

甘草 主要成分的抗菌特性

GANCAO

ZHUYAO CHENGFEN DE KANGJUN TEXING

廖成水 著



中国原子能出版社
China Atomic Energy Press

甘草 主要成分的抗菌特性

GANCAO

ZHUYAO CHENGFEN DE KANGJUN TEXING

廖成水 著



中国原子能出版社
China Atomic Energy Press

图书在版编目(CIP)数据

甘草主要成分的抗菌特性/廖成水著.——北京:中国原子能出版社,2016.11

ISBN 978-7-5022-7636-2

I. ①甘… II. ①廖… III. ①甘草—中药化学成分—研究 IV. ①R282.71

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 271571 号

甘草主要成分的抗菌特性

出 版 中国原子能出版社(北京市海淀区阜成路 43 号 100048)

责任编辑 蒋焱兰 邮箱:ylj44@126.com QQ:419148731

印 刷 河南承创印务有限公司

经 销 全国新华书店

开 本 710mm×1010mm 1/16

印 张 7.5

字 数 125 千字

版 次 2016 年 11 月第 1 版 2016 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5022-7636-2

定 价 36.00 元

出版社网址:<http://www.aep.com.cn> E-mail:atomep123@126.com

发行电话:010-68452845

版权所有 侵权必究

P 前言

REFACE

甘草是一种多年生草本植物,在我国作为一种中草药已多年,甘草药用为其根,性甘、平,中药功效为健脾补气,清热解毒,祛痰止咳,调和诸药。近代研究发现甘草对很多疾病的预防和治疗表现出良好的作用,故甘草的药理活性的研究和发掘在国内外的热度居高不下。因此,近年来,很多科研工作者都试图从自然植物甘草中提取活性物质,来用于各种不同的医学领域。在应用上,甘草不仅应用在食品、药物化妆品的添加剂,更重要的是,甘草具有抗癌、抗病毒、增强自身免疫活性以及多种疾病的防治和治疗方面。甘草中的主要药理成分为甘草甜素、甘草多糖、光甘草定等。现代试验研究和临床应用表明,甘草的水提取部位、甲醇提取部位和超临界提取物都具有一定的抗菌活性,对多种革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均表现一定的抑制作用,对呼吸系统感染和口腔溃疡等多种细菌疾病有一定疗效。

自 19 世纪 40 年代以来,科研工作者对来源于植物、海洋生物及菌类的多糖产生了浓厚兴趣。具有激活、增强和调节人体免疫能力、抗炎、抗癌、抗病毒、修复自身免疫力功效的天然植物活性多糖研究被公认为是当代医药生物技术的前沿领域之一。多糖是一种由糖苷键连接起来的醛糖或酮糖组成的天然大分子,参与机体能量储存和传递、结构支持、防御功能等多种生理功能。科学家已分离纯化数百种无细胞毒性、副作用小的植物性多糖。甘草多糖是甘草中的一类 α -D-吡喃多糖,甘草多糖的组成成分为鼠李糖、葡聚糖、阿拉伯糖、半乳糖。研究证明甘草多糖能够促进淋巴细胞增殖、增强吞噬细胞的吞噬功能。甘草多糖能够

抑制小鼠 S180 等肿瘤生长,抑制水疱性口炎病毒、腺病毒 II 型、HSV- I 和牛痘病毒复制。研究发现,葡萄糖对生物被膜的形成具有促进作用,可以刺激细菌的生长并且对细菌生物被膜的形成也有一定的促进作用。

甘草甜素在抗病毒抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、降血脂等方面具有明显作用。曲中堂等对甘草甜素的药理作用进行了深入的研究,对甘草甜素多种药理活性进行较为详细的总结,为甘草资源的合理利用和深度开发提供可靠依据。甘草甜素是应用最为广泛的甘草提取物,被广泛应用于食品、化妆品、医药、烟草等行业。目前市场上销售的复方甘草甜素是以 β -甘草酸、半甘氨酸和甘氨酸为主要成分的复方制剂,主要用于治疗慢性肝病。研究资料显示,甘草甜素是一种有效的生物应答修饰剂,主要非特异性增强 NK 细胞和巨噬细胞的活性,在体外或体内抑制水痘病毒、艾滋病病毒、SARS 病毒、乙肝病毒以及抑制肿瘤生长。甘草甜素可增强巨噬细胞吞噬功能,消除抑制性巨噬细胞的抑制活性。甘草甜素还具有降低血脂、较强的解毒功效、抗变态反应以及协同发挥利尿作用。

