

甘蔗多糖的免疫活性

金筠芳 梁惠珍 曹翠玉 王祖武 舒荣生 李晓玉

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用甘蔗渣培养云芝, 发现提取的“云芝多糖”大部分来自甘蔗渣。甘蔗多糖经超离心及层析分出 B_0 , B_1 , B_2 , B_3 四个单组分。纯化的 B_0 为均一葡聚糖。

小鼠 ip 甘蔗多糖或 B_0 能显著增加脾重, 甘蔗多糖又对抗强的松龙和环磷酰胺的免疫抑制作用。两者均显著提高小鼠对 iv 碳粒的廓清指数。ig 或 ip 甘蔗多糖, 均显著延长经深度 X 射线照射后小鼠的存活时间, 并对抗 CCl₄ 对肝脏的毒性。在移植植物抗宿主反应及正常小鼠免疫后血清中溶血素的观察, 未见有显著影响。电镜见到小鼠 ip 甘蔗多糖后脾脏、淋巴结的免疫组织细胞中粗面内质网、核糖体及溶酶体等亚微结构增多, 呈现活跃状态。

关键词 甘蔗渣; 多糖; 免疫加强; 碳廓清; 移植物抗宿主反应; 溶血素; 强的松龙; 环磷酰胺

从担子菌云芝培养菌丝体中分离到蛋白多糖“PS-K”经动物试验证明为免疫促进剂, 对实验性肿瘤有广谱的抗癌作用, 现已用于肿瘤治疗⁽¹⁾。我们和上海中药三厂发现云芝的甘蔗渣培养糖浆, 在临幊上对迁慢肝有一定疗效, 进一步发现提取之多糖大部分来自甘蔗渣。甘蔗渣多糖(以下简称甘蔗多糖)当以 NaCl 浓度为 0, 0.1, 0.2 及 0.3 M 进行梯度洗脱柱层析时, 相应可获得 B_0 , B_1 , B_2 和 B_3 四个单组分, 得量比例为 1:0.6:0.47:0.15。经超速离心, 高压电泳及化学组成分析, 证明 B_0 为均

表 1. Influence of bagasse polysaccharides and B_0 on the weights of some immunological organs in mice ($\bar{x} \pm SD$)

	Dose (mg/kg)	No of mice	Organ weight(mg/10 g)			WBC $\times 10^{-3}/mm^3$
			Spleen	Thymus	Lymph node	
Control	—	14	46 \pm 9	30 \pm 10	48 \pm 13	17 \pm 5
Bagasse polysaccharides	25	5	71 \pm 17**	20 \pm 11*	31 \pm 17*	14 \pm 2
Dextran (M_w , 15000)	200	5	59 \pm 9*	28 \pm 10	40 \pm 10	17 \pm 4
Dextran (M_w , 55000)	800	5	62 \pm 6*	22 \pm 9	39 \pm 9	16 \pm 1
Control	—	6	53 \pm 12	23 \pm 3	36 \pm 11	15 \pm 4
B_0	50	6	76 \pm 23*	20 \pm 3	46 \pm 9	15 \pm 4

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ (compared with control)

一葡萄糖，分子量 $10,700 \pm 1,000^{(2)}$ 本文对甘蔗多糖及 B_0 的免疫活性作了初步观察。

实 验

一、对免疫器官重量的影响及对抗免疫抑制剂的作用

1. 对免疫器官重量的影响 C57BL 小鼠 ♀♂兼用，每批同一性别 14-20 g, ip 甘蔗多糖 25 mg/kg, B_0 50 mg/kg, qd $\times 7$ d, 次日眼眶放血，解剖秤重脾脏、胸腺及淋巴结，并行外周 WBC 计数。见表 1 结果表明甘蔗多糖及 B_0 均显著增加脾重。

2. 对抗免疫抑制剂的作用 小鼠同上，ip 甘蔗多糖及不同分子量葡萄糖 qd $\times 6$ d, 同时在第 1, 3, 5 d ip 强的松龙 25 mg/kg 或给予多糖后第 4 d ip 环磷酰胺 70 mg/kg 1 次，通过对免疫器官重量的变化观察其对抗作用。由表 2 可见甘蔗多糖能对抗强的松龙和环磷酰胺的免疫抑制作用，脾脏、淋巴结重量有显著回升。同时，还可纠正强的松龙所致的 WBC 下降现象，而大致相同 mM 的几种葡萄糖的作用就不十分显著。

