

刺玫根多糖对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的免疫调节作用

查苏娜,苏日娜,齐和日玛*,彭斯格热希,萨仁高娃*

内蒙古医科大学,呼和浩特 010110

摘要:采用水提醇沉法提取刺玫根粗多糖,以 Sevage 法和 TCA 法脱蛋白,进一步分级醇沉法分离纯化得到较纯的 60% 醇沉物 (RDRP) 进行结构鉴定和活性评价。苯酚浓硫酸法测定出刺玫根多糖 RDRP 总糖含量为 94.1%;高效凝胶渗透色谱法测定表明主要含有重均分子量为 13.1 kDa,相对分散度为 1.2 的多糖;通过高效离子色谱法和红外光谱测定,鉴定刺玫根多糖为由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、木糖等 5 种单糖组成的含有 α -构型的中性吡喃多糖。环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠模型实验结果表明,与模型组相比,刺玫根多糖各剂量组小鼠的脾脏和胸腺指数明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);血细胞分析仪检测发现白细胞数、红细胞数、血小板显著升高 ($P < 0.05$);ELISA 法检测血清中免疫相关蛋白 IgG、IgM、IgA 以及细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 与 IL-2 的分泌水平,结果显示,与模型组比较,刺玫根多糖组显著上调小鼠血清中免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 浓度水平 ($P < 0.01$) 及 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 的含量 ($P < 0.01$);Western blot 法测定各组 TLR4、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B p65 蛋白的表达水平,发现刺玫根多糖各剂量组脾脏中 TLR4、TRAF-6 蛋白极显著上升 ($P < 0.01$),高剂量组的 MyD88 蛋白极显著上升 ($P < 0.01$),其他组呈现上升趋势;刺玫根多糖各剂量组 NF- κ B p65 蛋白均有上升趋势,因此其免疫调节作用机制可能与 TLR/NF- κ B 通道有关。本研究初步阐明刺玫根多糖的基本结构特征和其免疫调节作用及其机制,为刺玫根多糖的开发应用提供一定价值的实验依据。

关键词:刺玫根;多糖;结构鉴定;免疫调节;TLR/NF- κ B

中图分类号:R931.7

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)2-0196-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.2.002

Immunomodulatory effect of polysaccharides from *Rosa davurica* roots on immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide

Cha-su-na, Su-ri-na, Qi-he-ri-ma*, Peng-si-ge-re-xi, Sa-ren-gao-wa*

Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: The crude polysaccharide was obtained from *Rosa davurica* root via hot water extraction method and ethanol precipitation, followed by deproteinization using the Sevage and TCA methods, respectively. After deproteinization, the crude polysaccharide was purified by graded ethanol precipitation method. Herein, the 60% ethanol precipitate was labeled RDRP, and its structure and activity were further studied. The total sugar content of polysaccharides RDRP was 94.1%, and mainly contained a polysaccharide with an average molecular weight of 13.1 kDa with narrow polydispersity at 1.2, as well as comprised of five monosaccharides including glucose, arabinose, galactose, mannose, and xylose. IR spectrum indicate that it was a neutral glucopyranoside in the α -configuration. In cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice test, the spleen and thymus index of mice in each dose group of RDRP were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), respectively, compared to model group; the white blood cells, red blood cells and platelets in each dose group of RDRP were significantly increased ($P < 0.05$) compared to model group; the immunoglobulin IgG, IgM, IgA and IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-2 in each dose group of RDRP were significantly increased ($P < 0.01$) compared to model group; the TLR4 and TRAF-6 proteins in each dose group of RDRP were increased significantly ($P < 0.01$), and MyD88 was increased significantly in high-dose group ($P < 0.01$) and showed the increasing trend in other groups; the NF- κ B p65 protein also showed the increasing trend in the RDRP groups.

收稿日期:2023-09-28 接受日期:2023-12-06

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(82060769);内蒙古医科大学致远人才计划(ZY0201016, ZY0201030);内蒙古医科大学蒙药学“一流学科”蒙药专业研究生科研能力提升项目(myxylxk202115)

*通信作者 Tel:86-471-6693296; E-mail:sarangowa@immu.edu.cn, qiherima@126.com

Those results implied that the immunomodulatory mechanism of RDRP may be related to the TLR/NF- κ B. In this research, the basic structure and immunomodulatory effect and its mechanism of polysaccharide from *R. davurica* roots were clarified and those data will provide a valuable experimental basis for its development and application.

Key words: *Rosa davurica* roots; polysaccharide; structure characterization; immunomodulation; TLR/NF- κ B

刺玫根是蔷薇科蔷薇属植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的干燥根,别名山刺玫根,野玫瑰根,刺莓果根等。山刺玫广泛生长于我国东北地区,其花、果实、根均入药使用。刺玫根药材标准收载于吉林省药品标准中,其味苦、涩,性平,具有止血、抗菌作用,用于治疗月经不止、功能性子宫出血、慢性气管炎、肠炎、细菌性痢疾、膀胱炎和肾炎^[1]。在蒙医学中,刺玫根的蒙药名为“哲日力各·扎木尔因温都苏”,其功效为祛协日、镇赫依、消食,用于赫依协日症、巴达干协日症、胃协日症、脉病、咳嗽、清肝毒等^[2]。据研究报道,刺玫根含有内酯、鞣质、多糖、总苷、黄酮、酚类、生物碱类、蛋白质、葱醌等成分^[3-5],具有抗氧化^[4,6]、降糖^[6]、抗菌^[7]、血管舒张^[8]等药理作用。Han等^[9]报道了刺玫根多糖对衰老模型小鼠的免疫功能有改善作用,其他关于刺玫根多糖的研究甚少。

近年来,多糖作为一类具有多种生物活性的天然产物受到越来越多的关注^[10],大量研究证明多糖具有免疫调节^[11]、抗肿瘤^[12]、抗病毒^[13]、抗氧化^[14]、降血糖^[15]等多种活性。中药多糖作为天然免疫调节剂,功效明确,副作用少,对免疫细胞、免疫器官以及肠道菌群等具有调节作用^[16]。我国东北地区有丰富的野生山刺玫资源,其医药和功能性食品方面的研发将对地方经济发展具有促进作用。刺玫根入药较多,但相关保健品或食品中的应用较少。本文对刺玫根多糖进行提取、纯化以及结构解析,同时对环磷酰胺(CTX)法诱导的免疫低下小鼠的免疫功能的调节作用进行评价并探讨其作用机制,为今后的刺玫根多糖的开发提供了实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级KM属小鼠,雄性,48只,体质量18~22g,购置于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号为110324220104171893/SCXK(京)2019-0010。饲养环境温度控制在20~25℃,相对湿度40%~70%,12h明暗交替,小鼠可自由摄食饮水。

