

分类号: R392

密级: 公开

兰州大学

研究生学位论文

论文题目 (中文) 砂生槐种子多糖成分分析及对秀丽隐杆线虫寿命、行为、应激、生殖和抗菌能力的影响

论文题目 (外文) **Analysis of polysaccharides from
Sophoramoorcroftiana seeds and effects on
life, behavior, stress, reproduction and
antibacterial ability of *Caenorhabditis elegans***

研究生姓名 张媛

学 科 、 专 业 基础医学·免疫学

研 究 方 向 中药与免疫

学 位 级 别 硕 士

导师姓名、职称 马兴铭 教授

论 文 工 作

起 止 年 月 2014 年 09 月至 2017 年 03 月

论文提交日期 2017 年 4 月

论文答辩日期 2017 年 5 月

学位授予日期 2017 年 6 月

校址: 甘肃省兰州市

原创性声明

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文，是在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。学位论文中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究成果做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：_____

日 期：_____

砂生槐种子多糖成分分析及对秀丽隐杆线虫寿命、行为、应激、生殖和抗菌能力的影响

中文摘要

砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 是我国特有的高原植物, 其种子具有消炎解毒、催吐的功效, 主治湿热黄疸、白喉、痢疾、赤巴病、消化不良、寄生虫病等。砂生槐种子的不同溶剂提取物具有抑菌、杀虫、抗肿瘤及增强荷瘤小鼠免疫功能的作用。本研究提取、纯化砂生槐种子多糖, 并分析多糖的组成成分。选用的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)为模式生物, 观察砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命、行为、应激、生殖和抗菌能力的影响, 为砂生槐种子多糖药用价值的开发提供实验依据。

采用 60%乙醇醇沉法提取砂生槐种子多糖, 氯仿反复萃取除去脂溶性成分, 苯酚-硫酸法用于测定砂生槐种子多糖的含量。砂生槐种子多糖经 Sevege 法脱蛋白, 氧化脱色素, 气相色谱-质谱法联用分析组成成分。用砂生槐种子多糖, 水提取物, 氯仿提取物和乙醇提取物分别干预 L4 期秀丽隐杆线虫, 计算秀丽隐杆线虫的生存率, 分析各组药物对线虫毒性效应。砂生槐种子多糖干预秀丽隐杆线虫从 L1 期至 L4 期全部发育过程, 在显微镜下观察线虫的生命周期、行为学变化、应激条件下存活时间, 计数线虫排卵数目、线虫排卵时程和砷化物诱导的生殖细胞凋亡数目, 并建立秀丽隐杆线虫绿脓杆菌感染模型, 记录线虫的生存率和体内绿脓杆菌载菌量。

砂生槐种子多糖的含量为 82.23% (产率为 8.8%), 气相色谱-质谱法联用分析砂生槐种子多糖含有葡萄糖, 半乳糖和肌醇, 其中葡萄糖的含量为 35%。砂生槐种子多糖 (4mg/ml) 延长了秀丽隐杆线虫的生命周期至 27 天, 是对照组 (15 天) 的 1.7 倍 ($p=0.041$), 同时的增强了秀丽隐杆线虫对抗热应激和氧化应激的能力, 平均寿命分别是对照组的 1.5 倍 ($p=0.027$) 和 1.6 倍 ($p=0.018$)。砂生槐种子多糖提升秀丽隐杆线虫生殖能力, 4mg/ml 和 2mg/ml 组排卵数目分别是 481 个和 486 个, 与对照组 (230 个) 相比都增加 1.0 倍 ($p<0.01$)。砂生槐种子多糖 (4mg/ml 和 2mg/ml) 分别延长秀丽隐杆线虫的排卵时间至 8.0 天和 7.9 天, 而对照组仅为 6.1 天 ($p>0.05$)。砂生槐种子多糖 (4mg/ml) 增强秀丽隐杆线虫抗细菌感染的作用, 与模型对照组相比, 延长绿脓杆菌感染线虫的寿命 2.4 倍 ($p=0.013$), 并显著降低线虫体内绿脓杆菌的载菌量 ($p=0.014$), 促进线虫清除体内绿脓杆菌。

砂生槐种子多糖主要由葡萄糖，半乳糖和肌醇组成，其中葡萄糖为最主要的组成成分。砂生槐种子多糖可以延长秀丽隐杆线虫生命周期，并增强了秀丽隐杆线虫抗应激、抗衰老的能力，有效促进秀丽隐杆线虫排卵和延长线虫排卵时程，改善线虫的生殖能力，增强线虫抗细菌感染的能力。

关键词：砂生槐种子多糖 秀丽隐杆线虫 成分分析 生物活性

Analysis of polysaccharides from *Sophoramoorecroftiana* seeds and effected on life, behavior, stress, reproduction and antibacterial ability of *Caenorhabditis elegans*

Abstract

Sophora moorecroftiana (*S. moorecroftiana*) was an endemic plant in Tibet, China. Decoctions of the seeds have been used in Chinese folk medicine for dephlogistication, detoxication and emetic rescue which was used for diphtheria, dysentery, tripa disease, indigestion and parasitic disease. Different dissolvant extracts from *S. moorecroftiana* seeds have showed antibacterial, insecticidal, anti - tumor and enhanced the immune function of the tumor-bearing mice. This study was aimed to investigate the extraction, purification and constituent of polysaccharides from *S. moorecroftiana* seeds. The *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as a model organism for biological activity of polysaccharides from *S. moorecroftiana* seeds provided experimental basis for its exploitation.

Polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds were extracted with 60% ethanol and removed lipin components by chloroform extraction, the content of polysaccharides was determined by phenol - acid method. Polysaccharides from *S. moorecroftiana* seeds were purified through Seavage method protein removal, pigment degraded with H₂O₂ (30%) and constituent was analyzed by gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). Survival assay was performed on L4 *C. elegans* for screening polysaccharides, decoctions, chloroform extracts and ethanol extracts from *S. moorecroftiana* seeds, respectively. *C. elegans* rang L1 to L4 were supplied with polysaccharides from *S. moorecroftiana* seeds for obtained several indexes throuhg microscope, such as life cycle, behaviour, survivals under stress, eggs, germ cell apoptosis induced by arsenic compound and established *Pseudomonas aeruginosa* model for recording survivals and colony-forming units.

The content of polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds was 82.23% (yield 8.8%), and the composed of polysaccharides was analysed through GS-MS which indicated that polysaccharides was mainly composed of glucose, galactose and inositol as the glucose was the basis at 35%. Polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds (4mg/ml) prolonged the life span of *C. elegans* to 27 days as 1.7 times ($p=0.041$) as the control group (15 days), at the same time promoted the tolerance of *C. elegans* against both thermal and oxidative stress that the mean life span was as 1.5 times ($p=0.027$) and 1.6 times ($p =0.018$) as the control group. Polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds enhanced the reproduction of *C. elegans*, both 4mg/ml and 2mg/ml increased eggs of worms to 481 and 486 respectively that was 1-fold compared with the control group (230) ($p < 0.01$). Polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds(4mg/ml and 2mg/ml) were prolonged ovulation time of *C. elegans* to 8 days and 7.9 days, while the control group was only 6.1 days ($p > 0.05$). Polysaccharides from *S.moorecroftiana* seeds(4mg/ml) elevated antimicrobial

capacity of *C. elegans* that survival of the treated worms was higher than the untreated worms 2.4 times ($p=0.013$), meanwhile polysaccharides significantly reduce bacterial loads in *C.elegans* ($p=0.014$).

Polysaccharides from *S.moorcroftiana* seeds was composed of glucose, galactose and inositol and the glucose was the basis. Polysaccharides from *S.moorcroftiana* seeds can prolong the life span of *C.elegans*, enhanced resistance of *C.elegans* against stress, effectively increased the eggs of *C.elegans* and prolonged the ovulation time of nematodes, improved reproduction of *C.elegans* and enhanced antimicrobial capacity of *C.elegans*.

Key words:Polysaccharides, *Caenorhabditis elegans*, Component analysis , Biological activity

目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言.....	1
1.1 砂生槐种子概述.....	1
1.2 中药多糖的研究.....	2
1.3 秀丽隐杆线虫.....	3
1.4 课题的提出及研究意义.....	6
第二章 砂生槐种子多糖含量测定与成分分析.....	8
2.1 材料和仪器.....	8
2.1.1 材料和试剂.....	8
2.1.2 仪器和设备.....	8
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 砂生槐种子多糖提取.....	8
2.2.2 砂生槐种子多糖含量测定.....	9
2.2.3 砂生槐种子多糖纯化.....	9
2.2.4 气象色谱-质谱联用分析砂生槐种子多糖成分.....	10
2.3 结果.....	10
2.3.1 砂生槐种子多糖得率.....	10
2.3.2 砂生槐种子多糖含量.....	10
2.3.3 砂生槐种子多糖成分分析.....	11
2.4 讨论.....	12
第三章 砂生槐种子提取物对秀丽隐杆线虫生存率的影响.....	15
3.1 材料和仪器.....	15
3.1.1 材料和试剂.....	15
3.1.2 仪器和设备.....	15
3.2 实验方法.....	16

3.2.1 培养基配置.....	16
3.2.2 大肠杆菌 OP50 培养.....	16
3.2.3 秀丽隐杆线虫培养.....	16
3.2.4 秀丽隐杆线虫同期化.....	17
3.2.5 砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏试验.....	17
3.2.6 不同砂生槐种子提取物对秀丽隐杆线虫生存率影响.....	17
3.2.7 统计学分析.....	18
3.3 结果.....	18
3.3.1 秀丽隐杆线虫的培养.....	18
3.3.2 秀丽隐杆线虫冻存.....	18
3.3.3 秀丽隐杆线虫同期化.....	19
3.3.4 砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏结果.....	19
3.3.5 砂生槐种子不同提取物对秀丽隐杆线虫的影响.....	20
3.4 讨论.....	21
第四章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命、行为和应激的影响	24
4.1 材料和仪器.....	24
4.1.1 材料和试剂.....	24
4.1.2 仪器和设备.....	24
4.2 实验方法.....	25
4.2.1 实验分组.....	25
4.2.2 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命的影响.....	25
4.2.3 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响.....	25
4.2.4 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫应激能力的影响.....	26
4.2.5 统计学分析.....	26
4.3 结果.....	26
4.3.1 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命的影响.....	26
4.3.2 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响.....	27
4.3.1 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫在应激条件下的保护作用.....	28
4.4 讨论.....	29
第五章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫生殖的影响.....	31
5.1 材料和仪器.....	31

5.1.1 材料和试剂.....	31
5.1.2 仪器和设备.....	31
5.2 实验方法.....	32
5.2.1 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫排卵的影响.....	32
5.2.2 砂生槐种子多糖对 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡的影响	32
5.2.3 统计学分析.....	33
5.3 结果.....	33
5.3.1 砂生槐种子多糖增强秀丽隐杆线虫生殖能力.....	33
5.3.2 砂生槐种子多糖对 AS4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡无影响	34
5.4 讨论.....	36
第六章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫抑菌能力的影响.....	38
6.1 材料和仪器.....	38
6.1.1 材料和试剂.....	38
6.1.2 仪器和设备.....	38
6.2 实验方法.....	39
6.2.1 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌体外抗菌实验.....	39
6.2.2 实验分组和建立绿脓杆菌感染模型.....	39
6.2.3 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌感染后的线虫生存率的影响.....	39
6.2.4 秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌荷菌量的计数.....	40
6.2.5 统计学分析.....	40
6.3 结果.....	40
6.3.1 绿脓杆菌药敏试验结果.....	40
6.3.2 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌感染后的线虫生存率的影响.....	41
6.3.3 被感染秀丽隐杆线虫体内 CFU 计数.....	42
6.4 讨论.....	44
结论与展望.....	46
参考文献.....	47
在学期间的研究成果.....	52
缩略词表.....	53