二、甘蔗多糖对深度 X 射线照射的保护作用 ♂小鼠 18-22 g ip 甘蔗多糖 25 mg/kg qd $\times 4$ d, 最后一次 ip 后 10 min, 给予 8 Gy 的 X 射线照射，观察一个月内的生存情况。由

表 3 可见小鼠平均生存 9-12 d。无论 ig 200 mg/kg 或 ip 25 mg/kg 甘蔗多糖与对照组相比均能显著延长生存时间。

三、甘蔗多糖对 CCl_4 急性肝损伤的影响

♂小鼠 22-28 g, ip 甘蔗多糖 25, 50 mg/kg 及 B_0 , B_1 均为 45 mg/kg bid $\times 2$ d, 第 3 次 ip 后 30 min 以 0.13% CCl_4 0.1 ml/10 g ig 致中毒，24 h 后取血清 0.05 ml 测 SGPT。由表 4 可见 ip 甘蔗多糖 25 或 50 mg/kg 均能对抗 CCl_4 对肝脏的急性中毒作用，而 B_0 , B_1 与对照组相比 $P > 0.05$ 。葡萄糖 Dextran (M_w , 8000) 25 mg/kg 时 SGPT 降低 22% 左右。

四、甘蔗多糖对小鼠 iv 碳粒廓清作用的影响 小鼠 ♀♂均可每批同一性别 18-22 g, ip 甘蔗多糖 25 mg/kg qd $\times 4$ d, 第 4 次给药后 10 min 经尾 iv 英国 Winsor & Newton 出品的印度墨汁 0.1 ml/20 g, 注射后 1(t_1) 及 5(t_2) min 各从眼眶静脉取血 20 μ l, 溶于 2 ml 0.1% 的 Na_2CO_3 中，用 72 型分光光度计 680 nm 测定光密度 (OD)，计算廓清指数 K 值。

$$K = \frac{\log OD_1 - \log OD_2}{t_2 - t_1}$$

由表 5 可见甘蔗多糖与 B_0 均能显著提高小鼠对 iv 碳粒的廓清指数，增强网状内皮系统的活性。

表 2. Effects of bagasse polysaccharides on immunosuppressive agents in mice ($\bar{x} \pm SD$)

	Dose (mg/kg)	№ of mice	Organ weight (mg/10 g)			WBC $\times 10^{-3}/\text{mm}^3$
			Spleen	Thymus	Lymph node	
Prednisolone	25	5	20 \pm 7	7 \pm 4	10 \pm 4	9 \pm 4
Bagasse polysaccharides	25 + 25	5	40 \pm 13**	4 \pm 2	25 \pm 8**	17 \pm 6**
Prednisolone						
Prednisolone	25	6	21 \pm 7	3 \pm 3	12 \pm 3	7 \pm 1
Bagasse polysaccharides	25 + 25	6	69 \pm 27**	4 \pm 1	21 \pm 7*	15 \pm 5**
Prednisolone						
Dextran (Mw, 8000) Prednisolone	25 + 25	5	33 \pm 10*	3 \pm 1	20 \pm 6*	10 \pm 4
Dextran (Mw, 23000) Prednisolone	60 + 25	6	23 \pm 5	2 \pm 1	15 \pm 8	10 \pm 2*
Cyclophosphamide	70	6	46 \pm 8	8 \pm 2	15 \pm 4	4 \pm 1
Bagasse polysaccharides	50 + 70	6	67 \pm 12 ^{△△}	10 \pm 2	27 \pm 4 ^{△△}	6 \pm 2
Cyclophosphamide						

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ (compared with prednisolone)

^{△△} $P < 0.01$ (compared with cyclophosphamide)

表 3. Effect of bagasse polysaccharides on survival times of X-irradiated mice

	Dose (mg/kg)	Route	№ of Expt.	Mice Died	Survival time (d) $\bar{x} \pm SD$	P value
Control*	—	—	10	9	12 \pm 7	
Bagasse polysaccharides*	25	ip	10	6	20 \pm 9	<0.05
Control	—	—	10	10	9 \pm 3	
Bagasse polysaccharides	200	ig	10	10	15 \pm 8	<0.05
Bagasse polysaccharides	25	ip	10	9	13 \pm 6	>0.05
Control	—	—	10	10	9 \pm 3	
Bagasse polysaccharides	200	ig	10	9	16 \pm 10	<0.05
Bagasse polysaccharides	25	ip	10	9	15 \pm 8	<0.05

