

雪樱子多糖对鸡淋巴细胞体外增殖的影响分析

成好学^{1,2}, 张萍^{1*}, 姚宏亮¹

(1. 金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038; 2. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022)

摘要:为探讨雪樱子多糖(AcLP)对鸡淋巴细胞体外增殖的影响,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定 AcLP 的安全浓度,并检测不同浓度的 AcLP 单独或协同伴刀豆球蛋白(ConA)对鸡淋巴细胞增殖的影响。结果显示:AcLP 对鸡外周血淋巴细胞的最高安全浓度为 $13.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。AcLP 浓度在 $0.026 \sim 1.703 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,单独刺激鸡外周血和脾脏淋巴细胞,其吸光度值均显著高于细胞对照组;协同 ConA 时,其吸光度值均显著高于 ConA 对照组。AcLP 浓度在 $0.053 \sim 1.703 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,协同 ConA 刺激鸡脾脏淋巴细胞时,其吸光度值均显著高于 ConA 对照组。表明 AcLP 单独或协同 ConA 均可对鸡外周血淋巴细胞和脾脏淋巴细胞体外增殖起到促进作用。

关键词:雪樱子多糖;鸡淋巴细胞;体外增殖;伴刀豆球蛋白

中图分类号:S831

文献标识码:A

文章编号:1672-755X(2021)01-0088-05

Analysis on the Effect of Polysaccharides from *Amaranthus caudatus* L. on the Proliferation of Chicken Lymphocytes *in Vitro*

CHENG Hao-xue^{1,2}, ZHANG Ping^{1*}, YAO Hong-liang¹

(1. Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; 2. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: To study the effect of polysaccharides from *Amaranthus caudatus* L. (AcLP) on the proliferation of chicken lymphocytes *in vitro*, MTT method was used to determine safe concentration of AcLP and the effect of different concentration of AcLP alone or in combination with concanavalin(ConA) on the proliferation of chicken lymphocytes. The results showed that the safe concentration of AcLP to the spleen lymphocyte of chicken was $13.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. When the chicken peripheral blood lymphocyte or the chicken spleen lymphocyte was stimulated by AcLP in $0.026 \sim 1.703 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, its absorbance value was significantly higher than that of the cell control group. When the chicken peripheral blood lymphocyte was stimulated by AcLP + ConA, its absorbance value was significantly higher than that of the ConA control group; when the chicken spleen lymphocyte was stimulated by $0.053 \sim 1.703 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ AcLP + ConA, its absorbance value was significantly higher than that of the ConA control group. In summary, AcLP can not only stimulate the proliferation of peripheral blood lymphocytes and spleen lymphocytes *in vitro*, but also have synergistic effect with ConA.

Key words: polysaccharide from *Amaranthus caudatus* L.; chicken lymphocyte; *in vitro* proliferation; ConA

雪樱子(*Amaranthus caudatus* L.)为一年生草本植物,学名尾穗苋,又称仙人谷、老枪谷等^[1],在我国各地均可种植,其作为药食两用的植物在我国一些地区的药物志中已有记载。《全国中草药汇编》记载雪樱子的根须入药后具有止痛消肿的功效,可用于治疗跌打损伤和恶疮肿毒等;《中华草药》记载雪樱子叶具

收稿日期:2020-12-04

基金项目:金陵科技学院大学生创新训练计划项目(201913573084X);江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(17)3035);金陵科技学院校级“创客”虚拟班持续建设项目(2017009,2017008)

作者简介:成好学(1998—),男,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事动物疾病的药物应用研究。

通信作者:张萍(1979—),女,江苏沛县人,副教授,博士,主要从事兽医教学与新兽药研发工作。

有抗肿瘤、抗溃疡的作用^[2]。《湖南药物志》将其根收录为药,认为雪樱子根具有强壮滋补功效;《云南中药资源名录》将其种子收录为药,认为雪樱子的种子具有治疗麻疹和小儿水痘以及清热解毒的功效^[3]。