致 谢.....	54
----------	----

第一章 前言

1.1 砂生槐种子概述

砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 又名“西藏狼牙刺”, “刺柴”, 豆科槐属, 是我国西藏特有的高原植物。砂生槐是一种多年矮而多枝的灌木, 茎尖和托叶硬化为尖长刺, 密被白色短柔毛, 小枝顶端成刺状。单数羽状复叶, 小叶 11~17 厘米, 椭圆形至卵状椭圆形, 在西藏 4 月中下旬返青, 6 月开花, 7 月结荚, 8 月种子成熟, 有 5~6 颗种子, 花期 5 月^[1]。砂生槐是一种喜暖、旱中生灌木, 主要产于西藏波密、拉萨、米林等海拔 2800~4400 的山坡灌丛中, 并在雅鲁藏布江大片分布, 能够耐受 17.6℃~29℃ 的温度变化。砂生槐所在的土壤常为固定, 半固定或流动风沙土, 在落叶灌丛中, 常形成砂生槐群系, 覆盖度为 10~35%。砂生槐平均株高不超过 50cm, 在平坝或沙丘上, 常和固沙草(*Orinus thoroldii*)、中亚狼尾草(*Pennisetum centrasianicum*)、三刺草(*Aristida trisela*)相伴生, 在山坡上则与小草(*Microchloa indica*)、薄皮木(*Leptodermis sauranja*)等相伴生, 具有抗旱、耐瘠薄、抗风沙等生态适应性和很好的防风固沙, 防止水土流失的生态价值^[1]。

许毓英^[2], 李玉祥^[3]对砂生槐种子进行营养成分分析, 蛋白质含量高达 29.42%~31.23%, 仅次于大豆, 17 种氨基酸含量 24.53% 以上, 除色氨酸外其余 7 种必需氨基酸含量均高于豌豆, 这对于植物蛋白资源极缺的西藏具有重要意义。

根据藏医药^[4]和《中华本草》记载, 砂生槐常用种子入药, 在 8-10 月采收成熟的果实, 打下种子, 晒干, 通过汤煎的方式让患者内服, 味苦性凉, 具有清热燥湿, 解毒的功效, 主治湿热黄疸、白喉、痢疾、赤巴病、消化不良和寄生虫病等, 是一种极为宝贵的植物药用资源。但是目前当地群众未意识到砂生槐种子的各种生物学作用仅利用其作为生活燃料或牲畜饲料, 为充分开发其药物利用价值, 本实验室对其多种提取物的生物学特性、化学成分和防病治病的功效等方面进行了大量研究, 结果表明砂生槐种子具有多种对人体有利的多种生理和药理价值。

砂生槐水提取物即为通过传统煎煮的方法得到的汤剂, 将砂生槐水提取物通过灌胃给药的方式提供给 S₁₈₀ 荷瘤小鼠, 经过 10 天后, 小鼠免疫活性细胞升高, 抑瘤率增加, 说明砂生槐水提取物增强了荷瘤小鼠免疫功能^[5-6]。同样的给药方式, 将砂生槐种子水提取物提供给环磷酰胺所致的免疫抑制型小鼠, 发现砂生槐水提取物可提高免疫抑制小鼠脾脏指数, 并促进 B 淋巴和 T 淋巴细胞细胞的增

殖和抗绵羊红细胞特异抗体的生成,并且提高小鼠血清 IL-2、TNF- α 的水平,表明砂生槐水提取物可以增强免疫抑制型小鼠的免疫功能^[5-11]。

以氯仿为主要介质,从砂生槐种子中得到砂生槐种子的氯仿提取物,其主要成分为脂溶性生物碱,发现其能够抑制 G⁺金黄色葡萄球菌、G⁻大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的生长增殖^[11-12],尤其对金黄色葡萄球菌效果更为显著。实验表明生物碱不仅对微生物的生长繁殖有抑制作用,还可以抑制肺腺癌细胞的增殖^[12],并且诱导胃癌细胞凋亡^[13-15],同时生物碱具有体外杀灭原头蚴的生物活性^[16-20]。崔建芳^[21]等人用薄层光密度法分析砂生槐种子内所含有的生物碱,结果显示砂生槐种子含有四种生物碱,含量分别为:1.64 %氧化苦参碱、0.5 %氧化槐果碱、0.172 %苦参碱、0.005 %槐果碱。

用乙醇从砂生槐种子中提取到了乙醇提取物,琼脂扩散实验证实砂生槐种子 95%和 75%的乙醇提取物都有抗菌活性,但是 95%乙醇提取物具有较好的广谱的抑菌活性,同时 95%和 75%的乙醇提取物能够抑制癌症细胞增殖^[9]。砂生槐种子 95%乙醇提取物不仅有抑菌抑癌活性,且在低浓度(400mg/L)作用下可以延长秀丽隐杆线虫的寿命^[22]。砂生槐种子及其各种提取物具有多种药理作用,是一种多功能的藏药,具有很大的潜在开发价值。

1.2 中药多糖的研究

多糖主要参与构成细胞结构,在动物体内主要存在于细胞膜中,而在植物中主要存在于细胞壁中。多糖是由至少 10 个单糖分子,如单糖,如核糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、果糖和半乳糖等,通过糖苷键连接而成的具有空间构象的糖链。多糖的结构可分为一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。由于糖链的不同,可以分成直链多糖、支链多糖,有时也可以形成环状的多糖。

从我国现有资源和药物价值方面考虑,从中草药中提取的植物多糖最为常见。到目前为止,已有 300 多种多糖类复合物从天然产物中被分离出来。其中藏药历史悠久,是我国医学宝库的重要组成,且内容丰富,其中植物药 280 多种,原植物 950 多种^[23]。藏药多糖可以增强机体免疫功能,激活免疫因子加强免疫细胞活性,如山生柳多糖^[24]可以增强小鼠单核细胞吞噬功能,提高血清抗 SRBC 抗体凝集效价,提升 T 淋巴细胞转化率等,说明山生柳多糖对小鼠特异和非特异性免疫都有改善。藏药女贞子多糖^[25]不仅可以增强正常小鼠的免疫功能,还可以改善肾上腺素导致阴虚小鼠的脾淋巴细胞对 ConA 的反应,从而增强阴虚小鼠免疫功能。樊俊杰等人研究发现瑞香狼毒多糖^[26]可以增加免疫抑制小鼠免疫器官的重量,血清凝集素低度,增加绵羊红细胞刺激的迟发超敏反应和淋巴细胞数目,

显著改善小鼠免疫功能。近年来发现,一些藏药多糖的分离成分,如商陆多糖 I^[27]可以改善淋巴细胞 DNA 多聚酶 α 的活性,从而增强小鼠免疫功能。

目前研究认为,多糖除了有增强免疫功能的作用还可以被用来抑制肿瘤细胞增殖,主要利用它可以增强机体免疫功能,改善细胞生化代谢和抗氧化能力来达到抗肿瘤的作用。如当归多糖^[28]对小鼠 S₁₈₀ 实体瘤的抑制试验结果显示抑瘤率在 36~44%,与化疗药联用可显著增强其对肿瘤的作用,并减少药物用量,减低不良反应,并在停药后还能有持续的效应,证明多糖并不是直接杀死癌症细胞而是通过改善免疫功能达到作用。商陆多糖 I^[29]不仅可以增强小鼠的免疫功能,而且可以在脂多糖的协助下诱导肿瘤坏死因子 TNF 的启动,延长小鼠寿命。枸杞多糖^[30],冬虫夏草多糖^[31]等也有着抑制肿瘤改善免疫的功效,丰富了藏药多糖抗肿瘤药物的种类。

中药多糖不仅有增强免疫抗肿瘤等功能,还具有其他药效,如降血糖,抗氧化和抗衰老等药效。研究表明红景天不仅可以降低血糖^[32],还可保护被紫外线照射的小鼠的造血指标,起到抗氧化作用^[33]。枸杞多糖生物活性较多如增强免疫,抗肿瘤^[30]和降低正常和糖尿病模型小鼠的血糖^[35],还可以延长果蝇和小鼠的寿命,起到抗衰老的作用^[34]。

我国中药资源丰富,药效神奇,而中药多糖作为中药的主要活性成分,通过对中药多糖的药理活性及其成分的研究,为开中药资源提供了坚实的理论基础和依据。

1.3 秀丽隐杆线虫

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)属线形动物门,是一种对人类无害并且可以独立生存的线虫。成虫体长约为 1-1.5mm,体型较小。秀丽隐杆线虫生活在泥土中,以细菌和腐殖质为食物,对气味、光线、温度有一定的感知能力,并且通身透明易于观察,同时也是唯一一个基因组测序完成的生物。

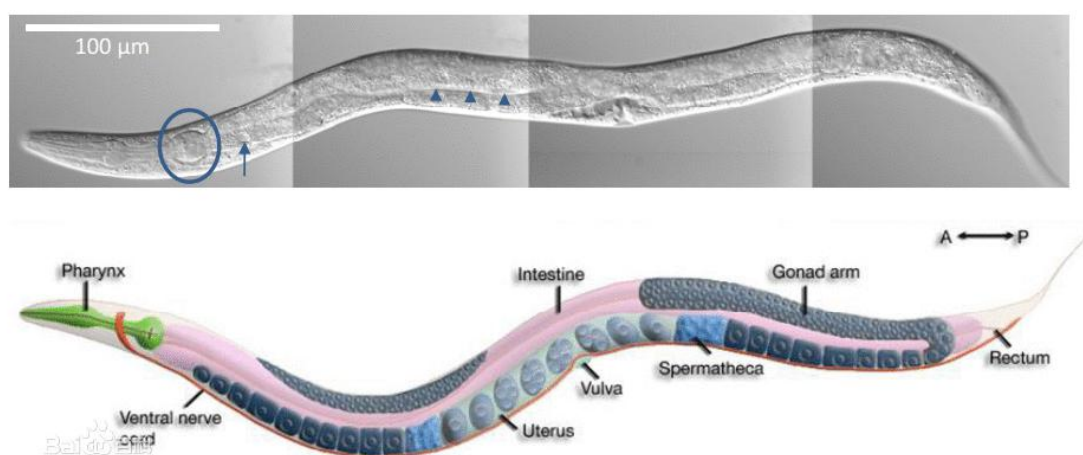


图 1-1 秀丽隐杆线虫形态特征

秀丽隐杆线虫的基本解剖构造包括个口、咽、肠、子宫，输精管，性腺以及角质层。有雄性和雌雄同体两种性别，大多数为雌雄同体，雄性个体仅占到线虫整个群体的约 0.2%，因而秀丽隐杆线虫的繁殖可以自体受精或是双性生殖。雄性有个单叶性腺、输精管及个特化为交配用的伞状尾部。雌雄同体有个卵巢、输卵管、藏精器及单一子宫。秀丽隐杆线虫寿命较短，仅在实验室中 20°C 的情况下，平均寿命约为二至三周，而从幼虫发育至成虫发育时间只须 72 小时。秀丽隐杆线虫具有较强的繁殖力，一个雌雄同体个体的平均繁殖力为约为 300 个，但如果与雄虫进行双性生殖，可以产生多达 1000 个以上的后代。秀丽隐杆线虫从受精卵到孵化的过程称为胚胎发育期，这个时期结束时受精卵可发育成 L1 期的线虫。后胚胎发育期由孵化后的 L1 期线虫有食物刺激下启动，经历四个阶段的发育（L1、L2、L3、L4）后发育成为成虫。当秀丽隐杆线虫处在高的数量密度和食物匮乏的条件下，会在 L2 期出现发育停滞，进入 dauer 期而不是 L3 期，出现 dauer 现象是线虫在不利于生长的环境的一种生存策略。dauer 期可以持续几个月的时间，当提供充足的食物后，dauer 期的线虫可以直接进入期 L4 期。

