

DB-624 可使 7 种残留溶剂达到基线分离、乙酸峰形较好,且分析时间适宜,故选用 DB-624 色谱柱。

本试验所确定的分析方法检测利伐沙班原料药中的乙酸,可确保乙酸的色谱峰和其他组分的色谱峰的分离度满足气相色谱测定的要求,采用直接进样法测定乙酸的定量限可达到 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,具有柱效高、分离度高、准确度高、色谱峰形好、分析时间短等优点,其检测限、定量限、精密性、准确度等指标都符合气相色谱分析的常规要求和药典对残留溶剂检验的要求,适用于利伐沙班中的乙酸、三乙胺等 7 种残留溶剂的测定,可满足分析要求。

REFERENCES

- [1] 孟宪丽. 利伐沙班预防老年患者髋关节置换术后深静脉血栓效果观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(8): 824-825.
- [2] ZHAO W G, LIU Z W, LIU L, et al. Efficacy of rivaroxaban prevention of postoperative lumbar vein thrombosis [J]. J Cervicodynia Lumbodynia(颈腰痛杂志), 2014, 35(5): 382-384.
- [3] TANG L P, ZHAO W G. Curative effect of rivaroxaban in the treatment of acute pulmonary embolism [J]. J Clin Pulm Med(临床肺科杂志), 2014, 19(10): 1780-1781.
- [4] 刘炜. 利伐沙班治疗非 ST 段抬高急性冠脉综合征的疗效观察[J]. 中国民康医学, 2014, 26(5): 33-35.
- [5] CHEN Y L, SHI Z W. Clinical research on rivaroxaban, a new oral anticoagulant [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2009, 30(5): 810-813.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 通则 105-109.
- [7] 张京伟. 阿莫西林中残留溶剂的测定[J]. 河北化工, 2009, 32(10): 67-68.
- [8] NIU H Y, LIU K L. Analysis method validation of residual solvent of ganciclovir [J]. Coal Chem Indust(煤炭与化工), 2014, 37(10): 79-83.
- [9] SHEN Y L, LIU J P. Determination of residual solvents in argatroban by headspace capillary GC [J]. Food Drug(食品与药品), 2014, 16(4): 282-283.
- [10] WANG Y Q, LIU L, LIN C. Determination of acetic acid in sulfadiazine by gas chromatography [J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2010, 37(10): 121-122.
- [11] FANG Q R, DIAO X L, WAN Q H, et al. Determination of residual solvents in retigabine active substances by headspace gas chromatographic method [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2013, 32(3): 308-313.

收稿日期: 2015-09-08

虫草多糖对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞及其亚群数量与功能的影响

诸葛定娟, 程敏, 董文彬, 陈爱瑛, 缪云萍, 郑高利, 叶小弟^{*}(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 研究虫草多糖对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞功能的影响。方法 除正常对照组外, 其余小鼠右前肢腋窝皮下注射 S180 肉瘤细胞悬液建立小鼠荷瘤模型。荷瘤小鼠随机分为荷瘤对照(等容生理盐水)组、香菇多糖($1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、虫草多糖高、中、低剂量($200, 100, 50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 腹腔注射, 每天 1 次, 连续 13 d 后, 检测虫草多糖对荷瘤小鼠的抑瘤作用以及荷瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群数量、Th1/Th2 类细胞因子水平和脾淋巴细胞转化功能。结果 虫草多糖高、中剂量组可明显抑制 S180 肉瘤生长, 提高荷瘤小鼠脾脏重量和脾脏系数; 提高外周血 CD3^+ 细胞(总 T 淋巴细胞)、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 亚群数量及 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-/\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 比值, 提高 Th1 淋巴细胞分泌的细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-2 水平, 并显著促进脾脏 T 淋巴细胞增殖转化能力。结论 虫草多糖具有明显的抗肿瘤活性, 其机制可能与调节机体 T 淋巴细胞及其亚群的数量与分泌功能有关。

