

## 唐古特白刺果多糖对免疫受抑小鼠 IFN- $\gamma$ 及 T/NK 细胞亚群的影响

秀仁杰<sup>1</sup> 索有瑞<sup>2</sup> 耿排力<sup>1\*</sup>

(1. 青海大学医学院 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院西北高原生物研究所藏药研究中心 青海 西宁 810001)

**摘要** 目的 本研究采用环磷酰胺建立免疫抑制模型,探讨唐古特白刺果(NTB)多糖对免疫受抑小鼠 IFN- $\gamma$  及 T/NK 细胞亚群的影响。方法 以光学显微镜观察各组小鼠脾脏组织结构的变化;以双抗体夹心法(ELISA)观察 NTB 多糖对免疫受抑小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的影响;以 RT-PCR法观察 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达;以流式细胞术检测 CD3、CD4、CD8 及 NK( CD49b) 细胞在内的 T/NK 细胞亚群的变化。结果 模型 + NTB 多糖组淋巴滤泡增加明显;NTB 多糖使免疫受抑小鼠血清 IFN- $\gamma$  的含量显著增加,其 mRNA 的表达增强。模型 + NTB 多糖组, CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、NK( CD49b) 细胞显著升高。结论 NTB 多糖可使免疫受抑小鼠脾脏组织中淋巴细胞数量增多且结构明显改善;能够明显增强免疫受抑小鼠血清 IFN- $\gamma$  的含量并增强 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达;NTB 多糖能使参与细胞免疫的 CD3、CD4、CD8 及 NK( CD49b) 细胞数量增加。

**关键词** NTB 多糖 免疫受抑模型 IFN- $\gamma$  T/NK 细胞亚群

中图分类号 R392.5 文献标识码 A

DOI: 10.13452/j.cnki.jqmc.2015.03.007

## EFFECT OF NITRARIA TANGUTORUM BOBR POLYSACCHARIDE ON IFN- $\gamma$ AND T/NK SUBSETS IN IMMUNOSUPPRESSED MICE

Xiu Renjie<sup>1</sup>, Suo Yourui<sup>2</sup>, Geng Paili<sup>1</sup>

(1. Qinghai University Medical College, Xining, Qinghai 810001;

2. Research center for Tibetan medicine, Institute of northwestern Plateau, Chinese Academy of science, Xining, Qinghai 810001)

**Abstract Objective** To explore the effect of Nitraria tangutorum Bobr( NTB) polysaccharide on interferon- $\gamma$  ( IFN- $\gamma$ ) and T/NK subsets in immunosuppressed mice model induced by cyclophosphamide. **Method** The amount of spleen cells and the structure of spleen were observed by light microscope; The contents of IFN- $\gamma$  were determined by enzyme linked immunoabsorbent assay( ELISA) in serum and the expression of IFN- $\gamma$  mRNA were observed by reverse transcription-polymerase chain reaction( RT-PCR) in immunosuppressed mice; the function and the quantity of CD3, CD4, CD8 and NK( CD49b) cells which participating in cellular immunology were detected by Flow Cytometry( FCM). **Result** Lymphoid follicles in model + NTB polysaccharide group increased signifi-

秀仁杰(1990~),女,蒙古族,青海籍,2012级科学班研究生,\* :通信作者,教授, E-mail: gamp12003@aliyun.com

cantly; and the serum IFN- $\gamma$  content was significantly increased and the expression of IFN- $\gamma$  mRNA enhanced as well. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and NK( CD49b) cells were significantly increased in model + NTB polysaccharide group. **Conclusion** NTB polysaccharide can increase the spleen lymphocytes and improve the structure of thymus and spleen in immunosuppressed mice. The NTB polysaccharide can significantly increase serum IFN- $\gamma$  and IFN- $\gamma$ mRNA expression; it can also increase the number of CD3, CD4, CD8 and NK( CD49b) cells which involving cellular immunity.