1.2 药物与试剂

刺玫根采集自大兴安岭,由内蒙古医科大学蒙

药重点实验室包勒朝鲁教授鉴定为山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的根。香菇多糖片(规格10mg/片,批号:2203010,国药准字:H42022727,湖北广仁药业有限公司);环磷酰胺(规格200mg/瓶,批号:22041525,江苏恒瑞医药股份有限公司);小鼠免疫球蛋白A(IgA,批号:34375734)、小鼠免疫球蛋白G(IgG,批号:32353771)、小鼠免疫球蛋白M(IgM,批号:34367262)、小鼠白介素-2(IL-2,批号:36397998)、小鼠白介素-6(IL-6,批号:38419241)、肿瘤坏死因子(TNF- α ,批号:30331257)、 γ 干扰素(IFN- γ ,批号:30331673)ELISA试剂盒(武汉新启迪生物技术股份有限公司)。

1.3 仪器与设备

FA2004N电子天平(上海菁海仪器有限公司);Waters 515高效液相色谱、2410示差检测器(美国沃特世科技有限公司);TU-1910双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);IRAffinity-1红外光谱仪(日本岛津株式会社);ICS5000离子色谱仪(美国赛默飞科技有限公司);涡旋混匀器(德国艾卡仪器设备有限公司);MEX-7222K全自动血细胞分析仪(日本广电工业株式会社);Spectra-Max-i3x全自动多功能酶标仪(美国分子仪器有限公司)。

1.4 刺玫根多糖的提取与分析

1.4.1 多糖提取与纯化

提取:称取干燥的刺玫根适量,粉碎成粗粉,按料液比1:20g/mL,温度80℃,煎煮120min,离心,取上清液在60℃减压浓缩至原体积的1/5,之后缓慢加入4倍量的无水乙醇并不断搅拌,4℃静置过夜,抽滤,浓缩,冷冻干燥,得到刺玫根粗多糖。

Sevage法脱蛋白:称取2.0g粗多糖,配制成1%的粗多糖溶液,加入1/4体积比的Sevage试剂(氯仿:正丁醇=4:1)混匀,磁力旋转20min,分液漏斗内静置30min,去下层蛋白液,上层多糖溶液重复此步骤至无明显蛋白层,流水透析48h,蒸馏水透析24h,旋转蒸发仪浓缩,冷冻干燥,以BCA法测量样品总蛋白含量。

三氯乙酸(TCA)法脱蛋白:称取2.0g粗多糖,

配制成 1% 的粗多糖溶液,加入 10% TCA (6.0 g TCA 溶于 60 mL 蒸馏水),磁力旋转 20 min,分液漏斗内静置 30 min,倒去蛋白层,流水透析 48 h,浓缩,冷冻干燥,以 BCA 法测量样品总蛋白含量。

分级沉淀:称取 1.0 g 刺玫根脱蛋白粉,溶于 150 mL 蒸馏水溶解,分别用 30%、40%、50%、60% 比例的乙醇分级沉淀,离心,取沉淀,透析,进行 GPC 分析。得到 60% 乙醇沉淀物为 200 mg,命名为刺玫根多糖(RDRP),用于结构鉴定及药理实验。

1.4.2 总糖含量测定

采用苯酚-硫酸法进行测定。以无水葡萄糖为标准品配置 0.08 mg/mL 的溶液,摇匀,得标准品溶液。分别吸取 0、10、20、30、40、50 mL 葡萄糖标准品溶液,用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶。从各容量瓶分别取 2 mL 溶液倒入试管,加 5% 苯酚溶液 1 mL,浓硫酸 5 mL,摇匀,90 °C 水浴 10 min,冷却至室温,在 490 nm 处测定其吸光度。以葡萄糖浓度为 X ,吸光度为 Y ,绘制标准曲线。“1.4.1”所制得的多糖用双蒸水溶解至 50 mL 容量瓶,得多糖样品溶液。准确吸取 2 mL,测定吸光度,根据葡萄糖标准曲线,求出多糖溶液浓度,计算刺玫根多糖中总糖含量。

1.4.3 分子量的测定

采用凝胶渗透色谱-示差检测器(HPGPC)法对脱蛋白山刺玫多糖进行分子量测定,具体方法参照 Mu^[17] 等报道的步骤和色谱条件。

1.4.4 红外光谱测定

精密称取样品 2.0 mg 和溴化钾 200 mg,压制成片,置于傅里叶变换红外光谱仪进行扫描,扫描波段为 400 ~ 4 000 cm^{-1} 。

1.4.5 单糖组成

取多糖样品 5 mg,置于安瓿瓶中,加入 3 mol/L 三氟乙酸(TFA)2 mL,120 °C 水解 3 h。准确吸取酸水解溶液转移至管中,氮吹干,加入 5 mL 水涡旋混匀,吸取 100 μL 加入 900 μL 去离子水,离心(12 000 r/min,5 min),取上清进行离子色谱分析。同时精密称取 11 种单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸)各 5 mg 置于安瓿瓶中,按照以上的方法处理得到混合标准溶液,根据绝对定量方法,测定不同单糖质量,计算出摩尔比。

色谱条件:Dionex CarbopacTM PA10 柱(4 mm × 250 mm,4 μm),检测器为电化学检测器,柱温为 30 °C,进样量为 25 μL ;流动相 A 为 H_2O ;B 为 500

mmol/L NaOH 和 50 mmol/L NaOAc 缓冲液;C 为 20 mmol/L NaOH;流速调节为 1.0 mL/min;洗脱梯度为 0 ~ 30 min:100% C;30 ~ 30.1 min:50% A 和 50% C;30.1 ~ 46.0 min:30% B 和 70% A。