关键词: 冬虫夏草菌丝体; 虫草多糖; T 淋巴细胞亚群; S180 肉瘤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0528-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.003

Effects of Polysaccharides of *Cordyceps Sinensis* Mycelium on the Number and Function of T Lymphocytes in Tumor-bearing Mice

ZHUGE Dingjuan, CHENG min, DONG Wenbin, CHEN Aiyong, MIAO Yunping, ZHENG Gaoli, YE Xiaodi^{*}
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2090286)

作者简介: 诸葛定娟, 女, 硕士生 Tel: (0571) 88215620
Tel: (0571)88215620 E-mail: ye_xiaodi@hotmail.com

E-mail: 770692046@qq.com

^{*}通信作者: 叶小弟, 女, 硕士, 副研究员

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of polysaccharides of *Cordyceps sinensis* Mycelium (cordyceps polysaccharide) on the function of T lymphocytes in tumor-bearing mice. **METHODS** Tumor-bearing mice were established by inoculated with S180 cells. The tumor-bearing mice were randomly divided into the tumor bearing group (physiological saline), lentinan group (1 mg·kg⁻¹), cordyceps polysaccharide groups in high, medium and low dose (200, 100, 50 mg·kg⁻¹). After celiac injection of cordyceps polysaccharide for 13 d (once a day), the number of T lymphocytes and its subgroups in peripheral blood, Th1/Th2 cytokines and transformation rates of spleen T lymphocytes were detected; and the thymus index, the spleen index and the inhibition rate of tumor were measured. **RESULTS** High and medium dose of cordyceps polysaccharide groups had significantly reduced growth of S180 sarcoma, increased spleen weight and spleen coefficient of tumor-bearing mice, increased the number of CD3⁺ cells (total T lymphocytes), CD4⁺CD8⁻ subgroup and CD4⁺CD8⁻/CD4⁺CD8⁺ ratio in peripheral blood, increased the level of TNF- α and IL-2 in Th1 lymphocytes, and significantly increased proliferation and transformation of spleen T lymphocytes. **CONCLUSION** Cordyceps polysaccharide has antitumor activity *in vivo*, and the underlying mechanism may relate to the regulation of the number and the immune function of T lymphocytes and its subgroup by cordyceps polysaccharide.

KEY WORDS: *Cordyceps sinensis* Mycelium; cordyceps polysaccharide; T lymphocyte subgroup; S180 sarcoma

冬虫夏草发酵菌丝体(俗称人工虫草)已成为虫草替代品,有研究显示发酵菌丝体和天然虫草在化学成分和药理功能上非常相似^[1-5]。冬虫夏草及其菌丝体活性成分包括核苷类物质、麦角甾醇、多糖、氨基酸及微量元素等。其中多糖是其免疫调节和抗肿瘤作用的关键成分^[6]。由于机体的免疫功能与肿瘤的发生发展有非常密切的关系。当机体的免疫功能低下或受到抑制时,肿瘤的发病率增高;当肿瘤生长时,肿瘤患者的免疫功能受到抑制。这两者互为因果,双方各因素的消长对肿瘤的发展起着重要的作用。本研究以干燥的冬虫夏草菌丝体粉制得的虫草多糖为试验材料,通过分析其对荷 S180 肉瘤小鼠的肿瘤生长、主要免疫器官指数、外周血 T 淋巴细胞亚群数量及比例的影响、ConA 诱导的脾淋巴细胞的转化功能以及检测荷瘤小鼠血清 Th1/Th2 类细胞因子的含量,评价其抑瘤率和免疫效应,以初步探讨其免疫作用机制。

1 仪器与材料

1.1 材料

冬虫夏草菌丝体粉(杭州中美华东制药有限公司);注射用香菇多糖(南京绿叶思科药业有限公司,规格:每瓶 1 mg)。清洁级 ICR 小鼠,♂,体质量(20±2)g,购自浙江省实验动物中心,动物合格证号:0016178。S180 细胞株,180 腹水型瘤株(S180)由浙江省医学科学院分子生物中心惠赠。