近年来国内外学者对雪樱子的化学成分及功效进行了研究,发现雪樱子化学成分复杂,主要含有三萜类、黄酮类、多糖、甾醇等^[3]。其中,雪樱子多糖作为植物多糖的一种,在临床上具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等功效^[4],这可能与其清除 DPPH 自由基有关。但有关雪樱子多糖在动物生产上的应用研究较少。本试验以雪樱子为原料,采用水提醇沉法提取雪樱子多糖,以四甲基偶氮唑蓝(MTT)法探讨不同浓度的雪樱子多糖及其协同伴刀豆球蛋白(ConA)对鸡外周血淋巴细胞和脾脏淋巴细胞体外增殖的影响,为雪樱子多糖在畜禽养殖上的进一步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

雪樱子由金陵科技学院动物科学与技术学院食品科学与工程系实验室提供;鸡外周血淋巴细胞分离试剂盒与鸡脾脏淋巴细胞分离试剂盒(包括全血及组织稀释液、分离液和洗涤液)、MTT、ConA 均购自上海索莱宝科技有限公司;RPMI1640 培养液购自苏州博美达试剂仪器有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海卓锐化工有限公司。

1.2 仪器

真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),微孔板分光光度计(EPOCH,美国 Bio Tek 公司),低温高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),倒置荧光显微镜(南京斯高谱仪器有限公司)。

1.3 试验材料

健康公鸡 2 只,2 月龄,由南京汤泉养殖场提供。

1.4 试验方法

1.4.1 雪樱子多糖的提取

采用水提醇沉法提取雪樱子多糖^[5]。雪樱子粉末与水以 1:20 混匀,95℃ 恒温水浴 6 h,纱布过滤除去废渣。将过滤后的液体浓缩至原液的 1/7 后加入 95% 的酒精,使液体中酒精的体积分数为 80%,4℃ 冰箱中静置一夜,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,将下层沉淀物置于真空冷冻干燥机中干燥成粉末,得雪樱子多糖,用苯酚-硫酸法检测雪樱子多糖含量。

1.4.2 安全浓度测定

MTT 法检测雪樱子多糖对鸡淋巴细胞的安全浓度^[6]。以 RPMI1640 培养液为稀释液,将雪樱子多糖浓度配置成 54.50 mg·mL⁻¹,并倍比稀释 11 个浓度,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4℃ 保存备用。

取 2 月龄健康公鸡,翅下静脉无菌采集 5 mL 抗凝血,与等量样本稀释液混匀,置于 10 mL 的外周血淋巴细胞分离液上层,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min。取云雾层内细胞至另一只离心管内,加适量清洗液,轻轻吹打混匀,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。用洗涤液重复洗涤一次。弃上清,用 RPMI1640 培养液稀释淋巴细胞至 5×10⁶ cfu·mL⁻¹ 备用。

取适量细胞悬液以 100 μL·孔⁻¹ 接种至 96 孔细胞培养板,各浓度雪樱子多糖 100 μL·孔⁻¹,每个浓度均重复 4 个孔,同时设细胞对照组。用 D-Hank's 液封闭一圈。5% CO₂ 培养箱 37℃ 条件下培养 44 h 后,每孔加入 20 μL MTT(0.5 mg·mL⁻¹)溶液,继续培养 4 h,取出后 4℃ 离心 10 min,弃上清,每孔加 100 μL DMSO 液,震荡 5 min,检测淋巴细胞培养液 570 nm 处吸光度(A₅₇₀ 值)。以 A₅₇₀ 值不显著低于细胞对照组的多糖最高浓度作为本次实验的最高安全浓度。