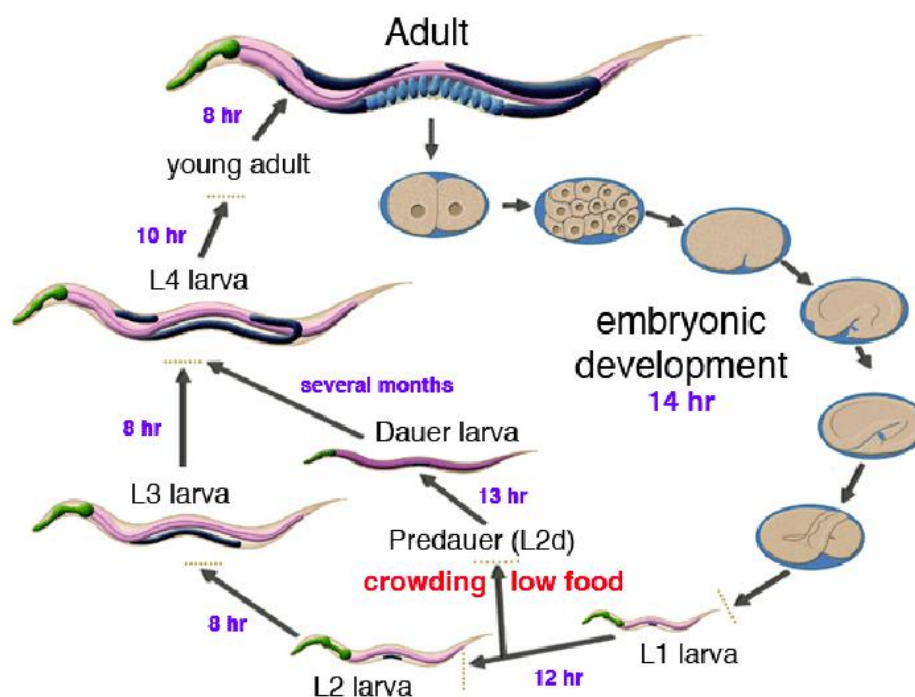


图 1-2 秀丽隐杆线虫的生命周期

从上个世纪八十年代开始,秀丽隐杆线虫就已经开始被广泛作为模式生物用于各种实验研究^[36]。秀丽隐杆线虫作为模式生物有以下几个优于其他动物的特点:

- 1、易于实验室培养,线虫繁殖能力强,体型小,在实验室可以固体培养或是在液体中培养,培养易于操作且占用空间小;
- 2、秀丽隐杆线虫在每个发育阶段身体呈透明,且解剖结构简单,易在普通光学显微镜下观察;
- 3、生周期短,幼虫发育至成虫仅需 3 至 4 天,在 20℃ 培养箱内的平均寿命为 3 周;
- 4、基因与人类有 80% 的基因相似度,高度保守,至今发现的哺乳动物的 17 条信号传导途径,线虫具有其中 12 条,这样的研究结果对人类更具有意义^[37];
- 5、易于获得大量的同期化样本,这样的获取方式样本量大,降低个体误差对试验结果造成的影响,得到更精确的试验数据,适合大规模的的药物筛选试验;
- 6、线虫有完整的行为学特征,包括机械感知和化学感知,避免有害刺激的趋向性;
- 7、由于雌雄同体的特殊繁殖方式,更易获得突变体且保存,因繁殖能力强可获得更多的相同突变体。

1.4 课题的提出及研究意义

砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 是我国西藏特有的高原植物, 长久以来, 民间使用砂生槐种子治疗黄疸、白喉、痢疾、赤巴病、消化不良和虫病等。砂生槐作为一种高原植物, 还具有防止水土流失, 保护生态环境的作用。砂生槐在当地, 多被牧民作为燃料和动物饲料使用, 并未很好的发挥它的药理作用, 很大程度上浪费了砂生槐的资源, 不利于生态资源合理的发展。现代研究证明, 多糖在降血糖, 抗凝血, 调节细胞分化和细胞分裂等方面生物活性的不断被揭示, 它的化学结构, 组成成分分析和生物活性的研究也越来越引起人们极大的兴趣和广泛关注。砂生槐种子多糖作为砂生槐种子的成分之一, 迄今为止, 有关砂生槐种子多糖的含量, 组成成分和生物学活性的研究尚未见报道。

本课题通过对提取工艺的优化改进, 将砂生槐种子用 60% 的乙醇回流, 经氯仿洗脱脂类、碱类、多酚等杂质, 最后得到砂生槐多糖。将得到的粗多糖经过去蛋白去脂, 脱色纯化后, 得到精制多糖, 使用气相色谱质谱联用仪分析它的单糖组成成分。以秀丽隐杆线虫为观察对象, 对砂生槐种子多糖的生物活性进行了初步的研究, 包括毒性、寿命、生殖能力、行为和抗感染, 为砂生槐种子多糖的药用开发利用提供实验依据。

本实验的技术路线如下:

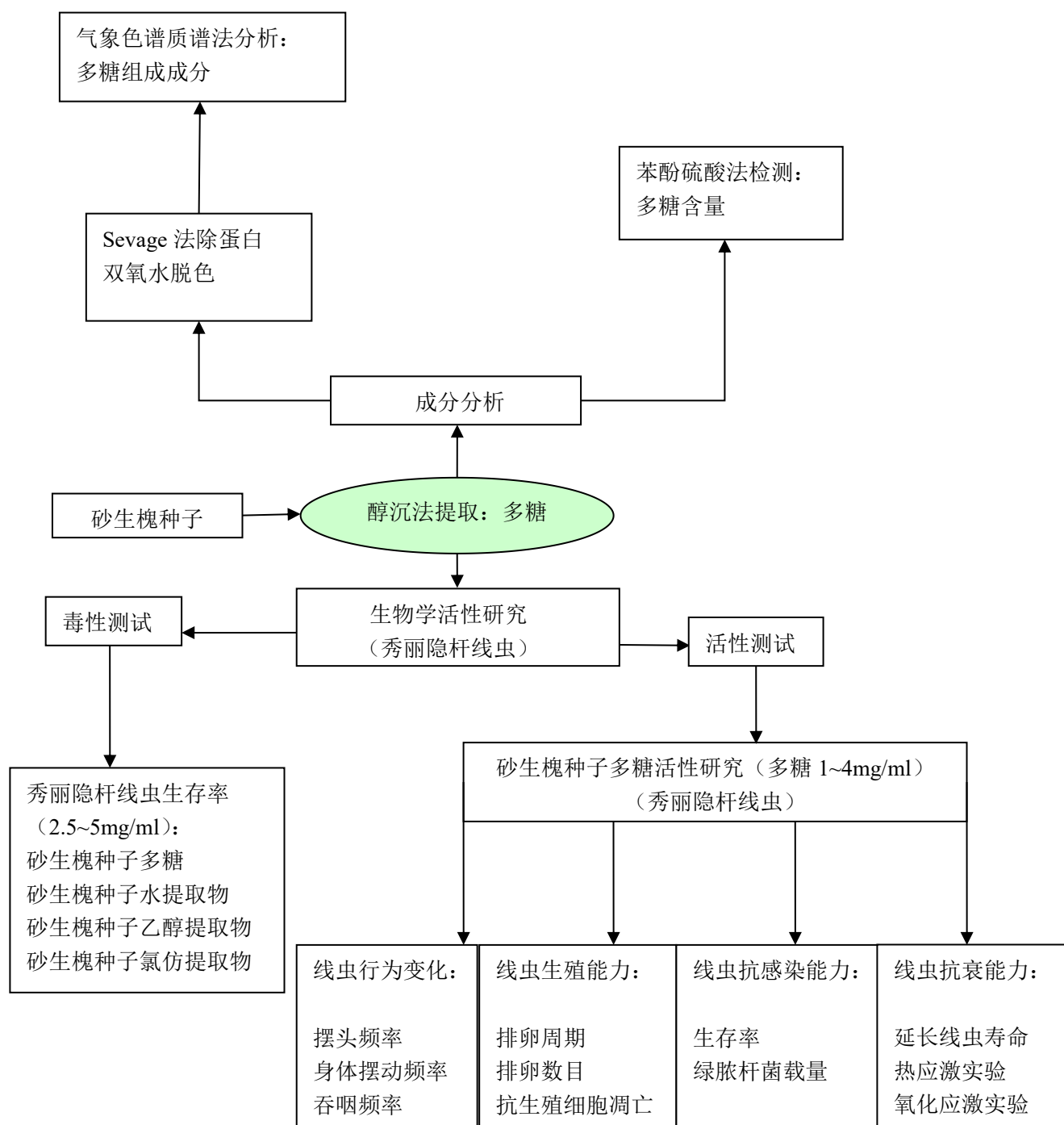


图 1-3 砂生槐种子多糖成分分析及生物学活性的实验研究的技术路线图

第二章 砂生槐种子多糖含量测定与成分分析

2.1 材料和仪器

2.1.1 材料与试剂

砂生槐种子，来自中国西藏。

砂生槐种子粗多糖，来自本实验室自备。

透析袋（10-100D），北京瑞达恒辉公司；滤膜（0.45 μ m），海宁市中力设备厂。

无水乙醇、浓硫酸、苯酚、NaOH、氯仿、正丁醇、H₂O₂（30%）、三氟乙酸、盐酸羟胺、吡啶、乙酸酐、单糖标准品（鼠李糖，葡萄糖，阿拉伯糖，半乳糖，核糖，肌糖，甘露糖），均为国产分析纯。

2.1.2 仪器与设备

电子精密天平（AR2130）	Ohaus Crop. Pine Brook, NJ, USA
台式离心机离心机（TGL-16）	长沙湘仪离心机仪器有限公司
紫外分光光度计（UV-2000）	上海尤尼柯仪器有限公司
调温型电热套（MH 5000）	北京科伟永兴仪器有限公司
循环水式多用真空泵（SHB-III）	郑州世纪双科实验仪器有限公司
旋转蒸发器（RE-52AA）	上海亚荣生化仪器厂
电热恒温水浴锅（MT-2）	江苏金怡仪器科技有限公司
冷冻干燥机	德国 Christ 公司
气象色谱仪（GC6890/MSD5973）	Agilent Technologies
漩涡振荡器（XY-XWH 型）	上海昕仪公司
数据处理软件	BF-9202N
台式离心机离心机（TGL-16）	长沙湘仪离心机仪器有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 砂生槐种子多糖提取