* Body weights of mice above 25 g

表 4. Effect of bagasse polysaccharides on acute CCl₄ liver damage

	Dose (mg/kg)	No of mice	SGPT (u) $\bar{x} \pm SD$	P value
Control	—	6	>359±100	
Bagasse polysaccharides	25	6	93±154	<0.01
Bagasse polysaccharides	50	6	52±76	<0.001
Control	—	7	>205±189	
B ₀	45	6	75±98	>0.05
B ₁	45	6	133±170	>0.05

表 5. Acceleration of clearance rate of iv charcoal particles by bagasse polysaccharides and B₀

	Dose (mg/kg)	No of mice	K value $\bar{x} \pm SD$	P value
Control	—	29	0.031±0.013	
Bagasse polysaccharides	25	14	0.048±0.019	<0.01
B ₀	50	8	0.047±0.020	<0.01

五、甘蔗多糖对移植植物抗宿主反应(GVH)的影响 参考文献(3)用♂C57BL小鼠18-22g, ip甘蔗多糖25 mg/kg qd×3 d或qd×6 d, 取脾用生理盐水制成10⁸/ml的细胞悬液为供体, 以出生9-10 d的♂C57BL/♀ICR的F₁小鼠为受体, 同窝配对, 每窝分成不注射脾细胞的不处理组, 注射脾细胞的对照组(F₁小鼠ip1×10⁷的亲代脾细胞)及给药组(F₁小鼠ip1×10⁷的给予甘蔗多糖之亲代脾细胞)脾细胞接种后第8 d解剖, 计算脾指数(mg脾重/g体重)结果见表6。实验见到甘蔗多糖对GVH没有显著影响, 对照组及给药组经统计学处理均不显著。

六、甘蔗多糖对小鼠抗体形成的影响 小鼠受SRBC致敏后产生抗SRBC抗体——溶血素。测定血清中溶血素的量即反映了机体体

表 6. Effect of bagasse polysaccharides on GVH reaction

Dose mg/kg×d	No of mice	Spleen wt mg/Body $\bar{x} \pm SD$	P value
Untreated	—	8.8±1.6	
Control	—	8.6±1.7	<0.05
Bagasse polysaccha- rides	25×3	7.7±1.5	>0.05
Untreated	—	5.0±0.6	
Control	—	9.4±1.9	<0.01
Bagasse polysaccha- rides	25×6	8.7±2.9	<0.05

