昆明学院学报　2012, 34(3):30~32　CN 53-1211/G4　ISSN 1674-5639
Journal of Kunming University

重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

杨黎江[1],沈　放[1],王德斌[2],路　斌[1],马银海[3*]
(1.昆明学院 生命科学与技术系,云南 昆明 650214;2.昆明学院 农学院,云南 昆明 650214;
3.昆明学院 化学科学与技术系,云南 昆明 650214)

摘要:将重楼皂苷类化合物 PHAC-A 和 PHAC-B 配制为高、低质量浓度组,以灌胃方式连续给药 7 d,测定小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数.结果显示,PHAC-A,PHAC-B 高、低质量浓度组对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数的影响均高于对照组和阳性对照组($P<0.05$);两组比较,PHAC-A 对巨噬细胞吞噬功能的促进作用明显高于 PHAC-B.结果表明,重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能具有明显促进作用,并以 PHAC-A 的作用最强.

关键词:重楼;偏诺皂苷;薯蓣皂苷;巨噬细胞;吞噬作用
中图分类号:R285　**文献标识码**:A　**文章编号**:1674-5639(2012)03-0030-03

The Effects of the Saponins in Rhizoma Paridis Yunnanensis on Phagocytic Function of Peritoneal Macrophages of Mice

YANG Li-jiang[1], SHEN Fang[1], WANG De-bin[2], LU Bin[1], MA Yin-hai[3]
(1. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;
2. College of Agriculture, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;
3. Chemical Science and Technology Department, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: Mice were administered intragastrically different dose of the Saponins in Rhizoma Paridis Yunnanensis, PHAC-A or PHAC-B, for 7 continuous days, then the devouring percentage and index of peritoneal macrophage cells were determined. The results show that both the high and the low dose of PHAC-A or PHAC-B develop the devouring percentage and index of peritoneal macrophage cells, which is significantly higher than that of the negative group and the positive group($P<0.05$). Compared to PHAC-B, PHAC-A has better effect on the macrophage phagocytosis. The results suggest that the Saponins in Rhizoma Paridis Yunnanensis, especially PHAC-A, can obviously develop phagocytic function of peritoneal macrophages.

Key words: Paris Rhizome (*Paris polyphylla Smith varyunnanensis* (French.) Hand.-Mazz); pennogenyl saponins; dioscins; macrophage; phagocytosis

重楼属植物全世界共有 24 种,我国拥有 19 种,在我国西南各省区种类和资源极为丰富,是一类极具药用价值的植物[1].重楼皂苷类化合物是重楼中的主要有效成分,有文献报道[2]其中多数具有止血、抗肿瘤、免疫调节等多种独特的药理活性.目前对重楼的药理研究和临床应用基本集中于粗提物和复方制剂,而对其皂苷类成分的研究和开发未见报道.为进一步研究重楼皂苷成分的免疫调节活性,拟分离纯化获得重楼的两种主要皂苷类成分偏诺皂苷(PHAC-A)和薯蓣皂苷(PHAC-B),探索其对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用,为重楼的合理开发和深入应用提供科学依据.

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

高速离心机(Backman, Microfuge 22R);精密水浴锅(土耳其, nüve);生物显微镜(Olympus);标准型净化工作台(SZX-ZP);恒温培养箱(德国 BIND);微量分析天平(瑞士梅特勒 XS205DU);混匀器;手动计数器;显微成像系统等.

试剂选用国产分析纯;黄芪注射液(国药准字:Z13020999)为阳性对照.

1.2　动物

体质量为 18~22 g 成年昆明小鼠,雌雄不拘,随机分组.购于昆明医学院实验动物中心(许可证号:2005017).