**Keywords** Nitraria tangutorum Bobr Immunosuppressed mice model IFN- $\gamma$  T/NK subsets

唐古特白刺( *Nitraria tangutorum* Bobr, NTB) 为蒺藜科( *Zygophyllaceae*) 白刺属( *Nitraria*) 植物。现代药理学研究表明它具有降血脂、降血糖、抗氧化、抗疲劳、抗菌<sup>[1-3]</sup>等作用。索有瑞等<sup>[4]</sup>研究发现白刺果实具有调节免疫作用。本研究拟通过环磷酰胺建立免疫抑制模型, 探讨唐古特白刺果( NTB) 多糖对免疫功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品及试剂

唐古特白刺果( 采自青海省德令哈市天然白刺林场, 经中国科学院西北高原生物研究所索有瑞研究员鉴定为柴达木产唐古特白刺果正品, 共 4000 g, 烘干后粉碎, 冷藏备用); 环磷酰胺 [FCM, 批号 14022425, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产( 每瓶 0.2g) ]; 石油醚( 沸程 30℃ ~ 60℃)、正丁醇、生理盐水( 0.9%)、无水乙醇( 国产分析纯); FITC-CD3、PE-CD4、ECY5-CD8、NK( CD49b) ( 美国 BD 公司产品); 肝素抗凝剂、红细胞裂解液、Elisa( IFN- $\gamma$ ) 检测试剂盒( 武汉博士德生物有限公司); Trizol 试剂、逆转试剂盒、2\* TAQpermix、5\* TAE( 天根生化科技有限公司)。引物由华大基因生物工程有限公司合成。

#### 1.1.2 主要仪器

超微细粉碎机( 上海泰斯特仪器); SHB-III 循环水式多用真空泵( 郑州长城科工贸有限公司); R-201 旋转蒸发仪( 上海申顺生物科技有限公司); Cary300 型紫外可见分光光度计( 美国 Varian 公司); 78HW-1 定时恒温磁力搅拌器( 金坛市正基仪器有限公司); 流式细胞仪( 美国 Becton Dickinson 公司); BIO-RAD Smartspec3000 紫外可见分光光度计( BIO-RAD 公司); 酶标仪( BIO-RAD 公司); PCR 仪( 杭州博日科技有限公司)。

## 1.2 方法

提取唐古特白刺果的多糖成分, 观察其对免疫

受抑小鼠脾细胞数量及脾脏组织结构的影响; 测定血清  $\gamma$  干扰素( Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 含量及 IFN- $\gamma$ mRNA 的表达; 以流式细胞仪检测各组参与免疫应答的淋巴细胞亚群 CD3、CD4、CD8 以及自然杀伤细胞( Natural Killer, NK) 细胞的变化。

### 1.2.1 NTB 多糖提取及其多糖含量的测定

NTB 果实多糖提取工艺流程: NTB 干果→清洁粉碎→加 4 倍体积石油醚除脂→滤渣挥干加 10 倍体积 80% 乙醇 85℃ 回流提取 2 次→滤渣中加入 5 倍体积蒸馏水→90℃ 提取 3 次, 每次 60 min →水提液减压蒸馏浓缩→双氧水氧化法脱色→Sevag 法去蛋白→乙醇沉淀→有机溶剂脱水→冷冻干燥→NTB 多糖。其多糖含量测定时用标准葡萄糖溶液, 以苯酚-硫酸法测定。建立回归方程为  $y = 0.0094x - 0.0256$ ,  $R^2 = 0.9986$ 。测得多糖含量为 47.78%。

### 1.2.2 动物及分组

昆明种小鼠 36 只, 清洁级, 质量(  $25 \pm 2$ ) g, 雌雄各半; 购自青海省地方病研究所, 合格证号: 2014009。随机分为三组, 每组 12 只, 设正常对照组、模型组及模型 + NTB 多糖组。模型组腹腔注射环磷酰胺( 80mg/kg), 连续 5 d。模型 + NTB 多糖组腹腔注射环磷酰胺( 80mg/kg), 连续 5 d, 造模成功后腹腔注射 NTB 多糖( 3.6g/kg)<sup>[6]</sup>, 连续 10 d。正常对照组腹腔注射等量生理盐水。末次给药 24 h 后断颈采血, 称取脾脏和胸腺, 取外周血测定 IFN- $\gamma$ 、CD3、CD4、CD8 及 NK( CD49b) 的含量。

### 1.2.3 脾脏、胸腺免疫器官及脾脏组织结构观察

末次给药 24 h 后, 断颈处死各组小鼠, 无菌取出脾脏和胸腺, 小心清除脾脏及胸腺附着的结缔组织, 用生理盐水清洗, 吸水纸吸干水分后用分析天平称重, 计算脾脏指数和胸腺指数。脾脏称重后固定做石蜡切片, HA 染色, 40 倍显微镜下观察淋巴滤泡及其结构。

