珠贝提取物药理作用的研究△

金亦涛,吴皓,陈文星,陆茵
(南京中医药大学 江苏省海洋药物研究开发中心,江苏 南京 210029)

摘 要:通过对珠贝的活性部位提取物相关药理作用的实验探讨,结果表明该提取物能明显增强小鼠的单核巨噬细胞吞噬功能,抑制迟发性超敏反应,对造血功能受损的小鼠有恢复作用,并对环磷酰胺抑制的 T 淋巴细胞转化有促进作用。此外该提取物还具有良好的增加抗疲劳能力和镇痛的作用。

关键词:珠贝提取物;免疫功能;抗疲劳;耐缺氧;镇痛
中图分类号:R931.711 **文献标识码**:A **文章编号**:1002-3461(2002)01-0015-04

Pharmacologic researches on extracts from flesh of *cridtaria plecata* and *hyriopsis cumingii*

JIN Yi-tao, WU Hao, CHEN Wen-xing, *et al.*
(*Nanjing traditional Chinese Medical University, Nanjing* 210029, *China*)

Abstract: administration of extracts from flesh of *Cridtraria plecata* and *Hyriopsis cumingii* can stimulate phagocytic function by macrophages; inhibit allergic reaction Ⅳ induced by 2, 4-Dinitrochlorobenzene; enhance the proliferation of immunoinhibited murine splenocytes stimulated by ConA in vivo. They can increase the hemoglobin (HB) and white blood cell count (WBC) in blood of mice modeled by Cytoxan. It also can prolong the swimming time of mice, enhance mice's tolerance towards hypoxia. Analgesic test showed significant analgesic activities on mice.

Key words: extracts from flesh of *Cridtraria plecata* and *Hyriopsis cumingii*; phagocytic function by macrophages; resist fatigue; hypoxia-resisting; analgesic activity

珍珠作为一味常用中药,已在临床广泛使用,但养殖珍珠软体还未得到充分利用。中医文献中早有记载,谓养殖珍珠的母体可以主妇人劳损下血,明目,除湿,止消渴。有关文献也报道其具有滋阴、清热、养肝、明目、消渴、凉血等功能,并可用于治疗肝热、肾衰、痘毒、烫伤等症[1]。为了使珍珠养殖得到综合利用,本课题组将养殖珍珠的母体部分依提取分离技术得珠贝活性部位提取物并制成制剂。本文主要对该提取物部分药理作用进行初步探讨。

1 材料,试剂及仪器

1.1 实验材料

珠贝提取物:珠贝购自南京市浦口珠贝养殖厂,经南京师范大学生物系苏萃蓉教授鉴定为软体动物门动物三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii Lea*)、圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana Lea*)的新鲜软体部分。其活性部位的提取分离由本中心制剂研究室完成。

1.2 试剂

印度墨汁、2,4-二硝基氯苯、冰醋酸、丙酮、注射用环磷酰胺(上海华联制药有限公-

△基金项目:国家"863"计划资助项目,项目编号(819-07-08)

司)、ConA、LPS、RPMI-1640 培养基等。

1.3 仪器

GS-15 台式冷冻离心机(BECKMAN);DU-640 核酸蛋白分析仪(BECKMAN);喷雾干燥器(BUCHIB-191);96 孔板(NUNC™);多头细胞收集器(ZT-Ⅱ型,浙江卫星机械厂);LKB1219 液闪仪等。

1.4 动物

ICR 种系小鼠,体重 18～22g,由南京中医药大学实验动物中心提供(苏动质字 97003)。

2 实验方法与结果

2.1 对免疫系统功能的影响

2.1.1 对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响[3]

取 ICR 小鼠,随机分组,按表 1 剂量灌胃给药,空白给予同等体积的生理盐水,给药 10d 后,小鼠每 10g 体重尾静脉注射(1/3)稀释的印度墨汁 0.1mL,立即计时,并分别于 2,10min 眼眶取血 25μL,加入 2mL0.1%碳酸钠,于核酸蛋白分析仪 600nm 处测定 A 值,并称取肝,脾重量。按公式计算吞噬指数(A)。

