

# 互花米草总黄酮对小鼠免疫功能的影响

张康宣 钦 佩<sup>1</sup> 钱红美 谢 民<sup>1</sup>

(南京药物研究所药理室, 210009)

(<sup>1</sup>南京大学大米草及海滩开发研究所, 210008)

收稿日期 1991年3月14日

关键词 互花米草, 黄酮, 免疫活性, 吞噬作用, 淋巴细胞转化

**提要** 互花米草总黄酮(TFS)是从盐沼植物互花米草中分离得到的一种免疫活性物质。在研究 TFS 对小鼠免疫功能的影响时发现 TFS $156.25 \times 10^{-6}$  ip qd $\times 8$  导致由环磷酰胺引起的免疫抑制小鼠的胸腺重量增加。TFS $154.25 \times 10^{-6}$  sc qd $\times 5$  还显著提高 C<sub>57</sub>/BL 和昆明小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数。TFS $3.125, 12.5 \mu\text{g/ml}$  在体外可明显促进由 ConA 诱导的<sup>3</sup>H-TdR 参入的淋巴细胞转化。

互花米草(*Spartina alterniflora*)是1979年自美国引进的一种生长于海滩潮间带的盐沼植物<sup>[1]</sup>。南京大学从互花米草中提取得到“生物矿质液”(Biomineralliquid, BML)<sup>[2]</sup>, 而互花米草总黄酮(Total flavonoids of *Spartina alterniflora*, TFS)是从 BML 中分离出的一类生物活性物质。

BML 可增加小鼠离体心脏的心搏次数并延长搏动时间<sup>[2]</sup>, 它还能增强嗜中性粒细胞对金黄色葡萄球菌在体外的吞噬作用<sup>[3]</sup>。

我们于1988年12月~1989年6月对TFS的免疫活性作了测试。现已证明在BML的生物活性中起主要作用的有效成分就是TFS。本文将报告TFS对小鼠免疫功能的促进作用。

## 1 材料

TFS 深棕色水溶性无定形物质, 由南京大学大米草及海滩开发研究所提供;

刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, ConA) Sigma 公司产品;

C<sub>57</sub>/BL 小鼠 6~8 周龄; 昆明小鼠 4~6 周龄及 BALB/C 小鼠 6~8 周龄, 分别由南京药

物研究所实验动物室和江苏省实验动物中心提供, 两性并用。

## 2 方法和结果

### 2.1 TFS 对小鼠脾脏及胸腺重量的影响<sup>[4]</sup>

实验中将 53 只 C<sub>57</sub>/BL 小鼠随机分为 5 组, 对照组每组 10 只。实验组每组 11 只。

2.1.1 TFS $156.25 \times 10^{-6}$ , 腹腔注射(ip), 每日一次, 连续 8d;

2.1.2 TFS $312.5 \times 10^{-6}$ , 每日一次, 连续 8d;

2.1.3 TFS $156.25 \times 10^{-6}$  腹腔注射 8d, 于第 4 天时皮下注射环磷酰胺(CYT) $100 \times 10^{-6}$  一次;

2.1.4 对照组, 生理盐水 0.2 ml/只, ip 每日一次, 连续 8d;

2.1.5 生理盐水 0.2 ml/只 ip 8d, 于第 4d 给予 CYT $100 \times 10^{-6}$  SC 一次。

实验结果以每 10g 体重的脾脏或胸腺的重量为脾指数或胸腺指数; 动物脾脏或胸腺重量的增加, 表明其免疫功能得到促进。全部数据用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示, *t* 检验统计

处理。

从表 1 中可以看到, TFS 小剂量组和对照的生理盐水(NS)组比较胸腺重量未见显著变化。然而, TFS 大剂量组与 NS 组相比胸腺重量明显减轻。对于由环磷酰胺(CYT)引起免疫

抑制的动物, TFS ( $156.25 \times 10^{-6}$ ) + CYT 组比 NS + CYT 组胸腺重量显著增加。TFS 对所有各组的脾脏重量均无明显影响。

