

螺旋藻多糖对机体免疫功能的提高作用及其机理研究*

刘力生 郭宝江 阮继红 王 勤 戴馨仪¹⁾ 陈林香¹⁾ 吴伯堂²⁾

(中国科学院海洋研究所实验生物学开放研究实验室, 青岛 266071)

(仲恺农业技术学院生物技术研究室, 广州 510225)

收稿日期 1990年10月6日

关键词 钝顶螺旋藻多糖, 巨噬细胞, 血清溶血素, T淋巴细胞

提要 螺旋藻多糖 150~300mg/kg, 无论注射或口服, 均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬指数, 增加外周血液中T淋巴细胞的百分数和血清溶血素的含量。说明螺旋藻多糖不但能提高机体非特异性的细胞免疫功能, 而且能促进机体特异性的体液免疫功能。它的作用机理似与螺旋藻多糖能增强骨髓细胞增殖能力, 促进胸腺、脾脏等免疫器官的生长和促进血清蛋白的生物合成有关; 同时还与其能消除免疫抑制剂(环磷酰胺)对机体免疫系统的抑制作用有关。

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 多糖, 经我们多年研究, 发现它是一种无细胞毒的天然物质, 分子量为 12590^[1], 具有增强小鼠骨髓细胞增殖能力的特性^[1,5], 还能显著减轻小鼠骨髓细胞和蚕豆根尖细胞的辐射遗传损伤, 大大降低电离辐射引起的突变频率^[3,15]。此外它有提高核酸内切酶活性和促进 DNA 修复合成的作用^[3], 并对体内移植性癌细胞的增殖有明显的抑制作用^[4]。为了进一步探讨螺旋藻多糖的生物活性及其作用机理, 本文探讨了螺旋藻多糖对机体免疫功能的提高作用及其机理。

I. 实验材料

- I.1. 螺旋藻多糖按文献[1]方法提取与纯化, 用 80℃ 无菌水配成所需浓度, 置冰箱备用。
- I.2. 实验动物: NIH 小鼠由兰州生物制品研究所提供, 昆明系小鼠由广州中医学院动物繁殖场供应。
- I.3. 环磷酰胺: 上海第十二制药厂, 批号 880309。
- I.4. 鸡红细胞: 取本校饲养场的公鸡红血球在 4℃ 冰箱保存于 Alsever 氏液中, 临用时用无菌生理盐水离心洗 3 次, 配成 5% 的悬液。
- I.5. 补体的制备: 取 2 只豚鼠血清混合, 用无菌生理盐水配成 10% 备用。
- I.6. 标记物: [³H] 亮氨酸 (³H-Leu 比强度 2.96TB_q/mmol), 上海原子核研究所产品。
- I.7. 消化剂: 过氯酸和过氧化氢容量比 1:1。
- I.8. 闪烁液: 0.4% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与乙二醇甲醚 6:4 (V:V)。

* 实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 35 号。

1) 广州中医学院。

2) 中国科学院南海海洋研究所。

II. 实验方法

II.1. 腹腔巨噬细胞吞噬功能的测定^[5]

将健康 NIH 小鼠随机分成 4 组, 每组 18 只, 实验组分别按 150, 200 和 300mg/kg 的螺旋藻多糖, 每天腹腔注射一次, 连续 6d, 取巨噬细胞前 48h 每鼠腹腔注射 0.4% 的糖原 (动物淀粉) 1 ml, 取巨噬细胞前 1h, 每鼠腹腔注射 5% 的鸡红细胞 0.5ml, 1h 后处死小鼠取腹腔液涂片、干燥、固定。经 Giemsa-Wright 氏染液染色后镜检计数 (每鼠涂片 3 张, 每片最少计数 100 个细胞) 然后分组统计比较各实验组与对照组的巨噬细胞的平均吞噬率与吞噬指数。

II.2. T 淋巴细胞用酯酶活性检测法^[6,7]测定

选健康昆明种雄性 18~20g 小鼠 80 只, 随机分组, 每组 10 只共 8 组, 灌胃法与注射法各 4 组。

II.2.1. 对照组: 灌胃法, 每天灌蒸馏水 0.5mL/只, 并腹腔注射生理盐水 0.2mL/只; 注射法则每天每只腹腔注射生理盐水 0.2mL/只。

II.2.2. 螺旋藻多糖组: 灌胃法, 每天灌螺旋藻多糖 0.5mL/只 (相当 1g/kg 体重), 并腹腔注射生理盐水 0.2mL/只; 注射法的则每天每只腹腔注射螺旋藻多糖 300mg/kg。