1.2 试剂

RPMI1640 完全培养液(南京凯基生物科技发展有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);单克隆抗体 Anti-Mouse CD3-PerCP、CD4-FITC 和 CD8-PE、Lysing Buffer 以及 BD Cytometric Bead Array(CBA)Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit,均为 BD Pharmingen 公司产品。

1.3 仪器

MEK-7222K 全自动血细胞分析仪(日本光电工业株式会社);NUAIR-NU-5510E 气套式 CO₂ 培养箱(美国 NUAIR 公司);Biotek Synergy 2 多功能酶标仪(美国 BD 公司);FACS Calibar 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 虫草多糖的制备与总糖含量测定

冬虫夏草菌丝体粉经石油醚索氏提取(80℃回流 6 h)脱脂脱色素、95%乙醇去除小分子物质,25℃干燥后,残渣于沸水提取 3 次,每次 4 h,合并上清液,减压浓缩后,在不断搅拌下,缓缓加入 3 倍体积的 95%乙醇,4℃静置 24 h;4℃,7 200 r·min⁻¹ 离心 20 min,沉淀物以丙酮洗涤 5 次,得糖蛋白;经中性酶+Sevage 方法除蛋白 8 次,经截留分子量>3 500 Da 的透析袋得粗多糖(虫草多糖);采用苯酚-硫酸法测定总糖含量。

2.2 瘤种保存与传代

自腹腔荷瘤小鼠无菌取瘤细胞,经 0.9%氯化钠注射液稀释后无菌操作接种于正常成年 ICR 小鼠腹腔,每 7 d 传 1 代保种。

2.3 荷瘤小鼠模型制备

腹腔传代 7 d 的 S180 荷瘤小鼠颈椎脱臼致死,无菌操作取腹水。放入无菌容器内,置于碎冰块,用 0.9%氯化钠注射液 5 倍稀释,除正常对照组 10 只小鼠外,其余小鼠将瘤细胞悬液接种于小鼠右侧腋窝皮下,每只 0.2 mL。于接种后第 2 天分组给药^[7]。

2.4 分组及给药方法

将荷瘤小鼠随机分成 5 组,每组 10 只,分别为荷瘤对照组、香菇多糖组(香菇多糖 1 mg·kg⁻¹)、虫草多糖高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)。

每天腹腔注射,注射体积均为 20 mL·kg⁻¹;正常对照组和荷瘤对照组腹腔注射等体积生理盐水,连续给药 13 d。第 13 天给药后 1 h,采肝素抗凝血 0.3 mL 用于流式细胞仪检测外周血的总 T 淋巴细胞(CD3⁺)和 CD4⁺CD8⁻、CD4⁺CD8⁺淋巴细胞亚群的数量,EDTA-Na₂ 抗凝血 0.4 mL 测定血常规,非抗凝血 0.4 mL 制备血清用于检测 Th1/Th2 类细胞因子,最后颈椎脱臼致死,无菌条件下取脾脏,称重后用于 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验,然后取胸腺和肉瘤称重量,计算抑瘤率、胸腺指数、脾脏指数。

2.5 外周血的 T 淋巴细胞及其亚群测定

直接免疫荧光染色法(FACS)测定 T 淋巴细胞表型 CD3、CD4 和 CD8 分子,取抗凝血 100 μL 置于流式管中,分别加入抗 CD3-PerCP、CD4-FITC 和 CD8-PE 单抗各 1.25 μL,4 ℃避光孵育 30 min,各管加 10 倍稀释的红细胞裂解液(Lysing Buffer)2 mL,4 ℃避光孵育 15 min,4 ℃,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液,细胞用冷 PBS 洗涤 2 次,4 ℃,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液,用 400 μL PBS 重悬细胞,待测。

2.6 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化试验(MTT 法)