根据安全浓度的测定结果,用细胞培养液将雪樱子多糖自 1.703 mg·mL⁻¹ 倍比稀释至 0.026 mg·mL⁻¹,备用。

1.4.3 单独刺激鸡外周血淋巴细胞增殖

取适量细胞悬液以 100 μL·孔⁻¹ 接种至 96 孔细胞培养板,各浓度雪樱子多糖 100 μL·孔⁻¹,每个浓度均重复 4 个孔,同时设细胞对照组,检测 A₅₇₀ 值。当处理组 A₅₇₀ 值显著高于细胞对照组时,说明处理对

淋巴细胞有明显的增殖促进作用,下同。

1.4.4 协同 ConA 刺激鸡外周血淋巴细胞增殖

取 96 孔细胞培养板,每孔依次加入 80 μL 外周血淋巴细胞悬液、20 μL ConA 溶液(终浓度 45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、100 μL 各浓度雪樱子多糖,每个浓度重复 4 孔,同时设 ConA 对照组及细胞对照组,检测其 A_{570} 值。

1.4.5 单独刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖

在无菌条件下取 2 月龄健康公鸡脾脏,用 3 倍体积的细胞稀释液研磨脾脏成液体,吸取等体积鸡脾脏淋巴细胞分离液于无菌离心管中,将研磨好的脾脏液体加于分离液上层,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。吸取清洗步骤同 1.4.2 节,最后用 RPMI1640 细胞培养液将分离的脾脏淋巴细胞重悬至 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

取适量细胞悬液以 100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 接种至 96 孔细胞培养板,各浓度雪樱子多糖 100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,每个浓度均重复 4 个孔,同时设细胞对照组,检测其 A_{570} 值。

1.4.6 协同 ConA 刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖

取 96 孔细胞培养板,每孔依次加入 80 μL 脾脏淋巴细胞悬液,ConA 溶液、雪樱子多糖、ConA 对照组及细胞对照组等自己制或处理方法同 1.4.4 节,检测其 A_{570} 值。

1.4.7 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行单因素方差分析和多重比较,结果以“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 雪樱子提取物多糖质量分数测定结果

以 A_{570} 值和葡萄糖质量浓度绘制标准曲线,得线性方程 $y = 0.3562x - 0.0128 (R^2 = 0.9993)$ 。根据雪樱子提取物的 A_{570} 值,计算得出雪樱子提取物多糖质量分数为 16.59%。

2.2 雪樱子多糖对细胞安全浓度测定结果

如表 1 所示,当雪樱子多糖培养液质量浓度为 0.053~13.625 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其吸光度值不显著低于细胞对照组。以雪樱子多糖组的 A_{570} 值不显著低于细胞对照组时的最高浓度作为最大安全浓度,本实验中雪樱子多糖对鸡外周血淋巴细胞的最高安全浓度为 13.625 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其中雪樱子多糖浓度在 1.703 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下时,其 A_{570} 值显著高于细胞对照组 ($P < 0.05$),因此后续淋巴细胞增殖试验选择雪樱子多糖浓度自 1.703 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 倍比稀释。

表 1 雪樱子多糖安全浓度测定结果

AcLP 终浓度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A_{570} 值
54.500	0.110 $\pm$ 0.003 ^a
27.250	0.119 $\pm$ 0.001 ^a
13.625	0.172 $\pm$ 0.003 ^b
6.812	0.181 $\pm$ 0.005 ^b
3.406	0.181 $\pm$ 0.004 ^b
1.703	0.196 $\pm$ 0.004 ^c
0.851	0.282 $\pm$ 0.019 ^e
0.425	0.358 $\pm$ 0.005 ^f
0.212	0.332 $\pm$ 0.014 ^g
0.106	0.271 $\pm$ 0.012 ^e
0.053	0.210 $\pm$ 0.004 ^d
细胞对照组	0.180 $\pm$ 0.003 ^b

注:同列数据后标注的不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

2.3 单独刺激鸡外周血淋巴细胞增殖的结果

如表 2 所示,0.026~1.703 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AcLP 单独刺激鸡外周血淋巴细胞时,各处理组的 A_{570} 值均