II.2.3. 环磷酰胺组: 灌胃法, 每天灌蒸馏水 0.5mL/只, 并腹腔注射环磷酰胺 10mg/kg; 注射法则每天每只腹腔注射环磷酰胺 10mg/kg。

II.2.4. 螺旋藻多糖加环磷酰胺组: 灌胃法, 每天每只灌螺旋藻多糖 1g/kg (0.5mL/只), 并腹腔注射环磷酰胺 10mg/kg; 注射法的则每天每只腹腔注射螺旋藻多糖 300mg/kg 环磷酰胺 10mg/kg。上述四组处理均连续 10d。停药后第 2 天, 分组逐只取小鼠外周血进行酸性 α -醋酸萘酯酶 (ANAE) 阳性淋巴细胞百分率检测。

II.3. 血清溶血素的测定

用鸡红细胞作免疫原的方法^[9]测定, 选健康 18~21g NIH 小鼠 50 只, 每鼠腹腔注射 5% 的鸡红细胞 0.2mL 进行免疫。免疫后第 2 天, 实验组按 150, 200 和 300mg/kg 剂量分别注射螺旋藻多糖, 每天一次连续 6d, 对照组注射相应的生理盐水。第 7 天眼球后静脉取血, 离心, 取血清用生理盐水稀释 100 倍。取上述稀释血清 1mL 与 5% 鸡红细胞悬液 0.5mL 混合, 在冰浴中加 10% 补体 0.5mL。37℃ 恒温箱内保温 30min 后在冰浴中停止反应。离心, 取上清液置 721 分光光度计 540nm 处比色, 测光密度。另设不加血清的空白组对照, 比较实验组与对照组的平均光密度。

II.4. 血清蛋白生物合成的测定^[9]

选健康 14~16g 昆明小鼠 60 只, 随机分成 5 组: 实验组分别按 150 和 300mg/kg 的螺旋藻多糖溶液, 每天腹腔注射 1 次连续 5d, 最后 1 次为皮下注射。另一组为连续自饮 0.2% 的螺旋藻多糖溶液 5d, 对照组分别注射相应的生理盐水或自来水。在标记前禁食 16h, 但饮水不限, 最后一次给药后 1h, 每鼠腹腔注射 ^3H -Leu 0.2mL (相当 0.1 $\mu\text{Ci/g}$), 4h 后眼球后静脉取血, 在室温下自然凝血 4h 后离心分离血清, 取血清 0.2mL 加 10% 三氯醋酸 4mL 洗 2 次, 以沉淀蛋白质并除去游离的 ^3H -Leu 及其他小分子, 离心后再用 1:1 的乙醇乙醚混合液洗 1 次, 以除去三氯醋酸和酯类物质, 加 0.05mL 消化液在 80℃ 消化 30min, 用 10mL 闪烁液分 3 次将消化物全部移入测量瓶中加盖过液置 FJ-2100 型自动液体闪烁仪测量放射性, 以 1mL 血清内含血清蛋白计算, 比较实验组与对照组的平均 cpm 值^[10]。

II.5. 胸腺皮质厚度与脾脏红髓内巨噬细胞数

用定量组织学^[11]方法进行观察, 此实验的分组与处理和 T 淋巴细胞酯酶活性检测试验相同。

III. 结果

III.1. 螺旋藻多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的促进作用

表 1 的结果显示: 腹腔注射 150, 200 和 300 mg/kg 的螺旋藻多糖均能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数, 其作用随剂量增大而升高。

表 1 螺旋藻多糖对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率与吞噬指数的影响

Tab. 1 Effect of Polysaccharide of *Spirulina platensis* on the phagocytic percentage and index of mice abdominal macrophage

组 别	剂量 (mg/kg)	吞噬率 (%)	吞噬指数
对 照	—	49.1±2.5	0.93±0.12
多 糖	150	65.2±2.2***	1.75±0.42***
多 糖	200	66.3±2.0***	2.15±0.25***
多 糖	300	74.4±1.3***	2.62±0.13***

注: 每组 18 只小鼠: $\bar{X} \pm SD$; ***P 值 < 0.01。

III.2. 螺旋藻多糖对小鼠 T 淋巴细胞的影响

表 2 的数据说明: 无论灌胃或注射螺旋藻多糖, 均能显著提高小鼠 T 淋巴细胞的百分数, 免疫抑制剂(环磷酰胺)明显减少 T 淋巴细胞的百分数, 螺旋藻多糖可以消除环磷酰胺的抑制作用。

表 2 螺旋藻多糖对小鼠 T 淋巴细胞的影响

Tab. 2 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* on the T-lymphocyte of mice

