

马蹄香含药血清对小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨嗜细胞的影响

马丽娟^{1,2,3}, 李鹏^{1,3}, 宋宇¹, 孙远², 王珊¹, 刘冰², 付玉², 蒋春茂⁴, 李勇军⁴, 王承宇^{2*}

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林长春 130062; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 3. 吉林农业科技学院, 吉林吉林 132101; 4. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的] 研究马蹄香(*Valeriana jatamansi* Jones)含药血清对小鼠脾淋巴细胞及腹腔巨嗜细胞的影响。[方法] 通过 MTT 法检测含药血清对正常小鼠脾淋巴细胞转化的影响, 结合中性红吞噬实验检测含药血清对小鼠腹腔巨嗜细胞能量代谢水平及吞噬能力的影响。[结果] 在一定剂量范围内, 马蹄香含药血清组的脾淋巴细胞和腹腔巨嗜细胞无论单独作用或协同非特异性丝裂原(Con A 或 LPS)作用与对照组均有显著性差异。[结论] 马蹄香含药血清能够增强小鼠脾淋巴细胞转化能力, 提高腹腔巨嗜细胞能量代谢水平和吞噬能力, 具有一定的免疫增强作用。

关键词 马蹄香; 脾淋巴细胞; 腹腔巨嗜细胞; MTT

中图分类号 S567.23⁹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)29-16230-02

Effects of Drug Serum of *Valeriana jatamansi* on the Splenic Lymphocytes and Peritoneal Macrophages in Mice

MA Li-juan et al (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130012)

Abstract [Objective] The aim was to investigate the effects of drug serum of *Valeriana jatamansi* on the lymphocytes and peritoneal macrophages in mice. [Methods] The influence of drug serum on splenic lymphocytes transformation in mice was detected by MTT, which was adopted together with Neutral Red Phagocytosis to study the influence of drug serum on the metabolic level and phagocytosis of peritoneal macrophages in mice. [Result] Within certain dose range, the single action or synergetic non-specific mitogen (Con A or LPS) effects of splenic lymphocytes and peritoneal macrophages in the drug serum group was significantly different from that of the control group. [Conclusion] The drug serum of *Valeriana jatamansi* could strengthen the transformation of splenic lymphocytes, improve the metabolic level and phagocytosis of peritoneal macrophages in mice, and enhance the immunity ability.

Key words *Valeriana jatamansi*; Splenic lymphocytes; Peritoneal macrophages; MTT

马蹄香(*Valeriana jatamansi* Jones)又名蜘蛛香、土细辛、老虎七和印度缬草等,系败酱科缬草属多年生草本植物。马蹄香生于土壤潮湿且富含有机质的地方,常见于海拔 1 800~2 800 m 的疏林或灌木林下或溪沟、田埂边。云南全省及四川、贵州、湖北、河南、陕西等省均有分布^[1]。马蹄香根有香气,常用于治疗消食健胃、理气止痛、祛风解毒、小儿疳积和腹泻等^[2]。近些年来,有关马蹄香生物活性的研究越来越多,但关于其对免疫调节的作用的研究较少。为此,笔者依据血清药理学理论,采用含药血清研究马蹄香的免疫药理作用,以期为其进一步深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。马蹄香原粉(100 目),由军事兽医研究所提供,用 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配制。

1.1.2 主要试剂。Con A、LPS、MTT 和 Hepes,均为 Sigma 产品;RPMI-1640 培养基,为 Gibco 产品;新生牛血清、DMSO 和中性红等,均为国产产品;PBS 和 tris-NH₄Cl 等,为吉林大学畜牧兽医学院实验室自制。

1.1.3 主要仪器。CO₂ 培养箱;酶标仪,由奥地利 TECAN-GENIOUS 公司生产;倒置显微镜;低速离心机;超净工作台;96 孔培养板,为美国 Costar 产品。

1.1.4 试验动物。健康 Wista 大鼠,雌性,体重(180±20)g;健康 Balb/c 小鼠,雄性,体重(20±2)g,由吉林大学基础医学

部实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备。取 10 只大鼠,实验室温度恒定 22℃,每天 12:00 定时灌胃给药,剂量为 5 g/kg,连续给药 3 d,末次给药 1 h 后取眼球采血。收集血液,37℃ 静置 1 h,3 000 r/min 离心,收集上层血清,微孔滤膜(0.22 μm)过滤,除菌后于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 MTT 法检测含药血清对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响^[3-7]。