甘草中具有 150 多种黄酮类化合物,光甘草定是分布在新疆等西部地区的光果甘草的一种脂溶性黄酮类成分,约占甘草总黄酮类成分的 11%。光甘草定具有多种生理活性而具有潜在的应用价值,具有良好的抗氧化活性、抗炎活性、抗溃疡、抗菌、抗动脉粥样僵化以及具有一定的降压、降血脂等作用,在心血管等疾病的防治中显示出良好的应用前景。此外,光甘草定是一种有市场潜力的酪氨酸酶抑制剂,是世界上公认的最安全、最昂贵的天然祛斑美白成分。赵全民等通过 MABA 药物敏感性实验方法研究光甘草定对结核分枝杆菌 H37Rv 和 H37Ra、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌的体外抗菌活性,结果显示,光甘草定对这些细菌均具有很好的抗菌活性。同时甘草对于生物被膜也有一定的杀菌活性,甘草查耳酮 A 可抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成。

抗生素治疗被认为是控制疾病的优先选择,但由于临床上滥用抗生素,近年来不断出现大量细菌耐药菌株,因此,寻找有效细菌抵抗药物就显得尤为重要。天然活性物质具有激活、增强和调节人体免疫能力、促进机体免疫活性细胞功能以及抗炎、抗瘤、抗病毒、修复自身免疫力功效。天然活性生物资源的开发利用和研究日益活跃,成为天然药物、生物化学和生命科学的研究热点,成为并列于

各种组学的另一研究热点,许多科研工作者试图从天然动植物中筛选活性物质开发新药物。甘草是一种有价值的开发保健品和药品的药用植物。应当注意的是,与其他中草药一样,成分复杂和药理、药代动力学不清以及临床副作用是制约甘草临床应用的主要因素。因此,应有更多的实验室基础研究、药物纯化分析和临床前期应用为甘草资源的合理利用和深度开发提供可靠的依据。

本书从革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中以鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、副猪嗜血杆菌、单增李斯特菌以及金黄色葡萄球菌为代表菌株,通过研究甘草三种主要成分甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对几种常见病原微生物体内外生长的影响情况,有助于甘草有效成分的临床应用以及常见细菌性疾病的防控。

最后,谨希望本书的出版能够更多地让科研工作者关注甘草的研究和临床应用价值开发。但需要指出的是,在本书中并未完全阐明甘草三种主要成分甘草甜素、甘草多糖和光甘草定抵抗常见细菌的确切分子机制,还需未来更多的相关科学研究进一步探索。同时,因知识和能力有限,虽然作了最大的努力,本书仍然存在许多错误的地方,望广大专家和读者批评指正。

廖成水

河南科技大学 2016年9月16日

C 目 录

ONTENTS

总 章	甘草主要成分的抗菌特性	001
第一章	甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对小鼠巨噬细胞的毒性与免疫功能 的调节	007
	1.1 材料与方法	008
	1.2 结果	012
	1.3 讨论	017
	1.4 小结	019
	参考文献	019
第二章	甘草多糖调节鼠伤寒沙门菌诱导的巨噬细胞氧化—抗氧化平 衡紊乱	021
	2.1 材料与方法	022
	2.2 结果	026
	2.3 讨论	028
	2.4 小结	032
	参考文献	033
第三章	甘草多糖对小鼠抵抗肠炎沙门菌感染的影响	034
	3.1 材料和方法	034
	3.2 结果与分析	038
	3.3 讨论	042
	3.4 结论	046
	参考文献	047