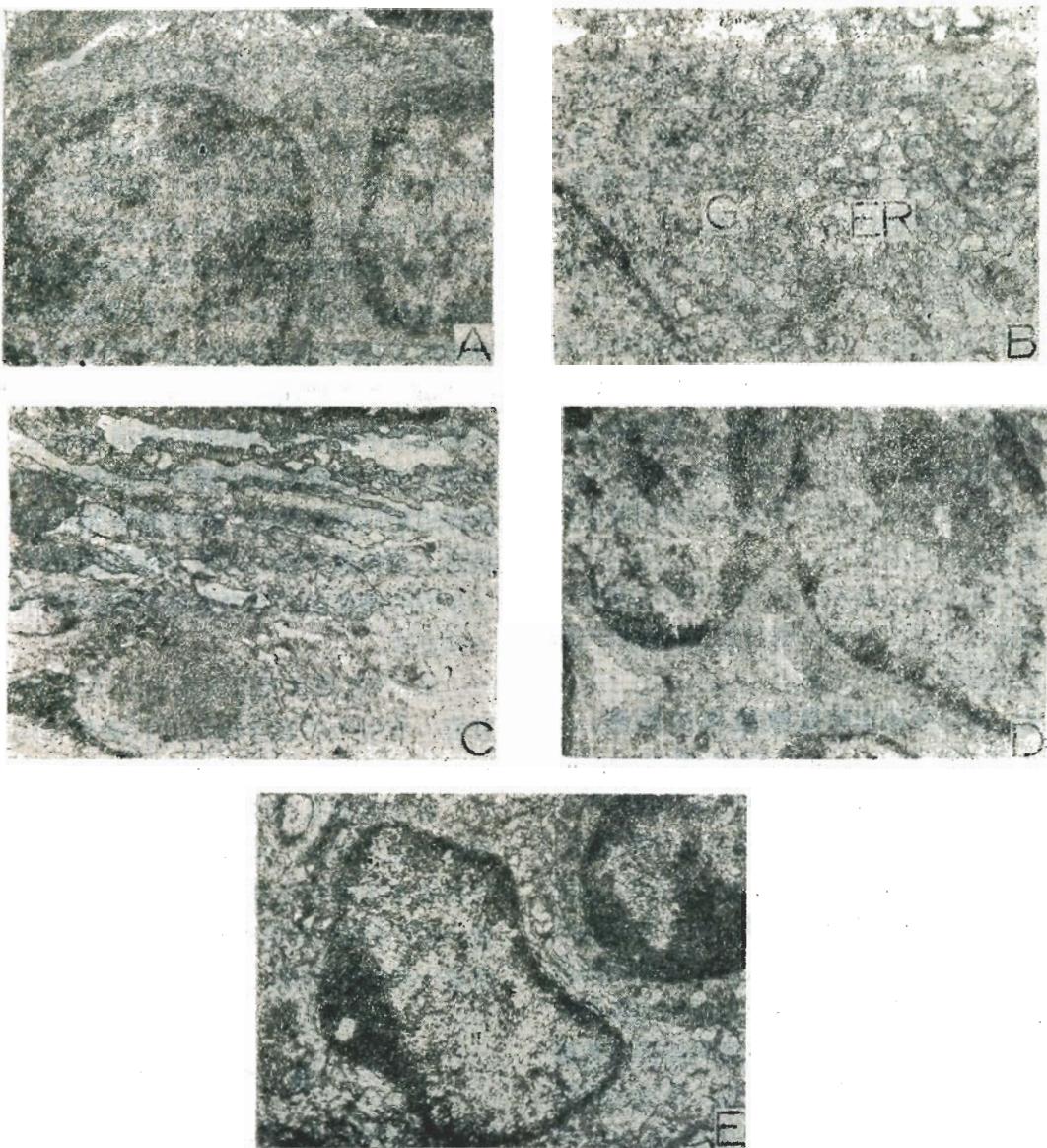


图 1. Effects of bagasse polysaccharides on ultrastructures of immunity organs of mice
 (A) Normal spleen cells of mouse. $\times 20,000$
 (B) Spleen cells of mouse following ip bagasse polysaccharides $25 \text{ mg/kg} \times 3 \text{ d}$, showing dilatation and increases of endoplasmic reticulum of lymphocytes. $\times 40,000$
 (C) Spleen cells of mouse following ip bagasse polysaccharides $25 \text{ mg/kg} \times 14 \text{ d}$, showing phagocytic material within the cytoplasm. $\times 25,000$
 (D) Normal lymph node cells of mouse. $\times 16,000$
 (E) Lymph node cells of mouse following ip bagasse polysaccharides $25 \text{ mg/kg} \times 3 \text{ d}$, showing slight increases of endoplasmic reticulum and lysosomes of lymphocyte. $\times 15,000$

液免疫的功能。本文参考文献(4)报道稍作改进, 方法为 1 ml 稀释血清加 1:20 SRBC 0.5

ml 及 1:10 补体 1 ml 混匀, 于 37°C 水浴保温 30 min 后放入冰中终止反应, 以后按原法测定

及计算样品半数溶血值 HC_{50}

$$HC_{50} = \frac{\text{样品OD}}{\text{SRBC半数溶血OD}} \times \text{稀释倍数}$$

取鼠令为 54 d 左右 ♀ ICR 小鼠 18-22 g 共 28 只分为四组, 每鼠 ip 3×10^8 SRBC 致敏, 致敏前后不同时间(0 d, -4, -3, -2, -1, 0 d qd $\times 5$ d; 0, 1, 2, 3, 4 d qd $\times 5$ d) ip 甘蔗多糖 25 mg/kg。+6 d 取血清测定。结果 HC_{50} ($\bar{x} \pm SD$) 对照组为 245 ± 126 , 致敏同时给药组 288 ± 167 , 致敏前给药 308 ± 118 , 致敏后给药 166 ± 64 , P 值均 > 0.05 。再用鼠令为 54 d 的同窝小鼠 ♀ ♂ 均用 17-26 g 共 17 只按性别、体重近似者分为对照组及致敏同时给药组, 也未见到显著作用。

我们还参考文献(5)改用 RPMI-1640 制备脾细胞悬液测定甘蔗多糖对其抗体形成的影响, 也未见到显著的作用。

七、对免疫器官超显微结构的影响 ♀ ICR 小鼠 18-22 g, ip 甘蔗多糖 25 mg/kg qd $\times 3$ d 及 qd $\times 14$ d 取脾、淋巴结及胸腺用戊二醛-锇酸复合固定, 醋酸铀块染, 丙酮脱水, 环氧-618 包埋, LKB V 型切片, DXA₄₋₁₀ 电镜观察。提示 ip 甘蔗多糖 3 d, 可对脾脏及淋巴结等免疫器官发生影响, 从图 1 可见到细胞质中内质网(ER)特别是粗面内质网增多和扩张, 核糖体也增加, 溶酶体或溶酶体样结构增多, 线粒体(M)有时也有所增加, 呈现比较活跃的现象, 但对胸腺的作用不太明显。ip 甘蔗多糖 14 d 对脾脏可见到同样的作用且更为明显, 但对淋巴结和胸腺的作用则使细胞质内膜性结构(包括内质网、核膜和高尔基体(G)等)呈现过度扩张之现象。

