

## 人参茎叶多糖对小鼠免疫功能的影响

赵萧萧, 王际辉\*, 叶淑红, 刘滢, 张丽莉

(大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

**摘要:**研究了热水浸提法从人参茎叶中提取水溶性多糖。体内实验测定小鼠免疫器官指数, 体外实验测定腹腔巨噬细胞吞噬中性红(3-氨基-6甲氨基-2甲基吩嗪盐酸盐)能力, 并采用噻唑蓝比色法(MTT)测定小鼠脾淋巴细胞增殖能力。结果表明, 人参茎叶多糖含量为81.67%。体内、外实验显示, 人参茎叶多糖能增加小鼠免疫器官的总质量并能明显提高腹腔巨噬细胞吞噬能力及脾细胞增殖能力。

**关键词:** 人参茎叶多糖; 提取; 免疫功能

中图分类号: Q539 文献标识码: A 文章编号: 0254-5071(2009)03-0056-03

### Effects of the polysaccharide from ginseng leaves and stems on immunological function of mouse

ZHAO Xiaoxiao, WANG Jihui\*, YE Shuhong, LIU Ying, ZHANG Lili

(College of Biology and Food Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**Abstract:** The hot-water-dipping method was used to extract the polysaccharide from ginseng leaves and stems. With in vivo experiment, the mouse immune system indexes were measured. With in vitro experiment, the mouse macrophage function was studied. The proliferation of mouse spleen cell was measured by MTT assay. The results showed that the ginseng leaves and stems contained 81.67% polysaccharides. The polysaccharide increased the mouse immune system index, and also improved the swallow ability of abdominal cavity macrophage and the multiplication ability of spleen cell obviously in mouse.

**Key words:** polysaccharide from ginseng leaves and stems; extraction; immunological function

人参属五加科植物, 是名贵补药, 久服健身延年, 在我国药用历史约4000年。近年来, 对人参多糖成分的研究引起了许多人的兴趣, 并对其组成及药理方面做了大量的研究工作, 发现人参多糖具有抗肿瘤, 增强免疫功能, 抗补体, 降血糖等多方面的活性<sup>[1-3]</sup>。但人参根需生长6~7年才能收获, 而人参茎叶每年均可采收。据化学成分分析及药理研究证明, 茎叶所含的化学成分及药理作用与其他器官(特别是药用部位)相比基本相同<sup>[4]</sup>。对叶类药的开发利用是针对名贵药材的叶开展研究, 寻找其替代品, 解决名贵药材药源紧缺问题。目前, 日本、韩国及我国对人参茎叶中多糖结构及组成颇有研究<sup>[5-7]</sup>, 本研究从人参茎叶中提取水溶性多糖, 并观察其对小鼠免疫功能的影响, 为今后人参茎叶多糖的应用提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人参茎叶干品: 由吉林宏久生物科技有限公司提供; 95%vol乙醇(AR): 沈阳新试剂厂; 噻唑蓝(MTT): Sigma公司; DMSO、台盼蓝染液(AR): Ameresco. Inc; RPMI-1640细胞培养液: Gibco。

#### 1.2 仪器

Model 680 酶标仪: 北京元业伯乐科技发展有限公司; LDZ5-2 低速自动平衡离心机: 北京雷勃尔离心机有限公司; 生物洁净工作台: 哈东联; 二氧化碳培养箱: 日本三洋;

XW-80A漩涡混合器: 上海精科实业有限公司。

#### 1.3 实验动物

昆明鼠: 6~8周龄, 体重(20±2)g, 购于大连医科大学实验动物中心。

#### 1.4 方法

##### 1.4.1 多糖提取

人参茎叶干品, 粉碎, 过40目筛。称取一定质量处理后的人参茎叶, 加12倍水于95℃提取2h, 重复2次, 合并提取液, 浓缩, 加2倍95%vol乙醇沉淀多糖, 冰箱中过夜, 离心、烘干沉淀即得多糖粗品。将粗多糖用水溶解, 95℃提取1h, 冻融离心, 冷冻干燥沉淀, 重复2次, 即得多糖样品。多糖样品用时以生理盐水溶解, 之后用孔径为0.22μm的滤膜过滤除菌。

