



## 大枣中性多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

大枣具有补中益气、养血安神、镇静收敛、滋补强壮等药效，郎杏彩等[1]从酸枣仁(与大枣同属不同种)及果肉中提取粗多糖，发现其具有增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的药理作用。我们已证实大枣粗多糖具有抗补体活性和促进小鼠脾细胞增殖作用[2]。本研究旨在探讨大枣中性多糖(Neutral jujube date polysaccharide, JDP-N)对小鼠脾细胞增殖作用的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 药品与试剂

大枣中性多糖为易溶于水的白色粉末，相对分子质量为23 000，由华南理工大学林勤保博士提供[3]。RPMI-1640培养基购自Gibco公司。Thiazolyl Blue(MTT)购自Sigma公司，用磷酸盐缓冲液(PBS)配成0.5%的溶液。IL-2为R&D公司产品。荧光探针Fluo-3/AM为Probes Ins产品。

#### 1.2 实验动物

BALB/c、C57BL/6j纯系小鼠，雌雄不限，8周龄，由第一军医大学实验动物中心提供。

#### 1.3 脾淋巴细胞培养

分别无菌取出BALB/c和C57BL/6j小鼠脾脏，置于含2%小牛血清的Hanks液平皿中，用玻片挤出脾细胞，经400目尼龙滤网过滤，Hanks液洗两次，锥虫篮染色计数，活率大于90%。混合淋巴细胞培养时，用RPMI-1640调BALB/c和C57BL/6j小鼠脾细胞数为 $8 \times 10^6$ /ml细胞悬液，1:1混合。自身淋巴细胞培养时，调BALB/c小鼠脾淋巴细胞数为 $5 \times 10^6$ /ml细胞悬液，用96孔板培养，每孔加上述细胞悬液100  $\mu$ l，另加待测药物或其他试剂，至总体积为200  $\mu$ l，连续培养3 d。进行刀豆素A(Concanavalin-A, ConA)(终浓度为3  $\mu$ g/ml)刺激实验时，仅用BALB/c小鼠脾细胞(终浓度为 $3 \times 10^6$ 个/ml)，连续培养3 d。进行IL-2(终浓度为2 ng/ml)促增殖实验时，脾细胞先经ConA活化3 d，收集活化细胞(终浓度为 $1 \times 10^6$ /ml)进行实验，培养1 d。终止实验前4 h加入MTT，然后测定细胞增殖。

#### 1.4 MTT法测定细胞增殖

按参考文献[4]进行，于终止培养前4 h加入0.5% MTT 20  $\mu$ l，37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养4 h后，1 500 r/min离心10 min，小心吸去上清，每孔加入100  $\mu$ l DMSO-乙醇(1:1)溶液，在微型振荡器上振荡5 min，用酶标仪于570 nm波长下测D570值。

#### 1.5 巨噬细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)测定[5][6][7]

1.5.1 染液配制 将 Fluo-3/AM溶于DMSO，配成1mmol/L储备液，分装冻存于-20~-80  $^{\circ}$ C条件下。染色前用Hepes或PBS缓冲液配成浓度为10  $\mu$ mol/L的染液。

1.5.2 荧光探针标记 吸弃Petri培养皿中的培养液，用Hepes或PBS缓冲液冲洗3次，滴加10  $\mu$ mol/L Fluo-3/AM 200  $\mu$ l，37  $^{\circ}$ C孵育40 min。吸弃染液，用Hepes或PBS缓冲液冲洗3次，再加入0.5 ml Hepes或PBS缓冲液待测。

1.5.3 ACAS570检测 $[Ca^{2+}]_i$  使用美国ACAS570型激光扫描共聚焦显微镜测定。测定时将改良Petri培养皿置于倒置显微镜下，受488 nm激光束激发，确定测定的细胞后，进入扫描程序调节，并确定扫描参数后开始动态扫描。首先测定静息状态下细胞水平，之后立即加入测试药物，监测动态变化。资料可储存于附属系统，并能自动计算、分析及打印结果。