1.3　方法

1.3.1　样品

重楼皂苷类化合物 PHAC-A 和 PHAC-B 由昆明学院天然产物研究所马银海教授分离制备.经鉴定,

收稿日期:2012-05-04
基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(09C0132)
作者简介:杨黎江(1969—),女,云南昆明人,副教授,硕士,主要从事生理学和药理学研究.
通讯作者:马银海(1964—),男,云南昆明人,教授,主要从事天然产物研究. E-mail:myh5929251@163.com

PHAC-A 和 PHAC-B 样品中主要成分含量(质量分数)>98%.

1.3.2　动物分组

分组前,为小鼠提供(20±2)℃室温环境,让其自由饮水、进食,适应环境数日.将小鼠随机分为对照组、阳性对照组和实验组(分别将 PHAC-A,PHAC-B 稀释为质量浓度为 0.1 mg/mL 和 0.02 mg/mL 的高、低两组,即 PHAC-A 高、低质量浓度组和 PHAC-B 高、低质量浓度组),每组 10 只.阳性对照组和实验组每天灌胃样品 0.5 mL,对照组每天灌胃同等体积的生理盐水,每天定时灌胃,连续灌胃 7 d.

1.3.3　鸡红细胞(CRBC)悬液的制备[3]

自健康雄鸡鸡翼静脉抽血加入 5 倍于鸡血量的 Alsever 保存液中(4 ℃冰箱保存 2 周).使用时,在超净工作台上将鸡血缓慢倒入无菌离心管中,加入无菌生理盐水摇匀,离心洗涤,2 000 r/min,5 min,反复 3 次.洗涤后,配成质量分数为 5% 鸡红细胞生理盐水悬液,4 ℃冰箱保存备用.

1.3.4　CRBC 细胞完整性检查

CRBC 注射前应制血涂片进行细胞完整性检查.将 CRBC 生理盐水悬液制血涂片,晾干后滴加 Wright 染液,染色 15 min,蒸馏水冲洗,晾干后镜检,观察 CRBC 细胞是否完整.

1.3.5　重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的测定[4-5]

灌胃第 7 d 每只小鼠腹腔注射 3 mL 质量分数为 5% 淀粉液,24 h 后腹腔注射 1 mL 质量分数为 2% CRBC 液,40 min 后断颈处死小鼠,腹腔注射 1.5 mL Hank's 液,轻揉小鼠腹部,使 Hank's 液充分涮洗腹腔内巨噬细胞.剖开腹部吸取腹腔液滴片(每只小鼠滴 3 张平行片),37 ℃恒温培养 30 min,生理盐水冲洗滴片,冷风吹干,甲醇固定 5 min 后用 Giemsa-Wright 染液染色,镜检,计算巨噬细胞吞噬指数(PI)和吞噬百分率.计算公式如下:

巨噬细胞吞噬指数(PI) = 被吞噬的 CRBC 总数/100 个巨噬细胞;

巨噬细胞吞噬率 = (吞有 CRBC 的巨噬细胞数/100 个巨噬细胞)×100%.

1.3.6　数据处理

所有数据经 SPSS 13.0 软件处理,各组对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能影响的比较采用单因素方差分析,q 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

2　实验结果

2.1　小鼠腹腔巨噬细胞

将小鼠腹腔巨噬细胞吞噬情况进行显微拍照(见图 1~图 3),巨噬细胞吞噬情况如下.

在显微照下,可清楚分辨出 CRBC 细胞、巨噬细胞(Mφ)和巨噬细胞的吞噬情况,并进行计数.

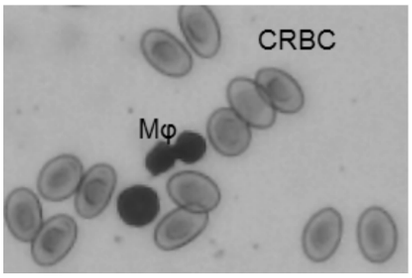


图 1　小鼠腹腔巨噬细胞(Mφ)和鸡血红细胞(CRBC)