编 号	组 别	T 淋巴细胞数的百分数 $\bar{X} \pm SD$	
		灌 胃	腹腔注射
1	对 照	29.3±2.66	31.6±1.78
2	多 糖	55.0±2.50	46.4±2.71
3	环磷酰胺	21.5±1.23	24.0±1.61
4	多 糖 加 环磷酰胺	36.6±1.99	45.0±1.71
P 值		2:1 组 P<0.001 2:3 组 P<0.001 1:3 组 P<0.01 4:3 组 P<0.001 4:1 组 P<0.05	2:1 组 P<0.001 2:3 组 P<0.001 1:3 组 P<0.01 4:3 组 P<0.001 4:1 组 P<0.001

III.3. 螺旋藻多糖对小鼠血清溶血素的影响

表 3 的结果表明: 螺旋藻多糖能显著提高小鼠血清溶血素的含量, 同时, 亦随剂量增多而升高。

表 3 螺旋藻多糖对小鼠血清溶血素含量的影响

Tab. 3 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* on the content of mice haemolysin

组 别	剂量 (mg/kg)	光密度 (O · D. × 100)
对 照		14.4±1.2
多 糖	150	20.1±1.5***
多 糖	200	31.4±2.4***
多 糖	300	33.5±2.6***

注: 每组 12 只小鼠 $\bar{X} \pm SD$, *** P < 0.01。

III.4. 螺旋藻多糖对小鼠胸腺皮质厚度与脾脏红髓内巨噬细胞的影响

表 4、表 5 的结果显示：无论灌胃或注射，螺旋藻多糖均能明显使小鼠胸腺皮质厚度增加和使脾脏红髓内的巨噬细胞增多。而免疫抑制剂环磷酰胺则使胸腺皮质厚度变薄，使脾脏红髓内巨噬细胞减少，螺旋藻多糖可消除或减轻环磷酰胺的抑制作用。

表 4 螺旋藻多糖对小鼠胸腺皮质厚度的影响

Tab. 4 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* on the thickness of mice thymus cortex

编号	组别	胸腺皮质厚度 (μm) $\bar{X} \pm \text{SD}$	
		腹腔注射	灌 胃
1	对照	214.62 $\pm$ 14.16	231.87 $\pm$ 14.49
2	多糖	263.58 $\pm$ 23.53	259.11 $\pm$ 13.02
3	环磷酰胺	192.59 $\pm$ 11.17	173.26 $\pm$ 11.53
4	多糖加 环磷酰胺	224.41 $\pm$ 7.16	232.24 $\pm$ 9.94
P 值		2:1 组 $P < 0.05$	2:1 组 $P < 0.05$
		2:3 组 $P < 0.05$	2:3 组 $P < 0.001$
		1:3 组 $P < 0.05$	1:3 组 $P < 0.001$

表 5 螺旋藻多糖对小鼠脾脏红髓内巨噬细胞的影响

Tab. 5 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* on phagocyte in spleen red marrow of mouse

编号	组别	脾脏红髓内巨噬细胞数(个) $\bar{X} \pm \text{SD}$	
		腹腔注射	灌 胃
1	对照	5.52 $\pm$ 0.44	4.50 $\pm$ 0.51
2	多糖	6.16 $\pm$ 0.47	5.71 $\pm$ 0.47
3	环磷酰胺	3.46 $\pm$ 0.19	4.42 $\pm$ 0.41
4	多糖加 环磷酰胺	5.04 $\pm$ 0.48	4.50 $\pm$ 0.17
P 值		2:1 组 $P < 0.05$	2:1 组 $P < 0.05$
		2:3 组 $P < 0.001$	2:3 组 $P < 0.05$
		3:1 组 $P < 0.01$	3:1 组 $P > 0.05$

III.5 螺旋藻多糖对小鼠血清蛋白生物合成的促进作用

从表 6 数据看，腹腔注射或自然饮用螺旋藻多糖均能明显促进小鼠血清蛋白的生物合成。

表 6 螺旋藻多糖对小鼠血清蛋白生物合成的影响

Tab. 6 Effect of polysaccharide of *Spirulina platensis* on the biosynthesis of mice serum protein

组 别	剂量 (mg/kg)	$^3\text{H-Leu}$ 参入血清蛋白的脉冲数 ($10^3 \times \text{cpm}$)/mL
对 照		37.0 $\pm$ 1.7
多 糖	150	44.8 $\pm$ 2.0**
多 糖	300	45.7 $\pm$ 2.1**
对 照	饮水	32.4 $\pm$ 1.5
多 糖	饮 0.2% 多糖	38.7 $\pm$ 1.7**

