

文章编号:1001-6880(2016)5-0741-04

红毛五加多糖 AHP-II 对 THP-1 源巨噬细胞中酶活性的影响

蔡文娣¹,陈永^{1*},陈志婷²,徐止露²,付晓燕¹¹潍坊医学院临床学院; ²潍坊医学院药学与生物科学学院,潍坊 261002

摘要:本研究检测红毛五加多糖 AHP-II 对 THP-1 巨噬细胞内多种酶活性的影响。通过 PMA 诱导 THP-1 成为巨噬细胞,用不同浓度的 AHP-II 与巨噬细胞共孵育 48 h 后,测定超氧化物歧化酶(SOD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、酸性磷酸酶(ACP)、ATP 酶的活性及溶菌酶(LZM)含量变化。结果显示 AHP-II 能显著增强细胞内的 SOD、SDH、ACP 和 ATP 酶的活性及 LZM 的含量。

关键词:红毛五加多糖;巨噬细胞;SOD;SDH;ACP;LZM;ATPase

中图分类号:R392.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.018

Effect of *Acanthopanax giraldii* Harms Polysaccharide on Enzyme Activity of THP-1 Macrophage

CAI Wen-di¹, CHEN Yong^{1*}, CHEN Zhi-ting², XU Zhi-lu², FU Xiao-yan¹¹Clinical Medical College, Weifang Medical University; ²Pharmacy and Biological Science College, Weifang Medical University, Weifang 261002, China

Abstract: To observe the effect of *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharide(AHP-II) on enzyme activities of THP-1 macrophages, macrophages converted from THP-1 monocytes by PMA, were incubated with different doses of AHP-II for 48 h. The activities of superoxide dismutase (SOD), succinodehydrogenase (SDH), acid phosphatase (ACP), lysozyme (LZM) and ATPase were determined. The results showed that the activities of SOD, SDH, ACP, LZM and ATPase were significantly enhanced, possibly demonstrating that AHP-II can enhance immunomodulatory effects of THP-1 macrophages.

Key words: *Acanthopanax giraldii* Harms polysaccharide; macrophage; SOD; SDH; ACP; LZM; ATPase

巨噬细胞是机体免疫系统的重要递呈细胞,在特异性和非特异性免疫过程中均发挥着重要作用。近年来研究发现,许多植物多糖具有多项生物活性,其细胞毒性较小,能有效提高机体的免疫调节能力,可激活巨噬细胞的免疫反应^[1-4]。红毛五加多糖(AHP-II)是从中药红毛五加中分离得到的药物活性成分,已有研究表明,红毛五加多糖具有明显的抗肿瘤、免疫调节等作用^[5-7]。然而关于红毛五加多糖对 THP-1 源巨噬细胞影响的研究,国内外尚未见报道。

1 材料与仪器

1.1 材料

红毛五加多糖 AHP-II 由本课题组分离制备^[8];注射用香菇多糖(粉剂)购自南京易亨制药有限公司(生产批号:1211307);THP-1 巨噬细胞细胞株购

自中国科学院细胞库。

1.2 试剂

RPMI-1640 培养基、胰酶,购自 Gibco 公司;酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、ATP 酶、琥珀酸脱氢酶(SDH)、溶菌酶(LZM)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司、佛波酯(PMA)购自 Sigma 公司;其它试剂为国产分析纯。

1.3 仪器

BCN-1360 型超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;Multiskan MK3 型酶标检测仪,购自 Bio-rad 公司;二氧化碳细胞培养箱(200 型),购自丹麦 Heto 公司;Centrifuge5417 R 台式高速冷冻离心机,购自德国 Eppendorf 公司;倒置显微镜 CK2 型,购自日本 Olympus 公司;TU-1800 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Synchron CX-7 生化测定仪,美国 Beckman 有限公司。

2 实验方法

收稿日期:2015-11-23 接受日期:2016-03-15
基金项目:国家自然科学基金(81303198);山东省自然科学基金(ZR2011HQ044)
*通讯作者 Tel:86-013780817251;E-mail:cheny@wfmc.edu.cn

2.1 材料处理

红毛五加多糖 AHP-II 以无血清 RPMI-1640 培养基溶解后,配制成 4.0 mg/mL 的储存浓度,微孔滤膜(0.22 μm)除菌待用。

THP-1 细胞用含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,在每次实验前用 100 ng/mL PMA 孵育 36 h,使其诱导分化成巨噬细胞。