砂生槐的种子来自青藏高原，收集起来后在室温下自然干燥 3 周。多糖提取

的操作步骤主要如下^[38]:

取 200g 研磨成粉末的砂生槐种子在 80℃ 下用 60%乙醇回流加热 4 小时。使用滤纸(Whatman No. 2)过滤收集上清液。

将收集到的上清液真空浓缩至膏状,用浓 HCl 调整 pH 值至 4,离心 2000rpm 10min,然后收集上清液,弃不溶物。再向收集到的上清液中滴加 10M NaOH 直至 pH 值为 12,重复离心步骤,收集上清液,所获得上清液即为砂生槐种子乙醇提取物 (Ethanol extracts from *Sophora moorcroftiana*, SMeth)。

按照体积比为 1:1 的比例向砂生槐种子乙醇提取物中加入氯仿溶液来除去乙醇提取物中的生物碱,脂类和多酚等,加入氯仿的乙醇提取物分为两层,上层棕色水溶液即为粗多糖溶液,经冷冻干燥得到咖啡色粉末即为砂生槐种子多糖 (Polysaccharides from *Sophora moorcroftiana*, SMpol)。下层氯仿溶液中的物质即为砂生槐种子氯仿提取物 (Chloroform extracts from *Sophora moorcroftiana*, SMchl)。

2.2.2 砂生槐种子多糖含量测定

苯酚-硫酸法^[39]用于测定砂生槐种子多糖的含量,用葡萄糖做标准曲线。称取干燥后所得的砂生槐种子多糖粉末 10.0mg,置于 10mL 容量瓶中,加蒸馏水精确溶解至 10mL。精密称取葡萄糖标准品 10mg,置于 10ml 容量瓶中,加蒸馏水精确溶解至 10mL,分别吸取该溶液 1.0mL、2.0mL、3.0mL、4.0mL 和 5.0mL 于 10mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至 10mL,各取 1mL 砂生槐种子多糖溶液和不同浓度的葡萄糖溶液,分别加入 5%苯酚溶液 1mL,摇匀,再匀速加入 5mL 浓 H₂SO₄,立即摇匀后置于冷水冷却至室温,以蒸馏水同法作空白参比,并使用紫外分光光度仪在 490nm 处测定吸光度,计算多糖含量。

公式:

$$A=8.038c-8.018$$

A: 多糖含量

c: 溶液浓度

2.2.3 砂生槐种子多糖纯化

Sevage 法除蛋白和脂类^[40]:用蒸馏水将砂生槐种子多糖配制成 10mg/ml 的溶液 30ml,按照体积比为 3:1 的比例加入氯仿:正丁醇(v:v=4:1)的混合液,剧烈震荡(漩涡振荡器)20 min,离心 4000rpm 10min,收集上清液,除去中间层变性蛋白和下层氯仿。重复操作 10 至 15 次直到中间层无变性蛋白为止。

取 10ml 去除蛋白和脂类的砂生槐种子多糖溶液进行脱色^[41]。将 30%的过氧

化氢溶液与砂生槐种子多糖溶液 (v:v=5:1) 混合, 在 60℃ 水浴锅内加热 3h, 重复 2 至 3 次, 直至多糖溶液由棕褐色变为淡黄色液体。选用即用型透析袋, 先用流水持续透析 24h, 再用蒸馏水静止透析 24h, 得到的溶液经旋转蒸发仪除水, 最后得到纯白色粉末即为纯化后的砂生槐种子多糖。

2.2.4 气象色谱-质谱联用分析砂生槐种子多糖成分

精密称取 15mg 纯化后的多糖粉末溶解在加了 10ml 三氟乙酸 (2 mol/L) 中的密闭玻璃试管, 然后在 120 °C 水解 3h。水解过的砂生槐种子多糖溶液接着进行糖腈乙酯衍生^[42-43]:

水解的砂生槐种子多糖溶液与 50g/L 盐酸羟胺的吡啶溶液和 0.5ml 混合在 90℃ 水浴锅内加热 40min。混合液在室温下冷却, 然后加入 5ml 乙酸酐, 继续在 90℃ 水浴锅内加热 40min。

单糖的标准品: 鼠李糖, 葡萄糖, 阿拉伯糖, 半乳糖, 核糖, 肌醇, 甘露糖分别称取 15mg 按照多糖相同的方法进行乙酰衍生化。向气象色谱仪进样口分别加入样品和标准品, 选用 DB-1701 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 进柱条件为载气 N₂, 流速 30 ml/min; 进样口温度: 270 °C; 检测器温度: 270 °C。最后用数据处理软件进行分析。

2.3 结果

2.3.1 砂生槐种子多糖的得率

砂生槐种子粉末 200g, 经过提取得到粗品 0.176g, 为深棕褐色膏体, 计算出砂生槐种子多糖的得率为 8.8%。

2.3.2 砂生槐种子多糖含量

本实验使用将浓硫酸快速加到溶液表面的方式, 按苯酚-硫酸法测定葡萄糖标准曲线, 结果见表 2-1 和图 2-1。标准曲线的线性回归方程为: $A=8.038c-0.018$, 相关系数 $R^2=0.991$, 经过标准曲线的公式计算得到, 砂生槐种子粗多糖的含量约为 82.23%。

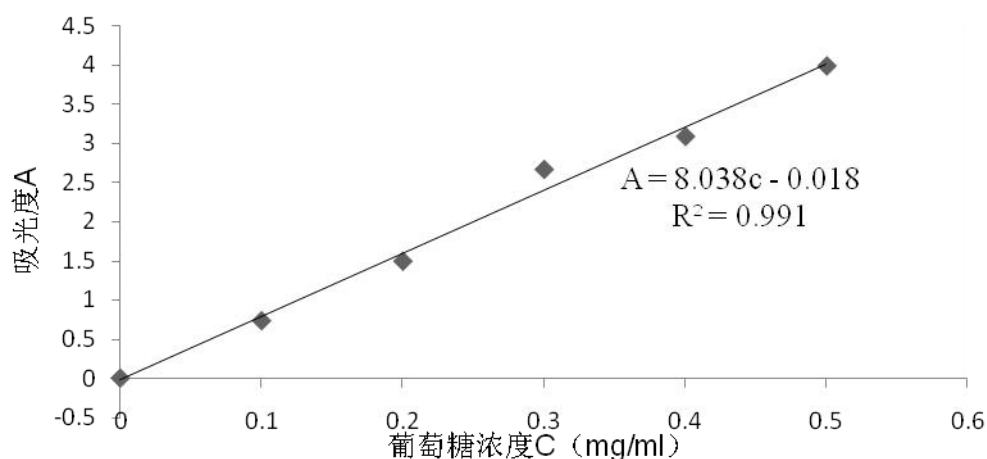


图 2-1 苯酚-硫酸法绘制的葡萄糖标准曲线

表 2-1 室温条件下葡萄糖在 490nm 处吸光度测定结果

标准品	编号	含量 (mg/ml)	吸光度 (A)
葡萄糖	1	0.1	0.731
	2	0.2	1.491
	3	0.3	2.662
	4	0.4	3.082
	5	0.5	3.982

2.3.3 砂生槐种子多糖成分分析

砂生槐种子多糖的气相色谱结果见表 2-2 和图 2-2，根据与单糖标准品的保留时间和响应因子可以确定样品单糖的种类，通过各个峰值的面积可以确定各单糖的摩尔比。结果表明，砂生槐种子多糖主要由葡萄糖、肌醇和半乳糖组成，三者的摩尔比为 35.7:1.3:17.0，说明葡萄糖是它的最主要成分，含量高达 35%。

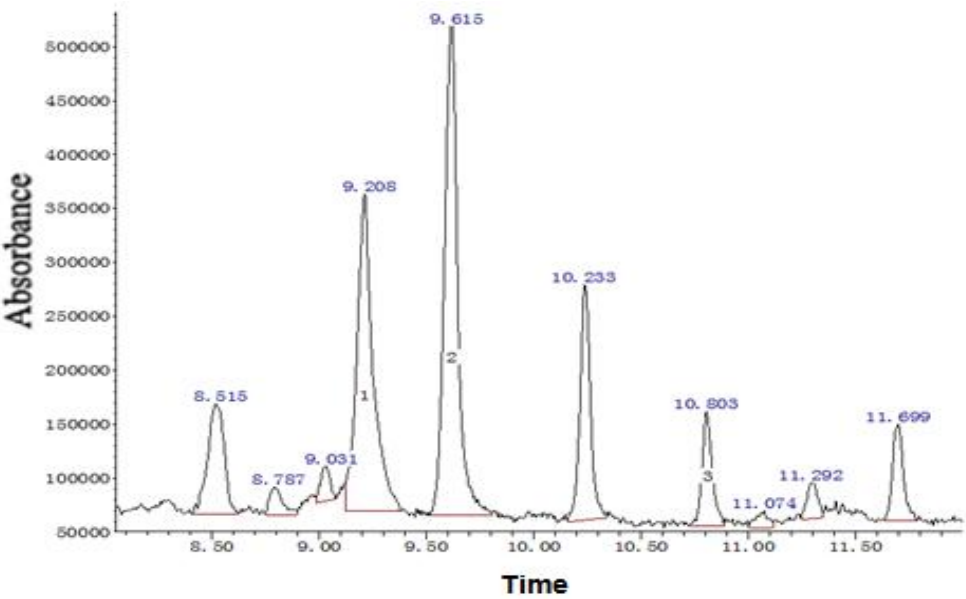


图 2-2 砂生槐种子多糖乙酰化的 GC 图

1.半乳糖（Gal） 2.葡萄糖（Glu） 3.肌醇（Inositol）

表 2-2 砂生槐种子多糖单糖糖腈乙酰化物结果分析表

	半乳糖	葡萄糖	肌醇
保留时间	9.208	9.615	10.803
总量%	17	35	3
CAS	083830-74-4	083831-74-4	029267-03-6
参比	178166	190528	203944

2.4 讨论

本实验提取砂生槐种子多糖的方法，是在传统的水提醇沉法（水醇法）^[31]上进行了改进。传统水提醇沉法是利用药材等植物中的大多数成分如生物碱盐、甙类、有机酸类、氨基酸、多糖等易溶于水和有机溶剂的特性，用水提出，并将其提取液浓缩，加入适当的乙醇反复数次沉降，除去其不溶物质，最后得到澄清液体。而本文提取多糖时为了更好的去除粗多糖中的碱性成分和其他杂质，选用60%乙醇和氯仿提取多糖代替了传统的蒸馏水和乙醇，再通过加入浓 HCl 和 NaOH 调整 pH 分别沉淀酸性和碱性物质来进行实验，目的是为了得到不含有酸性和碱性成分的粗多糖，并且用于实验。