### 1.2.4 脾细胞 IFN- $\gamma$ 的 mRNA 提取

按上述方法取出脾脏后制成脾细胞悬液, 采用

Trizol 试剂盒按说明书操作提取总 RNA。所提 RNA 溶于 DEPC 处理水(50 μL) 溶解,用 5 μL 在紫外分光光度计下检测 RNA 的纯度以及定量,总 RNA -80 °C 保存备用,其余 -20 °C 保存备用。

### 1.2.5 逆转录(RT-PCR)合成

反应合成 cDNA 取上述 mRNA 溶液 10 μL,按照逆转录试剂盒操作进行 cDNA 扩增,反应产物即 cDNA,-20 °C 保存备用(引物序列见表 1)。

表 1 IFN-γPCR 扩增引物序列

Table 1 Physical properties of various PHA in comparison with conventional plastics

基因	上游/下游	引物序列(5' - 3')	产物长度
β-actin	上游	GAGACCTCAACACCCCAGC	263 bp
	下游	ATGTCACGCACGATTTCCCAT	
IFN-γ	上游	CTGCTGATGGGAGGAGATGT	176 bp
	下游	TTTGTCATTTCGGGTGTAGTCA	

### 1.2.6 PCR 扩增

以上述 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系总体积为 50 μL。逆转录反应:42 °C 50 min;接着 95 °C 5 min 灭活逆转录酶。PCR 反应循环参数设置:变性温度 85 °C 1 min;退火温度 54 °C 1 min;延伸温度 72 °C 2 min;共 40 个循环。72 °C 保温 7 min。

### 1.2.7 PCR 产物定量

取 PCR 扩增产物 20 μL 用 5% 琼脂糖凝胶进行电泳;1% Gel Green 显色后用 Bio Rad mycycler 凝胶扫描仪对电泳凝胶中的 PCR 产物条带进行密度扫描,以 β-actin 作为 RT-PCR 的质控,计算 IFN-γ mRNA 与其对应的 β-actin 峰面积的比值,从而得出 NTB 多糖对免疫受抑小鼠 IFN-γ mRNA 表达的影响。

### 1.2.8 小鼠血清 IFN-γ 的测定

用外周血(0.5mL) 分离血清,采用双抗体夹心

法(ELISA)测定血清 IFN-γ 含量。取 50 μL 血清稀释 3 倍后加入酶标板内,具体操作步骤按 ELISA 试剂盒说明进行。

### 1.2.9 T/NK 细胞亚群分析

各组外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞的检测:取血约 0.5 mL 用肝素抗凝,取 200 μL 抗凝血加入单克隆抗体 CD3、CD4、CD8 和 NK( CD49b) 荧光标记单克隆抗体 20 μL 中充分混匀,避光孵育 20~35 min 标记样品中分别加入红细胞裂解液,白细胞(WBC) 稳定剂及细胞膜固定剂处理后用流式细胞仪进行检测。

### 1.2.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 NTB 多糖对免疫受抑小鼠脾脏及胸腺重量及指数的影响(表 2)

表 2 NTB 多糖对免疫受抑小鼠脾脏及胸腺重量、指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of NTB polysaccharides on the weight of spleen and thymus in immunosuppressed mice( $\bar{x} \pm s$ )

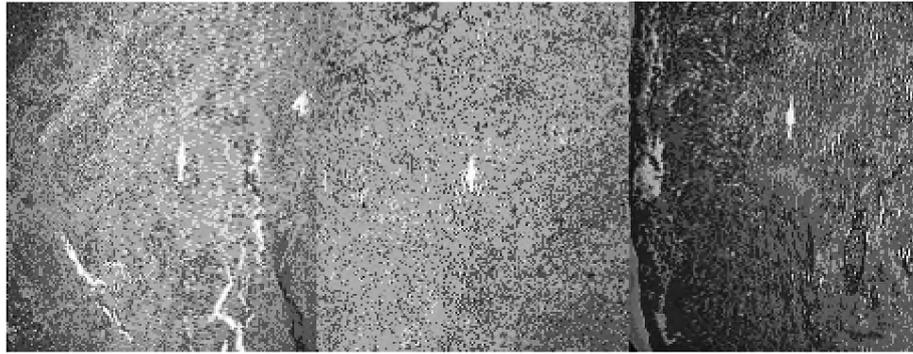
组别	n	体重(g)	胸腺重量(mg)	胸腺指数	脾脏重量(mg)	脾脏指数
正常对照组	12	27.38 ± 3.91	69.20 ± 4.04	2.52 ± 0.16	94.14 ± 8.49	3.41 ± 0.21
模型组	12	23.25 ± 2.75*	20.07 ± 3.66*	0.12 ± 0.04*	45.00 ± 5.5*	1.73 ± 0.17*
模型 + NTB 多糖组	12	27.07 ± 3.63 <sup>▲</sup>	26.05 ± 4.27* <sup>▲</sup>	0.17 ± 0.04* <sup>▲</sup>	81.56 ± 4.38* <sup>▲</sup>	3.18 ± 0.03 <sup>▲</sup>
F		5.287	539.491	2351.042	193.045	404.152
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: \* 表示与正常对照组比较  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup>表示与模型组比较  $P < 0.05$ 。Notes: \* compared with normal group  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup> compared with model group  $P < 0.05$ 。