1.2.2.1 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备。颈椎脱臼法处死 Balb/c 小鼠,用 75% 乙醇浸泡约 3 min 消毒;剪开皮肤暴露腹膜,剪开腹膜无菌取脾并置于无血清的 RPMI-1640 培养液中,冲洗 2 次,吸取约 5 ml 无血清 RPMI-1640 完全培养液,轻轻插入脾内吹出细胞,重复操作数次至脾外膜透明。收集全部细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 tris-NH₄Cl 约 3 ml,轻轻吹匀,去除红细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复操作 2 次;细胞沉淀用无血清 RPMI-1640 完全培养液重悬,轻轻吹匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;细胞沉淀用无血清 RPMI-1640 完全培养液重悬,调整细胞密度为 5×10⁹ 个/L,即配制成脾细胞悬液。

1.2.2.2 小鼠脾淋巴细胞给药。将制备的脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μl。然后每孔分别加入 100 μl 含不同浓度含药血清的 RPMI-1640 完全培养液,使含药血清终浓度分别为 20.00%、10.00%、5.00%、2.50%、1.25% (单独含药血清组),或每孔分别加入 100 μl 不同浓度含药血清(20.00%、10.00%、5.00%、2.50%、1.25%) 和 Con A (5 mg/L) 或 LPS (20 mg/L) 的混合液(组合组),同时设阳性对照组(5 mg/L Con A 或 20 mg/L LPS 和细胞)、阴性对照组(RPMI-1640 完全培养液和细胞)和空白对照组(RPMI-1640

基金项目 国家科技支撑项目(2008BADB4B03)。

作者简介 马丽娟(1962-),女,吉林吉林人,在读博士,教授,硕士生导师,从事经济动物饲养及疾病方面的研究。* 通讯作者,博士,副教授,从事犬的饲养和疾病方面研究, E-mail: jdwangchengyu@163.com。

收稿日期 2010-06-28

完全培养液), 每组均设 3 复孔。

1.2.2.3 细胞的培养及测定。将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中连续培养 44 h; 取出培养板, 每孔加入 20 μl MTT 液, 继续培养 4 h; 于 1 800 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min 至形成的紫色结晶完全溶解; 用酶标仪于波长 570 nm 处测定吸光度 A 值, 以刺激指数 (SI) 值反映小鼠脾淋巴细胞增殖、转化率的高低。SI = 药物刺激孔 A / 阴性对照孔 A。

1.2.3 MTT 法检测药物对小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢水平的影响^[3-7]。

1.2.3.1 小鼠腹腔巨噬细胞的制备与纯化。Balb/c 小鼠脱颈处死, 用 75% 乙醇浸泡约 3 min 消毒; 撕开皮肤暴露腹膜, 吸取约 8 ml 无血清 RPMI-1640 完全培养液注入小鼠腹腔内, 充分冲洗腹腔, 注意防止扎破脏器, 重复操作 3 ~ 4 次; 收集细胞悬液, 于 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用无血清 RPMI-1640 完全培养液重悬, 计数并调整细胞密度为 5 × 10⁹ 个/L; 将细胞种入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μl, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h; 取出培养板, 弃去上清液, 用无血清 RPMI-1640 完全培养液洗板 1 次, 弃去上清液, 每孔再加入 100 μl 无血清 RPMI-1640 完全培养液, 培养板孔内贴壁细胞即为纯化后的小鼠腹腔巨噬细胞。

1.2.3.2 小鼠腹腔巨噬细胞给药。方法同“1.2.2.2”。

1.2.3.3 细胞的培养及测定。将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 20 h; 取出培养板, 每孔加入 20 μl MTT, 继续培养 4 h; 取出培养板于 1 800 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min 至形成的紫色结晶完全溶解; 用酶标仪于波长 570 nm 处测定吸光度 A 值, 以 A₅₇₀ 值表示腹腔巨噬细胞能量代谢水平的高低。