##### 1.4.2 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法<sup>[12]</sup>。精确称取多糖样品0.0100g, 置于100mL容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 吸取溶液样品1.0mL, 按上述步骤操作, 测吸光度值, 以标准曲线计算样品中多糖的百分含量。

##### 1.4.3 体内实验

动物分组及剂量选择: 随机分为实验组和对照组, 每组10只。实验组每日用人参茎叶多糖按800mg/kg的剂量于第1d~13d灌胃, 给药体积为0.2mL/只; 对照组将生理盐水按0.2mL/只的剂量于第1d~13d灌胃。

收稿日期: 2008-11-18

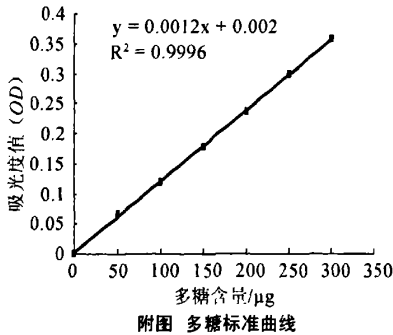
基金项目: 辽宁省科技攻关计划(2007211001); 辽宁省教育厅创新团队计划(2007T009)

作者简介: 赵萧萧(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术方面的研究工作; 王际辉\*, 教授, 通讯作者。

免疫器官指数的测定:最后一次给受试物后的第2d将所有供试小鼠称体重,摘除眼球采血,然后断椎处死,解剖取其胸腺和脾脏,分别称重,计算脾脏指数和胸腺指数。

胸腺指数 = 胸腺质量(mg) / 身体质量(g)

脾脏指数 = 脾脏质量(mg) / 身体质量(g)



Attached figure. Standard curve of polysaccharide

1.4.4 体外实验

(1) 小鼠脾细胞增殖实验

脾细胞悬液制备:用颈椎脱臼法处死小鼠并将其放入75%vol乙醇中浸泡消毒5min,在无菌条件下,剪开皮肤和腹壁,剥离脾脏,在200目滤网上用塑料注射器芯研碎脾脏获取单细胞悬液,1000r/min离心10min,再用0.83% NH<sub>4</sub>Cl破碎红细胞,1000r/min离心10min,用D-Hanks液洗3次,1000r/min离心10min,弃上清液,加入RPMI-1640培养液,用台盼蓝染色法检测细胞活性,保证细胞数>95%,并调节细胞浓度为5×10<sup>6</sup>个/mL。

淋巴细胞增殖反应:将细胞悬液加入96孔培养板中,每孔200μL,再在各孔中加入20μL不同浓度的多糖(稀释成500μg/mL、250μg/mL、100μg/mL的浓度),每个浓度做5个平行,对照组为RPMI-1640培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养48h。根据MTT比色法测定生存细胞活性。在培养结束前4h,向每孔中加入20μL的MTT,继续孵育4h,离心弃上清液,加入150μL DMSO溶解Formazan,用多孔酶标测定仪于波长490nm处测定吸光度值。

(2) 腹腔巨噬细胞吞噬实验:用颈椎脱臼法处死小鼠并将其放入75%vol乙醇中浸泡5min消毒,在无菌条件下,剪开腹部皮肤,保持腹膜完整,用无菌注射器向腹膜中注入10mL D-Hanks平衡缓冲液,轻柔腹部,收集腹腔液,离心,弃上清液,用含RPMI-1640培养基调细胞密度为1×10<sup>6</sup>个/mL,在96孔板内每孔加入200μL细胞悬液,再在各孔中加入20μL不同浓度的多糖(稀释成500μg/mL、250μg/mL、100μg/mL的浓度),每个浓度做5个平行,对照组为RPMI-1640培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养24h,在每孔中加入100μL滤过的1%中性红生理盐水溶液,继续培养0.5h后,离心去除非贴壁细胞,用PBS缓

冲液冲洗3次,每次1000r/min离心10min,在每孔中加入200μL细胞裂解液(乙酸:乙醇=1:1),漩涡振荡10min后用多孔酶标测定仪于波长450nm处测定吸光度值。