测定砂生槐种子多糖含量^[32]主要是采用了苯酚-硫酸法和紫外分光光度仪联合使用。其中苯酚-硫酸法基本原理是利用多糖在浓硫酸作用下,快速水解生成单糖,并迅速脱水生成糖醛或其衍生物,同时与苯酚缩合产生棕褐色物质,一般在 490nm 处有特征吸收,其颜色深浅与糖的浓度成正比,故可用于多糖含量测定。利用紫外分光光度仪测量粗多糖中糖的含量,主要是通过恒定温度下,在同一种溶剂中,不同物质或不同浓度的同一物质对于不同波长的光的吸收程度不同,根据这种特性可以测量出溶液中某种物质的浓度,或者判断溶液中有哪些物质,主要适用于微量测定。本文选用葡萄糖作为标准品,主要因为葡萄糖在糖类物质中含量最高,分布最广,所以我们采用绘制葡萄糖标准曲线的方法来确定多糖中糖含量。本实验测得砂生槐种子粗多糖的含量约为 82.23%。实验在操作过程中,应避光进行,标准品溶液也需要避光保存。

多糖提取液中蛋白质含量较高,常用的除蛋白方法^[40]为 Sevage 法、三氟三氯乙烷法、三氯醋酸法。传统的 Sevage 法能有效的除去多糖溶液中的游离蛋白质。Sevage 法所选用的试剂氯仿、正丁醇和戊醇都是常规、廉价且易获得。其原理是使多糖不沉淀而使蛋白质沉淀:利用蛋白质在氯仿等有机溶剂中变性的特点,将提取液与 Sevage 试剂(有机溶剂混合液)按照一定比例混合,振荡,离心,变性后的蛋白质介于提取液与 Sevage 试剂交界处。此法的优点是条件温和,不会引起多糖的变性,缺点是对多糖溶液损耗较大,对游离蛋白能有效的祛除,但是对与多糖结合的蛋白质影响甚微。在砂生槐种子多糖提取过程中,用氯仿萃取除去砂生槐种子水溶液中的生物碱,脂类和多酚等成分,本实验方法参照扈瑞平^[40]等人 Sevage 法,除去砂生槐种子多糖中的水溶性蛋白。通过实验,我们发现经反复多次震荡离心,多糖溶液的透明度发生了变化,溶液更加清亮透明。

多糖常含有一些色素^[44](游离色素和结合色素),这样非常不利于后续实验结果分析。多糖常用的脱色方法有^[44]:离子交换法、氧化法、金属络合物法、吸附法(纤维素、硅藻土、活性炭)。双氧水脱色法的原理是对含有不饱和双键、羟基、芳香环等化学键的物质,具有很好的氧化脱色效果。直接氧化多糖溶液中的色素,并未脱除,属于氧化还原反应,脱色范围广且操作简单,试剂廉价易获得,操作条件要求低,普通实验室即可完成。但是选择性差,在一定程度上破坏了多糖的链状结构,损耗率高,需要目的产物稳定性较高^[44]。本实验选用了简单易行的氧化法,多糖溶液在除蛋白后变为清亮的棕色提取液。通过 30%的双氧水在一定温度条件下脱色后,最终转变成浅黄色的提取液。

随着多糖检测分析技术的革命性进步,现在分析多糖组成成分已经从早期的薄层层析发展到了现代的色谱法(固相,气相和液相)等更加精准的方法。本实

验的砂生槐种子多糖的单糖组成测定主要采用气相色谱-质谱法联用, 简称为气质联用 (GC-MS) [45]。它主要用于从某个给定样品中鉴别出特定物质的存在。气质联用技术则是在气相色谱法的基础上进行改进, 综合了气相色谱和质谱各自的优势, GC-MS 兼备色谱高分离、高定量和质谱高灵敏、进样少、分析快的优点, 不仅能够分析普通化合物, 而且对易挥发、易衍生化合物能够一次性实现分离、定性、定量分析, 更适用于复杂混合样品。气质联用的原理是将待测混合物样品先进行色谱柱分离, 然后用质谱仪离子源电离, 该电离离子经过质量分析仪器、检测仪器检测分析后将所得质谱信号数据输入到计算机中。目前, 常用的方法有糖醇乙酯法、三甲基硅醚法、糖腈乙酯法及三氯乙酯法。我们根据砂生槐种子多糖的特点采用了糖腈乙酰衍生化法, 此法具有制备简单、试剂易得、异构峰少, 适用于难溶于有机溶剂的多糖等优点。

通过气相色谱分析, 砂生槐种子多糖主要由葡萄糖、肌醇和半乳糖组成, 三者的摩尔比为 35.7:1.3:17.0, 说明葡萄糖是它的最主要成分。而枸杞多糖主要由鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖等, 其中含量较多的是阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖, 其余的单糖含量比较低^[34], 枸杞多糖具有抗肿瘤, 降血糖和抗氧化等功能^[28]。冬虫夏草作为一种名贵的保健品, 具有增强免疫, 抗肿瘤和防治肾病等药效^[35], 它主要由葡萄糖, 半乳糖和甘露糖组成^[29]。不同的多糖有着相同或相似的单糖组成, 但又各自不同的结构, 导致其生物活性也不相同, 砂生槐种子多糖的主要单糖成分为葡萄糖、肌醇和半乳糖, 其生物学活性是否与其多糖结构有关有待进一步研究。

第三章 砂生槐种子提取物对秀丽隐杆线虫生存率的影响

3.1 材料和仪器

3.1.1 材料与试剂

实验动物

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*, the Bristol strain), 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验菌株

大肠杆菌 OP50 (*E.coli* OP50) 尿嘧啶渗漏缺陷型, 作为秀隐杆线虫的食物, 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验试剂

无水乙醇(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)、硫酸镁(分析纯)、硫酸钾(分析纯)、磷酸二氢钾(分析纯)、磷酸氢二钠(分析纯)、氯化钙(分析纯)、甘油、胆固醇(分析纯)均购自上海第二化工厂。

胰蛋白胨、酵母粉、琼脂粉均购自杭州木木生物有限公司。

砂生槐种子多糖 (SMpol), 来自本实验室制备。

砂生槐种子水提取物 (SMdec), 砂生槐种子氯仿提取物 (SMchl) 和 95% 乙醇砂生槐种子提取物 (SMeth) 来自兰州大学雒艳萍老师馈赠。

3.1.2 仪器与设备

连续变倍体视显微镜	上海一恒科技有限公司
倒置生物显微镜	重庆光电仪器总公司
生化培养箱	宁波江南仪器厂
电子精密天平 (AR2130)	Ohaus Crop. Pine Brook, NJ, USA
台式离心机离心机 (TGL-16)	长沙湘仪离心机仪器有限公司
冰箱	海尔电器有限公司
手提高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
SW-CJ-IFD 型单人单面净化工作台	苏州净化设备有限公司
隔水式恒温培养箱	上海安亭科学仪器厂

恒温振荡器	上海一恒科技有限公司
漩涡振荡器 (XY-XWH 型)	上海昕仪公司
微量移液器	培养皿
0.22 微米滤膜	注射器

3.2 实验方法

3.2.1 培养基配制

NGM (Nematode Growth Medium) 培养基配制: 3gNaCl, 2.5g 蛋白胨, 17g 琼脂, 1mol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH=6.0)25ml, 975ml 蒸馏水。120℃灭菌 20 分钟后加入 5mg/ml 胆固醇溶液(溶剂为无水乙醇)1ml, 1mol/L $MgSO_4$ 1ml, 1mol/L $CaCl_2$ 1ml。

LB 液体培养基的配制:胰蛋白胨 10g/L, 氯化钠 10g/L, 酵母粉 5g/L, 双蒸水配至 1000ml, 120℃灭菌 20 分钟。

LB 固体培养基的配制: 胰蛋白胨 10g/L, 氯化钠 10g/L, 酵母粉 5g/L, 琼脂粉 15g/L, 双蒸水配至 1000ml, 120℃灭菌 20 分钟。

缓冲液配制: S 缓冲液, 0.1mol/LNaCl, 0.05mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 (pH=6.0); M9 缓冲液, 每升缓冲液中含 15.12g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 3g KH_2PO_4 , 5g NaCl, 0.25g $MgSO_4$, 宜现用现配。

3.2.2 大肠杆菌 OP50 的培养

挑取大肠杆菌单个小菌落在 LB 固体平板培养基上分区划线, 将划线平板放入 37℃生化培养箱培养 24h 得单个菌落^[46]。从 LB 平板上挑取单个 OP50 菌落放入 LB 液体培养基中在 37℃恒温振荡器中增菌 24h。吸取 200 μ l 已增菌的 LB 液体培养基滴在 NGM 培养基 (60mm) 表面, 将 NGM 平板置于 37℃生化培养箱培养 24h。

3.2.3 秀丽隐杆线虫的培养

3.2.3.1 秀丽隐杆线虫的传代培养

将有秀丽隐杆线虫的 NGM 平板培养基切块^[47], 切好的 NGM 琼脂块转移到 NGM 培养基 (含 OP50), 20℃生化培养箱培养即为秀丽隐杆线虫传代培养。

3.2.3.2 秀丽隐杆线虫的冷冻保存

用现配的灭菌 S 缓冲液将 NGM 平板上的线虫冲洗下并装入含有 30%的甘油

5ml 密封分装离心管中, 并置于液氮环境中 (-196°C), 可长期保存线虫^[48]。

3.2.4 秀丽隐杆线虫的同期化

选择 L4 期秀丽隐杆线虫较多的 NGM 平板, 每板用 2ml 灭菌 M9 缓冲液冲洗, 冲洗三次, 将含有线虫的 M9 缓冲液用移液枪吸入 15ml EP 管中。EP 管静置 5min 直至秀丽隐杆线虫沉淀在试管底部时, 弃上清, 加入 10ml 裂解液 (4ml M9 缓冲液, 5ml 1M NaOH, 1ml HClO_2)。裂解 8min, 在显微镜下看到大部分秀丽隐杆线虫虫卵释放出来时, 离心 2500rpm, 2min。用 M9 缓冲液洗涤虫卵三次, 每次 2000rpm, 2min。秀丽隐杆线虫虫卵表面的裂解液被洗涤干净后, 用 M9 缓冲液混匀。

置于 20°C 生化培养箱内培养 12h (保证孵化的 L1 期线虫同时开始进食), 按照 60mm 培养皿滴加 200-300 μl 含 L1 幼虫的 M9 缓冲液点种在 NGM 固体平板 (含有 OP50) ^[47]。

3.2.5 砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏试验

使用打孔机将滤纸片打成直径 0.5cm 的圆形纸片若干^[48], 高压灭菌。称取砂生槐种子多糖, 配制成 4mg/ml, 2mg/ml 和 1mg/ml 的多糖溶液, 抽滤除菌。将若干高压灭菌的滤纸片浸泡在砂生槐种子多糖溶液 4mg/ml, 2mg/ml 和 1mg/ml 溶液中 1h。稀释含有 OP50 的菌液依照麦氏比浊管稀释至 1×10^5 ml, 并涂在 LB 固体培养基上。将带有药物的滤纸片, 放在 LB 培养基表面, 37°C 生化培养箱内培养 24h。

