

大黄的生化研究 XXXI. 波叶大黄多糖 对免疫功能的促进作用

姚文兵 陈琼华

(生物化学研究室)

摘要 从波叶大黄中提取、分离得到波叶大黄多糖 (*Rheum hotaoense* polysaccharide, RHP), ig RHP 100 和 200 mg/kg 能明显增加小鼠脾脏和胸腺重量, 与对照组相比, 脾指数分别增加 30% 和 38%, 200 mg/kg 的剂量使胸腺指数增加 25%; 能促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能, 吞噬百分数分别比对照组增加 38% 和 61%, 200 mg/kg 的剂量可使吞噬指数增加 155%; 能促进小鼠碳粒廓清速率, K 值分别比对照组增加 48% 和 217%; 能促进 SRBC 致敏小鼠血清溶血素形成, HC₅₀ 分别比对照组增加 11% 和 57%; 能促进小鼠抗体形成细胞的生成, QHS 分别比对照组增加 63% 和 126%, RHP 还可明显促进受 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞 DNA 的合成, 最适浓度为 20 µg/ml, 刺激指数为 1.61; 对 ConA 活化的脾淋巴细胞蛋白质合成也有明显促进作用, 刺激指数为 1.56; 对 ConA 诱导的淋巴细胞 IL-2 产生有明显增强作用。

关键词 大黄; 多糖; 免疫功能促进剂; DNA 合成; 蛋白质生物合成; IL-2

波叶大黄 (*Rheum hotaoense*) 为非正品大黄, 由于其缺乏大黄酸二蒽酮甙, 无泻下作用, 故历来得不到充分利用, 我们以自行设计的方法从波叶大黄中提取、分离波叶大黄多糖 (简称 RHP)^[1], 并进行系列生物活性和药理作用研究, 本文首先报道 RHP 对免疫功能的促进作用。

实验材料

一、波叶大黄 购自青海省西宁市药材公司, 经本校生药教研室金蓉鸾教授鉴定为 *Rheum hotaoense*, 按自行设计的方法^[1]提取 RHP。

二、实验动物 昆明种小鼠 (本校动物房提供) 雌雄兼用, 体重 20 ± 2 g。

三、试剂 环磷酰胺 (Cy), 白色粉针结晶 (上海第十二制药厂生产); ³H-TdR 和 ³H-Leu (中国科学院原子能研究所); ConA (Sigma 产品); RPMI-1640 培养基 (美国 GIBC, Laboratirics 产品)。

方法与结果

一、RHP 对小鼠免疫器官重量的影响

小鼠随机分为三组, 给药组分别 ig RHP 100 和 200 mg/kg, 连续 7 d, 对照组给等量生理盐水, 末次给药后 24 h, 眼眶放血处死动物, 按文献^[2]方法称体重及胸腺、脾脏重量, 计算胸腺指数及脾指数, 结果见表 1。

Tab 1. Effect of ig RHP on spleen and thymus weight in mice. n = 10, $\bar{X} \pm SD$

Group	Dose, mg/kg × d	Weight, mg/10 g wt	
		Thymus	Spleen
Control	Saline	35.8 ± 2.5	37.1 ± 4.8
RHP	100 × 7	42.9 ± 2.7*	48.2 ± 1.7***
	200 × 7	44.7 ± 2.8**	51.2 ± 3.4***

*p > 0.05, **p < 0.05, ***p < 0.01 vs control

由表 1 可见, 100 和 200 mg/kg 两种剂量的 RHP 均能明显增加小鼠脾脏重量, 与对照组相比, 脾指数分别提高 30% 和 38%; 200 mg/kg 剂量可增加小鼠胸腺重量, 胸腺指数提高 25%, 而 100 mg/kg 剂量对胸腺的影响不明显。

1989年10月4日收稿

二、RHP 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

小鼠分组及给药途径同前, 连续给药 7 d, Cy 组于处死前 72 h 一次 sc Cy (50 mg/kg), 按文献^[3]的方法进行实验, 并求出吞噬指数和吞噬百分数, 结果见表 2。