2.2 实验分组

将 THP-1 源性巨噬细胞接种于 6 孔板内,在每次实验前换无血清培养基培养 12 h,实验分组如下:

a. 空白对照组,全血清 RPMI-1640 培养基培养;b. 香菇多糖对照组,香菇多糖浓度为 25 μg/mL 的全血清培养基;c. AHP-II 低剂量组,AHP-II 浓度 25 μg/mL;d. AHP-II 中剂量组,AHP-II 浓度 50 μg/mL;e. AHP-II 高剂量组,AHP-II 浓度 100 μg/mL。将各试验组均置于二氧化碳培养箱(5% CO₂,37 °C)中孵育 48 h。

2.3 超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、ATP 酶的活性及溶菌酶(LZM)含量测定

各项酶指标的测定按照试剂盒中的操作方法进行。

各项指标中所需测定的蛋白质含量均采用 BCA 蛋白定量测定试剂盒。

2.4 数据处理

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行方差分析,用最小显著差法(LSD 法)检验作两两比较。

3 实验结果

3.1 巨噬细胞外部形态的变化

在显微镜下观察 THP-1 巨噬细胞的外部形态,发现香菇多糖组和添加 AHP-II 组细胞体积明显增大,呈圆形、椭圆、菱形、梭形或不规则形,还可见较

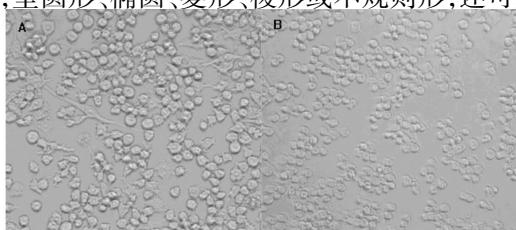


图 1 AHP-II (A) 及对照组(B)的 THP-1 巨噬细胞形态

Fig. 1 Morphology of THP-1 macrophages of AHP-II (A) and control (B)

长的伪足。对照组细胞一般呈圆形、椭圆形,突起、伪足少,如图 1 所示。

3.2 THP-1 巨噬细胞酶活性测定结果

3.2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定结果

由表 1 可知,AHP-II 低、中、高剂量组都对 THP-1 源巨噬细胞中的 SOD 值有显著增强效果,其中高剂量组效果最好($P < 0.01$)。

表 1 红毛五加多糖对 THP-1 巨噬细胞 SOD 酶活力的影响
($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of AHP-II on SOD in THP-1 macrophages ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(μg/mL)	SOD(U/mg prot)
空白对照组 Control	-	60.26 ± 18.57
香菇多糖组 Lentinan	25	90.36 ± 14.25 *
AHP-II 低剂量组 AHP-II Low	25	94.36 ± 19.30 *
AHP-II 中剂量组 AHP-II Medium	50	95.82 ± 29.86 *
AHP-II 高剂量组 AHP-II High	100	101.93 ± 29.49 * *

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2.2 酸性磷酸酶(ACP)活性测定结果

由表 2 可知,红毛五加多糖低、中、高剂量组都对 THP-1 源巨噬细胞中的 ACP 酶活性有极显著增强效果($P < 0.001$),从数值看高剂量组效果最好,但不具备统计学意义;与香菇多糖组相比,增强效果更优,差异显著($P < 0.01$)。

表 2 红毛五加多糖对 THP-1 巨噬细胞 ACP 酶活力的影响
($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of AHP on ACP in THP-1 macrophages ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose(μg/mL)	ACP (U/g prot)
空白对照组 Control	-	0.041 ± 0.002
香菇多糖组 Lentinan	25	0.60 ± 0.11 * * *
AHP-II 低剂量组 AHP-II Low	25	0.89 ± 0.16 * * * #
AHP-II 中剂量组 AHP-II Medium	50	1.06 ± 0.075 * * * #
AHP-II 高剂量组 AHP-II High	100	1.10 ± 0.086 * * * #

注:与空白对照组比较,* * * $P < 0.001$;与香菇多糖组比较,# $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * * * $P < 0.001$; Compared with lentinan, # $P < 0.01$.

3.2.3 琥珀酸脱氢酶(SDH)活性测定结果

由表3可知,红毛五加多糖低、中、高剂量组都对THP-1源巨噬细胞中的SDH酶活性有增强效果,差异极显著($P < 0.01$);从数值看高剂量组效果最好,但不具备统计学意义。

表3 红毛五加多糖对THP-1巨噬细胞SDH酶活力的影响
($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of AHP on SDH in THP-1 macrophages ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SDH (U/mg prot)
空白对照组 Control	-	12.65 ± 2.94
香菇多糖组 Lentinan	25	$14.52 \pm 0.72^{* *}$
AHP-II 低剂量组 AHP-II Low	25	$15.74 \pm 0.69^{* *}$
AHP-II 中剂量组 AHP-II Medium	50	$16.97 \pm 0.35^{* *}$
AHP-II 高剂量组 AHP-II High	100	$17.39 \pm 1.07^{* *}$

注:与空白对照组比较, $^{* *} P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, $^{* *} P < 0.01$.