1.2.4 中性红吞噬试验检测含药血清对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。取按“1.2.3.2”给药方法培养 24 h 的腹腔巨噬细胞, 于 1 800 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 每孔加入 100 μl 中性红 1 g/L 生理盐水液, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 30 min; 于 1 800 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 每孔加入 200 μl PBS 洗板, 弃去上清液, 重复操作 2 次; 每孔加入 100 μl 细胞溶解液 (乙酸: 无水乙醇 = 1:1, V: V), 室温静置过夜待细胞溶解; 翌日用酶标仪于波长 540 nm 处测量吸光度 A 值, 以 A₅₄₀ 值表示小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的强弱。

2 结果与分析

2.1 含药血清对小鼠脾淋巴细胞转化率的影响 由表 1 可知, 单独含药血清组对小鼠脾淋巴细胞的增殖、转化率没有明显的促进作用, 但是协同 Con A 和 LPS 作用的组合组则可以显著或极显著提高小鼠脾淋巴细胞的增殖、转化率。其中, 与阳性对照组相比, 含药血清浓度在 1.25% ~ 20.00% 时, 协同 Con A, 对小鼠的淋巴细胞转化均有极显著的正向刺激作用; 与阳性对照组相比, 含药血清浓度为 5.00%、20.00% 时, 协同 LPS, 对小鼠淋巴细胞转化均有显著的正向刺激作用, 而含药血清浓度为 1.25%、2.50%、10.00% 时, 协同 LPS, 对小鼠淋巴细胞转化均有极显著的正向刺激作用。

2.2 含药血清对小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢水平的影响 由表 2 可知, 含药血清单独和协同 Con A 和 LPS 作用

时, 小鼠腹腔巨噬细胞代谢 MTT 的能力均显著或极显著高于对照组。但 Con A 和 LPS 与含药血清协同作用并不像淋巴细胞转化试验中那么明显, 并且单药组和组合组血清均能够显著提高小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢水平。

表 1 含药血清对小鼠脾淋巴细胞的影响

Table 1 Effect of drug serum on lymphocytes of mice

含药血清浓度 // % Concentration of drug serum	刺激指数 SI		
	含药血清组 Group of drug serum	Con A + 含药血清组 Group of Con A + drug serum	LPS + 含药血清组 Group of LPS + drug serum
20.00	1.056 ± 0.008	1.469 ± 0.012**	1.386 ± 0.005*
10.00	1.036 ± 0.009	1.467 ± 0.009**	1.490 ± 0.005**
5.00	1.025 ± 0.006	1.383 ± 0.005**	1.427 ± 0.006*
2.50	1.030 ± 0.006	1.366 ± 0.008**	1.462 ± 0.005**
1.25	1.043 ± 0.007	1.375 ± 0.006**	1.488 ± 0.005**

注: 单药组 (含药血清组) 同阴性对照组相比, 组合组 (Con A + 含药血清组和 LPS + 含药血清组) 与阳性对照组相比, * 表示在 0.05 水平上有差异 ($P < 0.05$), ** 表示在 0.01 水平上有差异 ($P < 0.01$)。下同。

Note: By comparing using alone (group of drug serum) with negative control group, the combination group (group of Con A + drug serum and group of LPS + drug serum) with positive control group, * indicates difference at 0.05 level ($P < 0.05$), ** indicates difference at 0.01 level ($P < 0.01$). The same below.

表 2 含药血清对小鼠腹腔巨噬细胞能量代谢水平的影响

Table 2 Effect of drug serum on the energy metabolism of peritoneal macrophages in mice

含药血清浓度 // % Concentration of drug serum	刺激指数 SI		
	含药血清组 Group of drug serum	Con A + 含药血清组 Group of Con A + drug serum	LPS + 含药血清组 Group of LPS + drug serum
20.00	0.170 ± 0.005*	0.199 ± 0.005*	0.256 ± 0.004*
10.00	0.175 ± 0.007*	0.202 ± 0.005*	0.250 ± 0.002*
5.00	0.186 ± 0.004**	0.222 ± 0.010*	0.273 ± 0.006**
2.50	0.185 ± 0.006*	0.213 ± 0.004**	0.255 ± 0.005*
1.25	0.178 ± 0.006*	0.209 ± 0.003*	1.488 ± 0.005**