Tab 2. Effect of ig RHP on the phagocytosis of macrophage in mice. $n = 10$

Group	Dose, mg/kg × d	Phagocytosis, $\bar{X} \pm SD$	
		%	Index
Control	Saline	64.2 ± 4.74	1.22 ± 0.66
RHP	100 × 7	88.6 ± 5.90**	1.75 ± 0.21*
	200 × 7	105.0 ± 7.5***	3.11 ± 0.31***
Cy	50 × 1	20.86 ± 3.50	0.44 ± 0.03

* $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control

结果表明给药组剂量 100 mg/kg 可使小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分数和指数增加 38% 和 14% ($p > 0.05$); 剂量 200 mg/kg 分别增加 61% 和 155%。

三、RHP 对小鼠静脉注射碳粒廓清作用的影响

小鼠分组及给药途径同上, 连续给药 7 d, 末次给药后 24 h, 每鼠尾静脉 iv 4% 中华碳素墨汁 0.1 ml/10 g, 注射后 2 和 15 min 分别由眼眶取血 20 μ l, 溶于 0.1% Na_2CO_3 2 ml 中, 静置 1 h, 650 nm 处测光密度, 计算廓清指数 K, 结果见表 3。剂量 100 和 200 mg/kg 的给药组的 K 值分别比空白对照组增加 48% 和 217%。

Tab 3. Effect of ig RHP on clearance rate after iv charcoal particles in mice. $n = 10$, $\bar{X} \pm SD$

Group	Dose, mg/kg × d	Clearance rate, K
Control	Saline	0.01678 ± 0.0031
RHP	100 × 7	0.02490 ± 0.011**
	200 × 7	0.05351 ± 0.028***

** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control

四、RHP 对 SRBC 致敏小鼠溶血素形成的影响

小鼠分组及给药途径同前, 连续给药 7 d, Cy 组于处死前 72 h sc 一次 Cy (50 mg/kg), 按文献^[4]方法测定半数溶血值 (HC_{50}), 结果见表 4。100 和 200 mg/kg 的剂

量组分别可使 HC_{50} 高于对照组 11% 和 57%, 而且 RHP 还能部分拮抗 Cy 对溶血素生成的抑制作用。

Tab 4. Effect of ig RHP on production of Hemolysin in mice. $\bar{X} \pm SD$

Group	Dose, mg/kg × d	Mice	HC_{50}
Control	Saline	10	12.64 ± 3.53
RHP	100 × 7	8	14.05 ± 6.01**
	200 × 7	9	19.83 ± 3.93***
Cy	50 × 1	8	6.01 ± 0.64
Cy+RHP	50 × 1+200 × 7	8	8.61 ± 0.73 $\Delta\Delta$

** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control. $\Delta\Delta p < 0.05$ vs Cy

五、RHP 对小鼠抗体形成细胞功能的影响

实验采用脾细胞介导红细胞溶血分光光度计测定法 (QHS)^[5], 小鼠分组及给药途径同前, 连续给药 7 d, 给药第二日每鼠 ip 5% SRBC 0.2 ml 免疫, 停药后 24 h, 处死动物取脾脏 (每两只小鼠为一样品), 在冷的 Gey's 液中捣碎, 调整细胞数至 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 每管加脾细胞悬液 1 ml, 0.2% SRBC 1 ml, 1:30 豚鼠血清 1 ml, 37℃ 孵育 1 h, 2000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 413 nm 处测定光密度, 结果见表 5。结果表明, RHP 100 和 200 mg/kg 剂量组均能明显促进小鼠抗体生成细胞的形成。与对照组相比, QHS 分别增加 63% 和 126%。

Tab 5. Effect of ig RHP on QHS response in mice. $n = 10$, $\bar{X} \pm SD$

Group	Dose, mg/kg × d	QHS (OD 413 nm)
Control	Saline	0.19 ± 0.03
RHP	100 × 7	0.31 ± 0.01**
	200 × 7	0.43 ± 0.04***

** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control

六、RHP 对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞 DNA 合成的影响

按常规方法制备脾细胞悬液^[6], 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将脾细胞稀释成 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 向稀释的脾细胞悬液中加入 ConA, 使其终浓度达 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 将含 ConA 的细胞悬液加入 16 孔培养板中, 药物组分别于每孔中加入含 RHP 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RPMI-1640 培养液 100 μl , 对照组每孔再加