显著大于细胞对照组的 A_{570} 值 ($P<0.05$)。其中雪樱子多糖浓度为 $0.026\sim0.425\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, A_{570} 值随着多糖浓度的增大而升高, 呈现出一定的剂量-反应关系。

2.4 协同 ConA 刺激鸡外周血淋巴细胞增殖的结果

如表 2 所示,雪樱子多糖浓度在 $0.026\sim1.703\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时协同 ConA 刺激鸡外周血淋巴细胞,各处理组的 A_{570} 值均显著高于 ConA 对照组 ($P<0.05$) 和细胞对照组 ($P<0.05$)。其中雪樱子多糖浓度在 $0.026\sim0.212\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,协同 ConA 作用呈现出一定的剂量-反应关系。

表 2 雪樱子多糖刺激鸡外周血淋巴细胞增殖的试验结果

AcLP 终浓度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AcLP 单独刺激鸡外周血淋巴细胞时的 A_{570} 值	AcLP 与 ConA 协同刺激鸡外周血淋巴细胞时的 A_{570} 值
1.703	1.374 ± 0.008^e	1.782 ± 0.008^e
0.851	1.401 ± 0.004^{ef}	1.889 ± 0.006^f
0.425	1.433 ± 0.015^f	1.889 ± 0.073^f
0.212	1.431 ± 0.021^f	1.911 ± 0.008^f
0.106	1.233 ± 0.024^d	1.814 ± 0.004^e
0.053	1.139 ± 0.024^c	1.642 ± 0.053^d
0.026	1.042 ± 0.044^b	1.568 ± 0.014^c
ConA 对照组	—	1.433 ± 0.004^b
细胞对照组	0.932 ± 0.010^a	0.932 ± 0.010^a

2.5 单独刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖的结果

如表 3 所示, $0.026\sim1.703\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AcLP 单独刺激鸡脾脏淋巴细胞时,各多糖浓度组的 A_{570} 值均显著大于细胞对照组的 A_{570} 值 ($P<0.05$)。其中雪樱子多糖浓度在 $0.026\sim0.425\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, A_{570} 值随着多糖浓度的增大而升高, 呈现出一定的剂量-反应关系。

2.6 协同 ConA 刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖的结果

如表 3 所示,雪樱子多糖浓度在 $0.053\sim1.703\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时协同 ConA 刺激鸡脾脏淋巴细胞,各处理组的 A_{570} 值均显著高于 ConA 对照组 ($P<0.05$) 和细胞对照组 ($P<0.05$)。其中雪樱子多糖浓度在 $0.053\sim0.425\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,协同 ConA 作用呈现出一定的剂量-反应关系。

表 3 雪樱子多糖刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖的试验结果

AcLP 终浓度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AcLP 单独刺激鸡脾脏淋巴细胞时的 A_{570} 值	AcLP 与 ConA 协同刺激鸡脾脏淋巴细胞时的 A_{570} 值
1.703	1.038 ± 0.030^d	1.470 ± 0.020^c
0.851	1.143 ± 0.005^e	1.563 ± 0.016^d
0.425	1.235 ± 0.021^f	1.897 ± 0.004^e
0.212	1.166 ± 0.014^e	1.842 ± 0.003^f
0.106	1.143 ± 0.005^e	1.753 ± 0.026^e
0.053	0.940 ± 0.031^c	1.586 ± 0.047^d
0.026	0.843 ± 0.027^b	1.395 ± 0.014^b
ConA 对照组	—	1.379 ± 0.017^b
细胞对照组	0.713 ± 0.008^a	0.566 ± 0.029^a

3 结论与讨论

本实验采取水提醇沉法提取雪樱子多糖,通过苯酚-硫酸法测定其质量分数为 16.59%。由于雪樱子多糖浓度过高时,会因黏稠无法通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜,因此本实验在测定安全浓度时选择雪樱子多糖最高浓度 $54.50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行倍比稀释。