无菌取脾置于盛有适量 RPMI-1640 的培养皿中,用 5 mL 一次性注射器的针芯研磨,200 目筛网过滤,洗涤,制成单细胞悬液,计数,最后用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞密度为 5×10⁶·mL⁻¹。将细胞悬液分 8 孔加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL:4 孔加 100 μL ConA 液(终浓度:3 μg·mL⁻¹),另 4 孔作为对照,再加 100 μL RPMI-1640 完全培养液,总体积 200 μL,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔加入 50 μL MTT(1 mg·mL⁻¹),继续培养 4 h 后,去除培养液,每孔加入 150 μL 酸性异丙醇,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解。在 490 nm 处测定光密度值(OD 值)。最后用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值代表淋巴细胞的增殖能力。

2.7 流式微球法检测细胞因子

用试剂盒中稀释剂(G)溶解细胞因子标准品(C),室温 15 min,细胞因子标准品按照梯度法用稀释剂 G 稀释为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 的 8 种浓度,加上空白对照管制备细胞因子标准曲线。取 10 μL·test⁻¹捕获微球悬液(A1~A5)混合(取前剧烈振荡),每一

检测管中加入 50 μL 微球混合液,在相应样品管中加稀释好的标准品和待测样本,每管 50 μL,加入 PE 检测试剂(B)50 μL,室温下避光孵育 2 h,用 300 μL 洗涤缓冲液(F)洗涤,离心(200 g, 5 min),小心吸取弃去上清液,每管加 300 μL 洗涤缓冲液(F)重悬微球,FACS Calibar 流式细胞仪检测,FCAP Array TM software 软件分析检测结果。

2.8 统计学分析

以上结果所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Microsoft Excel 进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 虫草多糖的制备及总糖含量测定

虫草多糖水分为 6.75%,苯酚-硫酸法测得总糖含量为 71.21%(以干品计)。虫草多糖经紫外分光光度计于 200~400 nm 波长扫描,于 260,280 nm 处无吸收峰,于 200 nm 末端有强烈的吸收峰,表明样品中无蛋白、多肽及核酸。

3.2 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠肿瘤生长的影响

与荷瘤对照组比较,香菇多糖和虫草多糖高、中剂量组的瘤重明显减轻,差异有统计学意义(*P*<0.05);虫草多糖中、高剂量组的抑瘤率平均>40%,以虫草多糖 200 mg·kg⁻¹ 组效果最明显,抑瘤率达 56.2%。虫草多糖各剂量组对荷瘤小鼠体质量无明显影响。结果见表 1。

表 1 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠抑瘤率的比较(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of tumor inhibition rate among groups of S180 tumor-bearing mice(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	试验末体质量/g	瘤重/g	抑瘤率/%
正常对照组	—	32.9±1.8	—	—
荷瘤对照组	—	32.5±4.7	3.00±1.44	—
香菇多糖组	1	30.0±4.6	1.71±0.58 ³⁾	43.0
虫草多糖组	50	31.0±4.2	2.74±0.89	8.6
	100	32.4±3.7	1.65±0.71 ¹⁾	44.9
	200	32.5±3.9	1.31±0.47 ²⁾	56.2

注:与荷瘤对照组比较,¹⁾*P*<0.05,²⁾*P*<0.01。

Note: Compared with the tumor-bearing group,¹⁾*P*<0.05,²⁾*P*<0.01.

3.3 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠的免疫器官的影响

与正常对照组比较,荷瘤对照组的脾脏重量略有增加,脾脏指数增大(*P*<0.05),胸腺重量及其指数略有降低;与荷瘤对照组比较,虫草多糖中、高剂量组能提高荷瘤小鼠脾脏重量,脾脏指数明显增大(*P*<0.01 或 *P*<0.05),但对胸腺重量及指数具有减小的趋势,但没有统计学意义。结果见表 2。