第四章	甘草多糖对副猪嗜血杆菌的体内外抑制作用	049
4.1	材料与方法	050
4.2	结果	056
4.3	讨论	061
4.4	小结	065
	参考文献	065
第五章	甘草多糖对单核细胞增生性李斯特菌体内外生长的影响	068
5.1	材料与方法	069
5.2	结果与分析	074
5.3	讨论	078
5.4	小结	086
	参考文献	087
第六章	甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响	091
6.1	材料与方法	093
6.2	结果与分析	097
6.3	讨论	100
6.4	结论	105
	参考文献	105
附 录		108
后 记		110

总 章

甘草主要成分的抗菌特性

基于抗生素滥用引发耐药菌株的出现以及公共安全考虑,开发新型的抗菌制剂已成为迫在眉睫的问题。天然活性物质具有激活、增强和调节人体免疫能力、促进机体免疫活性细胞功能以及抗炎、抗瘤、抗病毒、修复自身免疫力功效,许多科研工作者试图从天然动植物中筛选活性物质开发新药物。天然活性生物资源的开发利用和研究日益活跃,成为天然药物、生物化学和生命科学的研究热点,成为并列于各种组学的另一研究热点。甘草是一种具有消炎、抗菌、抗病毒、抗癌、抗高血脂以及增强细胞免疫等多种药理活性的草本植物,素有“十方九草”之称,被历代名医尊称为“众药之王”。虽然可见甘草相关成分研究的报道,但尚未见甘草抵抗常见细菌感染的系统性研究。因此,本书对甘草 3 种主要成分甘草甜素(glycyrrhizin)、甘草多糖(glycyrrhiza polysaccharide)和光甘草定(glabridin)对鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和副猪嗜血杆菌等常见细菌体内外生长的影响等方面进行了详细深入介绍。主要包括以下六个方面的内容。

(一)甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对小鼠巨噬细胞的毒性与免疫功能的调节

探讨甘草三种主要成分甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对小鼠腹腔巨噬细胞的毒性与免疫功能的调节作用。三种药物 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、



20 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 与巨噬细胞作用 12 h、24 h 和 36 h 后,利用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测药物对巨噬细胞的毒性作用;荧光显微镜观察无细胞毒性浓度下对巨噬细胞吞噬大肠杆菌的影响,用 ELISA 试剂盒检测三种药物对巨噬细胞分泌细胞因子的影响。结果显示,400 $\mu\text{g/mL}$ 甘草甜素和光甘草定对细胞有一定毒性;所有实验浓度甘草甜素和甘草多糖显著增强巨噬细胞吞噬能力($P<0.01$),而仅 5 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 光甘草定有这种作用($P<0.01$);三种药物所有实验浓度显著增强巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、IL-12 和 TNF- α ($P<0.01$),高剂量抑制 IL-4、IL-10 和 TGF- β ($P<0.01$),而低剂量没有明显变化。结果表明,甘草三种主要成分甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对小鼠腹腔巨噬细胞基本无毒,呈剂量依赖增强巨噬细胞吞噬能力和分泌促炎性细胞因子以及降低抑炎性细胞因子的分泌。

(二)甘草多糖调节鼠伤寒沙门菌诱导的巨噬细胞氧化-抗氧化平衡紊乱

探讨甘草多糖对鼠伤寒沙门菌诱发巨噬细胞氧化-抗氧化平衡紊乱的调节作用。将 1 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 甘草多糖三个浓度组与小鼠腹腔巨噬细胞共孵育,同时设空白对照组,每组按 1:1 加入鼠伤寒沙门菌 SL1344;利用 ELISA 试剂盒检测各组丙二醛(malondialdehyde, MDA),活性氧(reactive oxygen species, ROS),一氧化氮(nitric oxide, NO),诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)变化情况;利用荧光显微镜和荧光酶标仪观察甘草多糖对鼠伤寒沙门菌引起巨噬细胞产生 ROS 的影响;利用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性试剂盒检测巨噬细胞上清 LDH 水平。结果表明,鼠伤寒沙门菌可诱导小鼠腹腔巨噬细胞发生氧化损伤,导致 NO、iNOS、MDA 和 ROS 氧化水平以及 LDH 水平显著升高,而 GSH-Px、SOD 和 T-AOC 抗氧化水平显著降低。荧光显微镜和荧光酶标仪检测显示,鼠伤寒沙门菌感染小鼠腹腔巨噬细胞 ROS 水平显著升高。甘草多糖呈剂量依赖明显降低细胞氧化水平和增强抗氧化水平,且 20 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 甘草多糖具有显著改善