3.2.6 不同砂生槐种子提取物对秀丽隐杆线虫生存率影响

将已经同期化的秀丽隐杆线虫置于普通 NGM 培养基上培养 72h 至 L4 期。

分别称取砂生槐种子多糖 (SMpol), 砂生槐种子水提取物 (SMdec), 砂生槐种子乙醇提取物 (SMeth) 和砂生槐种子氯仿提取物 (SMchl) 各 10mg 溶于 2ml M9 缓冲液中, 配成 5 mg/ml 的储液, 使用时候用 M9 缓冲液稀释至需要。

将提取物溶液加入 96 孔板中, 每孔 300 μl , 每孔挑入 15 条秀丽隐杆线虫。

SMpol 药物组: 药物终浓度 2.5mg/ml、5mg/ml

SMdec 药物组: 药物终浓度 2.5mg/ml、5mg/ml

SMeth 药物组: 药物终浓度 2.5mg/ml、5mg/ml

SMchl 药物组: 药物终浓度 2.5mg/ml、5mg/ml

M9 缓冲液对照组

将挑入秀丽隐杆线虫的 96 孔板置于生化培养箱 20°C ^[50], 每隔 24h 记录存活秀丽隐杆线虫数目, 分别记录 24h, 48h, 72h 线虫的生存率, 重复三次。

3.2.7 统计学分析

使用 SPSS18.0 进行统计学分析,对秀丽隐杆线虫的生存率的数据进行分析,全部试验数据用 t 检验分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义,得出结论。

3.3 结果

3.3.1 秀丽隐杆线虫的培养

野生秀丽隐杆线虫在 NGM 培养基 (OP50 接种适量) 上,生长发育良好。如图 3-1, 分别展示了在体视显微镜下,线虫的不同发育时期。实验发现,适量的 OP50 接种的 NGM 培养基有利于线虫生长,但是在含有过多的 OP50 的 NGM 培养基上,线虫的活动严重受限,不利于其生长繁殖。



图 3-1 体视显微镜下不同发育时期的线虫

3.3.2 秀丽隐杆线虫的冻存

在秀丽隐杆线虫的冷冻保存和复苏过程中,我们发现, L1 期的幼虫易于冷冻保存与复苏。同时,应注意冻存方式,冻存时应缓慢冷冻而不是快速直接冷冻,这样更利于提升复苏成功的几率。

3.3.3 秀丽隐杆线虫同期化

秀丽隐杆线虫的同期化成功对于后续试验起着至关重要的作用。成功的同期化结果显示,秀丽隐杆线虫数量多且都处于同一时期,各项生长发育指标(体长,摄食能力,排卵数目与运动行为)与正常排卵孵化的线虫一致见图 3-2。

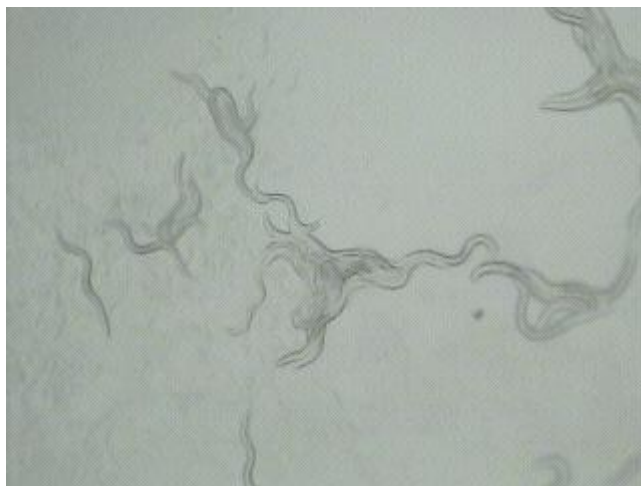


图 3-2 同步化的 L3 期线虫

3.3.4 砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏结果

砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏试验结果见图 3-3。在涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上,贴有含有不同浓度(1mg/ml-4mg/ml)砂生槐种子多糖的滤纸片,培养 24h 后,含有多糖的滤纸片周围并未形成抑菌环,其边缘清晰可见,4mg/ml 及以下浓度的砂生槐种子多糖对于大肠杆菌 OP50 的生长繁殖没有杀灭和抑制作用。

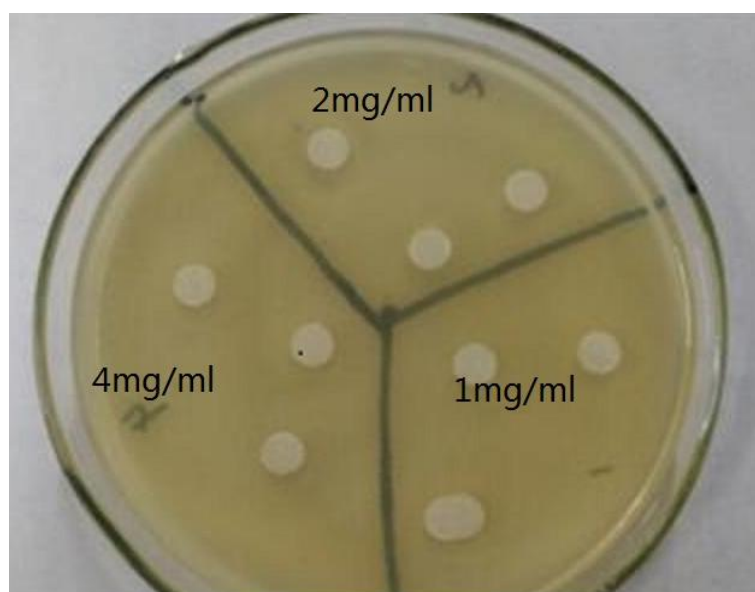


图 3-3 砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的药敏结果图

注：上方是砂生槐种子多糖 2mg/ml、左下方是砂生槐种子多糖 4mg/ml、右下方是砂生槐种子多糖 1mg/ml

3.3.5 砂生槐种子不同提取物对秀丽隐杆线虫的影响

四种来自砂生槐种子的提取物：砂生槐种子多糖（SMpol）、砂生槐种子水提取物(SMdec)、砂生槐种子乙醇提取物（SMeth）和砂生槐种子氯仿提取物（SMchl），分别测试 2.5mg/ml 和 5 mg/ml 的秀丽隐杆线虫生存率。砂生槐种子不同提取物对秀丽隐杆线虫生存率结果见图 3-4，表 3-1 和表 3-2。与对照组相比，在 2.5 mg/ml、5 mg/ml 浓度下砂生槐种子多糖和水提取物秀丽隐杆线虫的生存无杀灭作用，证明砂生槐种子多糖和水提取物在 5 mg/ml 浓度以下对秀丽隐杆线虫无毒性效应。而与对照组相比，连续 3 天内砂生槐种子氯仿提取物和乙醇提取物对秀丽隐杆线虫的生存率均有不同程度的降低，分别为 58.3%（ $p=0.023$ ）和 70.6%（ $p=0.030$ ）在 5 mg/ml（图 3-4A）、42.5%（ $p=0.031$ ）和 55.1%（ $p=0.039$ ）在 2.5mg/ml（图 3-4B）。上述结果初步表明：在 5 mg/ml 浓度以下，砂生槐种子多糖和水提取物对秀丽隐杆线虫无毒性作用，秀丽隐杆线虫可在该药物作用下正常生长发育。而砂生槐种子氯仿提取物和乙醇提取物在 5 mg/ml 浓度以下，对秀丽隐杆线虫的个体的生存有不同程度的毒杀作用。

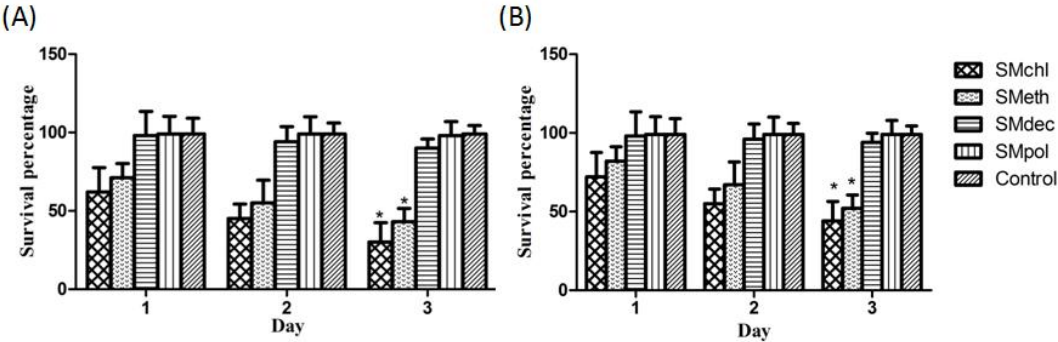


图3-4 砂生槐种子不同提取物对秀丽隐杆线虫生存率的影响(A: 5mg/ml 和 B: 2.5mg/ml)

* $p < 0.05$ VS 对照组 (control), $n = 35$

注：SMchl：砂生槐种子氯仿提取物、SMeth：砂生槐种子乙醇提取物、
SMdec：砂生槐种子水提取、SMpol：砂生槐种子多糖

表 3-1 四种提取物在 5mg/ml 浓度条件秀丽隐杆线虫生存率的变化

Group	24h	48h	72h
SMchl	62.1±15.6	45.7±9.3	30.3±10.4*
SMeth	71.5±8.2	55.2±14.3	43.6±8.7*
SMdec	98.9±11.3	94.0±19.7	90.8±15.8
SMpol	99.8±12.5	99.1±12.0	98.6±18.8
Control	99.0±10.0	98.9±17.8	98.9±15.4

注：四种提取物在 5mg/ml 浓度条件下，连续 3 天，秀丽隐杆线虫生存率的变化，平均数±标准差，n=45，* $p < 0.05$ VS 对照组（control）

SMchl：砂生槐种子氯仿提取物、SMeth：砂生槐种子乙醇提取物、

SMdec：砂生槐种子水提取物、SMpol：砂生槐种子多糖

表 3-2 四种提取物在 2.5mg/ml 浓度条件下秀丽隐杆线虫生存率的变化

Group	24h	48h	72h
SMchl	72.2±15.6	45.7±13.5	44.6±13.4*
SMeth	82.6±9.2	67.7±15.3	52.5±8.6*
SMdec	98.9±13.4	96.4±9.0	94.8±15.9
SMpol	99.7±12.1	99.1±11.0	98.9±19.8
Control	99.6±10.6	98.9±11.7	98.9±18.4

注：四种提取物在 2.5mg/ml 浓度条件下，连续 3 天，秀丽隐杆线虫生存率的变化，平均数±标准差，n=45 * $p < 0.05$ VS 对照组（control）

SMchl：砂生槐种子氯仿提取物、SMeth：砂生槐种子乙醇提取物、

SMdec：砂生槐种子水提取物、SMpol：砂生槐种子多糖

3.4 讨论

秀丽隐杆线虫，是最常用于实验的正常品系线虫^[23]，它便于观察且生命周期短，经常被用于各种药物试验。秀丽隐杆线虫以细菌为食，我们选用的尿嘧啶渗漏缺陷型大肠杆菌，有着在 NGM 培养基上生长缓慢，不易形成大菌落的特点，这样不仅利于我们观察线虫的各项指标，而且不会限制线虫的正常运动确保线虫的正常生长发育。在实验操作过程中，我们发现无菌操作技术是实验顺利进行的基本保障。NGM 平板培养基最容易被真菌污染，在显微镜下可见丝状菌丝，放