1.5 刺玫根多糖的免疫调节作用评价

1.5.1 分组与造模

取 KM 小鼠 48 只,分为 6 组,即空白对照组(control group, Con)、模型对照组(model group, Mod)、阳性对照组(positive group, Pos)、刺玫根多糖高剂量(RDRP high dose, RDRP-H)、中剂量(RDRP medium dose, RDRP-M)、低剂量组(RDRP low dose, RDRP-L),每组 8 只。空白对照组小鼠腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 10 mL/(kg · d),其他组小鼠均注射环磷酰胺 80 mg/(kg · d),连续 3 d 造模,第 4 d 开始给药 14 d。空白对照组与模型对照组用纯净水 1 mL/(kg · d)灌胃,阳性对照组以香菇多糖片 50 mg/(kg · d)灌胃,RDRP 高剂量组以 400 mg/(kg · d)、中剂量组以 200 mg/(kg · d)、低剂量组以 100 mg/(kg · d)剂量灌胃,灌胃体积为 10 mL/(kg · d)。

1.5.2 脏器指数的测定

末次给药后禁食 12 h,不禁水,称取各组小鼠体质量后,小鼠眼内采血,处死小鼠,取脾脏和胸腺,清除周围脂肪或其他组织,滤纸擦去表面残留血液和水分,称量,计算脏器指数,计算方式为:脾脏指数(mg/g) = 脾脏质量(mg)/体质量(g);胸腺指数(mg/g) = 胸腺质量(mg)/体质量(g)

1.5.3 组织病理学观察

取各组脾脏组织用固定液固定,石蜡包埋、切片,HE 染色,显微镜下观察小鼠脾脏和胸腺病理变化。

1.5.4 外周血细胞测定

小鼠眼内眦静脉采血于抗凝管中,使用全自动血细胞分析仪测定白细胞、红细胞、血小板、淋巴细胞、红细胞平均血红蛋白浓度。

1.5.5 细胞因子及免疫球蛋白含量的测定

眼眶取血,室温静置 30 min,离心(4 000 r/min,10 min,4 °C),取上清,采用酶联免疫法,严格按照 ELISA 试剂盒操作步骤检测免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 浓度变化和细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 含量水平变化。

1.5.6 脾脏组织中相关蛋白表达的影响

取出脾脏,在生理盐水中将血液冲洗干净,去除

其他蛋白组织,将脾脏放入冻存管,液氮中速冻,转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存备用。剪碎脾脏,研磨,加入10倍体积的RIPA裂解液,用匀浆器匀浆。离心($12\ 000\ \text{r}/\text{min}$, $5\ \text{min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$),取上清,使用BCA蛋白浓度试剂盒测定浓度。配置SDS-PAGE凝胶,上样,电泳,转膜,封闭,孵育一抗,孵育二抗,显色,通过TANONGIS软件读取相关条带灰度值。

1.5.7 统计学方法

采用IBM Statistics SPSS 23.0软件,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差分析组间差异, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 刺玫根多糖提取与分析

2.1.1 提取与纯化

采用水煮醇沉法提取刺玫根粗多糖,提取率为7.3%,得棕褐色絮状物。经过Sevage法和TCA法分别脱蛋白处理,以BCA法测定其总蛋白含量,刺玫根多糖的总蛋白浓度从 $60.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 分别降到 $10.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $6.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$,表明TCA法的脱蛋白效果更有效。经过不同浓度的乙醇溶液分级沉淀,采用GPC法测定各分级醇沉物,得到相对分散度较低小于1.5的60%乙醇沉淀的褐色絮状醇沉物RDRP,进行结构分析和活性评价实验。

2.1.2 多糖总糖含量

采用苯酚硫酸法测定多糖总糖含量。葡萄糖为标准品,在 $0.0\sim 80.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系,线性回归方程为 $Y=0.016\ 5X-0.018\ 3$,相关系数 $R^2=0.999\ 0$ 。刺玫根多糖RDRP中糖含量为91.9%,用Sevage法和TCA法分别脱蛋白纯化后,RDRP中糖含量分别为94.1%和90.2%。由此看来,TCA法脱蛋白效果虽然好,但糖的损失较多,所以Sevage法是山刺玫根多糖的最佳脱蛋白方法。

2.1.3 多糖分子量测定

采用凝胶渗透色谱法(GPC)测定刺玫根多糖RDRP的分子量。六种不同分子量的葡聚糖为标准品,分子量分别为5.8、11.8、47.3、100、380、788 kDa,得到标准曲线回归方程为 $\log Y=26.5-3.81X+0.236X^2-0.005\ 22X^3$,相关系数 $R^2=0.999\ 9$ 。GPC色谱图如图1。显示RDRP由两个不同分子量的多糖组成,保留时间为14.933 min的峰的重均分子量(M_w)为66.7 kDa,多分散度为1.1,面积为 $24\ 043\ \mu\text{v}\cdot\text{s}$,占总面积的13.3%。保留时间为17.550 min的峰的重均分子量(M_w)为13.1 kDa,多分散度为1.2,面积为 $156\ 434\ \mu\text{v}\cdot\text{s}$,占总面积的86.7%。由此看来,RDRP主要由重均分子量为13.1 kDa的多糖组成的。

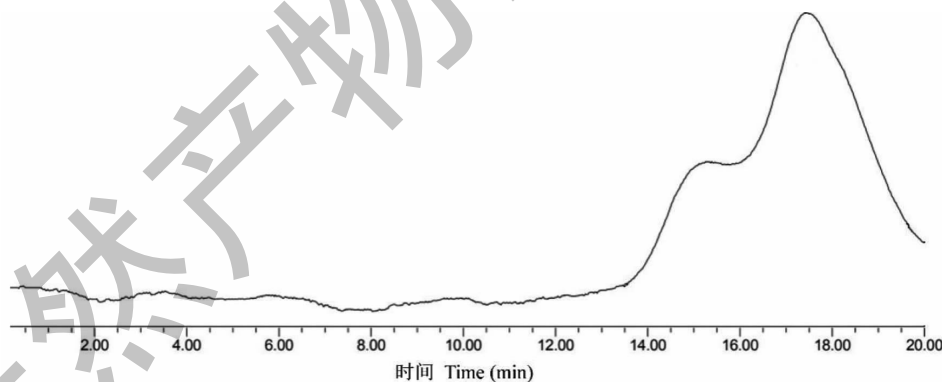


图1 RDRP的GPC色谱图

Fig. 1 The GPC chromatogram of RDRP

2.1.4 红外光谱检测

刺玫根多糖RDRP的红外光谱图如图2。从红外扫描结果看, $3\ 383\ \text{cm}^{-1}$ 是糖分子中O-H键的强伸缩振动吸收峰,是糖类的特征峰。 $2\ 928\ \text{cm}^{-1}$ 显示糖分子中C-H键的伸缩振动吸收, $1\ 616\ \text{cm}^{-1}$ 处的显示糖结合水的吸收峰, $1\ 522\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰可能是C=O键的伸缩振动吸收, $1\ 437\ \text{cm}^{-1}$ 处显示的弱吸收