表 1 珠贝提取物对小鼠单核巨噬细胞吞噬功能的影响(n=10)

组别	剂量($\mu g \cdot g^{-1}$)	A
正常组		5.273±0.354
提取物组	400	5.919±0.570**
	200	4.712±1.349

注: **$P<0.01$ vs 空白组

结果表明,珠贝软体提取物(下称"提取物")与对照组相比有显著性差异($P<0.01$),能够增强小鼠单核巨噬细胞的吞噬能力。

2.1.2 对二硝基氯苯造成的小鼠迟发性超敏反应的影响[3]

将小鼠按体重随机分入 5 组,每组 10 只,按表中剂量灌胃给药,空白及模型对照组给予同体积生理盐水,给药 7 天后,腹部去毛,以 7%二硝基氯苯(DNCB)丙酮溶液 20μL 涂抹致敏。10d 后,右耳均匀涂抹 7% DNCB 丙酮溶液 30μL 攻击,左耳涂抹溶剂对照,24h 后处死小鼠,剪下左右耳壳,于同一部位取直径 8mm 耳片称重,左右耳片重量之差为肿胀度,阳性对照使用皮下注射环磷酰胺 $100\mu g \cdot g^{-1}$,连续 5 天。结果见表 2

表 2 珠贝提取物对小鼠迟发性超敏反应的影响

组别	剂量($\mu g \cdot g^{-1}$)	动物数	肿胀度(mg)
正常组		10	0.0175±0.23
模型组		10	24.50±4.89ΔΔΔ
模型+环磷酰胺	100	10	15.78±4.80**
模型+提取物	600	10	11.63±4.37**
	300	10	14.29±7.55**

注:ΔΔΔ$P<0.001$,模型组 vs 正常组;

**$P<0.01$,给药组 vs 模型组;

实验结果表明,对于二硝基氯苯诱导的小鼠迟发性超敏反应,提取物对实验小鼠的体重和脏器/体重的比值未见明显影响($P>0.05$),但对小鼠耳廓肿胀程度与对照组相比均低于对照组,且有效应随剂量上升的趋势,两剂量组与对照组相比具有极显著性差异($P<0.01$),说明其具有抑制由 DNCB 引起的迟发性超敏反应作用。

2.1.3 H^3-TdR 掺入法对免疫抑制小鼠淋巴细胞转化的影响[4,5]

ICR 纯系小鼠,雌雄均可,随机分成 4 组,每组 7 只,除正常组外其他各组给予 $100\mu g \cdot g^{-1}$的环磷酰胺腹腔注射形成免疫抑制模型,提取物组小鼠同时灌胃给药,给药剂量见表,对照组给予相同剂量的生理盐水灌胃。连续给药 7d 后处死小鼠,无菌条件下迅速取出脾脏制成脾细胞悬液,用台盼蓝染色,稀释成 2×10^6 浓度备用。

将各组鼠脾细胞加入无菌培养板孔中,每孔 200μL,每一份样品重复 3～4 孔。刺激 T 细胞时加 ConA,刺激 B 细胞时加入 LPS。5% CO_2 培养 72h,终止培养前 6h 加 H^3-TdR 1μL,用多头细胞收集仪将细胞抽吸在 49 型玻璃纤维滤纸上,置 80℃干燥 30min,滤纸片