2.3 含药血清对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 由表 3 可知, 含药血清单独及协同 Con A 和 LPS 作用时, 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的促进作用均明显高于对照组。其中, 与阴性对照组相比, 含药血清组的促进作用达显著或极显著水平; 与阳性对照组相比, 含药血清组协同 LPS 的促进作用达显著或极显著水平; 与阳性对照组相比, 浓度为 1.25%、2.50% 的含药血清协同 Con A 的促进作用达显著水平, 浓度为 5.00% 的含药血清协同 Con A 的促进作用达极显著水平, 而含药血清浓度为 10.00%、20.00% 时, 协同 Con A 的促进作用不显著。

表 3 含有血清对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红能力的影响

Table 3 Effect of drug serum on phagocytosis of neutral red by peritoneal macrophages in mice

含药血清浓度 // % Concentration of drug serum	刺激指数 (SI)		
	含药血清组 Group of drug serum	Con A + 含药血清组 Group of Con A + drug serum	LPS + 含药血清组 Group of LPS + drug serum
20.00	0.160 ± 0.003*	0.168 ± 0.006	0.227 ± 0.008*
10.00	0.169 ± 0.002*	0.178 ± 0.005	0.232 ± 0.010*
5.00	0.188 ± 0.006**	0.201 ± 0.005**	0.255 ± 0.005**
2.50	0.181 ± 0.004**	0.191 ± 0.002*	0.247 ± 0.006*
1.25	0.191 ± 0.005*	0.199 ± 0.003*	0.235 ± 0.004*

所清除 DPPH 的质量。 IC_{50} 值越大,提取物对自由基的清除能力越强^[11]。

$$IC_{50} = 50\% \times \frac{\text{加入 DPPH 质量}}{\text{加入试样溶液中溶质质量}} \quad (2)$$

2 结果与分析

山奈不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用如图 1 所示。由图 1 可知不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除率为 50% 时提取物的浓度 C_{50} , 通过式 (2) 计算出 IC_{50} 值, 结果见表 1。

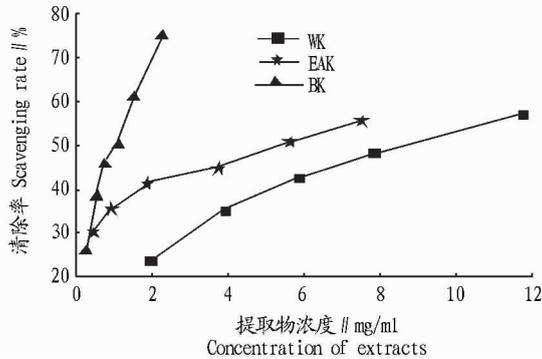


图 1 山奈不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 1 Scavenging of DPPH free radical by different solvent extracts

表 1 山奈不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基的 C_{50} 和 IC_{50}

Table 1 C_{50} and IC_{50} of different solvent extracts in scavenging DPPH free radical

不同溶剂提取物 Extracts of different solvents	C_{50} mg/ml	IC_{50} (DPPH 质量/提取物质量) // g/g DPPH weight / extract weight
EAK	5.48	14.78
BK	1.10	73.64
WK	10.02	8.08

由表 1 可知,3 种溶剂提取得到的山奈提取物对 DPPH 自由基均具有一定的清除作用,清除作用的强弱顺序依次为 BK > EAK > WK, BK 的抗氧化能力最强。因此,从山奈中提取抗氧化物质时,正丁醇提取效果最好。山奈提取物具有

一定的抗氧化性,对自由基具有较好的清除作用,可作为天然抗氧化物质资源开发利用。

3 结论

山奈不同溶剂提取物 (EAK、BK、WK) 对 DPPH 自由基均具有一定的清除作用,其中 BK 的清除能力最强,说明正丁醇提取物抗氧化效果最好。但该提取物中具有较强抗氧化能力的化学成分还有待进一步研究。