峰为糖分子中C-H键的变角振动吸收, $1\ 367\ \text{cm}^{-1}$ 处可能是C-H键的弯曲振动吸收峰, $1\ 157\ \text{cm}^{-1}$ 显示糖分子环上C-O键的伸缩振动吸收, $1\ 057\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰可能是O-H键的变角振动吸收, $1\ 016\ \text{cm}^{-1}$ 显示吡喃环醚C-O键的变形振动吸收, $762\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 α -构型吡喃环的对称振动,说明RDRP含有 α -构型的中性吡喃多糖。

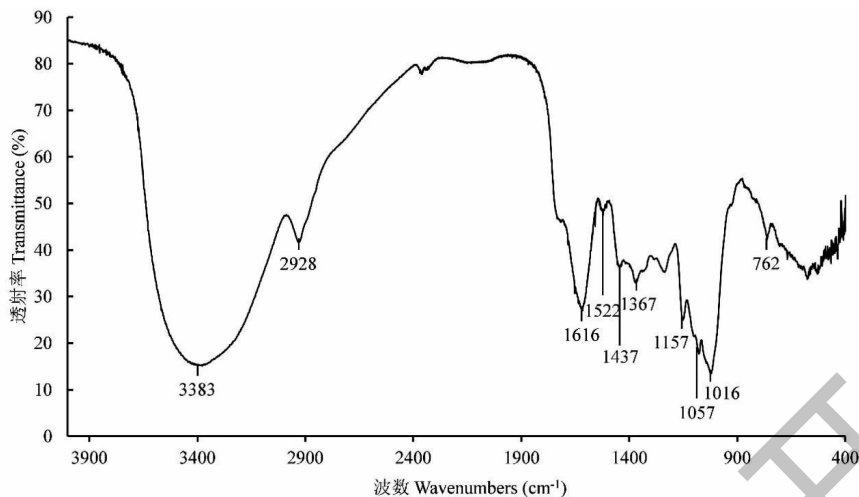


图2 RDRP 的红外光谱图

Fig. 2 The IR spectrum of RDRP

2.1.5 单糖组成分析

采用离子色谱法对刺玫根多糖 RDRP 进行分析, 色谱图如图 3。结果表明, 11 种单糖标准品的保留时间相比较, 刺玫根多糖中检测到了 5 种单糖, 即, 阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖。其摩

尔比为 0.207:0.121:0.598:0.040:0.033。从摩尔比看出, RDRP 主要由葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖组成的。其中, 葡萄糖占 59.8%, 阿拉伯糖占 20.7%, 半乳糖占 12.1%。

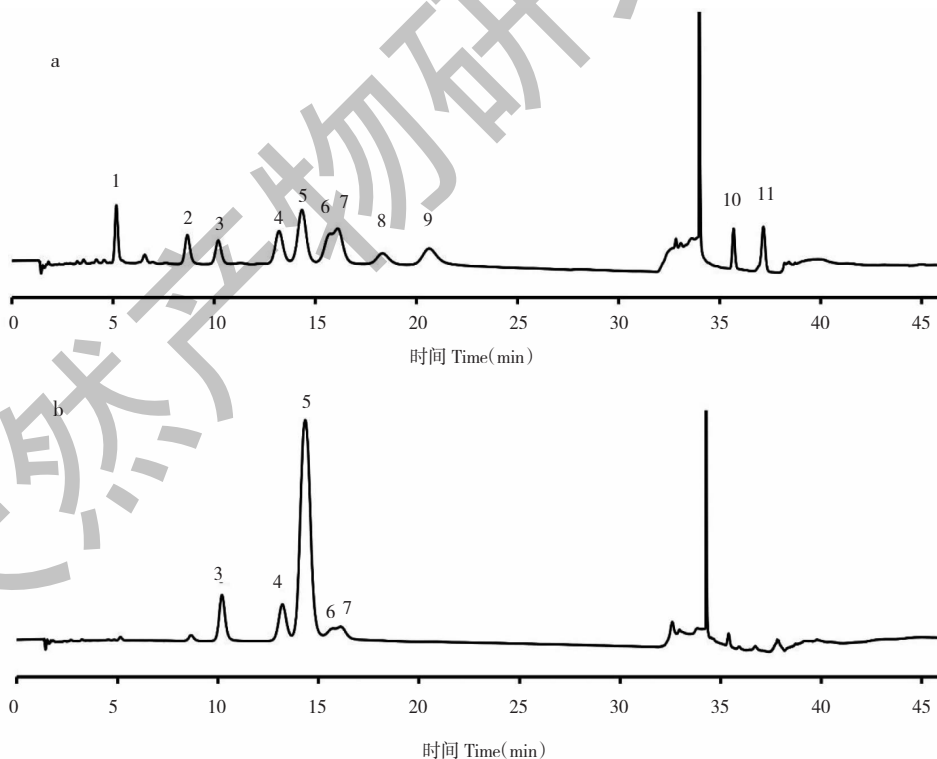


图3 单糖标准品的混合溶液(a)和RDRP(b)的离子交换色谱图

Fig. 3 Ion chromatograms of monosaccharide standard solution (a) and the RDRP polysaccharide (b)

注:1. 岩藻糖;2. 鼠李糖;3. 阿拉伯糖;4. 半乳糖;5. 葡萄糖;6. 木糖;7. 甘露糖;8. 果糖;9. 核糖;10. 半乳糖醛酸;11. 葡萄糖醛酸。Note:1. Fucose;2. Rhamnose;3. Arabinose;4. Galactose;5. Glucose;6. Xylose;7. Mannose;8. Fructose;9. ribose;10. Galacturonic acid;11. Glucuronic acid.