100 μ l RPMI-1640 培养液, 每个药物浓度及对照组作平行孔 6 孔。将培养板放入 CO₂ 孵箱, 37℃ 培养 42 h, 分别取 0.2 ml 转移入 96 孔培养板中, 每孔加入 ³H-TdR 74 KBq, 继续培养 6 h, 收集细胞, 用 Beckman 液体闪烁仪测定样品放射性, 计算不同浓度 RHP 及对照组 ³H-TdR 掺入淋巴细胞的 CPM, 结果见表 6。RHP 5, 10, 20, 40 μ g/ml 的四个剂量均能显著增强 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞 DNA 合成, RHP 最适浓度为 20 μ g/ml, 刺激指数为 1.61。

Tab 6. Effect of RHP on DNA synthesis of lymphocytes by ConA stimulation. n = 6

Group	Conc., μ g/ml		³ H-TdR uptake, CPM, $\bar{X} \pm SD$	Stimulation Index
	ConA	RHP		
Control	5		33922 \pm 3224	
RHP	5	5	34783 \pm 2915**	1.01
	5	10	52080 \pm 3173***	1.54
	5	20	54770 \pm 1753***	1.61
	5	40	46177 \pm 4876***	1.39

p < 0.05, *p < 0.01 vs control

七、RHP 对小鼠脾淋巴细胞蛋白质合成的影响

按文献^[7]的方法, 将 1×10^7 /ml 淋巴细胞加 ConA 5 μ g/ml 和 RHP 20 μ g/ml, 培养 42 h, 取 0.2 ml 于 96 孔细胞培养板中, 加 ³H-Leu 74 KBq, 继续培养 6 h, 加 20% 三氯乙酸 40 μ l, 收集沉淀, 用 5% 三氯乙酸洗涤, 以液体闪烁仪测定 CPM 值, 结果见表 7。RHP (20 μ g/ml) 能明显促进受 ConA 活化的淋巴细胞蛋白质生物合成, 其刺激指数为 1.56。

Tab 7. Effect of RHP on the spleen lymphocytes protein synthesis

Group	Conc., μ g/ml		³ H-Leu uptake, CPM, $\bar{X} \pm SD$	Stimulation Index
	ConA	RHP		
Control	5		13235 \pm 1460	
RHP	5	20	20587 \pm 1850***	1.56

***p < 0.01 vs control

八、RHP 对小鼠脾淋巴细胞 IL-2 产生的影响

5×10^6 /ml 淋巴细胞加 ConA 5 μ g/ml 及 RHP 20 μ g/ml, 同时设置 ConA 对照

组, 培养 24 h, 离心, 收集上清液经超滤, 保存于 4℃ 供分析, 参照文献^[8]方法测 IL-2 活性, 结果见表 8。RHP (20 μ g/ml) 对 ConA 诱导的淋巴细胞的 IL-2 产生有明显增强作用。

Tab 8. Effect of RHP on IL-2 production

Group	Conc., μ g/ml		³ H-TdR uptake, CPM, $\bar{X} \pm SD$
	ConA	RHP	
Control	5		5510 \pm 175
RHP	5	20	9684 \pm 986***

***p < 0.01 vs control

讨 论

1. 实验结果表明 RHP 对非特异性免疫具有一定的作用; 能促进体液免疫中抗体形成环节; 对淋巴因子的产生具有一定的促进作用, 并有可能增强 IL-2 基因的表达。

