

## 壳聚糖载黄芪多糖纳米粒调节糖尿病小鼠免疫功能

董德刚,吴亚芬,裘 梁,喻治达\*

江西中医药大学基础医学学院,南昌 330004

**摘要:**研究低分散度壳聚糖载黄芪多糖纳米粒(LCA)对糖尿病(DM)小鼠免疫功能的影响。注射链脲佐菌素与环磷酰胺混合试剂建立DM合并免疫力低下小鼠模型,酶法制备低分散度壳聚糖,离子交联法制备低分散度壳聚糖纳米粒,超声包埋黄芪多糖制备药物对昆明小鼠灌胃,每天1次,连续30d。ELISA法检测小鼠血清IgM、IgG与INF- $\gamma$ 的含量,碳粒廓清法测定非特异性免疫功能,耳肿胀法检测迟发型变态反应,MTT法检测脾淋巴细胞增殖率以反映细胞免疫功能。结果显示灌胃350 mg/(kg·d) LCA显著提高血清IgM、IgG的分泌,显著降低INF- $\gamma$ 表达量,增强碳粒廓清率,提高小鼠迟发型变态反应(DTH),改善脾淋巴细胞增殖反应。适当剂量的低分散度壳聚糖载黄芪多糖纳米粒能提高DM小鼠体液免疫、非特异性免疫及细胞免疫功能,且效果优于纯黄芪多糖。

**关键词:**壳聚糖;黄芪多糖;纳米粒;DM小鼠;免疫功能

中图分类号:R392.11

文献标识码:A

## Astragalus Polysaccharide Nanoparticle Adjusts Immune Function of Diabetes Mellitus Mice

DONG De-gang, WU Ya-fen, QIU Liang, YU Zhi-da\*

Basic Medical School, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of astragalus polysaccharide (APS) nanoparticle (using chitosan as carrier) with low dispersion on immune function of diabetes mellitus (DM) mice. The DM low immunity mice model was developed by injecting cephalosporins and cyclophosphamide. The low dispersion chitosan was prepared by enzymatic method. The low dispersion chitosan APS nanoparticle was then prepared by ultrasonic embedding. The prepared sample was gavaged to the developed mice model, one time a day and for 30 d. The levels of IgM, IgG and INF- $\gamma$  of DM mice serum were determined by ELISA method. The nonspecific immune function of DM mice was determined by carbon clearance method. The delayed type hypersensitivity (DTH) was determined by ear swelling method and the spleen lymphocyte proliferation rate was determined by MTT assay and was used to reflect the cellular immune function. The experimental results showed that the 350 mg/(kg·d) LCA group significantly increased the secretion of serum IgM and IgG, significantly reduced the INF- $\gamma$  expression, enhanced the carbon clearance rate, improved the mice DTH, improved spleen lymphocyte proliferation reaction. It indicated that appropriate doses of low dispersion chitosan APS nanoparticle can improve DM mice humoral immunity, nonspecific immunity and cellular immunity function, can reduce the incidence of DM complicated with infection. The effect of low dispersion chitosan APS nanoparticle was better than that of pure APS.

**Key words:** chitosan; astragalus polysaccharides; nanoparticles; DM mice; immune function

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种多发性内分泌代谢性疾病,常伴有红细胞免疫功能、补体、体液免疫和T细胞亚群的异常<sup>[1]</sup>。目前用于治疗的调节机体免疫功能的西药,如白蛋白、免疫球蛋白不

仅价格较贵,患者很难长期应用,且停药后易反复,不能根疗。天然产物在调节机体免疫功能方面具有独特优势,已被广泛关注。大量研究表明,从天然药物黄芪中提取的黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS)具有提高机体免疫力与降血糖作用<sup>[2]</sup>。另外,将药物制备成载药纳米粒,可使大分延长药物在体内的循环时间,有效提高药物的利用度,并减少

收稿日期:2013-06-03 接受日期:2013-11-06

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81260604);江西卫生厅中医药课题项目(2011A131)

\* 通讯作者 Tel:86-791-87105505; E-mail: andydau@126.com

副作用<sup>[3,4]</sup>。

本实验以自制的低分散度壳聚糖纳米粒为载体,包埋 APS,制备低分散度壳聚糖载黄芪多糖纳米粒(Low dispersion chitosan load astragalus polysaccharide nanoparticle, LCA),研究其调节 DM 小鼠免疫功能及其机制,为降低 DM 并发症的发病率提高可能的方向和实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