放入装有闪烁液的小瓶中测它的放射强度,计算刺激指数。测定结果见表 3。

表 3 珠贝提取物对免疫抑制小鼠淋巴细胞转化的影响

组别	剂量 ($\mu g \cdot g^{-1}$)	动物数 (n)	T 细胞刺激指数 ($\bar{x}\pm s$)	B 细胞刺激指数 ($\bar{x}\pm s$)	有核细胞数 ($\bar{x}\pm s$)
正常组		7	5.71±1.59	5.44±1.88	7.50±1.29
环磷酰胺	100	7	2.90±1.28$^{\Delta\Delta\Delta}$	3.40±0.90$^{\Delta\Delta}$	6.32±1.19$^{\Delta}$
环磷酰胺+提取物	600	7	12.5±1.93**	8.51±4.62*	7.63±1.87*
	300	7	4.08±2.56	2.91±0.46	7.58±2.79

注:$\Delta P<0.05$;$\Delta\Delta P<0.01$;$\Delta\Delta\Delta P<0.001$,模型组 *vs* 正常组

$*P<0.05$;$**P<0.01$,给药组 *vs* 模型组

结果表明,珠贝提取物对由环磷酰胺造成的 T 淋巴细胞转化抑制具有较强的对抗作用,能升高小鼠被抑制的 T 淋巴第胞转化率,具有极显著性差异($P<0.001$,$P<0.01$),对 B 淋巴细胞的转化抑制亦呈现出对抗作用,高剂量组与模型组相比具有显著性差异($P<0.05$)

2.2 对小鼠升高白细胞作用的考察[6]

取 20g 左右雄性小鼠 40 只,随机均分为 4 组,每组 10 只。第一组为空白组,每日生理盐水 0.02mL·g^{-1}灌胃一次,连续 6 天;第二组为白细胞减少模型组,生理盐水灌胃同第一组,第 6 天皮下注射 0.1%的环磷酰胺溶液 0.01mL·g^{-1},连续 3 天,给药组剂量见表 4,连续 6 天,于第 6 天皮下注射 0.1%环磷酰胺溶液 0.01mL·g^{-1},连续 3 天,于第 12 天眼眶取血,处死。测体重(G),血红蛋白(HB),红细胞数(RBC),白细胞数(WBC),血小板(PLT)。

表 4 珠贝提取物对造血功能受损小白鼠的作用的影响

组别	剂量 ($\mu g \cdot g^{-1}$)	G (g)	HB ($g \cdot L^{-1}$)	WBC ($\times 10^9$/L)	PLT ($\times 10^9$/L)
正常组		25.3±2.21	128.5±12.65	6.19±1.58	306.7±39.98
环磷酰胺	100	18.1±6.42$^{\Delta\Delta}$	119.5±9.81$^{\Delta}$	4.79±1.91$^{\Delta}$	208.2±36.01$^{\Delta\Delta\Delta}$
环磷酰胺+提取物	600	20.1±2.95	129±6.63*	6.39±1.29*	181.6±66.88
	300	19.3±3.77	117.88±17.63	6.20±2.72	149.4±93.07

注:$\Delta P<0.05$;$\Delta\Delta P<0.01$;$\Delta\Delta\Delta P<0.001$,模型组 *vs* 正常组

$*P<0.05$;$**P<0.01$,给药组 *vs* 模型组

结果表明模型组与空白组相比,其 G,HB,WBC,PLT 有显著差异,而 RBC 无显著差异;给药组与模型组相比,大剂量组对环磷酰胺造成的 HB,WBC 下降有显著恢复作用,而对 G、PLT 无影响。

2.3 对动物抗疲劳作用的影响[7]

2.3.1 珠蚌提取物对小鼠游泳时间的影响

取小白鼠 40 只,随机分成 4 组,每组 10 只。正常组(生理盐水组),阳性对照组(人参水提液组),珠贝提取物大、小剂量组。各组均灌胃给药 7d。于第 7 天给药后 1h 开始实验。游泳槽(水深 30cm,水温 28℃)。小白鼠腹部负重(体重 10%),开始记录放入游泳槽至小鼠沉入槽底的时间。