表 2 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠免疫器官重量及指数的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of Cordyceps polysaccharide on the immune organ weight and index of S180 tumor-bearing mice ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	脾脏重量/ mg	脾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	胸腺重量/ mg	胸腺指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照组	—	230±43	6.99±1.28	67±13	2.04±0.41
荷瘤对照组	—	284±91	8.59±1.90 ¹⁾	60±17	1.86±0.47
香菇多糖组	1	282±107	8.03±4.17	51±14	1.73±0.54
虫草多糖组	50	296±94	9.42±2.15	42±16	1.39±0.65
	100	360±97	11.15±2.80 ²⁾	70±25	1.80±0.53
	200	451±75 ³⁾	13.87±1.71 ³⁾	45±20	1.37±0.62

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与荷瘤对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the tumor-bearing group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.4 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠外周血白细胞数量及其分类的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组小鼠外周血白细胞及其分类中性粒细胞和单核细胞数量显著升高。与荷瘤对照组比较, 虫草多糖各剂量组对荷瘤小鼠白细胞总数无明显影响, 但显著升高其单核细胞数量; 虫草多糖高、低剂量的淋巴细胞明显增加。结果见表 3。

表 3 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠白细胞及其分类的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of Cordyceps polysaccharide on the leukocyte and its subtypes of S180 tumor-bearing mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	白细胞/ $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	中性粒细胞/ $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	淋巴细胞/ $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	单核细胞/ $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	5.3±0.9	1.3±0.60	3.9±0.49	0±0
荷瘤对照组	—	11.9±3.0 ¹⁾	7.8±2.4 ¹⁾	3.9±1.5	0.14±0.07 ¹⁾
香菇多糖组	1	11.7±4.5	6.9±4.1	4.6±1.2	0.28±0.24
虫草多糖组	50	13.3±3.9	6.1±2.9	6.9±2.1 ³⁾	0.31±0.21 ²⁾
	100	12.8±5.2	7.9±4.3	4.5±2.0	0.42±0.24 ³⁾
	200	12.3±2.9	6.6±2.5	5.3±1.3 ²⁾	0.44±0.17 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与荷瘤对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the tumor-bearing group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

表 5 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠外周血细胞因子的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of Cordyceps polysaccharide on the cytokines in peripheral blood of S180 tumor-bearing mice($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-2/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-4/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-5/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IFN- γ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常对照组	—	23.04±2.35	23.89±1.38	43.60±2.72	45.57±18.43	161.74±9.30
荷瘤对照组	—	22.50±1.49	23.42±1.15	44.06±3.95	39.04±9.90	144.49±7.25 ¹⁾
香菇多糖组	1	23.17±1.99	23.95±1.49	45.07±3.80	37.22±3.89	163.74±13.63 ²⁾
虫草多糖组	50	23.43±1.88	24.24±0.88	44.08±2.52	37.51±3.07	154.76±14.18
	100	24.44±1.03 ²⁾	26.04±3.50	48.11±4.11	45.06±9.75	165.87±10.26 ³⁾
	200	24.99±1.69 ²⁾	23.35±1.37	46.31±3.31	41.42±7.27	174.46±21.36 ³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与荷瘤对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the tumor-bearing group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.5 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群数量的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组小鼠外周血总 T 淋巴细胞($\text{CD}3^+$ 细胞)比例, 以及 $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$ 细胞亚群比例明显降低($P<0.01$)、 $\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ 细胞亚群比例明显升高($P<0.01$), $\text{CD}4^+\text{CD}8^-/\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ 比值明显下降($P<0.01$); 与荷瘤对照组比较, 虫草多糖高剂量组外周血 $\text{CD}3^+$ 细胞、 $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$ 细胞亚群比例上升, $\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ 细胞亚群比例变化不明显, $\text{CD}4^+\text{CD}8^-/\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ 比值上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 4。