表 2 显示,模型组与正常对照组相比,胸腺及脾脏重量均下降,差异显著( $P < 0.05$ );模型 + NTB 多糖组与模型组相比其胸腺及脾脏重量均显著上升,

有明显差异( $P < 0.05$ )。

### 2.2 NTB 多糖对免疫受抑小鼠脾脏组织结构的影响(图 1)



1 正常对照组                      2 模型组                      3 模型 + NTB 多糖组  
 1 Normal Group                      2 Model Group                      3 Model + NTB polysaccharide Group

图 1 各组小鼠脾脏组织结构变化图

Figure 1 Changes of the spleen structure in the three groups

图 1 显示 模型组淋巴滤泡及淋巴小结消失 模 及淋巴小结恢复。  
 型组与正常组相比有明显差异; 模型 + NTB 多糖组 2.3 NTB 多糖对免疫受抑小鼠脾细胞 IFN -  $\gamma$   
 与模型组差异明显 模型 + NTB 多糖组的淋巴滤泡 mRNA 表达的影响(表 3 图 2)

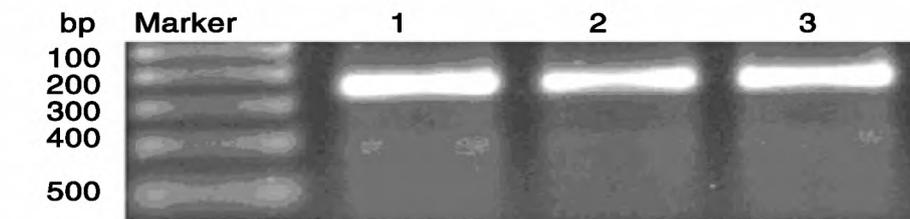
表 3 NTB 多糖对免疫受抑小鼠脾细胞 IFN -  $\gamma$  mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of NTB polysaccharides on IFN -  $\gamma$  mRNA expression in Immunosuppressed mice( $\bar{x} \pm s$ )

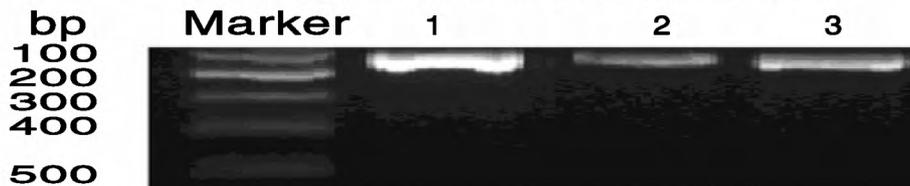
组别	n	IFN - $\gamma$ / $\beta$ - actin	血清 IFN - $\gamma$ ( $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
正常对照组	12	0.564 $\pm$ 0.132	723.66 $\pm$ 6.99
模型组	12	0.267 $\pm$ 0.225*	505.56 $\pm$ 4.45*
模型 + NTB 多糖组	12	0.545 $\pm$ 0.227 $\blacktriangle$	886.64 $\pm$ 4.28* $\blacktriangle$
F		8.322	15131.033
P		<0.05	<0.05

注: \* 表示与正常对照组比较  $P < 0.05$ ;  $\blacktriangle$ 表示与模型组比较  $P < 0.05$ . Notes: \* compared with normol group  $P < 0.05$ ;  $\blacktriangle$  compared with model group  $P < 0.05$ .