多糖类化合物能通过多种机制激活免疫系统,刺激免疫细胞增殖,提高机体特异性或非特异性免疫功

能,淋巴细胞增殖能力是评价机体免疫功能的重要指标,因此淋巴细胞增殖试验广泛应用于免疫增强药物的初步筛选试验中^[7-8]。脾脏是机体最大的外周淋巴器官,占全身淋巴组织总量的25%,是机体细胞免疫和体液免疫的中心;外周血淋巴细胞,主要是血液循环中的淋巴细胞,由T细胞和B细胞组成。故本实验采用外周血和脾脏淋巴细胞进行实验。实验采取MTT法测定淋巴细胞增殖情况,该方法灵敏度高、特异性好、重复性好,是检测细胞存活和生长的常用方法^[9],临床常用于检测药物对淋巴细胞功能的影响以判断药物活性的强度。ConA有凝集细胞和促进有丝分裂的作用。耿克祥等^[10]把ConA与PHA分别用于细胞培养,发现ConA制备的染色体标本片分裂相较多,因此认为ConA不仅可以刺激B淋巴细胞,还能刺激T淋巴细胞。目前,研究者常以中药多糖单独或协同ConA刺激淋巴细胞增殖作为判断中药多糖体外对细胞免疫调节功能的基本指标,因此本实验使用ConA协同AcLP刺激鸡淋巴细胞体外增殖。试验结果表明,雪樱子多糖浓度为 $0.026\sim 1.703\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,单独或协同ConA,能够显著促进鸡外周血淋巴细胞增殖;单独刺激能够显著促进鸡脾脏淋巴细胞增殖。雪樱子多糖浓度为 $0.053\sim 1.703\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,协同ConA能够显著促进鸡脾脏淋巴细胞增殖。综上所述,在一定浓度范围内,雪樱子多糖单独或协同ConA都能显著增强鸡淋巴细胞免疫活性,其中雪樱子多糖浓度为 $0.425\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对鸡淋巴细胞体外增殖效果最为显著。

本文通过研究雪樱子多糖对健康鸡外周血细胞和脾脏淋巴细胞体外增殖的影响,初步确定了雪樱子多糖具有增强体外免疫的作用,为进一步研究雪樱子多糖的体内免疫作用提供参考。

参考文献:

- [1] 覃丽清,刘贤贤,罗淑瑛,等.雪樱子低极性成分的GC-MS对比分析[J].安徽农业科学,2015,43(14):81-83
- [2] 刘丹,杜泽宇,陈鑫,等.牡丹江地区雪樱子的药用价值与栽培技术[J].甘肃农业科技,2016(10):83-84
- [3] 覃丽清.雪樱子抗氧化、抗肿瘤活性筛选及化学成分的研究[D].桂林:广西师范大学,2015
- [4] 玄永浩,金银哲,刘旭,等.苋菜药理作用研究进展[J].长江蔬菜,2010(22):1-4
- [5] 姚宏亮,孔聪聪,颜玉华.雪樱子粗多糖提取、纯化工艺及抗氧化活性研究[J].食品科学技术学报,2019,37(2):102-110
- [6] 董汝晶.多糖提取方法的研究进展[J].农产品加工(学刊),2014(8):46-48
- [7] 张萍.赤灵芝多糖抗病毒活性和增强免疫作用研究[D].南京:南京农业大学,2015
- [8] 夏继涛,成好学,姚宏亮,等.黄秋葵多糖对鸡淋巴细胞体外增殖的影响[J].金陵科技学院学报,2020,36(3):82-86
- [9] 梁宏伟,朱雯宇,冯波,等.MTT法检测大鼠外周血淋巴细胞增殖反应探讨与应用[J].中国农学通报,2016,32(26):21-26
- [10] 耿克祥,闫守庆,李冰,等.ConA与PHA在猪染色体制备中的比较[J].河北北方学院学报(自然科学版),2006(6):36-39

(责任编辑:湛江)