表 4 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞及其亚群的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of Cordyceps polysaccharide on the number of T lymphocyte and its subsets in peripheral blood of S180 tumor-bearing mice($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{CD}3^+$ / %	$\text{CD}4^+\text{CD}8^-$ / %	$\text{CD}4^-\text{CD}8^+$ / %	$\text{CD}4^+\text{CD}8^-/\text{CD}4^-\text{CD}8^+$
正常对照组	—	59.9±7.9	48.8±6.5	9.8±2.3	5.2±1.0
荷瘤对照组	—	50.3±14.9 ¹⁾	37.4±10.2 ¹⁾	12.9±6.2 ¹⁾	3.3±1.3 ¹⁾
香菇多糖组	1	47.9±8.4	38.0±7.3	9.2±1.6	4.2±0.9
虫草多糖组	50	50.1±16.2	38.1±12.2	12.0±5.4	3.7±1.6
	100	51.4±15.4	40.4±12.2	11.0±4.13	4.0±1.4
	200	68.6±12.5 ³⁾	56.4±12.6 ³⁾	12.2±1.8	4.8±1.4 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与荷瘤对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the tumor-bearing group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.6 虫草多糖对荷 S180 肉小鼠细胞因子的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组小鼠血清中的肿瘤坏死因子 $\text{TNF-}\alpha$ 含量明显降低($P<0.01$); 与荷瘤对照组比较, 虫草多糖中、高剂量组小鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-2 的含量显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果见表 5。

3.7 虫草多糖对荷 S180 肉瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞转化功能的影响

与正常对照组比较, 荷瘤对照组小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力明显降低($P<0.05$); 与荷瘤对照组比较, 虫草多糖各剂量组对由 ConA 诱导产生的 T 淋巴细胞增殖转化能力具有明显促进作用, 随剂量的增加而逐渐增高, 而高剂量作用强度高于香菇多糖($P<0.05$)。

表 6 虫草多糖对 S180 荷瘤小鼠脾脏淋巴 T 细胞增殖转化功能的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Effects of cordyceps polysaccharide on the spleen lymphocyte transformation rate of S180 tumor-bearing mice ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	空白处理 OD 值	ConA 处理 OD 值	增值指数
正常对照组	—	0.190±0.088	0.332±0.117	0.142±0.053
荷瘤对照组	—	0.188±0.035	0.284±0.063	0.096±0.041 ¹⁾
香菇多糖组	1	0.394±0.138 ²⁾	0.592±0.139 ²⁾	0.199±0.044 ²⁾
虫草多糖组	50	0.456±0.035 ²⁾	0.582±0.070 ²⁾	0.125±0.055
	100	0.460±0.129 ²⁾	0.665±0.150 ²⁾	0.206±0.073 ²⁾
	200	0.491±0.115 ²⁾	0.784±0.169 ²⁾³⁾	0.293±0.099 ²⁾³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与荷瘤对照组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与香菇多糖组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the tumor-bearing group, ²⁾ $P<0.01$; compared with the lentinan group, ³⁾ $P<0.05$.

4 讨论

多糖是生物有机体内普遍存在的生物大分子, 不仅参与组织细胞骨架的构成, 而且是多种内源性生物活性分子的重要组成部分。实验证实多糖类成分具有广泛的调节免疫机能的作用, 能明显的增强机体免疫功能^[8-9]。现代医学认为, 机体的免疫水平与肿瘤的发生发展有密切关系。当宿主免疫功能低下或受抑制时, 肿瘤发生率增高, 而肿瘤进行性生长过程抑制患者的免疫功能, 二者也互为因果。因此, 增强机体免疫功能, 发挥抗肿瘤免疫机制的作用是肿瘤免疫学研究的重要课题。多糖类化合物主要是依赖于对免疫功能具有较强的调节作用, 从而表现出具有一定的抗肿瘤作用^[10]。

本试验结果表明, 虫草多糖腹腔注射给药能明显抑制小鼠 S180 肉瘤的生长, 能提高荷瘤小鼠脾脏重量和脾脏系数; 但胸腺重量及指数有一定程度减小, 其原因可能是虫草多糖能促进胸腺细胞向脾脏和外周血释放, 促使胸腺内成熟和较成熟的 T 细胞减少^[11], 是其增强机体细胞免疫功能