3.2.4 溶菌酶(LZM)含量测定结果

由表4可知,红毛五加多糖低、中、高剂量组都对THP-1源巨噬细胞中的LZM酶含量有极显著增强效果($P < 0.001$);从数值看,高剂量组效果最好,但没有显著差异。

表4 红毛五加多糖对THP-1巨噬细胞LZM酶活力的影响
($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of AHP on LZM in THP-1 macrophages ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LZM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
空白对照组 Control	-	1.98 ± 0.21
香菇多糖组 Lentinan	25	$2.94 \pm 0.45^{* * *}$
AHP-II 低剂量组 AHP-II Low	25	$3.04 \pm 0.44^{* * *}$
AHP-II 中剂量组 AHP-II Medium	50	$3.21 \pm 0.44^{* * *}$
AHP-II 高剂量组 AHP-II High	100	$3.33 \pm 0.31^{* * *}$

注:与空白对照组比较, $^{* * *} P < 0.001$ 。

Note: Compared with control, $^{* * *} P < 0.001$.

3.2.5 ATPase活性测定结果

由表5可知,红毛五加多糖低、中、高剂量组都对THP-1源巨噬细胞中的ATP酶活性有非常显著增强效果($P < 0.001$),对 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase活性有显著增强效果($P < 0.05$)。

表5 红毛五加多糖对THP-1巨噬细胞ATP酶活力的影响($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of AHP on ATPase in THP-1 macrophages ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ATPase(U/mg prot)	
		$\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase	T-ATPase
空白对照组 Control	-	3.86 ± 0.94	12.82 ± 2.15
香菇多糖组 Lentinan	25	$5.40 \pm 1.40^*$	$18.43 \pm 2.06^{* * *}$
AHP-II 低剂量组 AHP-II Low	25	$5.36 \pm 1.40^*$	$18.82 \pm 2.01^{* * *}$
AHP-II 中剂量组 AHP-II Medium	50	$5.46 \pm 1.33^*$	$18.00 \pm 1.75^{* * *}$
AHP-II 高剂量组 AHP-II High	100	$5.48 \pm 1.12^*$	$18.85 \pm 2.66^{* * *}$

注:与空白对照组比较, $^* P < 0.05$; $^{* * *} P < 0.001$ 。

Note: Compared with control, $^* P < 0.05$; $^{* * *} P < 0.001$.

4 讨论

SOD是体内重要的抗氧化酶,能有效清除超氧阴离子自由基,对巨噬细胞的吞噬能力和整个机体的免疫功能方面起重要的作用。巨噬细胞溶酶体内有多种水解酶,其中以ACP作为其标志酶,参与多种溶酶体的消化功能^[9];ATPase是一类能将ATP催化水解为ADP和磷酸根离子的酶,SDH是线粒体的标志酶,它们在能量代谢、物质的吸收及运输等生理功能上具有重大意义。LZM可由巨噬细胞合成并分泌,是一种能水解致病菌中黏多糖的碱性酶,具有抗菌、抗病毒等作用,在机体免疫防御过程中起十分重要的作用。

巨噬细胞受到刺激进一步分化成熟,成为活化巨噬细胞,使细胞内多种酶活性显著增强,有效地执行其运动、吞噬、对抗原的处理及活性物质的分泌等功能^[10]。巨噬细胞中这些酶的酶活性强弱为巨噬细胞活化的一个标志。AHP-II可显著的增强THP-1源巨噬细胞中的SOD、ACP、SDH、ATPase的酶活性和LZM含量,提示巨噬细胞活性得到了明显的提高,成为活化的巨噬细胞,从而可能增强THP-1源巨噬细胞的免疫调节作用。

参考文献

- 1 Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6:317-333.
- 2 Lee KY, Jeon YJ. Polysaccharide isolated from *Poria cocos* sclerotium induces NF-kappaB/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*,

2003,3:1353-1362.