表 1 TFS 对  $C_{57}/BL$  小鼠脾脏和胸腺重量的影响

Tab. 1 Effect of TFS on thymus in  $C_{57}/BL$  mice and the weights of spleen

| 药物        | 剂量( $\times 10^{-6}$ ) | 动物数 | 胸腺指数                                  | 脾指数             |
|-----------|------------------------|-----|---------------------------------------|-----------------|
| NS        |                        | 10  | $22.0 \pm 6.0$                        | $55.3 \pm 12.6$ |
| NS + CYT  |                        | 10  | $16.5 \pm 5.1$                        | $44.5 \pm 6.1$  |
| TFS       | 156.25                 | 11  | $19.5 \pm 3.7$                        | $48.5 \pm 6.4$  |
| TFS       | 312.50                 | 11  | $15.6 \pm 4.5^{**}$                   | $52.6 \pm 9.2$  |
| TFS + CYT | 156.25                 | 11  | $21.6 \pm 4.1^{\downarrow\downarrow}$ | $51.4 \pm 7.1$  |

注: 表中数据为  $\bar{x} \pm SD$ , t 检验, \*\*表示与 NS 组相比  $P < 0.05$ ,  $\downarrow\downarrow$  表示与 NS + CYT 相比  $P < 0.05$ , CYT  $100 \times 10^{-6} SC$ , 于第 4 天一次给药。

表 2 TFS 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

Tab. 2 Effect of TFS on the phagocytic activity of macrophages of  $C_{57}/BL$  mice

| 动物             | 药物          | 动物数 | 吞噬百分率(%)             | 吞噬指数                  |
|----------------|-------------|-----|----------------------|-----------------------|
| $C_{57}/BL$ 小鼠 | NS          | 8   | $27.9 \pm 12.2$      | $0.35 \pm 0.18$       |
|                | TFS         | 8   | $56.4 \pm 6.7^{***}$ | $0.86 \pm 0.20^{***}$ |
|                | Levamisolum | 4   | $56.6 \pm 14^{***}$  | $1.03 \pm 0.56^{***}$ |
| 昆明小鼠           | NS          | 7   | $19.5 \pm 9.7$       | $0.27 \pm 0.13$       |
|                | TFS         | 8   | $69.7 \pm 5.7^{***}$ | $1.70 \pm 0.37^{***}$ |
|                | Levamisolum | 9   | $67.4 \pm 9.7^{***}$ | $1.92 \pm 0.61^{***}$ |

注: 表中数据为  $\bar{x} \pm SD$ , t 检验, \*\*\*表示与 NS 组相比  $P < 0.01$ , TFS 剂量  $154.25 \times 10^{-6} sc \text{ gd} \times 5$ , Levamisolum 剂量  $2.5 \times 10^{-6} sc \text{ gd} \times 2$ 。

## 2.2 TFS 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响<sup>[5]</sup>

实验中分别将 20 只  $C_{57}/BL$  小鼠和 24 只昆明小鼠(雌雄不限)随机分成 3 组。

2.2.1 TFS  $154.25 \times 10^{-6} SC$ , 每日一次, 连续 5d;

2.2.2 对照组, 重量盐水(NS)  $0.1 \text{ ml/只}$  SC, 每日一次, 连续 5d;

2.2.3 左旋咪唑(Levamisolum)  $2.5 \times 10^{-6} SC$ , 每日一次, 连续 2d。

于第 5 天, 每只小鼠腹腔注射 2% 鸡红细胞悬液(CRBC)  $0.5 \text{ ml}$ , 40 min 后处死, 做腹腔渗出液涂片, 用 Giemsa-Wright 氏染色, 油镜观察计数。

结果按下列公式计算

吞噬百分率(%) =

$\frac{\text{吞有鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{观察的巨噬细胞总数}} \times 100\%$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{观察的巨噬细胞总数}}$$

表 2 表明, TFS 采用  $154.25 \times 10^{-6}$  剂量时能显著提高 C<sub>57</sub>/BL 小鼠和昆明小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率与吞噬指数, 其作用与免疫促进剂在旋咪唑(Levamisolum)相似。