2.2 刺玫根多糖对免疫功能低下小鼠的影响

2.2.1 刺玫根多糖对小鼠脏器指数的影响

从表1可知,模型对照组体质量、脾脏指数、胸腺指数均明显低于空白对照组($P < 0.01$),表明免

疫低下模型小鼠制备成功。与模型组相比,阳性对照组和刺玫根多糖 RDRP 各剂量组脾脏指数和胸腺指数均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明其可促进免疫低下小鼠免疫器官的发育。

表1 各组小鼠体质量、脾脏指数、胸腺指数的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison of body weight, spleen and thymus index of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	体质量 Body weight(g)	脾脏指数 Spleen index(mg/g)	胸腺指数 Thymus index(mg/g)
Con	34.64 ± 2.25	4.20 ± 0.44	2.72 ± 0.19
Mod	32.05 ± 1.03 ^{##}	3.08 ± 0.37 ^{##}	2.40 ± 0.09 ^{##}
Pos	34.23 ± 0.87	4.08 ± 0.28 [*]	2.59 ± 0.10 ^{**}
RDRP-L	33.34 ± 2.20	3.71 ± 0.53 [*]	2.52 ± 0.13 ^{**}
RDRP-M	33.76 ± 1.03 [*]	3.89 ± 0.52 ^{**}	2.56 ± 0.11 ^{**}
RDRP-H	33.83 ± 1.62 ^{**}	3.82 ± 0.63 ^{**}	2.59 ± 0.08 ^{**}

注:与 Con 比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 Mod 比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,下同。

Note: Compared with Con, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with Mod, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, the same below.

2.2.2 刺玫根多糖对小鼠组织病理的影响

在生物光学显微镜下观察各组织病理的变化。从图4中看出,脾脏空白组白髓和红髓分布均匀,而

模型组红髓偏多,细胞排列不紧密且出现空泡状。与模型组相比,刺玫根多糖 RDRP 各剂量组白髓显著增多,分布均匀,表明淋巴细胞增多,且界限清晰。

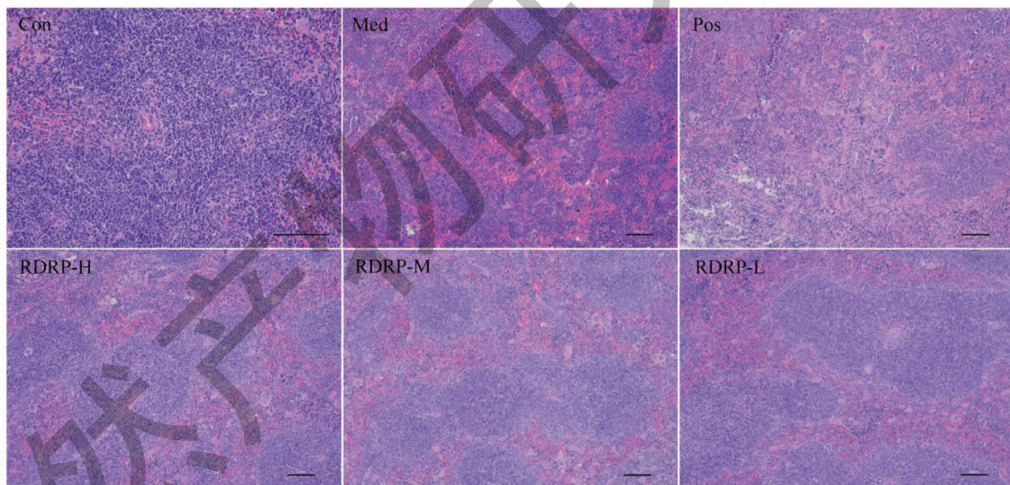


图4 RDRP 对小鼠脾脏病理形态影响(HE, ×100)

Fig. 4 Effects of RDRP on the pathological morphology of mice spleen(HE, ×100)

如图5所示,空白对照组胸腺细胞排列整齐,皮质和髓质界限清晰,皮质主要由淋巴细胞和胸腺上皮细胞组成,皮质上淋巴细胞排列密集;髓质部分染色较浅,主要由大量的胸腺上皮细胞及少量淋巴细胞构成,髓质区可见大小不等圆形或椭圆形的胸腺小体。模型对照组胸腺皮质髓质界限清晰,髓质区可见胸腺上皮细胞空泡变性,髓质区细胞间隙增大。与模型组相比,刺玫根多糖 RDRP 各剂量组细胞界限清晰,可见胸腺小体。

2.2.3 刺玫根多糖对小鼠外周血白细胞数量的影响

与空白对照组相比,模型组白细胞数(white blood cell, WBC)、红细胞数(red blood cell, RBC)、血小板(blood platelet, PLT)、淋巴细胞数量(lymphocyte, LYM)明显显著降低($P < 0.01$),平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin, MCHC)显著增高;与模型组相比,阳性对照组和刺玫根多糖高剂量组的白细胞、红细胞、血小板数量均显著升高

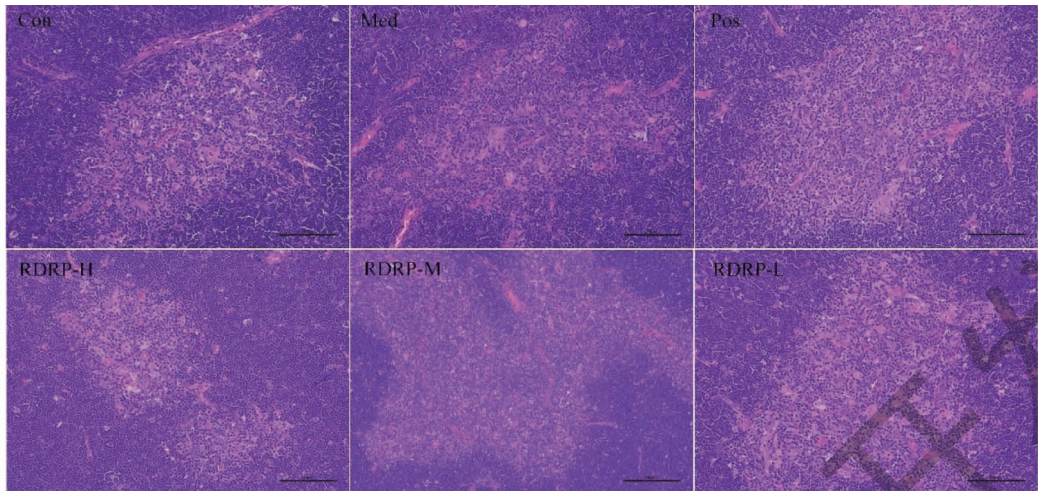


图5 RDRP对小鼠胸腺病理形态影响(HE, ×100)