作用。甘草多糖作为重要的免疫调节剂,能够调节鼠伤寒沙门菌引起的巨噬细胞氧化损伤,维持细胞氧化—抗氧化平衡。

(三)甘草多糖对小鼠抵抗肠炎沙门菌感染的影响

甘草多糖是从中药甘草中提纯出的一种具有多种药理作用的生物活性多糖。近年来的研究表明,甘草多糖与动物机体的免疫调节功能密切相关,能特异和非特异性的增强细胞的免疫功能,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、无毒副作用等功效。肠炎沙门菌隶属肠杆菌科沙门菌属,具有较高的分离率并具有广泛的宿主谱,分布极其广泛,是重要的人畜共患病原体。肠炎沙门菌能引起畜禽以及人类胃肠炎,也是人类食物中毒的元凶之一,严重危害畜禽业的发展和人类的健康。

首先,将培养好的新鲜肠炎沙门菌制备成 1×10^{10} CFU 的菌液,以此为基础连续进行 10 倍递进稀释,总共 5 个浓度梯度,每只昆明系实验小鼠腹腔注射 0.2 mL,接种后每隔 12 h 观察一次,连续 7~14 d,利用 Bliss 法计算 LD_{50} 为 1×10^8 CFU。之后,进行第二阶段的攻毒试验,配制 100 LD_{50} 、 LD_{50} 和 0.01 LD_{50} 菌液接种于昆明系实验小鼠,给予小鼠不同剂量的甘草多糖(高剂量 2 mg/只/天;中剂量 0.2 mg/只/天;低剂量 0.02 mg/只/天),正常饲喂,观察其死亡情况。

通过分析小鼠死亡数据来研究不同甘草多糖浓度对小鼠抵抗肠炎沙门菌感染的影响,可见高、中剂量的甘草多糖能够明显减少小鼠的死亡数量,低剂量甘草多糖和空白对照组效果则不明显。由此可以得出,高、中剂量的甘草多糖能够有效抵抗肠炎沙门菌对小鼠的感染,本章节研究为甘草抗菌能力的进一步研究及临床应用提供理论依据。

(四)甘草多糖对副猪嗜血杆菌的体内外抑制作用

为了研究副猪嗜血杆菌对猪肺泡上皮细胞氧化应激及细胞因子分泌的影响。试验采用 CCK-8 分析副猪嗜血杆菌 HS1075 与猪肺泡上皮细胞共孵育后细胞活力;利用 ELISA 试剂盒检测细胞 GSH-Px、iNOS、MDA、NO、ROS、SOD 和 T-AOC 变化;利用荧光酶标仪观察细胞 ROS 水平;利用 LDH 试剂盒检测细胞 LDH 水平;ELISA 试剂盒检测细胞 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 和



TGF- β 水平。结果表明,随着孵育时间延长,导致 iNOS、MDA、NO 和 ROS 氧化水平以及 LDH 水平逐渐升高,而 GSH-Px、SOD 和 T-AOC 抗氧化水平逐渐降低。猪肺泡上皮细胞分泌的 IL-1 β 、IL-6、IL-12 和 TNF- α 水平逐渐升高,而 IL-4、IL-10 和 TGF- β 逐渐降低。表明副猪嗜血杆菌可诱导猪肺泡上皮细胞发生氧化损伤,影响细胞因子分泌。