讨 论

甘蔗多糖显著延长 X 射线照射后动物的生存时间; 对抗强的松龙和环磷酰胺所引起的抑制作用; 对 CCl_4 肝脏的急性中毒起保护作用; 显著提高正常小鼠对 iv 碳粒的廓清指数, 提示甘蔗多糖可能具有非特异的免疫加强作用。葡

聚糖在对抗强的松龙的抑制作用与对抗 CCl_4 致肝脏急性毒性时作用就不十分显著, 可见甘蔗多糖并非是单纯的大分子多糖作用。

对给予甘蔗多糖小鼠的电镜观察中见到内质网扩张增多, 细胞器处于活跃状态, 提示甘蔗多糖可能通过刺激这些细胞器而发挥作用。

甘蔗多糖降低正常小鼠胸腺重量, 在本组其他多糖的实验中有时也可见到类似倾向。甘蔗多糖又见到对正常小鼠的 GVH 反应似有降低趋势, 二者似相吻合。虽 GVH 反应及正常小鼠血清中溶血素的影响与对照组相比无显著差异, 然而免疫药物不同于一般药物, 对机体的作用可以变化很大, 因素复杂如机体所处的状态, 药物投入的时间等, 故随着甘蔗多糖进一步的分离纯化, 其对免疫反应的作用再可进一步研究。

在 CCl_4 致中毒的实验中, CCl_4 易挥发需注意, 有时个体差异较大, 中毒时 CCl_4 浓度可视情况采用 0.13%—0.18%。

甘蔗多糖从甘蔗渣裂解提取, 可综合利用制糖工业下脚料, 来源广泛, 价格低廉, 由于它具有多方面的免疫活性, 对某些指标口服有效, 且在迁慢肝临床观察中初步见到可喜苗头, 有进一步研究价值。

参 考 文 献

- 1 Tsukagoshi S. Fundamental approaches to cancer immunotherapy using a protein-bound polysaccharide, PS-K, with special reference to its clinical application. In: Mizuno D, Chihara G, Fukaoka F, Yamamoto T, Yamamura Y, eds. *Host defence against cancer and its potentiation*. 1st ed. Tokyo: University of Tokyo Press, 1975:365—77
- 2 朱关平、包琴珠、周祚忠、谢如源、刘鸿益、朱振岳、陈万彬. 待发表
- 3 中医研究院中药研究所微生物室免疫组. 新医药学杂志. 1979 年 3 月, (3):51
- 4 徐学瑛、李元、许津. 药学学报. 1979 年 7 月, 14(7):443
- 5 Simpson MA, Gozzo JJ. *J Immunol Methods* 1978 May; 21(1/2):159

IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF BAGASSE POLYSACCHARIDES

JIN Yun-fang, LIANG Hui-zhen, CAO Cui-yu, WANG Zu-wu, SHU Rong-sheng,
LI Xiao-yu (*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT Bagasse polysaccharides injected ip into C57BL inbred mice caused a marked increase in spleen weight, and antagonized the immunosuppressive actions of prednisolone and cyclophosphamide. Dextran ip in equimolecular doses showed no significant effects.

Bagasse polysaccharides injected ip or ig into mice irradiated by deep X-ray prolonged significantly the survival time. Bagasse polysaccharides also protected the mice from CCl_4 intoxication.

Bagasse polysaccharides given ip increased the clearance rate of iv charcoal particles, i. e., stimulated the phagocytic activity of macrophages. Therefore, it enhanced the functions of reticuloendothelial system.

These polysaccharides had no definite influence on graft versus host reaction (GVHR), nor on serum hemolysin in mice.

The electron microscopic studies of the immunity organs indicated that bagasse polysaccharides given ip 25 mg/kg for 3 d stimulated some membranous organelles in the cytoplasm, as shown by increases and dilatations of endoplasmic reticulum, especially rough endoplasmic reticulum, Golgi bodies and lysosomes. Sometimes the number of mitochondria and ribosome were increased too.

KEY WORDS bagasse; polysaccharide; immunopotentiating; clearance of carbon; GVHR; hemolysin; prednisolone; cyclophosphamide