的机制之一。

T 淋巴细胞^[12]主要参与机体的细胞免疫, 它与某种特异性抗原物质或细胞相互接触时发挥免疫效应, 主要介导细胞免疫应答和分泌白介素、干扰素等细胞因子。T 淋巴细胞在体外培养时, 受到 ConA 刺激后, 可出现细胞体积增大, 代谢旺盛, 蛋白与核酸合成增加, 并进行分裂增殖。T 淋巴细胞的转化增殖程度, 可以反映机体细胞免疫水平。本研究显示, 荷瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞的增殖能力受到抑制, 这与文献报道^[13]荷瘤机体 T 淋巴细胞增殖能力显著下降一致。虫草多糖可以诱导 T 淋巴细胞转化、增殖。

机体维持正常免疫功能状态, 有赖于各种免疫细胞(特别是各类 T 淋巴细胞亚群)之间的相互协作或相互制约, 以产生适度的免疫应答, 使之既能清除异物抗原, 又不致损伤机体自身组织。这种免疫应答主要为细胞介导的免疫, 其中 CD3^+ 、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 和 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 系统起着重要作用^[14-15]。当不同淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时, 可导致机体细胞免疫功能紊乱。本试验结果表明, 虫草多糖能不同程度地使外周血总 T 淋巴细胞(CD3^+)、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 亚群比例增加, 提示其对辅助性 T 细胞功能的增强作用, 辅助性 T 细胞可能是其主要的原发刺激细胞。

早在 1986 年, Mosmann 等已发现小鼠 CD4^+ 细胞群是一个不均一的亚群, 可分为 Th1 和 Th2 的 2 个功能不同的独立亚群。Th1 细胞主要分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 和 IL-2 等, $\text{TNF-}\alpha$ 可作为效应分子直接诱导肿瘤细胞的凋亡, $\text{IFN-}\gamma$ 可活化巨噬细胞, 增强其杀伤已被吞噬的病原体的能力, IL-2 可增强 NK 细胞的杀伤能力; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 等, 其主要功能为刺激 B 细胞增殖并产生抗体, 与体液免疫相关。由于 Th1/Th2 亚群及其相互之间的平衡在免疫应答的调节中起着关键的作用, 因此目前认为 Th1/Th2 平衡的失调与多种疾病(包括恶性肿瘤)的发生、发展和预后有着密切的关系。本试验采用 CBA 技术检测细胞血清淋巴细胞因子浓度, 结果显示, 虫草多糖可显著提高荷瘤小鼠血清中 Th1 细胞标志性细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-2 水平, $\text{IFN-}\gamma$ 含量也有升高的趋势。提示虫草多糖可诱导 Th1 细胞较 Th2 细胞的优势, 诱导荷瘤小鼠的 Th1/Th2 平衡向 Th1 细胞占优势的方向转化, 改善调节机体的免疫状态, 增强机

体的抗肿瘤免疫功能,从而发挥抑制肿瘤的作用。

REFERENCES

- [1] TAN Z L, YIN H S, HUANG H, et al. Chemical ingredients of submerged cultivation mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(3): 328-321.
- [2] 高俊德, 马紫亮, 张喜财, 等. 冬虫夏草菌丝体分离培养及其与生药冬虫夏草化学成份的比较[J]. 中药通报, 1981, 6(1): 3-6.
- [3] 陈万群, 陈古荣. 冬虫夏草代用品研究进展[J]. 中草药, 1994, 25(5): 269-271.
- [4] 肖宏亮, 高孔荣, 谭盈科. 冬虫夏草及其菌丝体研究进展[J]. 中国食用菌, 1997, 16(2): 3-5.
- [5] 徐方云. 冬虫夏草及发酵虫草菌丝体的临床应用[J]. 药品评价, 2005, 2(4): 255-263.
- [6] 唐茂芝, 贝峰. 食用菌类食品作为功能性食品的优势和特点[J]. 食品科技, 1999, 25(3): 5-6.
- [7] 黄彩玲, 林勇, 肖柳英, 等. 青蒿琥酯对 S180 荷瘤小鼠免疫调节的作用及机制初探[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(2): 145-148.
- [8] 陈洪亮, 李伯涛, 张家祥. 免疫活性多糖的免疫调节作用及机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 249-252.
- [9] RAMESH H P, THARANATHAN R N. Carbohydrates-the renewable raw materials of high biotechnological value [J]. Crit Rev Biotechnol, 2003, 23(2): 149-173.
- [10] 卫军, 顾振纶. 植物多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 1997, 16(1): 1-4.
- [11] 苏秀榕, 姜永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究III[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 43-44.
- [12] 汪道鑫, 虞春华, 叶颖俊, 等. T 淋巴细胞的研究进展[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(24): 3193-3195.
- [13] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 北京科学出版社, 2004: 148-153.
- [14] 曹宇, 赵祯, 张瑶, 等. 2002. 紫外线照射小鼠 T 细胞 CD4 和 CD8 的表达[J]. 中国应用生理学杂志, 18(4): 403-405.
- [15] GUIDOTTI L G, ROCHFORD R, CHUNG J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection [J]. Science, 1999, 284(5415): 825-829.