### 2.3 在体外对由刀豆球蛋白 A(ConA)诱导的小鼠脾脏淋巴细胞转化作用的影响<sup>[9]</sup>

首先, 在无菌条件下取 BALB/C 小鼠脾脏, 制备脾细胞悬液, 最终用 RTPML-640 培养液将细胞浓度调节到  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 。实验组将上述脾细胞悬液、ConA(终浓度为  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )与经除菌过滤的不同浓度的 TFS 溶液混合后, 置于  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72h, 在培养结束前 6h 加入  $^3\text{H-TdR}$  ( $0.5\mu\text{Ci}/\text{管}$ ), 进行放射性标记。

培养完毕, 用微量多头细胞收集仪收集脾细胞并使之干燥, 最后用 BECKMAN 自动液闪计数器测定样品放射性(cpm)。对照组取上述脾细胞悬液, 只加入 ConA(终浓度为  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 不加 TFS, 实验方法与实验组相同。本底值的测定: 取上述制备的脾细胞悬液培养, 培养结束之前 6h 加入  $^3\text{H-TdR}$  ( $0.5\mu\text{Ci}/\text{管}$ )测 cpm。

表 3 TFS 对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞转化作用的影响

Tab. 3 Effect of TFS on ConA-induced lymphocyte transformation of mouse spleen cells

| TFS 浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 刺激指数(SI)               |
|-----------------------------------|------------------------|
| 0                                 | $52.62 \pm 2.37$       |
| 0.2                               | $58.96 \pm 7.67$       |
| 0.78                              | $51.72 \pm 3.85$       |
| 3.125                             | $65.86 \pm 9.38^{**}$  |
| 12.5                              | $68.12 \pm 5.89^{***}$ |
| 509                               | $50.39 \pm 0.20$       |
| 200                               | $26.64 \pm 2.37^{***}$ |
| 1 000                             | $1.83 \pm 1.12^{***}$  |

注: 表中数据为  $\bar{x} \pm SD$ , \*\*表示与对照管相比  $P < 0.05$ , \*\*\*表示与对照管相比  $P < 0.01$ 。

根据下式计算刺激指数(SI):

$$SI = \frac{\text{测定管 cpm} - \text{本底 cpm}}{\text{对照管 cpm} - \text{本底 cpm}}$$

此外, 在不加有丝分裂原 ConA 刺激脾淋巴细胞情况下测定  $^3\text{H-TdR}$  的参入并与对照相比较。

表 3 显示 TFS 在 3.125 和  $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ (浓度时能显著促进由 ConA 诱导的 BALB/C 小鼠脾淋巴细胞的转化作用, 在  $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度时作用最强。但进一步提高 TFS 的浓度则产生明显抑制。

在不加 ConA 情况下, 低浓度的 TFS 对淋巴细胞转化无明显作用, 当 TFS 的浓度提高到  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  以上时, 则显著增加  $^3\text{H-TdR}$  的参入。

## 3 讨论

迄今, 国外已经分离得到 20 多种植物抗毒素(Phytoalexin)并在化学上得到鉴定, 所有的都是小分子量化合物而且许多是黄酮类化合物(flavonoids)。近来的研究强调指出植物抗毒素在免疫上有重要意义。总结有关动物生理活性方面的大量资料得出这样的结论: 黄酮类化合物对动物可能具有若干普遍有益的生理效果, 而且有效剂量的黄酮类化合物通常基本上没有有害的影响<sup>[8]</sup>。

此外, 国内已发现从各种植物中分离出的某些黄酮类化合物具有一定的促进免疫功能的作用。例如: 沙棘总黄酮(Total flavones of *Hippophae rhamnoids* L., TFH)<sup>[6]</sup>。

目前, 互花米草的生化研究表明黄酮类化合物是这种植物的一类次生代谢物质(Secondary metabolites)。黄酮类化合物在其地上部分和地下部分的含量每 g 干草分别含  $4.161 \sim 4.667 \times 10^{-3}$  和  $2.328 \sim 2.442 \times 10^{-3}$ 。