### 1.6 统计学处理

采用t检验。

## 2 结果

### 2.1 JDP-N对混合淋巴细胞培养反应的影响

JDP-N与混合淋巴细胞共同培养3 d后，可促进淋巴细胞增殖，其刺激作用的方式呈先上升后下降趋势。在多糖浓度为10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时便有明显促进淋巴细胞增殖作用，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时达最高水平(图1)。

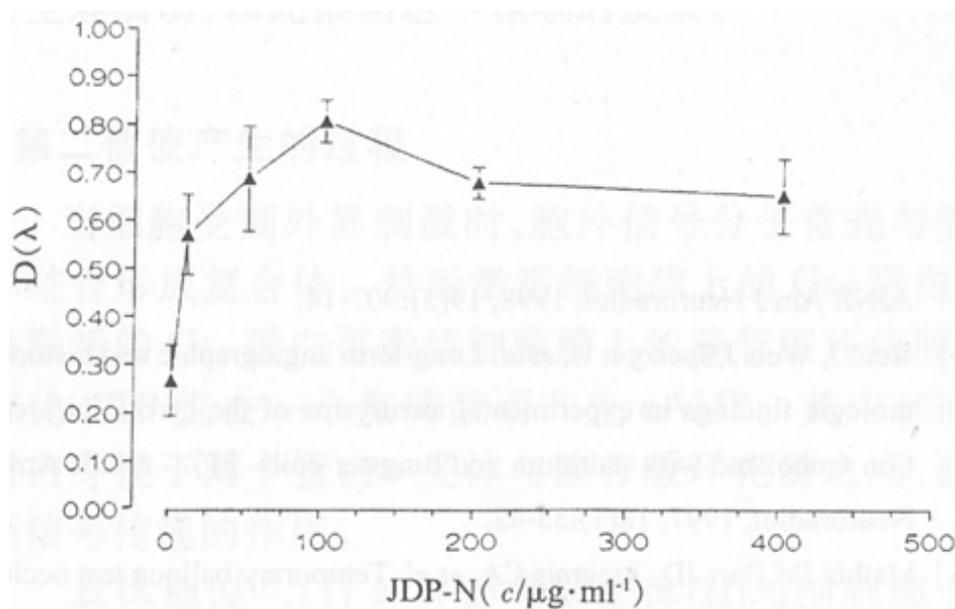


图1 JDP-N对混合淋巴细胞培养反应的影响  
Fig.1 Effect of JDP-N on mixed lymphocyte culture reaction

### 2.2 JDP-N对小鼠脾细胞自发增殖反应的影响

T细胞与自身非T细胞如B细胞、巨噬细胞共同培养时，T细胞受自身抗原刺激后，可发生增殖反应，称为自身混合淋巴细胞反应。由表1可看出，JDP-N能够促进脾细胞的自发增殖能力，但比ConA弱，其中100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时JDP-N刺激增殖作用最强。

表 1 JDP-N 对小鼠脾细胞自发增殖反应的影响 ( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

Tab.1 Effect of JDP-N on the proliferation of mouse splenocytes ( $n=6, Mean\pm SD$ )

Group	JDP-N concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$D_{570}$
Control	-	$0.234\pm 0.007$
ConA	2	$0.404\pm 0.008^{**}$
JDP-N	25	$0.277\pm 0.006^*$
JDP-N	50	$0.288\pm 0.012^*$
JDP-N	100	$0.320\pm 0.016^{**}$
JDP-N	200	$0.303\pm 0.013^{**}$

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control

### 2.3 JDP-N对IL-2诱导的脾细胞增殖反应的影响

2.3.1 IL-2最适浓度的确定 由图2可看出, 0.625 ng/ml 时IL-2对ConA活化的脾细胞即有明显的增殖作用, 此作用迅速增强, 到2.5 ng/ml时达峰值, 然后缓慢减弱。因此, 2.5 ng/ml是IL-2诱导脾细胞增殖的最适浓度。