表 5 珠贝提取物对小鼠游泳时间的影响

组别	剂量 ($\mu g \cdot g^{-1}$)	动物数	游泳时间
正常组		10	69.75±15.15
人参水提液组	3g/kg	10	118.05±35.47**
提取物组	600	10	109.8±38.08**
	300	10	83.4±43.25

注:$*P<0.05$;$**P<0.01$,给药组 *vs* 对照组

结果表明珠贝提取物具有延长负重小鼠游泳时间的作用。

2.3.2 小鼠耐缺氧能力的影响

取小白鼠 40 只,随机分成 4 组,每组 10 只。正常组(生理盐水组),阳性对照组(人参水提液组),提取物大、小剂量组。于第 7 天给药后 0.5h 开始实验。取 125mL 广口瓶,内置 5g 钠石灰,覆盖吸水纸一层,瓶口涂凡士林,将小鼠置瓶中,一鼠一瓶,即刻上盖封口。记录封口至窒息死亡时间。剂量同上。

表 6 珠贝提取物对小鼠耐缺氧能力的影响

组别	剂量 ($\mu g \cdot g^{-1}$)	动物数	存活时间(s)
正常组		10	28.2±2.24
人参水提液组	3g/kg	10	38.8±7.52**
提取物组	600	10	33.53±8.85**
	300	10	34.92±6.02**

注:* $P<0.05$;** $P<0.01$,给药组 *vs* 对照组:

结果表明珠贝提取物具有延长小鼠常压下耐缺氧能力的作用。

2.4 对小鼠醋酸扭体法镇痛实验的影响[3]

取小鼠按体重随机分成 6 组,每组 16 只,雌雄不限,按表中剂量灌胃给药,阳性对照组给予阿司匹林 100$\mu g \cdot g^{-1}$灌胃,空白给予同等体积的生理盐水,给药 30min 后,腹腔注射 0.6%醋酰溶液 0.2mL/只,观察并记录 15min 内扭体次数,结果见表 7。

表 7 小鼠醋酸扭体法镇痛实验的影响

组别	剂量 ($\mu g \cdot g^{-1}$)	动物数 (n)	扭体($\bar{x}\pm s$ 次)
对照组	0	10	32.6±16.8
阿司匹林组	100mg/kg	15	18.2±9.94**
提取物组	600	15	21.3±8.33**
	300	15	23.4±12.1*
	150	15	22.6±10.78*

注:* $P<0.05$;** $P<0.01$,给药组 *vs* 对照组

结果表明,该提取物对小鼠因注射醋酸引起的疼痛扭体反应有明显的抑制作用。

3 讨论与结论

实验表明所得珠贝提取物能增强小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能,抑制小鼠由二硝基氯苯攻击导致的迟发性超敏感反应,对环磷酰胺造成造血功能受损的小白鼠有恢复作用,增强小鼠的细胞免疫功能和体液免疫功能。提示其具有良好的免疫调节作用。本课题组曾将提取物进行 MTT 实验,未见其对体外培养的肿瘤细胞有细胞毒作用,其他实验反映出该提取物良好的镇痛作用,抗疲劳和增加耐缺氧能力的作用为珠贝活性提取物的开发提供了新的可能方向。实验结果提示珠贝提取物对免疫系统不同环节的作用较为复杂,值得进一步研究。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社. 1977:1848.

[2] 徐叔云等主编. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社. 1991.

[3] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社. 1993.

[4] Xia D, Lin ZB. Effects of Ganoderma polysaccharides on immune function in mice[J], *J Beijing Med Univ*, 1989, 21:533.

[5] 中国医学科学院首都医院基础组等. 放射免疫分析及其他放射体外测定法[M]. 北京:原子能出版社. 1975.

[6] 国家卫生部药政司编. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编. 1993,103.

[7] 王筠默. 长白参的药理研究[J]. 中草药. 1986,17(2):19.

(收稿日期:2001-4-12)

欢迎订阅《中国海洋药物》杂志

欢 迎 惠 赠 广 告