Fig. 5 Effects of RDRP on the pathological morphology of mice thymus(HE, ×100)

($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组相比,刺玫根多糖 RDRP 低剂量组和中剂量组的白细胞、红细胞、血小板数量有升高,但没有显著意义。与模型组比较,其他给药组的淋巴细胞数量均有增高趋势,而平均红

细胞血红蛋白浓度均有降低的趋势(见表2),提示刺玫根多糖 RDRP 可能上调免疫功能低下小鼠的外周血细胞来增强细胞免疫。

表2 各组小鼠血常规指标比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of blood routine indexes of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	WBC	RBC	PLT	LYM	MCHC
Con	4.39 ± 1.19	11.36 ± 0.76	549.38 ± 74.05	4.05 ± 1.13	288.44 ± 8.14
Mod	2.94 ± 0.55 ^{##}	10.09 ± 0.77 ^{##}	440.50 ± 57.66 ^{##}	2.66 ± 0.51 ^{##}	294.00 ± 8.29 [#]
Pos	4.18 ± 0.63 ^{**}	11.05 ± 0.62 [*]	534.71 ± 75.80 [*]	3.02 ± 0.82	287.00 ± 8.40
RDRP-L	3.10 ± 0.50	10.44 ± 1.45	474.45 ± 86.00	2.81 ± 0.43	291.50 ± 6.02
RDRP-M	3.35 ± 0.67	10.58 ± 0.44	506.70 ± 55.58	2.99 ± 1.08	291.29 ± 6.29
RDRP-H	3.82 ± 0.79 ^{**}	10.84 ± 0.78 [*]	512.13 ± 79.86 [*]	2.80 ± 0.77	291.68 ± 4.54

2.2.4 刺玫根多糖对小鼠血清中免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 浓度的影响

由图6可知,与空白对照组比较,模型组小鼠血

清中的免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 浓度水平极显著下降($P < 0.01$),说明环磷酸胺免疫抑制小鼠模型造模成功。与模型对照组比较,刺玫根多糖 RDRP 各

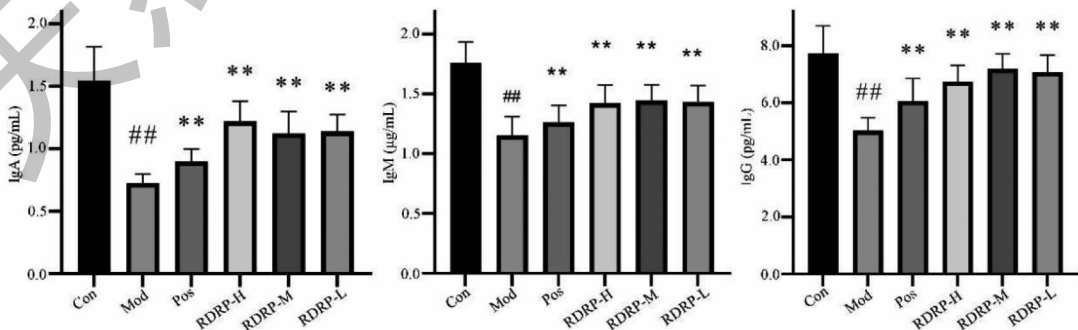


图6 RDRP对小鼠血清中免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 的影响

Fig. 6 Effects of RDRP on the levels of IgM, IgG, IgA in mice serum

注:与 Con 比较,^{##} $P < 0.01$;与 Mod 比较,^{**} $P < 0.01$,下同。Note:Compared with Con,^{##} $P < 0.01$;Compared with Mod,^{**} $P < 0.01$,the same below.

剂量组和香菇多糖组的免疫球蛋白 IgA、IgG、IgM 浓度水平极显著上升($P < 0.01$)。但是高、中、低剂量组之间没有显著差异。

2.2.5 刺玫根多糖对小鼠血清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 的影响

由图 7 可知,与空白对照组比较,模型对照组小鼠血清中的 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 含量极显著降

低($P < 0.01$)。与模型组比较,刺玫根多糖 RDRP 各剂量组和香菇多糖组均极显著上调了 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 的含量($P < 0.01$),各剂量组之间没有差异。这结果提示 RDRP 可能通过上调免疫低下小鼠血清中细胞因子的含量而调节免疫功能,缓解环磷酰胺引起的免疫低下状况。

