.093 ± 0.005	0.103 ± 0.011	0.0092 ± 0.0090
中剂量组 Middle dose group	600	0.100 ± 0.010	0.114 ± 0.024	0.0140 ± 0.017
高剂量组 High dose group	800	0.112 ± 0.006	0.128 ± 0.010	0.0159 ± 0.007

注: 与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。Compared with control group($P > 0.05$)。

表 4 球花石斛多糖对 B 淋巴细胞增殖的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 4 The effect of DTP on proliferation of mouse spleen B lymphocyte in vitro($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	OD(未加 LPS) OD(LPS absence)	OD(加 LPS) OD(LPS)	OD(LPS 差) OD(difference of LPS)
对照组 Control group	蒸馏水 Distilled water	0.090 ± 0.005	0.099 ± 0.012	0.0087 ± 0.011
低剂量组 Low dose group	400	0.093 ± 0.005	0.118 ± 0.025	0.0247 ± 0.023
中剂量组 Medium dose group	600	0.100 ± 0.010	0.135 ± 0.037	$0.0343 \pm 0.030^{*}$
高剂量组 High dose group	800	0.112 ± 0.006	0.147 ± 0.015	0.0347 ± 0.014

注: * 与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。* Compared with control group($P < 0.05$)。

3 讨论

在药物研究趋势由化学合成药物转向天然药物的今天,到目前为止科学工作者已对 100 余种中药多糖进行了活性研究,香菇多糖、猪苓多糖、云芝多糖等一批质量稳定、疗效确切、毒性和不良反应小的多糖类新药已用于临床。石斛属植物所含化学成分丰富,其主要的化学成分是多糖,还有生物碱、氨基酸、酚类、挥发油等,它的药理作用广泛,其中多糖类成分是石斛具有免疫增强作用和抗肿瘤作用的活性成分。脾脏是重要的周围免疫器官,是免疫细胞执行免疫功能的场所,尤以 B 淋巴细胞为主,而 B 淋巴细胞又是调节体液免疫的主要细胞。巨噬细胞参与机体的特异性和非特异性免疫,具有强大的杀伤和清除作用,还能分泌细胞因子调节免疫,并将抗原提呈给 T、B 淋巴细胞^[1]。本试验结果显示 DTP 对小鼠脾脏重量虽有增加趋势,但与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$),而脾脏指数有显著性差异,这样排除了体重的影响,更能说明 DTP 可增加脾脏的净重量。DTP 可显著增强巨噬细胞的吞噬能力,提高机体对病原微生物的抵抗力。DTP 还可显著促进 B 淋巴细胞的增殖,从而增强机体的体液免疫功能。用 ConA 刺激的 T 淋巴细胞增殖试验中,各组间比较无显著性差异($P > 0.05$),但有一定的增长趋势,考虑可增大剂量或检测其分泌的细胞因子,以评价其对细胞免疫的影响。所有小鼠免疫试验结果均无剂量效应关系,而 DTP 中剂量组的结果均较好,这与科学家的研究结果一致,多糖类都有一个最适效应量,大于这个剂量反而产生免疫抑制。因此,本研究提示 DTP 可显著增加脾脏重量,增强巨噬细胞的碳廓清能力和 B 淋巴细胞的增殖能力,具有一定的免疫增强作用,可增强机体的特异性和非特异性免疫功能,是一种具有良好开发前景的免疫调节剂。

参考文献

1 Xu C (徐程), Shen Y (沈颖), Zhang M (张铭). Studies on

- medicinal *Dendrobium* identification. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(8): 11-12.
- 2 Zhang JL (张纪立), He JL (何锦丽). Advances in study on *Dendrobium*. *Lishizhen Med and Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11: 469-470.
- 3 Deng YH (邓银华), Xu KP (徐康平), Tan GS (谭桂山). Advances in study on chemical constituents and pharmacological activity of *Dendrobium*. *J Chin Mater Med* (中药材), 2002, 25: 677-680.
- 4 Lin P (林萍), Bi ZM (毕志明), Xu H (徐红). Advances in study on pharmacological activity of *Dendrobium*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(11): 19-22.
- 5 Shi H (施红), Chen YC (陈玉春), Lin ZC (林智诚), et al. Effect of compound preparation of *Dendrobium* on immunologic function in mice. *Fujian Coll TCM* (福建中医学院学报), 1996, 6(2): 24.
- 6 Zhao YL (赵永灵), Wang SL (王世林), Li XY (李小明). Studies on the polysaccharides of *Dendrobium aphyllum*. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1994, 16: 392-396.
- 7 Huang MQ (黄民权), Cai TY (蔡体育), Liu QL (刘庆伦). Effects of polysaccharides from *Dendrobium candidum* on white blood cells and lymphocyte moving inhibition factor of mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1996, 8(3): 39-41.
- 8 Luo HL (罗慧玲), Cai TY (蔡体育), Chen QL (陈巧伦), et al. Enhancement of *dendrobium candidum* polysaccharide on killing effect of LAK cells of umbilical cord blood and peripheral blood of cancer patients *in vitro*. *Chin Oncol* (中国癌症杂志), 2000, 19: 1124-1126.
- 9 Li YK (李仪奎). *Methodolgy in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学). Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1991. 155-167.
- 10 Chen Q (陈奇). *Methodolgy in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. 706-712.
- 11 Chen WF (陈慰峰). *Medical Immunology* (医学免疫学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. 79-102.