壳聚糖(CS),脱乙酰度 91.3%,黏度为 113 mPa·s,江西省黎川新鑫生物有限公司;壳聚糖酶、黄芪多糖(纯度为 71.6%)均为实验室自制;SD 昆明种(KM)小鼠(体重 23 ± 3g),雌雄各半,由江西中医药大学实验动物科技中心提供,合格证号 JZDW No:2012-0064;链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 编号 SB0130-100 g),上海生工;环磷酰胺(国药准字 H32026196),江苏恒瑞;ELISA 试剂盒均购于武汉博士德;刀豆蛋白(ConA)、MTT 购于 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UV1102 型紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);DIF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);恒温培养箱(国华电器有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);550 型酶标仪(美国 Bio-Rad);Biofuge stratos 型高速冷冻离心机(德国 Hereaus);RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);ONE TOUCH SureStep 血糖仪及其配套试纸(美国强生)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 低分散度壳聚糖载黄芪多糖纳米粒(LCA)的制备

采用自制内切壳聚糖酶降解,粘度法<sup>[5]</sup>测定低分散度壳聚糖粘均分子量为  $1.79 \times 10^5$  Da,离子交联法<sup>[6]</sup>制备低分散度壳聚糖纳米粒,冷冻干燥,待用。

将 APS 与上述低分散度壳聚糖纳米粒按一定比例混合(以壳聚糖氨基含量为准,APS 过量),加一定量的蒸馏水,室温下 24 kHz 超声 10 min,充分溶解后转移至透析袋内,置于 1L 蒸馏水中透析 24 h,在 12 h 更换新鲜蒸馏水,24 h 后将透析袋中溶液 8000 rpm 离心 10 min,除去未包埋 APS,上清液冷冻

干燥得 LCA,采用紫外分光光度法测定黄芪多糖含量<sup>[7]</sup>,差量法计算低分散度壳聚糖纳米粒载药量:

$$\text{包封率}(\%) = (1 - \text{上清 APS 质量} / \text{APS 总质量}) \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = (1 - \text{纳米粒中 APS 质量} / \text{纳米粒总质量}) \times 100\%$$

#### 1.3.2 动物分组与给药

KM 小鼠 80 只,随机分组,每组 16 只,设模型组,APS 组,LCA 低、中、高剂量组。各组适应饲养 1 周后,禁食 12 h 后腹腔一次性注射 60 mg/kg STZ 溶液(pH 4.5, 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液,0.22 μm 滤膜除菌),72 h 后眶后静脉丛采血,测血糖。以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者为造模成功,血糖值 < 16.7 mmol/L 者追加 25 mg/kg STZ。DM 小鼠腹腔注射给药,低、中、高剂量组灌胃 150、350、450 mg/(kg·d) LCA,模型组灌胃等量生理盐水,APS 组灌胃 280 mg/(kg·d) 黄芪多糖。给药 15d 后各组均腹腔注射 80 mg/(kg·d) 环磷酰胺,连续 3 d,获得 DM 小鼠免疫力低下模型。各组小鼠均连续灌胃 30 d。

#### 1.3.3 耳肿胀法检测小鼠迟发型变态反应(DTH)

于给药后第 4 d,各组取 8 只小鼠,硫化钡腹部脱毛范围约 3 cm × 3 cm,在去毛部位均匀涂抹 1% 二硝基氟苯(DNFB)丙酮溶液 50 μL/只致敏,次日同剂量加强 1 次。于第 30 d 末次给药 1 h 后,将 1% DNFB 均匀涂抹于小鼠右耳 10 μL/只,使局部产生迟发型变态反应(水肿),24 h 后处死小鼠,用 8 mm 打孔器打取两耳相同部位的耳片,称质量,以左右耳片质量之差为肿胀度(mg),肿胀度越大,提示反应越强。

#### 1.3.4 ELISA 法检测小鼠血清 IgM、IgG 与 INF-γ 含量

于末次给药 2 h 后,眼眶取血制备血清,用双抗体夹心 ELISA 法检测血清中 IgM、IgG 和 INF-γ 的水平(严格按照试剂盒说明操作)。

#### 1.3.5 碳粒廓清法测定非特异性免疫功能

上述小鼠尾静脉注射经稀释的印度墨汁 0.05 mL/10 g,于 1.5 min 后,分别从眼眶静脉取血 20 μL 加到 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 mL 中摇匀,于 600 nm 处测定 1 min (t<sub>1</sub>) 和 5 min (t<sub>5</sub>) 的光密度(OD<sub>1</sub> 和 OD<sub>5</sub>),计算碳粒廓清指数 K 和吞噬指数 α 之后,将小鼠处死,取肝脏、脾脏及胸腺称重,计算其脏器系数。

$$\text{碳粒廓清指数 } K = (\log OD_1 - \log OD_5) / (t_5 - t_1) = \log(OD_1 / OD_5) / 4$$

