

文章编号 :1009-038X(2003)04-0049-03

黄芪活性成分的提取及其对淋巴细胞增殖的影响

聂小华¹, 史宝军¹, 敖宗华¹, 尹光耀², 金 坚¹, 陶文沂¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡市第三人民医院, 江苏 无锡 214041)

摘 要:研究了黄芪多糖(APS)、皂甙(AP)的提取工艺及其对淋巴细胞增殖的影响. 通过单因素实验初步确定了 APS、AP 的提取工艺. 淋巴细胞增殖实验表明, 在 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, APS、AP 均能促进 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖, 其中 APS 的增强作用显著.

关键词:黄芪; 多糖; 皂甙; 淋巴细胞增殖

中图分类号: TQ 460.7⁺2

文献标识码: A

Extraction of the Active Compounds from *Astragalus membranaceus* and its Effects on the Lymphocytes Proliferation

NIE Xiao-hua¹, SHI Bao-jun¹, AO Zong-hua¹, YIN Guang-yao², JIN Jian¹, TAO Wen-yi¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. The 3rd people hospital of Wuxi, Wuxi 214041, China)

Abstract: The optimum conditions of extracting *Astragalus* polysaccharides (APS) and saponins (AP) were determined. In a certain concentration range (12.5~100 $\mu\text{g/mL}$), APS and AP obviously stimulate the lymphocytes proliferation induced by ConA.

Key words: *Astragalus membranaceus*; APS; AP; lymphocytes proliferation

黄芪是一味健脾益气的中药, 临床应用极为广泛, 其治疗肿瘤的作用一般认为, 是通过提高机体的免疫功能、增强体内的抗癌能力、调整全身的器官功能而实现的. 一般黄芪的有效部位为多糖和皂甙, 对免疫系统的作用主要为 (1) 对非特异性免疫功能的影响 (2) 对体液免疫功能的影响 (3) 对细胞免疫功能的影响 (4) 对诱生干扰素的影响^[1~4]. 本研究室在研制胃康复新药的过程中, 对其君药——黄芪的活性成分(黄芪多糖 APS、黄芪皂甙 AP)进行了提取制备, 并研究了两者在体外的免疫活性.

1 材料与方法

1.1 药材和药品

黄芪: 购于无锡山禾药材经销总公司, 经鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; 黄芪甲甙: 购于中国药品生物制品检定所.

1.2 动物

昆明小鼠: 体重 18~22 g, 购于江苏省原子医学研究所.

收稿日期: 2003-02-17; 修回日期: 2003-03-20.

作者简介: 聂小华(1974-)女, 江西南昌人, 发酵工程博士研究生.

万方数据

1.3 方法

1.3.1 黄芪活性成分的提取工艺 采用单因素实验优化 APS ,AP 的提取工艺 ,工艺流程见图 1.

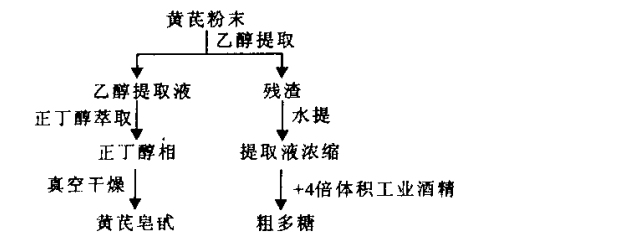


图 1 黄芪活性成分的提取工艺

Fig.1 The technology of extracting the Active Compounds from *Astragalus membranaceus*

粗多糖溶于水 ,依次添加澄清剂 A ,B ,50 ℃ 水浴处理 4 h ,离心 ,上清液加 4 倍体积工业酒精 ,放置过夜 ,沉淀依次用体积分数 80 % 的乙醇、95 % 的乙醇、无水乙醇、无水乙醚洗涤 ,真空干燥得 APS.

1.3.2 APS 含量的测定 采用硫酸—苯酚法^[5];

1.3.3 AP 含量的测定 采用硫酸—香草醛法^[5];

1.3.4 黄芪甲甙的测定 采用 HPLC 分析^[6] , ZORBAX ODS SB-C18 柱(150 mm×4.6 mm) ,流动相为 V(乙腈): V(水)= 30 : 70 ,体积流量 1 mL/min ,紫外检测 205 nm.

1.3.5 对 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响 常规制备小鼠脾脏淋巴细胞^[7] ,经台盼蓝检测活细胞数目大于 95 % ,用体积分数 10 % 小牛血清—RPMI1640 调整细胞数为 3×10⁶/mL ,加样 24 孔板 ,每孔 1 mL ,加入 0.5 mL ConA 溶液 ,使其最终质量浓度为 5 μg/mL ,加入 0.5 mL 稀释成不同质量浓度的 APS ,AP ,置于 37 ℃ ,体积分数 5 % 的 CO₂ 条件下培养 72 h. 试验结束前 4 h 加 MTT 液(5 mg/mL) ,继续孵育 ,离心 ,弃去上清液 ,加入 DMSO 1 mL ,振荡 10 min ,检测 OD₅₇₀. 试验以培养基对照组为空白.

增殖刺激指数(SI)= 样品 OD₅₇₀/对照组 OD₅₇₀

1.3.6 对 ConA 诱导的小鼠胸腺淋巴细胞增殖的影响 同 1.3.5.