2. RHP 对体液免疫和细胞免疫的促进作用与大黄中游离蒽醌衍生物对免疫功能的抑制作用^[9]截然不同, 可能大黄中存在着影响免疫功能的其它物质。

参 考 文 献

- 姚文兵, 陈琼华. 波叶大黄多糖的提取、分离、纯化和理化分析. 生物化学与生物物理学报 (待发表)
- 刘士忠, 黄杏林, 张开莲. 升白冲剂的升白作用及其对免疫功能的影响. 中国药科大学学报 1989; 20(1): 28-30
- 张明, 林培英, 潘竞雄. 蒿甲醚对小鼠免疫功能的影响. 中国药理学通报 1989; 5(1): 37-9
- 徐学英, 李元, 许津. 一个改进的体液免疫测定方法——溶血素测定法. 药学报 1979; 14(7): 443-5
- Simpson MM, Gozzo JJ. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis *in vitro*. J Immunol Method 1978; 21: 159-65
- 吴梧桐, Cheung HT, Richardson A. 老化过程中 IL-2 基因表达的改变. 生物化学与生物物理学报 1988; 20(1): 21-8
- Wu Wutong, Pahlavani M, Chung HT. The effect of aging on the expression of interleukin 2 messenger ribonucleic acid. Cell Immunol 1986; 100: 224-31
- 吴梧桐, 高向东. 当归及其成分阿魏酸对小鼠脾淋巴细胞的作用. 中国药科大学学报 1989; 20(4): 219-21
- 路铭, 陈琼华. 大黄的生化学研究 XXX. 蒽醌衍生物对免疫功能的抑制作用. 中国药科大学学报 1989; 20(4): 223-6

Biochemical Study of Chinese Rhubarb XXXI. Effect of Polysaccharide From *Rheum hotaoense* on Immune System

Yao Wenbing, Chen Qionghua

Division of Biochemistry

The polysaccharide from Chinese *Rheum hotaoense* (RHP) was isolated and its effects on immune system were studied. The results showed, at the doses of 100 and 200 mg/kg by ig administration for 7 days in mice, RHP increased the thymus and spleen weights; the phagocytosis of macrophage, the clearance rate of carbon particles, the production of hemolysins, and the response of lymphoid cells immune to sheep red cells (QHS). RHP also showed a remarkable effect on DNA, protein synthesis and IL-2 production of mice spleen lymphocytes with ConA stimulation. The optimal concentration of RHP for increasing DNA synthesis was 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The stimulation index was 1.61 for DNA synthesis and 1.56 for protein synthesis. It is suggested that RHP has the effect on immune functions and the effect is quite opposed to those of anthraquinone derivatives of Rheum. Therefore, we suggest that there are some components with the different effects in the Rheum on the immune system.

Key words *Rheum hotaoense*; Polysaccharide; Immunopromoter; DNA synthesis; Protein synthesis; Interleukin-2

【文摘 020】抗变态反应药曲尼司特稳定性试验

陈新, 陈钟华, 王丽华, 常福喜. 中国医药工业杂志 1989; 20(11): 517-8

作者对本校制药厂生产的曲尼司特进行了留样观察和光照试验。分别考查了外观、水分、熔点、紫外最大吸收、含量等。结果曲尼司特原料经留样观察 41 个月稳定性良好, 使用期限可定为 3 年, 与国外文献报道一致。光照试验表明遮光保存是必要的。

【文摘 021】GC/FTIR 联用分析麝香风湿油

吴桥, 邱宁婴, 葛召恒. 药学报 1990; 25(1): 44-8

用气相色谱/富里叶变换红外光谱联用对中成药麝香风湿油作了分析, 鉴定了 10 个主要组分, 并对其中水杨酸甲酯, 桂皮醛和丁香酚三组分用气相色谱内标法作了含量测定。平均回收率为 $100 \pm 1.0\%$, 变

异系数小于 2.0%。

【文摘 022】中药贝母的研究 X II. 商品贝母的调查及鉴定 李萍, 徐国钧, 徐珞珊, 金蓉鸾. 中草药 1990; 21(3): 26-9, 37

通过对贝母生产区原植物和商品药材调查采集, 在搞清各种贝母性状和显微特征的基础上, 对得自全国 23 个省、市(区)的商品贝母及外销品 90 件进行了基源鉴定, 计 22 种贝母属植物, 以暗紫贝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia, 甘肃贝母 *F. przewalskii* Mazim. ex Batal. 梭砂贝母 *F. delavayi* Franch., 浙贝母 *F. thunbergii* Miq., 伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk, 新疆贝母 *F. walujewii* Rgl., 托里贝母 *F. tortifolia* X. Z. Duan et X. J. Zheng, 平贝母 *F. ussuriensis* Maxim. 和湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia 等的鳞茎应用较广。