为探讨甘草多糖对副猪嗜血杆菌的抑制作用,利用平板计数法和分光光度法分别分析甘草多糖对副猪嗜血杆菌生长速度和生物被膜形成的影响。根据 Bliss 法计算细菌对小鼠半数致死量(LD₅₀),将 100 $\times$ LD₅₀ 副猪嗜血杆菌感染小鼠,观察低剂量(1 mg/kg)、中剂量(10 mg/kg)和高剂量(100 mg/kg)甘草多糖对小鼠的保护力。将 0.01 $\times$ LD₅₀ 副猪嗜血杆菌感染小鼠,于感染后 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d 和 35 d 剖杀小鼠,检测副猪嗜血杆菌在脾脏、肝脏、肺脏和心血的分布情况。结果显示,在低浓度时(10 μ g/mL、20 μ g/mL 和 50 μ g/mL),甘草多糖随着浓度的增加对副猪嗜血杆菌血清型 12 生长速度和生物被膜形成的促进呈上升趋势,但高浓度时(100 μ g/mL 和 200 μ g/mL)甘草多糖的这种促进作用有所降低,甚至出现抑制作用。副猪嗜血杆菌口服感染小鼠的 LD₅₀ 为 3.12 $\times$ 10⁷ CFU。高剂量(100 mg/kg)甘草多糖对于 100 $\times$ LD₅₀ 副猪嗜血杆菌感染可提供 60.00% 的保护力。0.01 $\times$ LD₅₀ 副猪嗜血杆菌攻毒小鼠,随着甘草多糖浓度增加小鼠脾脏、肝脏、肺脏和心血的细菌量逐渐减少。结果表明,低浓度甘草多糖在体外对副猪嗜血杆菌的生长具有促进作用,但在高浓度时则表现出一定的抑制作用。而甘草多糖可以提高小鼠抵抗副猪嗜血杆菌的感染。

(五)甘草多糖对单核细胞增生性李斯特菌体内外生长的影响

单增李斯特菌属于典型的革兰氏阳性致病菌,是一种严重的人畜共患食源性致病菌。由于生物被膜的形成使得对单增李斯特菌的防治变得更加困难。因此,开发安全、高效和经济的药物已经成为当今疾病预防的首要任务。本试验首先将单增李斯特菌加入到 96 孔细胞培养板恒温培养 48 h 进行生物被膜培养,然后分别加入终浓度为 10 μ g/mL、20 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL 和 200 μ g/mL 的甘草甜素、甘草多糖和光甘草定孵育后,于 6 h 后提取单增李斯特菌 eDNA

并测定其含量变化情况。同时利用结晶紫染色法观察不同浓度的甘草甜素、甘草多糖和光甘草定作用 2 h、4 h、6 h 和 8 h 后单增李斯特菌生物被膜形成的影响情况。结果显示,低浓度($10\ \mu\text{g/mL}$ 和 $20\ \mu\text{g/mL}$)甘草多糖对单增李斯特菌 eDNA 和生物被膜形成有促进作用,其他浓度为抑制作用。甘草甜素对单增李斯特菌 eDNA 和生物被膜形成无影响。而光甘草定对单增李斯特菌 eDNA 和生物被膜形成均有一定的抑制作用。本章节通过观察不同甘草甜素、甘草多糖和光甘草定浓度下单增李斯特菌生物被膜的形成情况,为甘草抗菌能力的进一步研究和临床应用以及单增李斯特菌的防治提供一定的理论依据。

探讨甘草多糖对单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)体内外生长的影响。采用平板计数法和荧光显微镜、分光光度法及 Bliss 法分别分析甘草多糖对 Lm 生长速率和生物被膜形成的影响及计算细菌对小鼠半数致死量(median lethal dose, LD_{50})。观察低剂量($1\ \text{mg/kg}$)、中剂量($10\ \text{mg/kg}$)和高剂量($100\ \text{mg/kg}$)甘草多糖对感染 $100\times\text{LD}_{50}$ Lm 小鼠的保护力。小鼠感染 $0.01\times\text{LD}_{50}$ 的 Lm 后 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 剖杀小鼠,检测脾脏、肝脏和肺脏中 Lm 分布的消长情况。低浓度时($10\ \mu\text{g/mL}$ 、 $20\ \mu\text{g/mL}$ 、 $50\ \mu\text{g/mL}$),甘草多糖随着浓度增加对 Lm 标准菌株 10403S 生长速度和生物被膜形成的促进呈上升趋势,但高浓度时($100\ \mu\text{g/mL}$ 、 $200\ \mu\text{g/mL}$)这种促进作用逐渐降低。Lm 口服感染小鼠的 LD_{50} 为 $2.70\times 10^8\ \text{CFU}$ 。高剂量甘草多糖对于 $100\times\text{LD}_{50}$ 的 Lm 感染可提供 50.00% 的保护力。 $0.01\times\text{LD}_{50}$ 的 Lm 感染小鼠,随着甘草多糖浓度增加小鼠脾脏、肝脏和肺脏的细菌量逐渐减少。低浓度甘草多糖在体外对 Lm 的生长具有促进作用,但随着浓度增高促进强度逐渐降低。而甘草多糖可以提高小鼠抵抗 Lm 感染的能力。