吞噬指数  $\alpha = \text{体重}/\text{肝脾重} \times K^{1/3}$

### 1.3.6 脾淋巴细胞增殖率的测定

上述处死后小鼠在无菌条件下取脾,常规制备脾细胞悬液<sup>[8]</sup>。在96孔平底培养板每孔中分别加入100  $\mu\text{L}$  上述脾细胞悬液(终浓度为  $1 \times 10^9/\text{mL}$ )与100  $\mu\text{L}$  浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ConA,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养48 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5  $\text{mg}/\text{mL}$ ),再继续培养12 h。取出培养板,2000 rpm 离心5 min,弃上清液,每孔加入100  $\mu\text{L}$  二甲亚砜(DMSO),充分振荡30 s后,静置20 min,于570 nm 处用酶标仪进行比色分析。

### 1.3.7 统计学处理

所有数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,应用SPSS21.0 统计软件进行分析,方差不齐时采用

Tamhane's T2 法各组间比较采用单因素方差分析及LSD 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 LCA 药物包封率与载药量

获得的 APS 壳聚糖纳米粒冻干粉表面蓬松,可溶性良好。平均包封率为(73.672  $\pm$  3.6)%,平均载药量为(18.63  $\pm$  1.13)%。

### 2.2 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠 DTH 的影响

由表1可知,灌胃给药30 d后,免疫力低下 DM 小鼠不同剂量的 LCA 与 APS 耳肿胀度明显高于模型组,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。而 APS 组耳肿胀度与低剂量 LCA 组差异不显著,中、高剂量组耳肿胀度均显著高于 APS 组。

表1 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠 DTH 的影响( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

Table 1 Effect of LCA on DTH of diabetic mice ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

组别 Group	剂量 Dose [ $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]	耳肿胀度 Ear swelling degree ( $\text{mg}$ )
模型组 Model	-	3.83 $\pm$ 1.31
APS 组 APS	280	6.65 $\pm$ 2.15 <sup>**</sup>
LCA 低剂量组 LCA-L	150	6.36 $\pm$ 0.89 <sup>**<math>\Delta</math></sup>
LCA 中剂量组 LCA-M	350	8.96 $\pm$ 1.04 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>
LCA 高剂量组 LCA-H	450	9.42 $\pm$ 3.12

注:与模型组比较,\*  $P > 0.05$ ,\*\*  $P < 0.05$ ;与 APS 组比较, $\Delta$   $P > 0.05$ , $\Delta\Delta$   $P < 0.05$ 。下同。

Note: Compared with model group,\*  $P > 0.05$ ,\*\*  $P < 0.05$ ; Compared with APS group, $\Delta$   $P > 0.05$ , $\Delta\Delta$   $P < 0.05$ . Same as below.

### 2.3 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠血清 IgM、IgG、INF- $\gamma$ 分泌的影响

由表2可知,与模型组相比,各剂量组和 APS 组均显著促进免疫力低下 DM 小鼠血清 IgM、IgG 的

生成( $P < 0.05$ ),显著降低 INF- $\gamma$  的分泌,低剂量组与 APS 组差异均不显著( $P > 0.05$ ),中、高剂量组 IgM、IgG 含量均显著高于 APS 组。

表2 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠血清 IgM、IgG 与 INF- $\gamma$  分泌的影响( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

Table 2 Effect of LCA on IgM, IgG and INF- $\gamma$  levels of diabetic mice ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

组别 Group	剂量 Dose [ $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]	IgG ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	IgM ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	INF- $\gamma$ ( $\text{ng}/\text{L}$ )
模型组 Model	-	80.6 $\pm$ 7.3	52.7 $\pm$ 8.6	308.4 $\pm$ 21.1
APS 组 APS	280	99.8 $\pm$ 2.3 <sup>**</sup>	66.3 $\pm$ 10.2 <sup>**</sup>	280.5 $\pm$ 7.4 <sup>**</sup>
LCA 低剂量组 LCA-L	150	101.1 $\pm$ 6.7 <sup><math>\Delta</math></sup>	65.9 $\pm$ 4.3 <sup>**<math>\Delta</math></sup>	269.8 $\pm$ 14.3 <sup><math>\Delta</math></sup>
LCA 中剂量组 LCA-M	350	118.6 $\pm$ 13.4 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>	75.5 $\pm$ 8.1 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	265.1 $\pm$ 17.2 <sup><math>\Delta</math></sup>
LCA 高剂量组 LCA-H	450	133.9 $\pm$ 12.5	85.2 $\pm$ 6.8	251.0 $\pm$ 16.8 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>