置一至两天便出现肉眼可见的白色大菌落。被污染的秀丽隐杆线虫状态较差,活动能力下降,不仅生长缓慢还会导致同期化成功率也大幅度降低。

秀丽隐杆线虫同期化是线虫药物实验能够得出科学,准确结果的前提。想要秀丽隐杆线虫同期化能够达到理想的效果,足够充足的 L4 期线虫是同期化成功的基础。在实验过程中,我们发现碱性次氯酸钠裂解液对同期化的成功也是必不可少的步骤。裂解液作用 4min, 线虫大部分虫体没有裂解完全, L2-L3 期幼虫尤其不易裂解且生命力顽强,如果不能将幼虫裂解完全,会严重降低同期化的成功率。虽然裂解时间不够会影响实验,但是如果裂解时间过长也会影响同期化的效果。实验中, 如果将碱性次氯酸钠溶液裂解线虫的时间延长至 10min 或者更长,即使秀丽隐杆线虫虫体可以全部裂解成碎片,然而虫卵也会被裂解液严重破坏,大量虫卵不能正常孵化,无法得到所需数量的同期化线虫。

药敏试验主要有稀释法和纸片扩散法^[43]。其中稀释法主要使用在微生物对抗生素的耐药性表现上。而纸片扩散法简单易行,对设备试剂要求较低,更适用于本实验。该法是将含有定量待测药物的滤纸片贴在已接种了测试菌的琼脂表面上,纸片中所含的药物在琼脂中扩散,随着扩散距离的增加,待测药物的浓度呈对数减少,从而在纸片的周围形成一定的浓度梯度,不同的抑菌药物的抑菌圈直径因受药物在琼脂中扩散速度的影响而可能不同,抑菌圈的大小可以反映测试菌对药物的敏感程度,并与该药物对测试菌的 MIC 呈负相关。经过试验证明,砂生槐种子多糖对大肠杆菌 OP50 的生长并无抑制作用。因此, OP50 才可以在加了多糖的 NGM 琼脂板上正常繁殖。

秀丽隐杆线虫是唯一细胞能够被逐个盘点并归类的生物^[37],所以它能够成为当代生命科学和医学研究中最重要模式生物之一。近几年来,秀丽隐杆线虫适用于高通量的筛选且分子机制清晰被广泛应用于环境毒性监测、合成化合物活性筛选以及初步毒性评价等生物领域。我国是中药大国,依靠我们科研工作者孜孜不倦的努力,发现秀丽隐杆线虫也可以被应用于中药的活性成分研究与毒性评价。传统的中药毒性评价主要是依赖动物实验,大量的动物实验不仅浪费大量的人力和财力。目前,有很多成熟的体外毒性评价系统,如 P450 酶技术、毒理芯片技术、液质联用技术以及应用代谢组学方法等^[51-55]。然而这些评价系统都是基于在体外实施,并不能模拟动物体内复杂的代谢环境,所得结果仍然需要进一步验证。秀丽隐杆线虫作为稳定的药物模式生物,利用基因与人类相似程度高且对毒性物质的反应敏感性与哺乳动物具有一致性,它被广泛应用在化学药物毒性的评价上^[58]。李贞景等^[57]首次将线虫应用于中药毒性评价中,通过检测中药提取物对线虫生存率和产卵数目。秀丽隐杆线虫载毒性刺激下^[58],能够产生一系列生物学特征的改变,如生存率降低,排卵数目减少,寿命缩短,运动能力下降和体

长的改变等，这些指标都为线虫在毒理学的评价提供了更好的依据。

砂生槐的四种提取物：砂生槐种子多糖（SMpol），砂生槐种子水提取物（SMdec），砂生槐种子乙醇提取物（SMeth）和砂生槐种子氯仿提取物（SMchl），实验表明，砂生槐种子氯仿提取物和乙醇提取物都降低了线虫的生存率。砂生槐种子乙醇提取物主要是使用 60% 的乙醇提取，含有杂质较多，包含砂生槐种子所以能溶于有机溶剂的所有物质，如糖类，碱类，脂类和蛋白类物质等，因此在 2.5~5mg/ml 表现出来对线虫的生存抑制的现象。与此同时，砂生槐种子氯仿提取物也具有抗肿瘤，抗感染和抗寄生虫的作用^[17-20]，砂生槐种子氯仿提取物主要以生物碱为主，生物碱对生物机体有一定的毒性作用。砂生槐水提取物是单纯用去离子热水从砂生槐种子中提取出来的混合物，更接近我们传统服用的中药，对秀丽隐杆线虫并未表现出毒性作用。经文献报道，95%砂生槐乙醇提取物（400mg/L）可以延长秀丽隐杆线虫的寿命^[22]。砂生槐种子多糖来自砂生槐种子乙醇提取物，经过氯仿反复沉淀去除碱类，部分蛋白和脂类等，与砂生槐种子氯仿提取物共同构成砂生槐种子乙醇提取物。实验结果表明，砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫并未表现出毒性作用，进一步研究其对秀丽隐杆线虫行为、应激、生殖、抗感染能力的影响。

第四章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命、 行为和应激的影响

4.1 材料和仪器

4.1.1 材料和试剂

实验动物

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*, the Bristol strain), 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验菌株

大肠杆菌 OP50 (*E.coli* OP50) 尿嘧啶渗漏缺陷型, 作为秀隐杆线虫的食物, 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验试剂

无水乙醇(分析纯), 氢氧化钠(分析纯), 氯化钠(分析纯), 硫酸镁(分析纯), 硫酸钾(分析纯), 磷酸二氢钾(分析纯), 磷酸氢二钠(分析纯), 氯化钙(分析纯), 甘油, 胆固醇(分析纯), H_2O_2 (分析纯) 均购自上海第二化工厂。

胰蛋白胨, 酵母粉, 琼脂粉均购自杭州木木生物有限公司。

砂生槐种子多糖 (SMpol), 来自本实验室制备。

砂生槐种子水提取物粉末 (SMdec) 来自兰州大学雒艳萍老师馈赠。

4.1.2 仪器和设备

连续变倍体视显微镜	上海一恒科技有限公司
倒置生物显微镜	重庆光电仪器总公司
生化培养箱	宁波江南仪器厂
电子精密天平 (AR2130)	Ohaus Crop. Pine Brook , NJ , USA
台式离心机离心机 (TGL-16)	长沙湘仪离心机仪器有限公司
冰箱	海尔电器有限公司
手提高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
SW-CJ-IFD 型单人单面净化工作	苏州净化设备有限公司

台

隔水式恒温培养箱	上海安亭科学仪器厂
恒温振荡器	上海一恒科技有限公司
漩涡振荡器 (XY-XWH 型)	上海昕仪公司
微量移液器	培养皿
0.22 微米滤膜	注射器

4.2 实验方法

4.2.1 实验分组

配制含有药物的 NGM 培养基:

向 NGM 培养基中加入砂生槐种子多糖 (按照 NGM 培养基: 多糖=10ml: 40mg 的比例), 得到含砂生槐种子多糖 (4mg/ml) NGM 平板培养基的。同法配制砂生槐种子多糖 2mg/ml、1mg/ml 和砂生槐水提取物 4mg/ml 的 NGM 平板培养基。

将已经同期化的秀丽隐杆线虫置于含有药物 NGM 培养基上培养 72h 至 L4 期。

SMpol 药物组: 药物终浓度 1mg/ml、2mg/ml、4mg/ml

SMdec 药物组: 药物终浓度 4mg/ml

M9 缓冲液对照组

4.2.2 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命的影响

每实验组随机选取 15 条秀丽隐杆线虫^[59], 转移到普通 NGM 培养基, 每隔 2 日更换一次 NGM 平板并且计数, 死亡和丢失的线虫都记到死亡数据里, 直至线虫全部死亡。秀丽隐杆线虫死亡判断标准: 无游动及吞咽动作, 轻触后无任何反应。实验重复三次。

4.2.3 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响

每实验组随机选取 15 条秀丽隐杆线虫^[60], 转移到普通 NGM 培养基, 在体式显微镜 (40*10 倍) 下观察。测定 20s 内身体弯曲次数, 内头部摆动次数和吞咽次数, 实验重复三次。

身体弯曲的定义如下假定沿咽泵的方向为轴, 则垂直方向为轴, 因此沿轴方向的一次运动定义为一次身体弯曲。

头部摆动的定义如下身体弯曲过程中头部摆动至体长的一半时, 计为一次头部摆动。

吞咽次数的定义为咽泵从上至下运动一次，计数为一次。

4.2.4 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫应激能力的影响

4.2.4.1 热应激实验

各实验组随机选取 20 条秀丽隐杆线虫^[61]，将各组秀丽隐杆线虫转移至 M9 缓冲液中，放入 35℃生化培养箱，每隔 20min 记录一次线虫死亡的数目，直至线虫全部死亡。线虫死亡判断标准:无游动及吞咽动作，轻触后无任何反应，实验重复三次。

4.2.4.2 氧化应激实验

各实验组随机选取 20 条秀丽隐杆线虫^[62]，将各组秀丽隐杆线虫转移至用 M9 缓冲液稀释的 40mmol/ml 双氧水 300 μ l (含 OP50)，放入 20℃生化培养箱，每隔 20min 记录一次线虫死亡的数目，直至线虫全部死亡。线虫死亡判断标准:无游动及吞咽动作，轻触后无任何反应，实验重复三次。

4.2.5 统计学分析

使用 SPSS18.0 进行统计学分析，对秀丽隐杆线虫在砂生槐种子多糖干预下生命周期的数据进行分析，全部试验数据用 t 检验分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义，得出结论。

使用 SPSS18.0 进行统计学分析，对秀丽隐杆线虫在多糖干预下的行为的数据进行统计分析，全部试验数据用方差齐性检验和单因素方差分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义，得出结论。

使用 SPSS18.0 进行统计学分析，全部实验数据用 log-rank 检验分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义，得出结论。

4.3 结果

4.3.1 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫寿命的影响

砂生槐种子多糖干预后秀丽隐杆线虫的寿命变化结果见图 4-1。砂生槐种子多糖可以延长秀丽隐杆线虫寿命，随着多糖浓度的逐渐升高，秀丽隐杆线虫的寿命也延长更加明显，与对照组秀丽隐杆线虫的平均寿命（15.9 天）相比，4 mg/ml 的砂生槐种子多糖延长线虫的寿命至 27.3 天，有明显的延长线虫寿命作用（ $p=0.041$ ）。2 mg/ml 的砂生槐种子多糖延长了线虫的寿命至 21.2 天，与对照组相比（ $p=0.072$ ），无统计学差异。砂生槐种子多糖（1mg/ml）和砂生槐种子水