1.5 数据统计及处理

统计学处理:实验所得数据用x±s表示,采用Minitab统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 多糖含量

实验从人参茎叶中提取的多糖含量为81.67%。利用热水浸提醇沉法提取人参茎叶多糖,此方法不需特殊设备,成本低,操作简单<sup>[14,15]</sup>,利用苯酚-硫酸法测定多糖含量,该方法快速,灵敏<sup>[16]</sup>。

2.2 人参茎叶多糖对小鼠免疫器官的影响

胸腺和脾脏是机体主要的免疫器官,免疫器官指数可反映免疫器官的发育和免疫细胞的功能状态,间接反映了机体的免疫水平<sup>[17]</sup>。表1数据显示,每日经口给予小鼠人参茎叶多糖800mg/kg的剂量,13d后,小鼠脾脏和胸腺指数均高于生理盐水对照组,脾脏指数差异性极显著(p<0.01),但胸腺指数差异性不显著(p>0.05),说明人参茎叶多糖具有提高小鼠机体免疫机能的功效。

表1 人参茎叶多糖对小鼠免疫器官的影响

Table 1. Effect of polysaccharide from ginseng leaves and stems on the immune organs of mice

分组	胸腺指数/(mg·g <sup>-1</sup> )	脾脏指数/(mg·g <sup>-1</sup> )
对照组	2.94±0.37	4.42±0.62
实验组	3.24±0.58	6.73±0.36**

注:与对照组比较,\*\*表示差异显著(p<0.05);\*\*\*表示差异极显著(p<0.01)(以下同)。

2.3 人参茎叶多糖对小鼠体外实验的影响

2.3.1 脾淋巴细胞增殖实验

表2 人参茎叶多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

Table 2. Effect of polysaccharide from ginseng leaves and stems on lymphocyte proliferation

分组	剂量/(μg·kg <sup>-1</sup> )	脾淋巴细胞增殖能力(OD)
对照组		0.61±0.05
低剂量组	100	0.86±0.04**
中剂量组	250	0.92±0.01**
高剂量组	500	0.94±0.03**

MTT比色法可定量测定哺乳动物细胞线粒体酶活性,以此反映存活细胞的数量及其生命活性<sup>[18]</sup>。以1640培养液为对照组,用3组不同浓度的人参茎叶多糖作用于小鼠脾淋巴细胞,测定结果见表2。研究表明,淋巴细胞经人参茎叶多糖诱导激活后,细胞活性明显增强,能量代谢水平增强,添加人参茎叶多糖组明显高于空白对照组,并且随着浓度的增加OD值增大,表明淋巴细胞增殖能力逐渐增强,低、中、高剂量组升高与对照组相比均差异显著(p<0.01),表明人参茎叶多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖能力与剂量成

依赖关系。

### 2.3.2 腹腔巨噬细胞吞噬实验

巨噬细胞是动物体重要的免疫调节和效应细胞,在

表3 人参茎叶多糖对小鼠巨噬细胞吞噬能力的影响

Table 3. Effect of polysaccharide from ginseng leaves and stems on macrophage swallow ability

分组	剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	巨噬细胞吞噬中性红能力(OD值)
对照组		0.16±0.01
低剂量组	100	0.19±0.01*
中剂量组	250	0.22±0.02**
高剂量组	500	0.27±0.03**

机体众多的生理和病理反应过程中发挥着重要作用。巨噬细胞识别、吞噬和消除病原微生物及机体衰老的细胞,分泌特定的细胞因子参与机体的炎症反应,通过加工处理提呈抗原,启动特异性免疫应答,对肿瘤细胞的细胞毒作用、细胞因子分泌和抗原释放,有抵御病原体和癌细胞侵袭的作用<sup>[19-20]</sup>。

从表3可以看出,人参茎叶多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响情况。实验组与对照组相比较,都有明显的升高,并且随着多糖剂量的增加,巨噬细胞吞噬能力明显增强,以中、高剂量组与对照组相比差异极显著( $p < 0.01$ )。