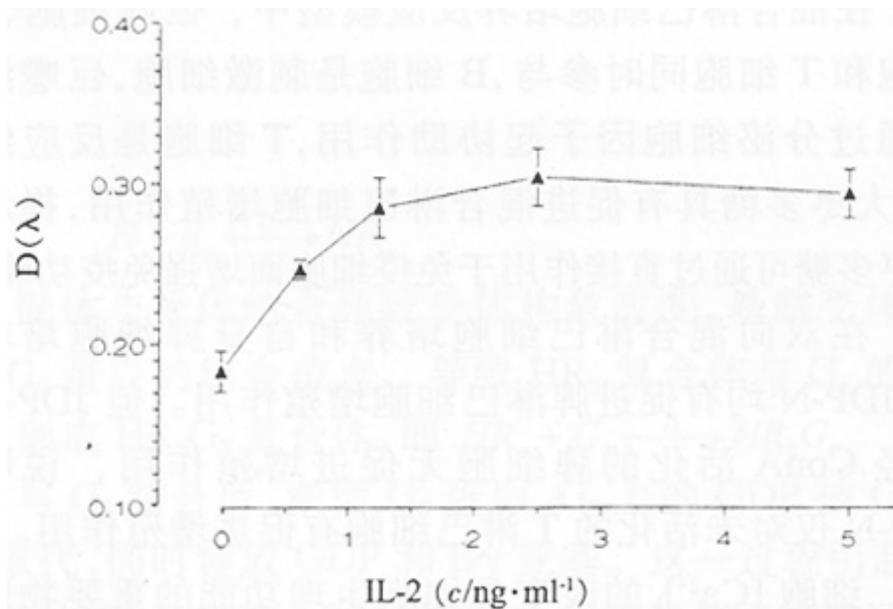


图2 IL-2对ConA活化的脾细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of IL-2 on the proliferation of ConA-activated splenocytes in vitro

2.3.2 JDP-N对ConA活化、IL-2诱导的脾细胞增殖的影响 由表2可看出, JDP-N对ConA活化、IL-2诱导的脾细胞无促进增殖作用。

表 2 JDP-N 对 ConA 活化、IL-2 诱导的脾细胞增殖的影响

(n=6,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Effect of JDP-N on the proliferation of ConA-activated splenocytes in the presence of IL-2 (n=6, Mean±SD)

Group	JDP-N concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	D <sub>570</sub>
Control	-	0.307±0.007
JDP-N	25	0.297±0.006
JDP-N	50	0.295±0.012
JDP-N	100	0.305±0.016
JDP-N	200	0.303±0.013

#### 2.4 JDP-N对ConA活化脾细胞细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

荧光探针Fluo-3/AM进入细胞后, AM被胞浆内脂酶水解, Fluo-3与胞浆游离 $\text{Ca}^{2+}$ 结合发光, 反映出 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度[7]。实验结果显示, JDP-N刺激后, Fluo-3荧光值无明显变化。因此, JDP-N对ConA活化脾细胞细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无影响。

### 3 讨论

多糖是由单糖组成的天然高分子化合物。20世纪60年代后, 多糖作为广谱免疫促进剂引起人们极大兴趣。赵武述等[8]对21种中药多糖进行了体外淋巴细胞增殖反应研究, 发现多糖对淋巴细胞有一定促增殖作用。本实验证明大枣多糖同样具有促进淋巴细胞增殖作用, 并且浓度-效应关系呈先上升后下降趋势。由此可见, 大枣多糖对淋巴细胞的促增殖作用存在最适剂量, 超过最适剂量可能导致毒性作用, 从而使淋巴细胞增殖能力下降。虽然多糖整体给药时很少出现毒性反应, 但本实验提示, 如果剂量过大同样会导致不良后果。因此, 在临床应用时, 应注意不能过量使用。