2 结果与讨论

2.1 黄芪活性成分的工艺优化

2.1.1 AP 的提取工艺 两步提取 ,提取液为体积分数 70 % 乙醇.第一次提取液用量是药材用量的 12 倍 ,提取时间为 80 min ;第二次提取液用量是药材用量的 8 倍 ,提取时间为 60 min ,回流提取.产品得率 1.4 % ,产品中 AP 的质量分数为 58 %

(香草醛-硫酸测定) ,其中黄芪甲甙的质量分数为 20.5 % (见图 2).

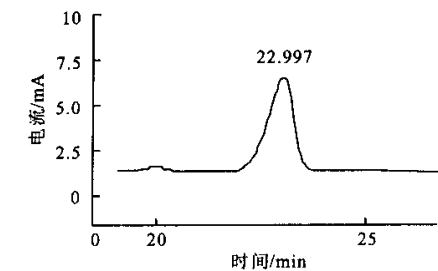


图 2 黄芪甲甙标准品的 HPLC 图

Fig.2 Analysis of Astragaloside by HPLC

2.1.2 APS 的提取 两步法 ,第一次水用量是药材用量的 10 倍 ,提取时间 60 min ,第二次水用量为药材用量的 8 倍 ,提取时间 50 min ,回流提取.产品得率 2.5 % ~ 3.0 % .用硫酸—苯酚法测定可知 ,产品中 APS 的质量分数为 56 % .

2.2 黄芪活性成分对 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞增殖的促进作用

脾脏淋巴细胞中包含了 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞 ,两者含量基本相近. ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原 ,仅促进 T 淋巴细胞的增殖 ,对 B 淋巴细胞不起作用.实验结果(见表 1)表明 ,APS 和 AP 对 ConA 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖有一定的增强作用 ,黄芪多糖、皂甙在 12.5 ~ 100 μg/mL 范围内基本呈钟罩形(先升后降).

表 1 APS ,AP 对 ConA 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞增殖的促进作用

Tab.1 The effects of APS and AP on the mice spleen lymphocytes proliferation with ConA

项 目	质量浓度/ (μg/mL)	OD ₅₇₀	SI
APS+ ConA	12.5	0.211 *	1.17
	25	0.254 * *	1.40
	50	0.268 * *	1.48
	100	0.267 * *	1.48
AP+ ConA	12.5	0.203 *	1.12
	25	0.211 *	1.17
	50	0.199	1.10
	100	0.199	1.10
ConA 对照组		0.181	

注 : * P<0.05 ; * * P<0.01.

2.3 黄芪活性成分对 ConA 诱导的小鼠胸腺淋巴细胞增殖的促进作用

由实验结果(见表 2)可知 ,APS 在 12.5 ~ 100

$\mu\text{g/mL}$ 范围内显著促进 ConA 诱导的小鼠胸腺 T 淋巴细胞增殖,当质量浓度为 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时 SI 值高达 5.10,而 AP 只表现出一定的促进作用. APS、AP 在 $12.5\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内呈钟罩形,统计学上具有显著性.由于胸腺淋巴细胞中绝大部分为 T 淋巴细胞,APS 对 ConA 诱导的小鼠胸腺淋巴细胞增殖的促进作用均明显高于 APS 对小鼠脾脏淋巴细胞增殖的促进作用.

3 结 论

黄芪作为健脾益气的中药,已有不少研究报道了其活性成分 APS、AP 具有良好的免疫增强作用.本实验结果进一步证实了 APS、AP 对于 ConA 诱导的脾脏、胸腺 T 淋巴细胞增殖具有促进作用,其中 APS 作用显著,但 APS、AP 在 $12.5\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内基本呈钟罩形的量效关系尚无报道,有待于进一步研究探讨.

表 2 APS、AP 对 ConA 诱导的小鼠胸腺淋巴细胞增殖的促进作用

Tab.2 The effects of APS and AP on the mice thymus lymphocytes proliferation with ConA

项 目	质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	OD ₅₇₀	SI
APS+ ConA	12.5	0.082**	4.32
	25.0	0.090**	4.74
	50.0	0.097**	5.10
	100.0	0.071**	3.74
AP+ ConA	12.5	0.017	1.00
	25.0	0.019	1.00
	50.0	0.029*	1.53
	100.0	0.018	1.00
ConA 对照组		0.019	

注： * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

参考文献：

[1] 单俊杰,王顺春,刘涤,等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(3): 61-65.
[2] Bedir E, Pugh N, Calis I, et al. Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from astragalus species[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(7): 834-837.
[3] Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, et al. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and oldenlandia diffusa in particular[J]. Int J Immunopharmacol, 1997, 19(7): 359-370.
[4] Zheng Z, Liu D, Song C, et al. Studies on chemical constituents and immunological function activity of hairy root of Astragalus membranaceus[J]. Chin J Biotechnol, 1998, 14(2): 93-97.
[5] 韩鲁佳,阎巧娟,江正强. 黄芪多糖及皂甙提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2000, 16(5): 118-121.
[6] 王静竹,闫汝南,关莹,等. HPLC 法测定黄芪炮制品中黄芪甲甙含量[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(2): 84-85.
[7] 尹学念. 免疫学和免疫学检验实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997: 39.

(责任编辑 杨 勇)