表 3 显示 模型 + NTB 多糖组与模型组相比, IFN -  $\gamma$  显著升高, 差异显著( $P < 0.05$ )。



$\beta$  - actin mRNA RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图  
 $\beta$  - actin mRNA PCR product agarose gel electrophoresis



IFN -  $\gamma$  mRNA RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图  
 IFN -  $\gamma$  mRNA PCR product agarose gel electrophoresis

1 模型 + NTB 多糖组 2 模型组 3 正常对照组  
 1 Model + NTB polysaccharide Group 2 Model Group 3 Normal Group

图 2 RT - PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 RT - PCR agarose gel electrophoresis

图 2 显示,半定量分析 NTB 对小鼠脾细胞中 IFN- $\gamma$  mRNA 表达的影响,其目的条带与内参( $\beta$ -actin)相比较,模型+NTB 组可明显增强 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达( $P < 0.05$ ),并使免疫受抑小

鼠模型 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达接近正常对照组水平。

2.4 NTB 多糖对外周血 T/NK 细胞亚群的影响(表 4,图 3~5)

表 4 NTB 多糖对外周血淋巴细胞/NK 细胞亚群的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	NK (%)
正常对照组	12	66.2 ± 16.36	33.1 ± 3.06	19.3 ± 1.40	22.5 ± 0.29
模型组	12	38.6 ± 8.24*	13.5 ± 9.07*	11.1 ± 8.86*	10.8 ± 2.04*
模型 + NTB 多糖组	12	67.4 ± 13.06 <sup>▲</sup>	32.6 ± 2.30 <sup>▲</sup>	17.6 ± 6.42 <sup>▲</sup>	21.7 ± 1.03 <sup>▲</sup>
<i>F</i>		18.881	46.382	5.542	289.835
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: \* 表示与正常对照组比较  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup>表示与模型组比较  $P < 0.05$ . Notes: \* compared with normal group  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup> compared with model group  $P < 0.05$ .