收稿日期: 2015-10-25

当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍的影响

吴国泰^{1,2}, 景琪¹, 刘五州¹, 妥海燕¹, 杜丽东^{1,2}, 任远^{1,2*} (1.甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2.甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 观察当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍的影响。方法 SD 大鼠结肠 2 处横向切口, 原位缝合, 建立腹部手术模型, 随机分为模型组、阳性对照组(西沙比利 $0.0035\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、当归黄芪水提物组(AEA, 生药 $5.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、当归黄芪半仿生提取物(SEA)高、中、低剂量组(生药 $10.5, 5.2, 2.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 设假手术组, 每组 10 只, 术后 24 h 灌胃给药, 连续 10 d。观察大鼠一般状态, 记录首次排便时间和粪便量; 测定大鼠摄食量, 胃肠推进指数和血浆胃动素(motilin, MTL)和血清胃泌素(gastrin, GAS)水平; 观察结肠组织形态 Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)结构, 检测结肠肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)、肌动蛋白和肌球蛋白含量。结果 术后大鼠排便减少、体质量减轻、胃肠推进指数减小($P<0.05$), 血浆 MTL 和血清 GAS 含量均降低($P<0.01$), 结肠平滑肌细胞间隙变大, 数量减少, ICC 结构明显损伤; MLCK、肌动蛋白和肌球蛋白含量明显下降($P<0.01$)。给药第 9 天, SEA 高、中剂量组体质量增加($P<0.05, P<0.01$), 首次排便时间缩短、排便量增多($P<0.05$), 且 24 h 食量增加($P<0.05, P<0.01$); 胃肠推进指数增加、血浆 MTL 和血清 GAS 含量均升高($P<0.05, P<0.01$), 结肠 ICC 细胞数量较多, 结构完整; 结肠 MLCK、肌动蛋白和肌球蛋白含量均有上升($P<0.05, P<0.01$)。结论 当归黄芪半仿生提取物对腹部术后大鼠胃肠运动功能障碍具有一定的治疗作用, 作用机制与升高血液 MTL 和 GAS 及结肠平滑肌收缩相关蛋白的含量有关。

关键词: 当归; 黄芪; 半仿生提取; 腹部手术; 胃肠功能障碍

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)05-0533-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.004

Effects of Semi Bionic Extraction of *Angelica Sinensis* and *Astragalus Membranaceus* on Gastrointestinal Motility Dysfunction after Abdominal Surgery in Rats

WU Guotai^{1,2}, JING Qi¹, LIU Wuzhou¹, TUO Haiyan¹, DU Lidong^{1,2}, REN Yuan^{1,2*} (1. Gansu University of Chinese

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1212RJZA079), 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金(ZDSYS-KJ-2013-006)

作者简介: 吴国泰, 男, 博士, 副教授 Tel: 13919102724 E-mail: wgt@gszy.edu.cn *通信作者: 任远, 男, 教授 Tel: (0931)8762653 E-mail: Leyuan816@163.com