山奈是一种药食两用植物,具有广泛的药理活性和一定的抗氧化能力,其提取物可作为天然抗氧化剂开发利用。

参考文献

- 钱信忠. 中国本草彩色图谱. 常用中药篇: 上卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 25.
- WONG K C, ONG K S, LIM C L. Composition of the essential oil of rhizomes of *Kaempferia galanga* L. [J]. *Flav Frag J*, 1992, 7: 263 - 266.
- 中华人民共和国药典委员会. 中国药典 (2005 年版) 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 21.
- RUIANANWATE C, KANJANAPOTHI D, AMOMLER DPISON D. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 102: 120 - 122.
- STEVENSON P C, VEITCH C N, SIMMONDS M S J. Polyoxygenated cyclohexane derivatives and other constituents from *Kaempferia rotunda* L. [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 1579 - 1586.
- 薛颖, 村上明, 清水弘一. 沙姜中抗促癌有效成分的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 522.
- 樊亚鸣, 陈永亨, 李丽敏, 等. GC/MS 法分析广东阳春沙姜精油的化学成分[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 196 - 198.
- COTELLEN N, BERNIER J L, CATTEAU J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, 20 (1): 35 - 43.
- SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90(4): 743 - 749.
- 白红进, 周忠波, 杜红梅, 等. 黑果枸杞叶片甲醇提取物清除自由基活性研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (2): 326 - 327.
- 陈从瑾, 黄克瀛, 李德良, 等. 香椿叶提取物清除 DPPH 自由基能力的测定方法[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 69 - 72.
- 王晓冬, 解备涛, 李建民, 等. 外源 γ -氨基丁酸 (GABA) 对小麦苗期耐涝性的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 159 - 164.
- 徐亚民, 马越, 赵晓燕, 等. 紫苏等 4 种天然色素抗氧化能力的比较 [J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 191 - 194.
- 吕平, 林明涛. 银杏内酯对活性氧自由基和过氧化氢清除作用的研究 [J]. 华北农学报, 2010, 25(1): 155 - 158.

(上接第 16231 页)

3 结论与讨论

(1) 淋巴细胞转化试验结果显示, 含药血清对免疫系统存在一定的影响。在一定剂量范围内, 含药血清对小鼠脾淋巴细胞的作用增强了脾淋巴细胞对 Con A 和 LPS 的反应能力, 而不只是单一地激活。一些学者认为, LPS 主要作用于 B 淋巴细胞, 介导机体的特异性体液免疫应答, 而 Con A 则主要作用于 T 淋巴细胞, 介导机体特异性细胞免疫应答^[8]。由此可以证明, 在一定剂量范围内, 含药血清对机体特异性细胞和体液免疫应答均有一定的正向调节作用。

(2) 含药血清无论是单独还是协同 Con A 或者 LPS, 都可以增强小鼠腹腔巨噬细胞的能量代谢水平, 增加腹腔巨噬细胞代谢 MTT 的能力, 同时可以显著增加腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力。由此可以说明, 含药血清对小鼠机体的非特异性免疫应答存在一定的免疫调节促进作用^[3-7]。

(3) 该研究结果表明, 含药血清的浓度并不是越高越好,

它的有效浓度是在一定范围之内的。在预试验的基础上, 该试验将体外试验中动物含药血清使用浓度初步确定为 1.25% ~ 20.00%。最终认为, 2.50% ~ 5.00% 的含药血清浓度对小鼠的淋巴细胞和腹腔巨噬细胞的影响较为明显, 为今后的实验室研究提供了参考。

参考文献

- 王宗玉, 钮芳娣. 马蹄香精油的化学成分研究[J]. 云南植物研究, 1980, 2(1): 58.
- 陈磊, 郑清明. 蜘蛛香的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2002(21): 1.
- 赖新峰, 王立生, 潘令嘉, 等. 双歧杆菌对裸鼠腹腔巨噬细胞激活作用的初步观察[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(6): 18 - 20.
- 姜峰. 中药鞣酐免疫活性的体外研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- 曹永国. 胡黄连单体 Caffeoyl Glycoside 免疫活性的体外研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- 曹永国, 邓旭明, 曾胜, 等. Caffeoyl Glycoside 对小鼠免疫细胞功能的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 1 - 5.
- 安娜. 胡黄连单体 Scrocaffeside A 免疫增强活性的体外研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- 毕爱华. 医学免疫学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995: 315.