- 3 Zhang W(张巍), Zhang K(张昆), Shao ML(邵明亮), et al. Research progress of selective immune cell receptors in Chinese herbal polysaccharide. *Int Tradit Chin Med* (中医药信息), 2012, 29:125-127.
- 4 Xie YX(谢燕霞), An LG(安利国), Yang GW(杨桂文). Immunomodulatory activity of botanical polysaccharides on macrophage. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2008, 24:307-314.
- 5 Ouyang ZZ(欧阳资章), Long QC(龙启才). Apoptosis of ovarian cancer cell lines OVCAR-3 induced by the extract *Acanthopanax giraldii* Harms. *China Mod Med*(中国当代医药), 2012, 19(21):10-12.
- 6 Chen Y(陈永), An HQ(安洪庆), Song L(宋利), et al. Analysis for the composition of monosaccharide in the polysaccharides from *Acanthopanax giraldii* Harms by gas chromatog-

(上接第 723 页)

- 11 Yang J(杨晋), Zhu GH(朱桂花), Zhang LY(张砾岩). Five alkaloids were analyzed in *Sophora alopecuroides* by RP-HPLC. *J Chin Med Mat*(中药材), 2010, 33:929-931.
- 12 Du XF(杜小凤), Wu CW(吴传万), Yang WF(杨文飞), et al. Bioactivity of methanol extract from leaves of *Sophora alopecuroides* to *Meloidogyne incognita*. *Acta Agric Jiangxi*(江西农业学报), 2010, 22:88-90.
- 13 You S(游素碧), Han Z(韩宗先). Study on extraction tech-

(上接第 765 页)

- 6 Han SB, Lee CW, Jeon YJ, et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Int J Immunopharmacol*, 1999, 41: 157-164.
- 7 Li G, Kim Y, Kim TD, et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G₂/M Phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett*, 2004, 216:175-181.
- 8 Wang GB, Dong LL, Zhang YY, et al. Polysaccharides from *Phellinus linteus* inhibit cell growth and invasion and induce apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Biologia*, 2012, 67:247-254.
- 9 Wang QB(王钦博), Yang Y(杨焱), Zhou S(周帅), et al. Comparison of chemical compositions and *in vitro* immunological activities of eight kinds of crude polysaccharides from *Phellinus* sp. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, 22:873-877.
- 10 Wu SJ, Liaw CC, Pan SZ, et al. *Phellinus linteus* polysaccha-

- raphy. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药), 2008, 40: 65-66.
- 7 Hao HH(郝慧慧), Chen Y(陈永), Lin ZJ(林志娟), et al. Effect of Different Polysaccharide Fraction from *Acanthopanax giraldii* Harms on Peritoneal Macrophage. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:612-616.
- 8 Chen Y(陈永), Li Q(李强), Tan XJ(谭晓晶), et al. Study on characterization of polysaccharides from *Acanthopanax giraldii* Harms. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2004, 16:507-510.
- 9 Guo RQ(郭仁强). The Function of Macrophage Cell Differentiation. *Clinical Immunology Foundation*(临床免疫学基础). Nanjing: Jiangsu Science Press, 1982. 72-86.
- 10 Huang HH(黄海华). *Pharmaceutical Cell Biology*(药学细胞生物学). Beijing: China Medical Science Press, 2006. 208.

nique of alkaloids from *Pinellia ternata*. *J Gansu Lianhe Univ*(甘肃联合大学学报), 2006, 20:69-71.

- 14 Li D(李端), Zhou LG(周立刚), Wang JG(王敬国), et al. Inhibitory effects of *Sophora alopecuroides* extract to pathogens on the pathogens of cucumber and tomato. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 2006, 26:558-563.
- 15 Wang K, Luo C, Liu H, et al. Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. *Afr J Agric Res*, 2012, 7:5925-2929.

rides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells. *J Funct Foods*, 2013, 5:679-688.

- 11 Van Griensven L, Verhoeven HA. *Phellinus linteus* polysaccharide extracts increase the mitochondrial membrane potential and cause apoptotic death of THP-1 monocytes. *Chin Med*, 2013, 8(1):25-37.
- 12 Wang H, Wu G, Park H, et al. Protective effect of *Phellinus linteus* polysaccharide extracts against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: a proteomics analysis. *Chin Med*, 2012, 7(1):23-32.
- 13 Kim HM, Kang JS, Kim JY, et al. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse. *Int J Immunopharmacol*, 2010, 10(1):72-78.
- 14 Chang F(常飞), Wang SY(王绍云), Chen F(陈飞). Extraction and deproteinization of polysaccharides from Guizhou wild *Paederia scandens*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:294-300.