在我们的初步实验中, TFS 可引起免疫抑制动物胸腺重量明显增加, 另外 TFS 也显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用。以上结果表明 TFS 能对非特异性免疫系统产生免疫促进作用。

TFS 在体外可明显促进由 ConA 诱导的  $^3\text{H}$ -TdR 参入的淋巴细胞转化,这一结果反映了 TFS 可提高机体的细胞免疫功能。

TFS 在低浓度显示免疫促进作用,但到高浓度时就抑制免疫功能。此结果揭示它可能象其他典型免疫调节剂那样起免疫调节作用。

有关 TFS 的其他免疫药理作用还有待于进一步研究

## 参考文献

- [1] 徐国万,卓芳宗,1985。我国引种互花米草 (*Spartina alterniflora* Loisel) 的初步研究(1)。南京大学学报(米草研究的进展—22 年来的研究成果论文集)。212~225。
- [2] 钦佩,谢民,桂诗礼,1988。大米啊草食用价值的开发研究。自然杂志 11 (12): 931。
- [3] 钦佩,谢民,王长永,李镇杰,姜元申,1990。一种能增强肌体免疫功能的新饮料,自然杂志 13(4):226。

- [4] 林志彬,1983。免疫药物筛选规程。药理学进展(抗炎免疫药理分册)。人民卫生出版社,208~217。
- [5] 舒荣华、谭剑萍、卫寄英、宋芙蓉、张新建、尹琰,1983。除毒河豚肝油对小鼠免疫功能增强作用的观察。海洋药物杂志 4: 194。
- [6] 钟飞、蒋韵、吴芬芬、舒荣华、蔡仙德、谭剑萍,1989。沙棘总黄酮对小鼠免疫功能的影响。中国药理学通报 5 (5): 307。
- [7] 曹日强,朱汝幸,施金峰,1988。互药米草 (*Spartina alterniflora* Loisel) 和大绳草 (*Spartina cynosuroides* (L.) Roth) 的比较生化研究(2)地上部与地下部次生代谢物质的初步研究。南京大学学报(自然科学版) 24(3): 515。
- [8] 哈本, J. B. 编,戴伦凯等译,1983。黄酮类化合物。科学出版社,316, 322, 335。
- [9] Barasoain I., Rejas M. T., Portoles M. P., Ojeda G., Rojo J. M., 1987. Isoprinostine Restores *in vitro* T Lymphocyte Functions of cyclophosphamide Immunosuppressed Mice, *Int. Immunopharmacol* 9 (4):489。

# INFLUENCE OF TOTAL FLAVONOIDS OF SPARTINA ALTERNIFLORA (TFS) ON IMMUNE FUNCTION IN MICE

Zhang Kangxuan, Qin Pei<sup>1</sup>, Qian Hongmei and Xie Min<sup>1</sup>

(Department of Pharmacology, Nanjing Institute of Materia Medica, 210009)

(<sup>1</sup> Institute of *Spartina* Tidal Land Development, Nanjing University, 210008)

Received: Mar., 14, 1991

Key Words: *Spartina alterniflora*; Flavonoids; Immune activity; Phagocytosis; Lymphocyte transformation

## Abstract

Total flavonoids of *Spartina alterniflora* (TFS) are immuno-active materials isolated from *Spartina alterniflora*, a salt marsh plant. The effects of TFS on immune function in mice were studied. It was found that TFS 156.25 mg/kg ip qd  $\times$  8 caused a significant increase in the weight of thymus in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide (CYT). TFS 154.25 mg/kg sc qd  $\times$  5 also increased markedly the phagocytic percentage and the phagocytic index of macrophages in peritoneal exudate, both in C<sub>57</sub>/BL and Kunming mice. TFS 3.125—12.5  $\mu$ g/ml remarkably promoted lymphocyte transformation of  $^3\text{H}$ -TdR incorporation induced by ConA *in vitro*.