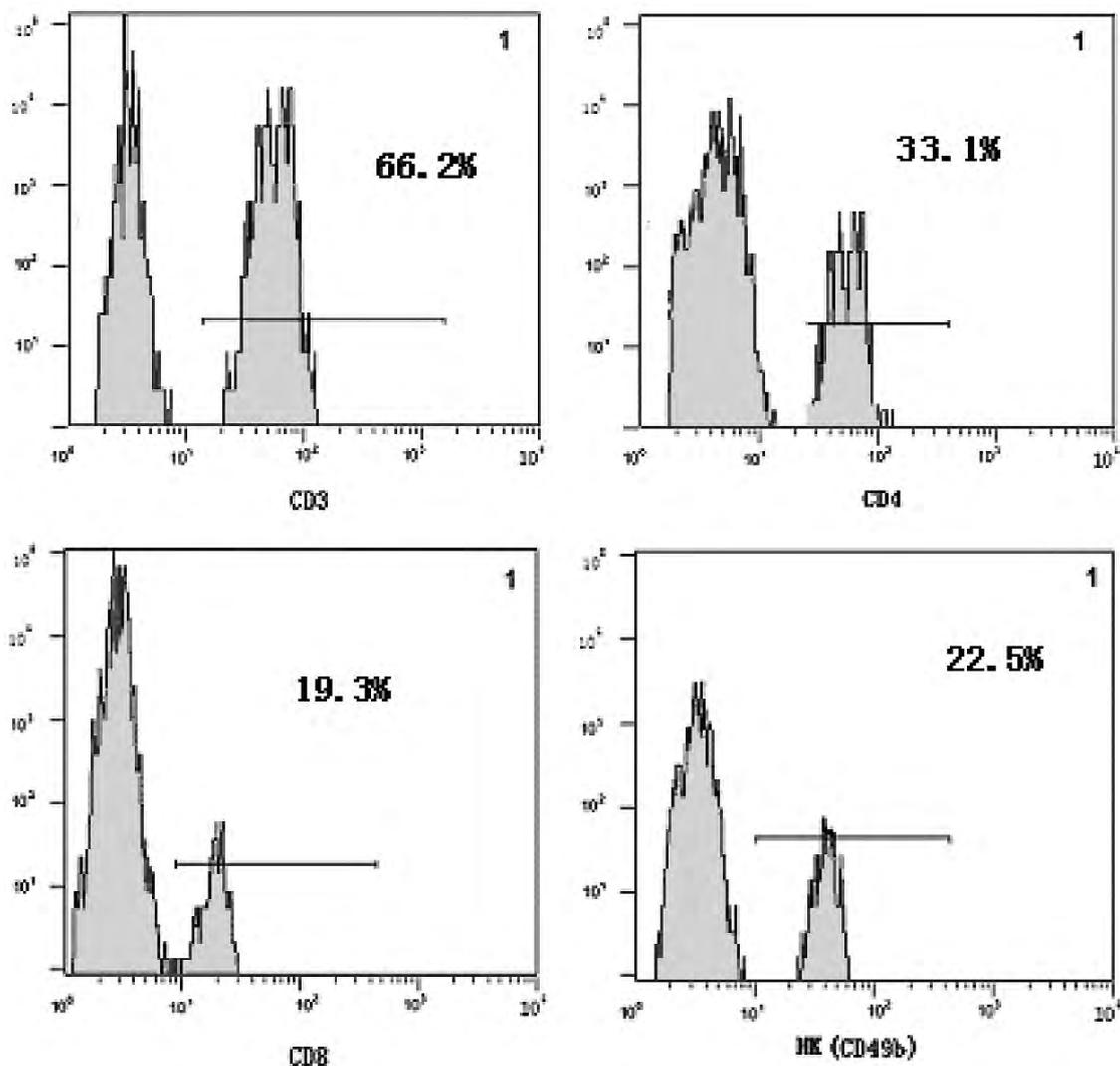


图 3 正常对照组 CD3、CD4、CD8 及 NK 细胞比值

Figure 3 The ratio of CD3 ,CD4 ,CD8 and NK cells in Normal Group

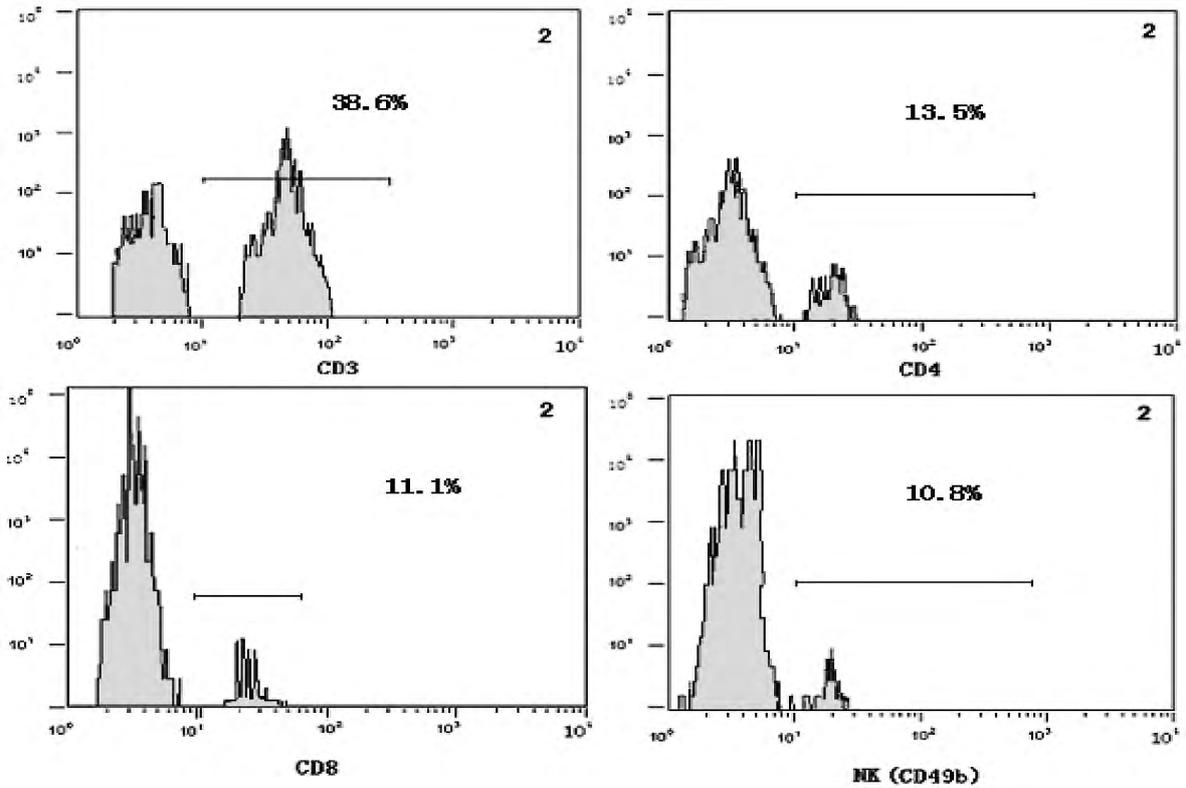


图4 模型组 CD3、CD4、CD8 及 NK 细胞比值

Figure 4 The ratio of CD3 ,CD4 ,CD8 and NK cells in Normal Group