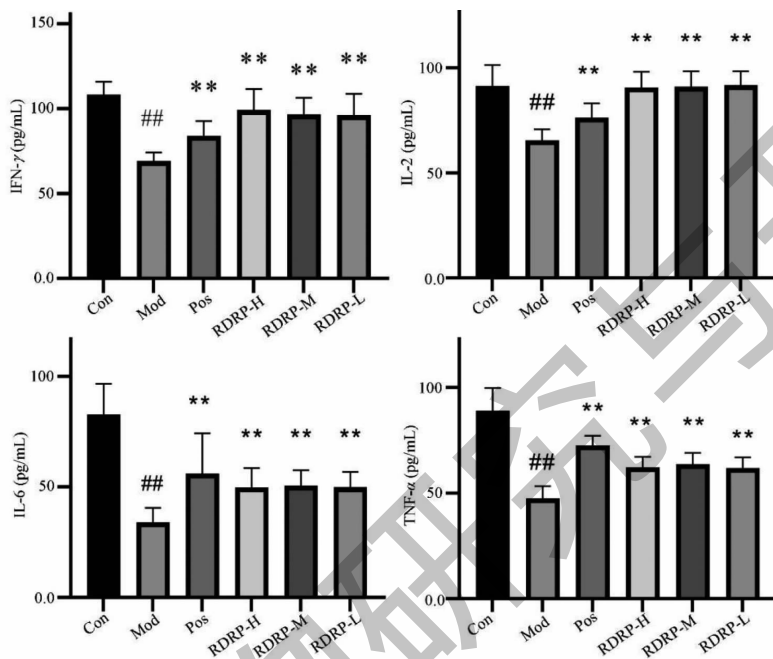


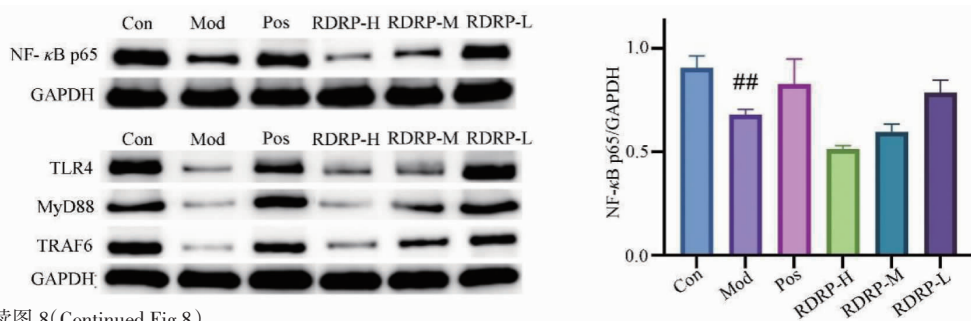
图 7 RDRP 对小鼠血清中细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF- α 的影响

Fig. 7 Effects of RDRP on the levels of IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α in mice serum

2.2.6 刺玫根多糖对小鼠脾脏组织中相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 法测定各组 TLR4、MyD88、TRAF-6 和 NF- κ B p65 蛋白的表达水平。结果如图 8,与空白对照组相比,模型对照组小鼠脾脏的 NF- κ B p65 蛋白显著下降($P < 0.01$)。与模型对照组相比,刺玫根多糖 RDRP 各剂量组有上升趋势,但无统计学意义,且浓度和剂量有依赖趋势。与空白组对照组相比,模型对照组的 TLR4、MyD88、TRAF-6 蛋

白表达水平显著下降($P < 0.01$)。与模型组相比,刺玫根多糖 RDRP 各剂量组的 TLR4 和 TRAF6 蛋白极显著上升($P < 0.01$),刺玫根多糖 RDRP 低剂量组的 MyD88 蛋白极显著上升($P < 0.01$),刺玫根多糖中、高剂量组的 MyD88 蛋白水平有上升趋势,但无统计学意义。综上结果,刺玫根多糖 RDRP 可能有由调节 TLR4/MyD88/TRAF-6 信号通路和 NF- κ B p65 蛋白的表达水平来提升小鼠免疫功能。



续图 8(Continued Fig.8)

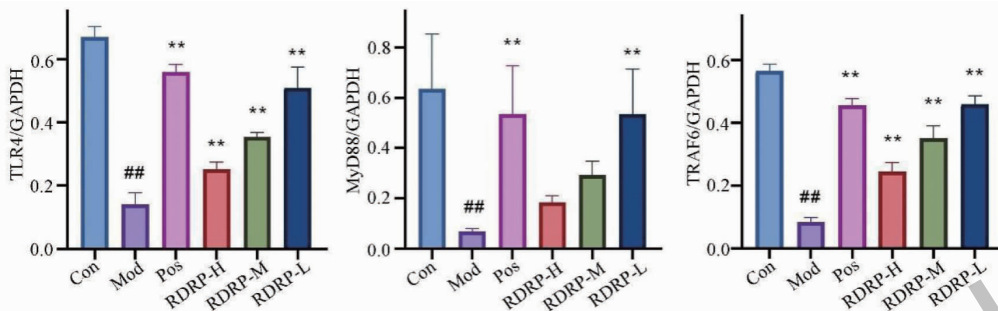


图8 小鼠脾脏中 TLR4、MyD88、TRAF6 和 NF- κ B 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Expression of TLR4, MyD88, TRAF6 and NF- κ B proteins in the mice spleen($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

植物多糖具有多种生物活性而越来越受到天然产物研究者的关注。有生物活性的植物多糖在药物、食品、保健品、绿色产品等领域上起着重要作用^[18]。随着科学技术的不断进步,植物多糖的提取纯化和结构鉴定技术逐步走向多样化,比如热水提取法、碱提取法、乙醇发酵沉淀法、酶辅助法、微波辅助提取法、超声提取法、超声辅助酶提取法、亚临界水提取法、超高压提取法、减压/真空提取法等陆续报道^[19]。这些方法都有利弊,其中热水提取法虽然提取率不是很高,但经济、无毒、安全、无损害细胞壁等优势而常用在多糖提取中。本研究中采用热水提取/乙醇沉淀方法,从刺玫根中提取多糖,并用两种方法进行脱蛋白。结果表明,TCA法脱蛋白效果明显,但糖的损失较多,所以Sevage法相比TCA法更适合山刺玫根多糖的脱蛋白。经过乙醇分级沉淀,得到60%醇沉多分散度相对较小的多糖RDRP,其糖含量为94.1%。植物多糖的结构直接影响其生物活性,可采用分子量分布、红外特征吸收峰、单糖组成等来鉴定多糖基本结构^[20,21]。本研究中,GPC法测定刺玫根多糖分子量,发现RDRP为重均分子量为13.1 kDa,少含分子量较大(66.7 kDa)的混合多糖。其红外检测结果表明,刺玫根多糖是含有 α -构型的中性吡喃多糖。单糖组成分析表明,主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、木糖组成。但其单糖支链连接方式有待进一步深入研究。

免疫系统包括免疫器官、免疫细胞和免疫分子,它们共同作用保护机体免受病原体的侵害。胸腺和脾脏是主要的免疫器官,在产生和维持免疫细胞方面起着重要作用^[22]。作为体液免疫和细胞免疫的中心,脾脏是T、B淋巴细胞定居的主要场所,因此脾脏指数可以反映机体免疫力的高低。环磷酰胺是