### 3 结论

从实验可以看出,利用热水浸提法提取人参茎叶多糖,其含量为81.67%,在体内可以提高胸腺、脾脏指数,在体外可增强脾淋巴细胞增殖及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力,因此认为人参叶多糖具有提高小鼠免疫功能的活性,为今后对人参茎叶的开发提供依据。

### 参考文献:

- [1] 张彬,林瑞超,冯芳. 人参多糖的研究概况[J]. 中国药事, 2004, 18(9): 566-569.
- [2] 王筠默. 人参药理研究的进展[J]. 人参研究, 2001, 13(3): 2-10.
- [3] 崔桂英. 试从现代药理学角度阐述人参的补益功效[J]. 中国临床保健杂志, 2004, 7(4): 313-314.

- [4] 刘郁,刘连新. 人参功效再认识[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 289.
- [5] 陈群,刘家昌. 人参多糖、黄芪多糖、枸杞多糖的研究进展[J]. 淮南师范学院学报, 2001, 3(2): 39-41.
- [6] 赵俊. 人参多糖的化学与药理学研究进展[J]. 国外医学中医中药分析, 2004, 26(2): 79-81.
- [7] HOFESTH L J, WARGOVICH M J. Inflammation, cancer, and targets of ginseng [J]. *J Nutr*, 2007, 137: 183-185.
- [8] WANG B X, ZHOU Q L, YANG M, et al. Hypoglycemic activity of ginseng glycopeptides [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(1): 50-54.
- [9] SHIN K, KIYOHARA H, MATSUMOTO T, et al. Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer as a macrophage fc receptor expression-enhancing polysaccharide [J]. *Carbohydr Res*, 1997, 300: 239-249.
- [10] 申光淳. 人参叶中的药理活性 RG-II 样多糖 [J]. 国外医学中医中药分册, 1998, 20(3): 59.
- [11] GAO Q P, KIYOHARA H, CYONG J C, et al. Chemical properties and anti-complementary activities of heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* [J]. *Planta Medica*, 1991, 57(2): 132-136.
- [12] 高其品,姜瑞芝,张大军,等. 人参茎叶多糖的研究进展[J]. 吉林中医药, 1993(5): 43.
- [13] 涂宗财,李敏,刘光亮,等. 苯酚硫酸法测定油菜花粉多糖含量的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 219-221.
- [14] 刘韶,雷鹏,李新中,等. 莲心多糖的提取工艺研究[J]. 中药材, 2006, 29(10): 1102-1104.
- [15] 许燕燕. 植物多糖的提取方法和工艺[J]. 福建水产, 2006(3): 32-36.
- [16] 聂凌鸿,宁正祥. 广东准山多糖提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(12): 43-45.
- [17] 秦红兵,杨朝晖,刘红旗,等. 麋鹿角醇提液对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中成药, 2006, 28(12): 1812-1813.
- [18] 郭莉霞,侯育青. 细胞活性测定方法研究进展 [J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2006, 23(6): 564-567.
- [19] KLIMP A H, DE VRIES E G, SCHERPHOF G L, et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 44(2): 143-161.
- [20] PETER J H, GIESELER R, THIELE B, et al. Dendritic cells: From ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants [J]. *Immunol Today*, 1996, 17(6): 273-278.

## 我国将开展食品企业诚信体系建设试点

从国务院新闻办新闻发布会上获悉,工业和信息化部正在组织起草《食品工业企业诚信体系建设指导意见》,计划于2009年5月发布,并将组织开展企业试点工作。

刚通过的食品安全法中确立一系列制度,强化了食品生产经营者是保障食品安全第一责任人的原则,如食品生产经营许可制度、索票索证制度、不安全食品召回制度等。

工业和信息化部有关负责人表示,推进食品工业企业生产者诚信体系建设是落实食品安全法、系统有序有效解决食品安全问题的一项重要措施。通过建立食品工业企业诚信规则和开展试点工作,有利于提高从业人员的道德、法律意识,规范企业生产经营行为,建立起以遵纪守法为准绳、社会道德为基础、企业自律为重点、社会监督为约束、诚信效果可评价、诚信奖惩有制度的生产者诚信体系。