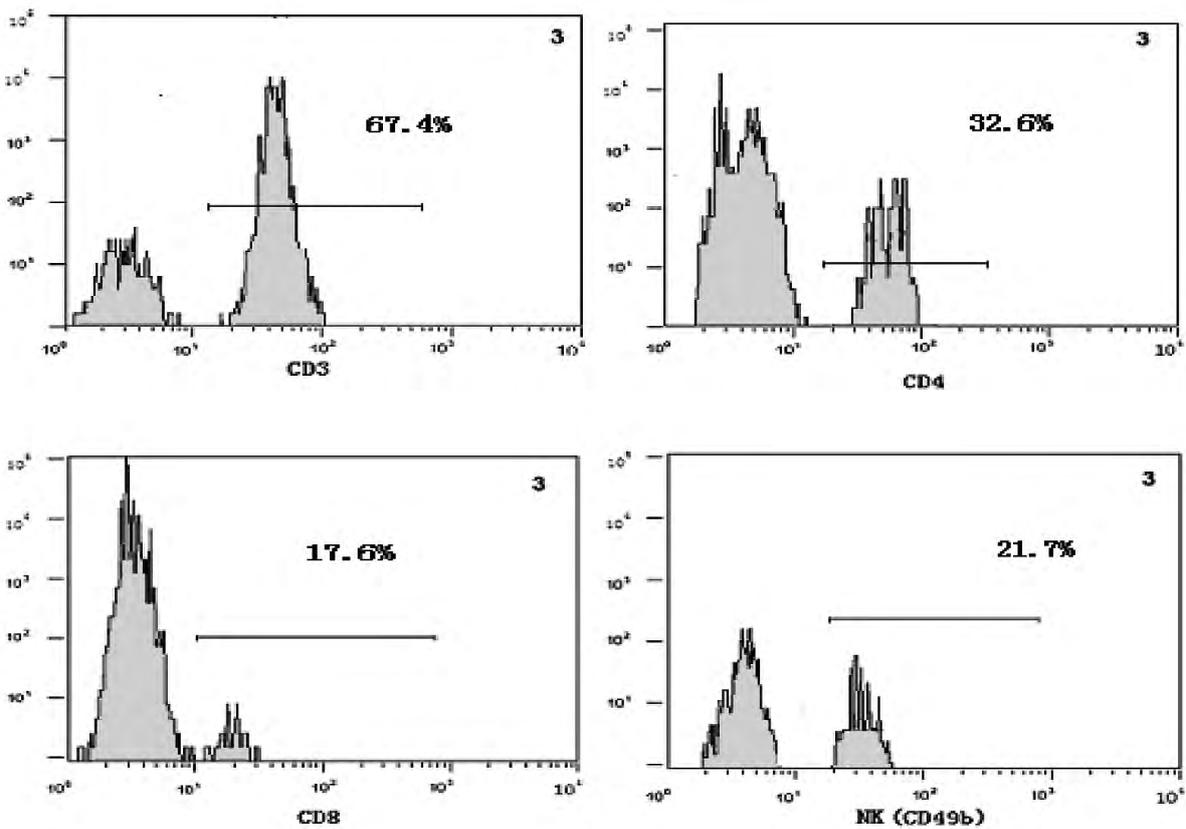


图5 模型 + NTB 多糖组 CD3、CD4、CD8 及 NK 细胞比值

Figure 5 The ratio of CD3 ,CD4 ,CD8 and NK cells in Model + NTB polysaccharide Group

表4及图3~5可见,与模型组相比,模型+NTB组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、NK(CD49b)细胞显著升高( $P < 0.05$ ),说明NTB多糖对免疫受抑小鼠T细胞亚群及NK细胞具有保护和促进作用。