注: $\bar{X} \pm \text{SD}$; ** $P < 0.05$ 。

IV. 讨论

灌胃或腹腔注射螺旋藻多糖, 均能提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬百分率和吞噬指数(表 1), 说明其多糖大大促进了巨噬细胞的吞噬活性, 这与真菌多糖^[12]和黄芪、红芪多糖有相似的作用^[5,13], 螺旋藻多糖还能提高小鼠外周血中 T 淋巴细胞的百分数(表 2)和血清溶血素的含量(表 3)。显示螺旋藻多糖不但能提高机体非特异性的细胞免疫功能, 而且能促进机体特异性的体液免疫功能。螺旋藻多糖能增大小鼠骨髓中多染红细胞与正染红细胞的比值(PCE/NCE)^[15], 即增强了骨髓细胞的增殖活力, 有利于巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞等免疫效应细胞的形成。胸腺在维持机体免疫功能方面起着重要的作用, 螺旋藻多糖促使胸腺皮质厚度增加(表 4), 便有效地促进了 T 淋巴细胞的发育生成, 并进入淋巴管和外周血而发挥细胞免疫功能。螺旋藻多糖促进血清蛋白的生物合成(表 6)的特性, 与银耳等多糖的作用^[11,14]一致, 这对血清溶血素(特异性抗体)含量的增加是有利的。因此, 螺旋藻多糖对机体免疫功能的提高作用与其能增强骨髓细胞的增殖活力, 促进胸腺、脾脏等免疫器官的生长和促进血清蛋白的生物合成有关, 同时还与其能消除或减轻环磷酰胺这类免疫抑制剂对机体免疫系统的抑制作用有关。

参考文献

- [1] 庞启深、郭宝江、阮继红, 1989. 螺旋藻抗辐射多糖的提纯和分析。生物化学与生物物理学报 21(5): 445~449.
- [2] 阮继红、郭宝江等, 1988. 螺旋藻抗辐射的研究。遗传 10(2): 27~30.
- [3] 庞启深、郭宝江、阮继红, 1988. 螺旋藻多糖对核酸内切酶活性和 DNA 修复合成的增强作用。遗传学报 15(5): 374~381.
- [4] 刘力生、郭宝江等, 1991. 螺旋藻多糖对移植性癌细胞的抑制作用及其机理的研究。海洋科学 5: 33.
- [5] 兰中芬等, 1987. 红芪多糖成份的分析及其对小鼠免疫功能与移植性肿瘤的作用。中国药理学报 8(3): 275~277.
- [6] 姜世勃等, 1983. T 淋巴细胞酯酶活性检测法的改良及其影响因素。上海免疫学杂志 3(4): 254.
- [7] 刘琰等, 1981. T、B 淋巴细胞的酶标记鉴别法。安徽医学院学报 1: 41.
- [8] 吴铁、郭澄泓, 1985. 用鸡红细胞作免疫原的溶血素测定法。中草药 16(1): 28.
- [9] 夏尔宁、陈琼华, 1985. 黑木耳、银耳、银耳孢子多糖对血清蛋白生物合成的影响。南京药学院学报 16(3): 37.
- [10] 刘力生、郑荣梁等, 1985. 多被银莲花素 A 对癌细胞 DNA, RNA、蛋白质和血浆 CAMP 含量的影响。中国药理学报 6(3): 192~194.
- [11] 胡素坤等, 1985. 党参与抗癌药物配伍对肿瘤和荷瘤动物作用的实验研究。中西医结合杂志 10: 618~621.
- [12] 夏尔宁、陈琼华, 1984. 黑木耳、银耳和银耳孢子多糖生物活性的比较。南京药学院学报 15(3): 50.
- [13] 陈丽娟等, 1981. 黄芪多糖对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响。中国药理学报 2: 200~202.
- [14] 吴东儒等, 1987. 糖类的生物化学(第一版)。上海高等教育出版社。617~623.
- [15] Pang Qishen, Guo Baojiang et al., 1989. Radioprotective effect of extract from *Spirulina platensis* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Letters* 48: 165~169.

STUDY ON EFFECT AND MECHANISM OF POLYSACCHARIDES OF *SPIRULINA PLATENSIS* ON BODY IMMUNE FUNCTIONS IMPROVEMENT

Liu Lisheng, Guo Baojiang and Ruan Jihong

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

Dai Xinyi, Chen Linxing and Wu Botang

(Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou, 510225)

Received: Oct. 6, 1990

Key Words: Polysaccharides, Phagocyte, T-lymphocyte, haemolysin

Abstract

Polysaccharides of *Spirulina platensis*, at the dosage of 150-300 mg/kg by injection or

taking orally, can increase the phagocytic percentage and phagocytic index of abdominal macrophage, the percentage of T-lymphocyte and haemolysin content in the peripheral blood of mouse. The results demonstrate the polysacchrides can improve both the non specific function of cellular immunity and the specific humoral immunity. The mechanism seems to be related to the fact that the polysacchrides can enhance the reproductive ability of marrowcyte, the growth of thymus and spleen, the biosynthesis of serum protein, and that polysacchrides can eliminate the inhibition effect of inhibitive circular phosphamide on immune system of body.