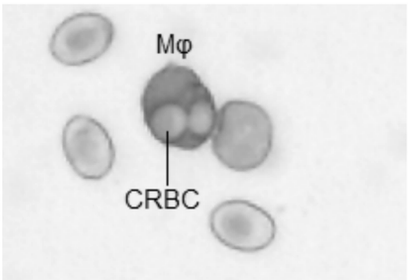


图 2　吞噬有 CRBC 的巨噬细胞

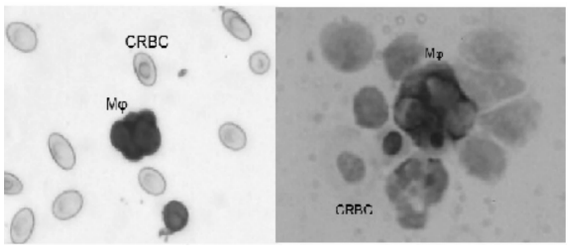
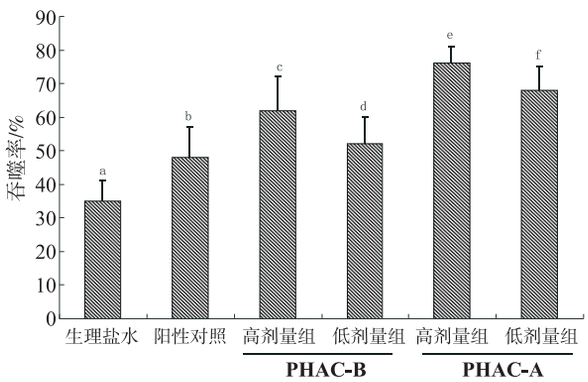


图 3　吞噬多个 CRBC 的巨噬细胞

2.2　重楼皂苷类化合物对小鼠巨噬细胞吞噬百分率的影响

分别将 PHAC-A,PHAC-B 稀释为 0.1 mg/mL 和 0.02 mg/mL 高、低两种质量浓度,以生理盐水作为空白对照,黄芪注射液(质量浓度为 0.1 mg/mL)作为阳性对照,分组测定其对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬百分率的影响,其结果见图 4.



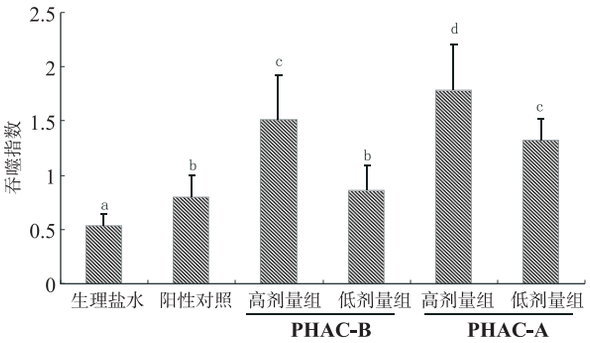
柱上不同字母示各比较组间差异有统计学意义,$P<0.05$

图4 重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率的影响

结果表明,阳性对照组和 PHAC-A,PHAC-B 组均能够明显增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性,且 PHAC-A,PHAC-B 不论在低质量浓度还是在高质量浓度时与阳性对照比较,对巨噬细胞吞噬活性的促进作用差异都有统计学意义. 与其它组比较,PHAC-A 组对小鼠巨噬细胞吞噬活性的促进作用最强,其中低质量浓度组的促进作用也明显高于对照组、阳性对照组和 PHAC-B 组.

2.3 重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数的影响

分别将 PHAC-A,PHAC-B 稀释为 0.1 mg/mL 和 0.02 mg/mL 高、低两种质量浓度,以生理盐水作为空白对照,黄芪注射液(质量浓度为 0.1 mg/mL)作为阳性对照,分组测定其对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数的影响,其结果见图 5.