(六)甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响

金黄色葡萄球菌属于典型的革兰氏阳性致病菌,是一种严重的人畜共患食源性致病菌。由于生物被膜的形成使得对金黄色葡萄球菌的防治变得更加困难。因此,开发安全、高效和经济的药物已经成为当今疾病预防的首要任务。本



试验首先将金黄色葡萄球菌加入到 96 孔细胞培养板恒温培养 48 h 进行生物被膜培养,然后分别加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的甘草甜素、甘草多糖和光甘草定孵育后,于 6 h 后提取金黄色葡萄球菌 eDNA 并测定其含量变化情况。同时利用结晶紫染色法观察不同浓度的甘草甜素、甘草多糖和光甘草定作用 2 h、4 h、6 h 和 8 h 后金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响情况。结果显示,低浓度(10 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$)甘草多糖对金黄色葡萄球菌 eDNA 和生物被膜形成有促进作用,其他浓度为抑制作用。甘草甜素对金黄色葡萄球菌 eDNA 和生物被膜形成无影响。而光甘草定对金黄色葡萄球菌 eDNA 和生物被膜形成均有一定的抑制作用。通过观察不同甘草甜素、甘草多糖和光甘草定浓度下,金黄色葡萄球菌生物被膜的形成情况,为甘草抗菌能力的进一步研究和临床应用以及金黄色葡萄球菌的防治提供一定的理论依据。

第一章

甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对小鼠巨噬细胞的 毒性与免疫功能的调节

天然活性物质具有激活、增强和调节人体免疫能力、促进机体免疫活性细胞功能以及抗炎、抗瘤、抗病毒、修复自身免疫力功效,许多科研工作者试图从天然动植物中筛选活性物质开发新药物^[1]。甘草是一种多年生草本植物,共有 29 种 6 变种,我国存在 18 种 3 变种。中医学认为甘草具有泻火解毒,健脾补气,润肺止咳,缓急止痛和缓和药性之功效,被历代名医尊称为“众药之王”,素有“十方九草”之称,民间已有几千年的使用历史,常用于治疗咳嗽、肝炎、食物中毒以及胃肠道疾病等。甘草有效成分主要有黄酮类、三萜类和多糖类化合物^[2,3],研究资料报道,已从甘草中分离纯化到 300 多种黄酮类和 20 余种多种三萜类化合物^[4]。

甘草不仅可以作为甜味剂添加到食品中,可以作为抗氧化剂和美白剂添加到化妆品中,更重要的是,甘草具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗瘤、抗高血脂以及增强细胞免疫等多种药理活性^[5]。甘草的药理活性研究主要集中于甘草酸、甘草次酸和甘草苷等。活性物质主要是通过提高机体的非特异性免疫和细胞免疫发挥作用,巨噬细胞在细胞免疫中占据重要作用,具有吞噬和分泌多种细胞因子等功能。本章节通过检测甘草甜素(glycyrrhizin)、甘草多糖(glycyrrhiza polysaccharide)和光甘草定(glabridin)对小鼠腹腔巨噬细胞的毒性以及对细胞吞噬功能和



分泌 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 和 TGF- β 的影响,以探讨甘草甜素、甘草多糖和光甘草定对巨噬细胞免疫功能的调节作用。

1.1 材料与方法

1.1.1 主要试剂

胰蛋白胨和酵母浸出物(购自英国 Oxoid 公司);