在混合淋巴细胞培养反应模型中, 巨噬细胞、B细胞和T细胞同时参与, B细胞是刺激细胞, 巨噬细胞通过分泌细胞因子起协助作用, T细胞是反应细胞, 大枣多糖具有促进混合淋巴细胞增殖作用, 提示大枣多糖可通过直接作用于免疫细胞而增强免疫功能。

在双向混合淋巴细胞培养和自身脾细胞培养中, JDP-N均有促进脾淋巴细胞增殖作用。但JDP-N对经ConA活化的脾细胞无促进增殖作用, 说明JDP-N仅对未活化的T淋巴细胞有促进增殖作用。

细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的改变是细胞生理功能的重要物质基础,  $\text{Ca}^{2+}$ 作为肌醇磷脂代谢途径中重要的第二信使在细胞内信息传递、诱发一系列细胞形态和功能事件中起重要作用。JDP-N对经ConA活化的脾细胞细胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无影响, 进一步证明JDP-N对经ConA活化的脾细胞无促增殖作用。

T细胞活化增殖首先需要巨噬细胞分泌的IL-1, 我们既往实验已证明JDP-N能诱导巨噬细胞分泌IL-1[9]。由此可见, JDP-N可通过活化巨噬细胞使其分泌IL-1而间接促进未活化T淋巴细胞增殖, JDP-N能否直接作用于T淋巴细胞还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 郎杏彩, 李明湘, 贾秉义. 酸枣仁、肉多糖增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6):366-8.

[2] 张庆, 雷林生, 林勤保, 等. 大枣粗多糖体外抗补体活性及促小鼠脾淋巴细胞增殖作用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5):19-21.

[3] 林勤保. 大枣多糖的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1998.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to

proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55-61.

[5] 张 薇, 朴英杰, 鲍永耀, 等. 粘附式细胞仪测定巨噬细胞内游离钙的方法[J]. 第一军医大学学报, 1994, 14(1):43-5.

[6] Rijkers GT, Justement LB, Griffioen AW, et al. Improved method for measuring intracellular  $Ca^{2+}$  with Fluo-3[J]. Cytometry, 1990, 11(8):923-37.

[7] 黄行许, 鲍永耀, 黄 辉, 等. 共聚焦同时检测细胞内 $Ca^{2+}$ 、pH的变化[J]. 中华物理医学杂志, 1998, 20(1):35-7.

[8] 赵武述, 张玉琴, 李 洁, 等. 植物多糖提取物致有丝分裂反应的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(6):381-3.

[9] 张 庆, 雷林生, 孙莉莎, 等. 大枣多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3):21-3.

#### 参考文献:

[1] 郎杏彩, 李明湘, 贾秉义. 酸枣仁、肉多糖增强小鼠免疫功能和抗放射损伤的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(6):366-8.

[2] 张 庆, 雷林生, 林勤保, 等. 大枣粗多糖体外抗补体活性及促小鼠脾淋巴细胞增殖作用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5):19-21.

[3] 林勤保. 大枣多糖的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1998.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55-61.

[5] 张 薇, 朴英杰, 鲍永耀, 等. 粘附式细胞仪测定巨噬细胞内游离钙的方法[J]. 第一军医大学学报, 1994, 14(1):43-5.

[6] Rijkers GT, Justement LB, Griffioen AW, et al. Improved method for measuring intracellular  $Ca^{2+}$  with Fluo-3[J]. Cytometry, 1990, 11(8):923-37.

[7] 黄行许, 鲍永耀, 黄 辉, 等. 共聚焦同时检测细胞内 $Ca^{2+}$ 、pH的变化[J]. 中华物理医学杂志, 1998, 20(1):35-7.

[8] 赵武述, 张玉琴, 李 洁, 等. 植物多糖提取物致有丝分裂反应的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(6):381-3.

[9] 张 庆, 雷林生, 孙莉莎, 等. 大枣多糖体外对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3):21-3.