柱上不同字母示各比较组间差异有统计学意义, $P<0.05$

图5 重楼皂苷类化合物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数的影响

结果表明,阳性对照组和 PHAC-A,PHAC-B 组与对照组比较均能够明显增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能, PHAC-B 在 0.02 mg/mL 质量浓度时对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的增强作用与阳性对照组(质量浓度为 0.1 mg/mL)相比差异无统计学意义,而 PHAC-A 在同样质量浓度时表现出显著的促进作用,且显著高于 PHAC-B 低质量浓度组和阳性对照组,促进作用接近 PHAC-B 高质量浓度组(差异无统计学意义). 与其它两组比较,PHAC-A 组对小鼠巨噬细胞吞噬功能的促进作用最强,低质量浓度组的促进作用明显高于对照组、阳性对照和 PHAC-B 的低质量浓度组.

3 讨论

巨噬细胞是机体免疫功能的关键细胞,在免疫应答过程中起辅佐作用,当病原微生物或其它抗原进入机体后,它承担着摄取、加工和提呈抗原的重要作用. 巨噬细胞能产生多种免疫分子,如 IL-1,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12 等白细胞介素,生成干扰素 INF-α,β,可对免疫应答进行正、负调节效应,因此巨噬细胞的功能在一定程度上反映了机体免疫能力的强弱. 巨噬细胞作为体内执行吞噬异物的重要细胞之一,当异体抗原性物质 CRBC 进入小鼠体内后,注射至小鼠腹腔的淀粉可诱导小鼠周身巨噬细胞迁移至腹腔导致巨噬细胞聚集并吞噬. 所以小鼠腹腔巨噬细胞数量的变化和吞噬能力的改变可作为衡量机体非特异性免疫功能的重要指标,用于评价药物对机体防御功能的影响[6].

已有的研究表明,重楼总皂苷具有抗肿瘤、止血和调节免疫等药理作用. PHAC-A,PHAC-B 是从传统中药重楼中分离纯化的皂苷类成分,据文献报道重楼中的活性成分偏诺皂苷元和薯蓣皂苷元能促进小鼠粒/巨噬细胞克隆形成细胞(GM-CFC)增殖,同时是作用较强的免疫调节剂[2]. 本文研究结果显示,重楼皂苷中的 PHAC-A,PHAC-B 明显具有增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性和提高吞噬指数的作用,与阳性对照组黄芪注射液比较,重楼皂苷类化合物对巨噬细胞吞噬活性的促进作用明显高于黄芪注射液,并以 PHAC-A 的促进作用最强. 由此提示,重楼总皂苷中对机体免疫功能具明显增强作用的皂苷类化合物为 PHAC-A,它能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,呈现出具有显著提高吞噬百分率和吞噬指数的作用. 巨噬细胞对药物作出的反应,可能与细胞表面的分子受到刺激有关. 分布于巨噬细胞表面的受体分子影响其代谢及功能的变化,主要表现在细胞的趋化、识别、吞噬、增殖、生长及免疫反应等方面. 本研究所涉及到的重楼皂苷类化合物可能正是通过对巨噬细胞表面分子的作用,增强其吞噬异物的能力,因而在试验中观察到小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的显著改善,即 PHAC-A,PHAC-B 具有明显提高小鼠免疫功能的作用.

对重楼皂苷类化合物的研究,不但可避免粗提物或复方制剂中其它成分对其活性的影响降低药效,亦可消除这些成分在人体产生的副作用,同时还可因其成分和功效明确,为研制和开发新型药物顺利进入市场提供科学依据.

[参考文献]

[1]汤海峰,赵越平,蒋永培,等. 重楼属植物的研究概况[J]. 中草药,1998,29(12):839-842.

[2]武珊珊,高文远,段宏泉,等. 重楼化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2004,35(3):344-347.

[3]徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.

[4]宁康健,阮祥春,吕锦芳,等. 黄芪对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):1670-1672.

[5]王瑾,屈雪菊,蒋正明,等. 小鼠腹腔巨噬细胞诱导方法的比较[J]. 湖北预防医学杂志,1999,10(3):47.

[6]唐孝礼,颜光美,许实波,等. 海蛾提取物对小鼠免疫器官重量和抗应激能力的影响[J]. 中药材,1999,22(6):300-302.