### 2.4 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠非特异性免疫功能的影响

由表3可见,模型组小鼠廓清指数 K 和吞噬指数  $\alpha$  相对 LCA 低、中、高剂量组明显降低( $P <$

0.05)。APS 组碳粒廓清指数和吞噬指数明显升高( $P < 0.05$ ),但与 LCA 低剂量组疗效无显著性差异( $P > 0.05$ )。中、高剂量组 K、 $\alpha$  值均显著高于 APS 组,提示 LCA 明显增强免疫低下小鼠非特异性免疫

功能,且存在剂量负相关性。

表 3 LCA 对 DM 小鼠非特异性免疫功能的影响 ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

Table 3 Effect of LCA on nonspecific immune function of diabetic mice ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	K	$\alpha$
模型组 Model	-	0.0123 $\pm$ 0.0048	4.8377 $\pm$ 0.1545
APS 组 APS	280	0.0237 $\pm$ 0.0029 * *	5.2482 $\pm$ 0.1891 * *
LCA 低剂量组 LCA-L	150	0.0244 $\pm$ 0.0036 * * $\Delta$	5.3048 $\pm$ 0.1428 * * $\Delta$
LCA 中剂量组 LCA-M	350	0.0401 $\pm$ 0.0044	5.7441 $\pm$ 0.3296
LCA 高剂量组 LCA-H	450	0.0746 $\pm$ 0.0106	6.3625 $\pm$ 0.3569

## 2.5 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠脾淋巴细胞增殖

由表 4 可知,灌胃给药 30 d 后,免疫力低下 DM 小鼠不同剂量的 LCA 与 APS 脾淋巴细胞增殖率均

明显高于模型组,差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。提示 LCA 具有提高免疫力低下 DM 小鼠的细胞免疫功能。

表 4 LCA 对免疫力低下 DM 小鼠脾淋巴细胞增殖率的影响 ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

Table 4 Effect of LCA on spleen lymphocyte proliferation rate of diabetic mice ( $\bar{X} \pm S, n = 8$ )

组别 Group	剂量 Dose [mg/(kg·d)]	OD570
模型组 Model	-	0.223 $\pm$ 0.011
APS 组 APS	280	0.264 $\pm$ 0.034 * *
LCA 低剂量组 LCA-L	150	0.270 $\pm$ 0.023 * * $\Delta$
LCA 中剂量组 LCA-M	350	0.365 $\pm$ 0.031 $\Delta\Delta\Delta$
LCA 高剂量组 LCA-H	450	0.395 $\pm$ 0.024 $\Delta\Delta\Delta$

## 3 讨论

机体的免疫功能低下不能有效的抵御外来感染,大量研究证实 DM 患者免疫功能易发生改变,这可能是由于患者长期处于高血糖状态下,血细胞的趋化性、吞噬作用及杀菌能力降低,免疫力下降,易并发感染或是感染扩散,引发如糖尿病足等并发症,威胁着 DM 患者的生命安全。因此,寻找安全、有效增强 DM 患者免疫力的途径是降低 DM 并发症的发生率,提高 DM 患者生活质量的重要方向。本文采用注射 STZ 与环磷酰胺混合试剂建立 DM 合并免疫力低下小鼠模型为研究对象,通过检测各项指标变化评价药物调节 DM 免疫力作用具有一定的学术价值和社会价值。

本研究黄芪多糖是由 75% 乙醇超声辅助提取,复合药物在灌胃前都均经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后采用冷冻干燥法获得,保证药物的无菌性。经以上数据,可知 LCA 可提高免疫力低下 DM 小鼠体液免疫与非特异性免疫功能,促进脾淋巴细胞增殖,改善

DM 小鼠免疫紊乱现象,从而降低 DM 小鼠的如并发感染等症状,提高 DM 小鼠存活率。其免疫调节作用效果较黄芪多糖好,且具有控缓释功效,为临床治疗 DM 提供有效、无毒的辅助药物。数据显示本实验中的 APS 组与低剂量组的各项指标差异不明显,可能与 LCA 剂量有关,另外,诸多研究表明壳聚糖的生物功能与其分子量密切相关,因此,在后续研究中,通过酶量与反应时间制备不同窄分子量的壳聚糖,将从分子量与载药量等方面做进一步的探索研究。

### 参考文献

- 1 Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999, 26:259-265.
- 2 Yuan SL, Piao XS, Li DF, et al. Effects of dietary astragalus polysaccharide on growth performance and immune function in weaned pigs. *Animal Sci*, 2006, 8:501-507.