胎牛血清和 DMEM 培养基(购自美国 Gibco 公司);

谷氨酰胺、青霉素、硫酸链霉素和异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)(均购自美国 Sigma 公司);

Brewer's complete thioglycollate 培养基(购自美国 BD 公司);

CCK-8 试剂盒(购自日本同仁化学研究所);

IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 和 TGF- β ELISA 检测试剂盒(均购自美国探索诊断公司(Research & Diagnostics Systems, R&D Systems));

甘草甜素、甘草多糖和光甘草定(均为洛阳蓝冰贸易有限公司产品);

NaCl、KCl、医用酒精等其他试剂(均为国药集团化学试剂有限公司产品)。

1.1.2 主要试剂配制

PBS:NaCl 8.0 g,KCl 0.2 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g,KH₂PO₄ 0.27 g,溶于 900 mL ddH₂O,调节 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL,120 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 保存备用。

10 mg/mL 甘草甜素储备溶液:0.01 g 甘草甜素充分溶解于 1 mL 无菌 PBS 中,置于-20 °C 保存,根据实验需要添加至终浓度 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、20 μ g/mL、100 μ g/mL 和 400 μ g/mL 甘草甜素。

10 mg/mL 甘草多糖储备溶液:0.01 g 甘草多糖充分溶解于 1 mL 无菌 PBS 中,置于-20 °C 保存,根据实验需要添加至终浓度 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、20 μ g/mL、100 μ g/mL 和 400 μ g/mL 甘草多糖。

10 mg/mL 光甘草定储备溶液:0.01 g 光甘草定充分溶解于 1 mL 无菌 PBS 中,置于-20 °C 保存,根据实验需要添加至终浓度 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、20 μ g/mL、100 μ g/mL 和 400 μ g/mL 光甘草定。

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母浸出物 5 g,NaCl 10 g,无菌 ddH₂O 溶解后调 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL,120 °C 高压灭菌 20 min,4 °C 保存备用。

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入 1.0% 的琼脂粉,120 °C 高压灭菌 20 min,待培养基温度降至 50~60 °C 左右,加或不加相应抗生素,按 20 mL/板的量倒直径 9 cm 灭菌玻璃平皿,倾注灭菌平皿,凝固后于 4 °C 保存备用。

100×谷氨酰胺:准确称取 2.922 g 谷氨酰胺,溶于适量无菌 PBS,充分搅拌溶解,加至 100 mL,即配成 200 mM 的储备溶液。过滤除菌后分装到 1.5 mL EP 管中,-20 °C 保存备用。

1 000×青霉素:用细胞培养用 PBS 缓冲液将 80 万单位/瓶的青霉素配成贮存浓度 10 万单位/mL,过滤后分装,-20 °C 保存备用。

1 000×硫酸链霉素:用细胞培养用 PBS 缓冲液将 100 万单位/瓶配成储存浓度 10 万单位/mL,过滤后分装,-20 °C 保存备用。

Triton X-100 储备溶液:Triton X-100 28.2 mL,0.1 M PBS (pH 7.3),双蒸水加至 1 000 mL,即为 30% Triton X-100 储备溶液。

碳酸盐缓冲液:准确称取 1.5 g Na₂CO₃ 和 2.9 g NaHCO₃,加灭菌 ddH₂O 800 mL 溶解,调 pH 9.6 后加灭菌 ddH₂O 至 1 000 mL。

1.1.3 细菌菌株

大肠杆菌 ATCC 25922 购自美国模式菌种收集中心(American type culture collection, ATCC),本实验室常规冻存。

1.1.4 实验动物

6~8 周龄 BALB/c 小鼠[(18±2) g],雌雄各半(购自吉林大学白求恩医学院动物实验中心)。

1.1.5 主要实验仪器与设备

CO₂ 培养箱(购于青岛龙杰仪器公司和日本 Sanyo 公司);

高压灭菌锅(购于上海三申);

冰箱(购于扬子集团);

超净工作台(购于苏州争化设备公司);

电子天平(购于北京赛多利斯天平有限公司和德国 Sartorius 公司);