### 3 讨论

近年来,国内外学者对中药多糖从不同角度进行了大量研究,并逐步阐明其化学、生理学和药理学等多方面的性质<sup>[5-6]</sup>。

本研究在索有瑞等前期工作基础上,利用NTB多糖对小鼠免疫受抑模型进行干预,观察其免疫器官及细胞因子、淋巴细胞亚群、NK细胞在内的多项指标。实验结果表明,NTB多糖对免疫受抑小鼠模型受损的脾、胸腺具有保护作用。这与张乐萃等以复方中药多糖,张晓冬用大枣和地黄多糖观察其对免疫器官影响的研究结果有相同之处<sup>[7-8]</sup>。

IFN- $\gamma$ 是诸多细胞因子的一种,它能对宿主免疫细胞活性产生影响,如对巨噬细胞、T细胞、B细胞和NK细胞等均有调节作用<sup>[9]</sup>。本实验中我们观察到,NTB多糖能增强免疫受抑小鼠脾细胞中IFN- $\gamma$ 的mRNA表达,亦能增加血清中IFN- $\gamma$ 含量。

T细胞亚群按其CD抗原主要分为三类,其中CD3主要代表成熟T细胞,而CD4则代表辅助性T细胞(Th),CD8代表抑制性T细胞(Ts)<sup>[10]</sup>。临床上,通过检测外周血T细胞亚群及Th/Ts比值了解患者的免疫状态。可以说,Th和Ts亚群是免疫应答的核心枢纽。本实验中,NTB多糖可上调由免疫抑制剂环磷酰胺导致的T细胞亚群数量降低,对免疫系统呈现有效的保护作用。NK细胞作为天然免疫系统的重要效应细胞,通过介导细胞毒性免疫反应,分泌细胞因子等途径发挥免疫监视、免疫调节的重要功能。本实验中,NTB多糖亦能提高低下的NK(CD49b),这说明对以NK为代表的非特异性免疫也有较强的调整作用。朱彩平、张声华报道,枸杞多糖对肝癌H22荷瘤鼠的T淋巴细胞和NK细胞活性具有增强作用<sup>[11]</sup>。谭周进、谢大凭和Ims A等也有类似的报道<sup>[12-13]</sup>。

NTB多糖的特殊结构可能有利于宿主免疫系统的识别,不仅能提高机体的非特异性免疫,还能够提高特异性免疫。至于其提高和调整免疫功能详细机制有待进一步研究。

### 参考文献

- [1]索有瑞,王洪伦,汪汉卿.柴达木盆地唐古特白刺果实降血脂和抗氧化作用研究[J].天然产物研究与开发,2004,16(1):54-58.
- [2]朱利娜,张伟,史俊友,等.唐古特白刺果粉的抗氧化作用研究[J].中国野生植物资源,2010,29(2):41-44.
- [3]马挺军,徐芝青.西伯利亚白刺籽油的抗疲劳活性[J].中国实验动物学报,2012,20(5):77-79.
- [4]索有瑞,李玉林,王洪伦,等.柴达木盆地唐古特白刺果实调节免疫、抗疲劳和耐寒冷作用研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(6):717-721.
- [5]常改,杨溢,霍飞,等.植物多糖的研究进展及保健功能[J].中国公共卫生,2003,19(11):1394-1395.
- [6]陶遵威,郑夺,邱明磊,等.植物多糖的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(2):148-152.
- [7]张乐萃,王金宝,孙月平,等.复方中药多糖对鸡免疫器官形态学的影响[J].中国兽医科技,1998,28(8):26-28.
- [8]张晓冬.两种中药多糖对小鼠性腺及免疫器官的影响[J].中国保健营养(中旬刊),2013,10:42-44.
- [9]B. Wei, S. Baker, J. Wiecekiewicz, et al. IFN- $\gamma$  Triggered STAT1 - PKB/AKT Signalling Pathway Influences the Function of Alloantigen Reactive Regulatory T Cells[J]. American Journal of Transplantation, 2010, 10(1):69-80.
- [10]Marik Jutel, Cezim A. Akdis. T Cell Subset Regulation in Atopy[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2011, 11(2):139-145.
- [11]朱彩平,张声华.枸杞多糖对肝癌H22荷瘤鼠的抑瘤和免疫增强作用[J].营养学报,2006,28(2):182-183.
- [12]谭周进,谢大凭.多糖的研究进展[J].食品科技,2002,(3):10-12.
- [13]Ims A, Kim K, Lee CK. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(9):1451-1458.

收稿日期 2015-01-05