烷化剂的一种,广泛用于癌症治疗的药物。但它不仅对癌细胞有各种毒性,对免疫细胞、上皮细胞等快速分裂的细胞也有毒性,常被用于免疫抑制模型的建立。本研究中,给小鼠腹腔注射环磷酰胺后,小鼠体质量、脾脏指数、胸腺指数、免疫球蛋白浓度水平均明显低于空白对照组($P < 0.01$),表明免疫抑制模型小鼠制备成功。并连续刺玫根多糖RDRP干预2周后,与模型对照组相比,RDRP组小鼠的外周血白细胞、淋巴细胞、血小板数量和脾脏指数、胸腺指数均为显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明其可促进免疫低下小鼠免疫器官的发育。在生物光学显微镜下观察胸腺和脾脏病理的变化,结果表明刺玫根多糖RDRP组小鼠脾脏和胸腺的病理变化有一定的改善,说明能提高免疫器官的免疫功能。ELISA检测发现刺玫根多糖RDRP各剂量组和香菇多糖组的免疫球蛋白IgA、IgG、IgM浓度水平极显著上升($P < 0.01$),说明刺玫根多糖有助于增强机体免疫功能。此外,植物多糖能够激活T淋巴细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞等,促进相关细胞因子,提高机体免疫功能^[23]。本研究中,刺玫根多糖RDRP各剂量组和香菇多糖组均极显著上调了免疫低下小鼠血清中IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6的含量($P < 0.01$),说明刺玫根多糖可能通过上调免疫低下小鼠血清中细胞因子的含量,调节免疫功能,缓解环磷酰胺引起的免疫低下。

目前,多糖免疫调节作用机制的研究也受到关注。其中TLR下游通路NF- κ B的报道最多^[24]。本研究中,采用Western blot法测定各组TLR4、MyD88、TRAF-6和NF- κ B p65蛋白的表达水平。结果显示,与模型组相比,刺玫根多糖RDRP高剂量组的TLR4、MyD88、TRAF-6蛋白极显著上升($P < 0.01$),刺玫根多糖RDRP各剂量组NF- κ B p65蛋白

有上升趋势。这结果表明,刺玫根多糖可能激活 TLR4 受体,进而激活 MyD88(髓样分化因子 88)与 IRAK(IL-受体相关激酶)结合去激活 TRAF-6(TNF 受体相关因子 6)和 I κ B 激酶复合体,诱导 NF- κ B 抑制蛋白激酶 I κ B 磷酸化,增加 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的分泌,进而发挥免疫调节作用^[16,25]。

综上所述,主要由 13.1 kDa 重均分子量的多糖组成的刺玫根多糖能够增加免疫器官指数和外周血白细胞、淋巴细胞、血小板数量,改善免疫器官病理变化,还能够上调免疫相关蛋白和细胞因子表达水平,缓解 CTX 所导致的免疫低下,呈展现一定的免疫调节活性,并其作用机制与 TLR/NF- κ B 通道有关。本研究结果为刺玫根多糖的开发应用提供一定价值的实验依据。

参考文献

- Liu ZM, Yang JL, Xing X, et al. Investigation on medicinal use and resources of *Rosa davurica* Pall in Jilin Province [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2017, 40:1558-1562.
- Compilation Committee of "Traditional Chinese and Mongolian Medicine Plant Resources of Daxing'anling, China". Traditional Chinese and Mongolian Medicine Plant Resources of Daxing'anling, China(中国大兴安岭蒙中药植物资源志) [M]. Chifeng: Inner Mongolia Science and Technology Press, 2011:211.
- Peng XL, Liu ZM. Revision and improvement of quality standards for *Rosae Davuricar Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Pharm*(中国药师), 2018, 21:1104-1108.
- Liu J, Di ZZ, Wang GH, et al. Study on Anti-oxidant activity in vitro of *Rosa davurica* Pall [J]. *Asia-Pac J Tradit Med* (亚太传统医药), 2014, 10:30-32.
- Xie XY, Gong JY, Wang LY, et al. Chemical constituents of the root of *Rosa davurica* Pall [J]. *Lishizhen Med Mater Res*(时珍国医国药), 2009, 20:366-367.
- Hu W, Han W, Jiang Y, et al. Biological activity and inhibition of non-enzymatic glycation by methanolic extract of *Rosa davurica* Pall. root [J]. *J Food Sci Nutr*, 2011, 16:242-247.
- Zheng JD. Research on antibacterial activity of extract and effective components from the root of *Rosa davurica* Pall [D]. Yanbian: Yanbian University(延边大学), 2021.
- Zhang XR, Cao LH. Effect of aqueous extract of *Rosa davurica* Pall. radix on the function of rat isolated vessels and its mechanism [J]. *J Yanbian Med Univ* (延边大学医学学报), 2018, 41:8-10.
- Han JL, Yu WL, Jia JY. Effect of *Rosa davurica* root polysaccharides on immune function in *D*-galactose-induced aging model mice [J]. *Chin J Gerontol*(中国老年学杂志), 2008, 28:759-760.
- Yu Y, Shen M, Song Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 183:91-101.
- Feng LL, Wang R, Dong ZB, et al. Preparation, structure characterization and immunoregulatory activity of *Cerasus humilis* polysaccharide [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2022, 34:739-749.
- Li W, Hu X, Wang S, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145:985-997.
- Zheng RL, Chen MY, Chen DY, et al. Research progress of polysaccharides against influenza virus [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2022, 34:167-172.
- Meng H, Wu J, Shen L, et al. Microwave assisted extraction, characterization of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and its antioxidant effects via ferroptosis-mediated activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 215:398-412.
- Geng XQ, Pan LC, Sun HQ, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* L. Moench (Okra) and its hypoglycemic effect and mechanism on type 2 diabetes mellitus [J]. *Food Funct*, 2022, 13:11973-11985.
- Lai MT, Xiao P, Fang YY, et al. Research progress on immune regulation mechanism of traditional Chinese medicine polysaccharide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54:3339-3348.
- Mu D, Saren GW, Bao L, et al. Structure, immunomodulatory and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from *Radix Asparagi* [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报), 2022, 22:51-60.
- Lovegrove A, Edwards CH, De Noni I, et al. Role of polysaccharides in food, digestion, and health [J]. *Cri Rev Food Nutr*, 2017, 57:237-253.
- Mohanta B, Jyoti Sen D, Mahanti B, et al. Antioxidant potential of herbal polysaccharides: an overview on recent researches [J]. *Sensors Intl*, 2022, 3:100158.
- Ren Y, Bai Y, Zhang Z, et al. The preparation and structure analysis method of natural polysaccharides of plants and fungi: a review of recent development [J]. *Molecules*, 2019, 24:3122.
- Jiang M, Zhu L, Jiang J. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2010, 14:1367-1402.
- Yin M, Zhang Y, Li H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:145.