提取物组（4mg/ml）无延长线虫寿命的作用（ $p>0.05$ ）。

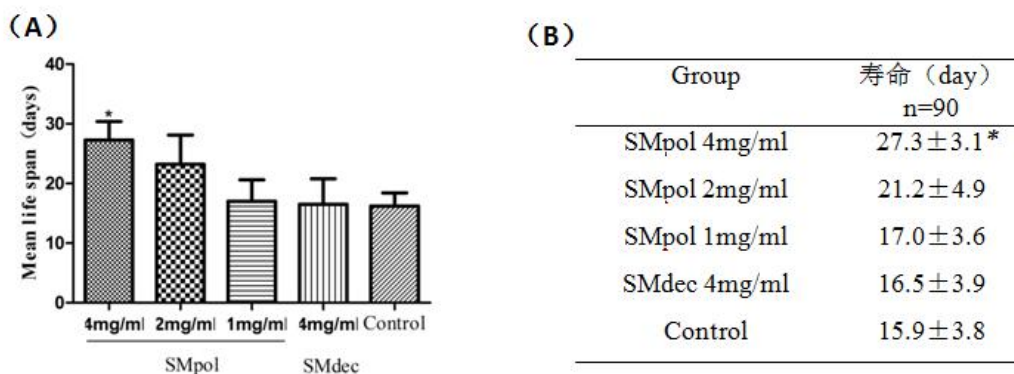


图 4-1 砂生槐种子多糖干预后秀丽隐杆线虫的寿命变化 (A: 秀丽隐杆线虫寿命变化柱状图,

B: 秀丽隐杆线虫平均寿命), 平均数±标准差, n=90, * $p < 0.05$ VS 对照组 (control)

注: SMdec: 砂生槐种子水提取物、SMpol: 砂生槐种子多糖

4.3.2 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响

砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响结果见图 4-2 和表 4-1。砂生槐种子多糖和砂生槐种子水提取物对秀丽隐杆线虫的行为无影响。药物组和对照组之间比较, 摇头频率 ($p=0.324$), 身体摆动频率 ($p=0.462$) 和吞咽频率 ($p=0.507$) 无统计学差异。

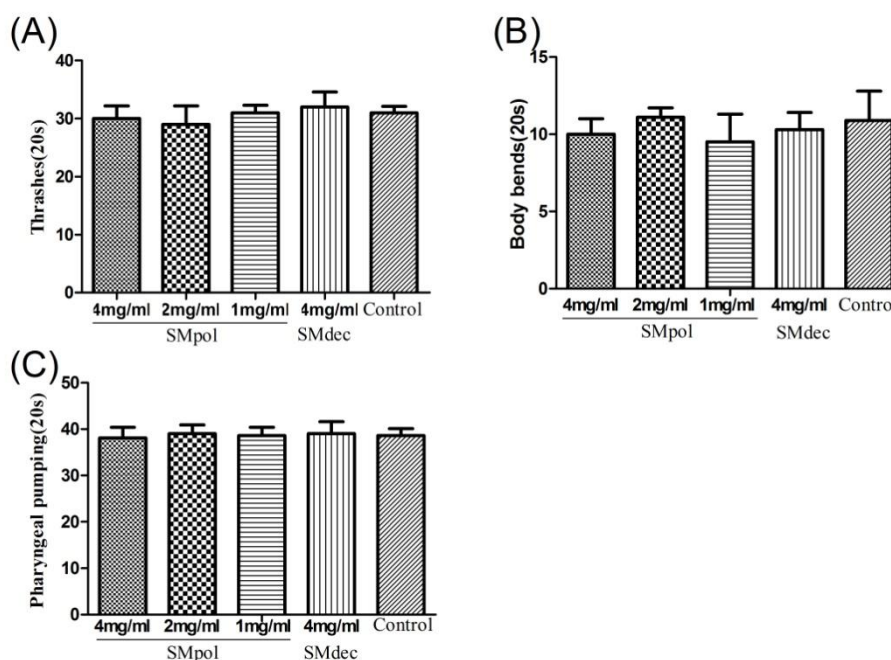


图 4-2 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫行为的影响 (A: 头部摆动次数、B: 身体弯曲次数和 C: 吞咽次数)。

注: SMdec: 砂生槐种子水提取物、SMpol: 砂生槐种子多糖

表 4-1 砂生槐种子多糖干预的秀丽隐杆线虫的行为

	SMpol 4mg/ml	SMpol 2mg/ml	SMpol 1mg/ml	SMdec 4mg/ml	Control	<i>p</i>
摆头	30.7±3.2	29.6±2.2	31.0±1.3	32.2±2.6	31.5±2.1	0.324
身体 摆动	10.6±1.0	11.1±1.6	9.5±1.8	10.3±1.1	10.9±1.9	0.462
吞咽	38.1±2.9	29.0±1.9	38.6±1.8	39.0±2.6	38.6±1.5	0.507

注：20s 内秀丽隐杆线虫摆头，身体摆动和吞咽的次数变化，平均数±标准差，n=60，

SMdec：砂生槐种子水提取物、SMpol：砂生槐种子多糖

4.3.3 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫在应激条件下的保护作用

砂生槐种子多糖(4mg/ml)在正常条件下延长秀丽隐杆线虫的寿命，而且在高温，氧化的条件下，砂生槐种子多糖仍然可以延长线虫的生存寿命，增强秀丽隐杆线虫对外界条件变化的适应能力见图 4-3 和表 4-2。图 4-3（A）为秀丽隐杆线虫应对热应激能力的实验结果。与对照组相比，砂生槐种子多糖在高温条件下延长了秀丽隐杆线虫平均生存时间 1.7 倍。砂生槐种子多糖（4mg/ml）增强了秀丽隐杆线虫对抗热应激的能力，并且延长线虫寿命至 24h。通过统计学 log-rank 检验（ $p=0.027$ ），有统计学差异。图 4-3（B）为秀丽隐杆线虫应对抗氧化应激能力的实验结果。与对照组相比，砂生槐种子多糖（4mg/ml）增强了秀丽隐杆线虫对抗强氧化应激的能力，延长了线虫的寿命。统计学 log-rank 检验（ $p=0.018$ ），有统计学差异。

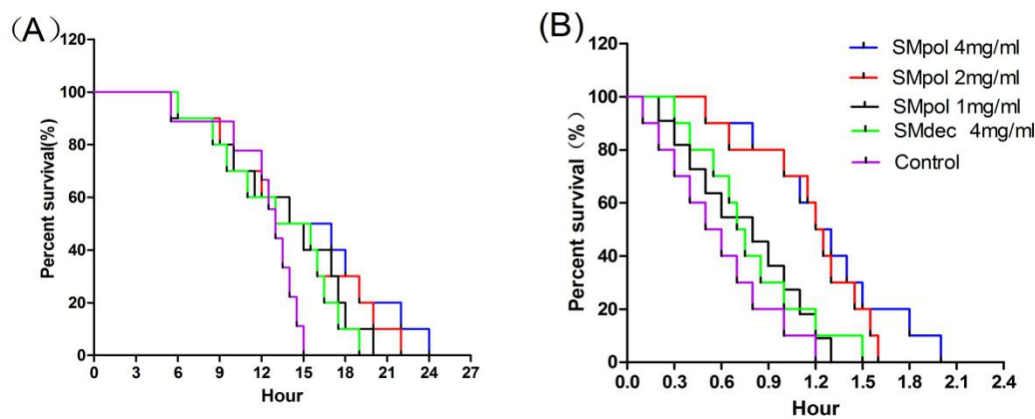


图 4-3 砂生槐种子多糖增强秀丽隐杆线虫应对应激的能力 (A: 秀丽隐杆线虫应对热应激的能力 B: 秀丽隐杆线虫应对抗氧化应激的能力)

注: SMdec: 砂生槐种子水提取物、SMpol: 砂生槐种子多糖

表 4-2 热应激和氧化应激实验组秀丽隐杆线虫平均生存时间

	SMpol 4mg/ml	SMpol 2mg/ml	SMpol 1mg/ml	SMdec 4mg/ml	Control	<i>p</i>
热应激 (Hour)	13.1±1.5*	10.8±2.2	9.4±2.0	8.8±0.9	7.9±1.2	0.027
氧化应激 (Hour)	1.1±0.1*	0.8±0.2	0.6±0.1	0.7±0.1	0.5±0.1	0.018

注: n=90, 平均数±标准差, **p* < 0.05 VS 对照组 (control)

SMdec: 砂生槐种子水提取物、SMpol: 砂生槐种子多糖

4.4 讨论

秀丽隐杆线虫是目前研究抗衰以及衰老过程调控机制研究的重要模式生物。秀丽隐杆线虫延长寿命的主要机制是, 依靠它的三大信号通路: 胰岛素 / 胰岛素样生长因子-1(insulin / IGF-1)信号通路、Sirtuin 家族信号通路以及雷帕霉素靶蛋白(TOR)信号通路^[63]。通过实验发现, 在 1~4mg/ml 浓度之间, 秀丽隐杆线虫寿命的延长与砂生槐种子多糖呈剂量依赖关系, 随着多糖浓度的增加, 线虫延长寿命的效果越明显。与砂生槐种子水提取物和对照组相比, 砂生槐种子多糖(4mg/ml)可以显著性延长秀丽隐杆线虫寿命, *p* < 0.05。虽然砂生槐种子多糖 (2mg/ml) 从图中观察也可以延长秀丽隐杆线虫的寿命, 但是 *p* > 0.05。经文献报道秀丽隐

杆线虫的平均寿命是 14-20 天^[64]在 20℃条件下, 而本实验高浓度砂生槐种子多糖可以将线虫的平均寿命延长至 27.3 天, 说明砂生槐种子多糖对线虫有抗衰老的作用。由于寿命实验周期较长, 培养基放置久了容易受到真菌和细菌污染, 被污染会影响线虫寿命, 导致线虫死亡, 所以在实验过程中我们每隔两日, 便会更换 NGM 平板, 并用保鲜膜将培养皿封口, 防止线虫爬出。

在进行寿命实验同时, 可以测定对照组和实验组秀丽隐杆线虫的运动行为(摆头, 身体弯曲和吞咽)。秀丽隐杆线虫的运动行为代表了线虫神经系统的发育, 线虫的神经元种类完善, 虽然简单但是也存在高级神经功能活动和神经系统疾病。秀丽隐杆线虫不仅分泌多种哺乳动物神经系统中的经典神经递质, 如 γ -氨基丁酸、多巴胺、谷氨酸盐、5-羟色胺、乙酰胆碱, 而且也有人类类似的神经退行性改变, 如阿尔兹海默病(Alzheimer's Disease, AD)、帕金森综合(Parkinson's Disease, PD)、肌肉萎缩性侧索硬化(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)、亨廷顿舞蹈病(Huntington Disease, HD)^[65]。本实验使用的秀丽隐杆线虫, 虫体本身具有正常且完善的神经系统。实验过程中秀丽隐杆线虫从 L1 期幼虫发育至 L4 期, 全程都伴有砂生槐种子多糖和水提取物干预, 但是结果显示: 与对照组相比, 无论是砂生槐种子多糖或水提取物均对线虫的神经系统无影响。

许多中药不仅在秀丽隐杆线虫抗衰老方面有着显著地优势, 而且在抗压力应激方面仍然起着强大的作用。压力应激^[66]指线虫对外界恶劣环境的抵抗能力, 本实验通过急性热应激和急性氧化应激来测定砂生槐种子多糖干预后线虫的应激能力。热应激目的是检测线虫对高温的耐受能力, 其中主要起作用的信号通路是: 核激素受体(NR)途径; 转变增长因子(TGF- β)通路; IGF/胰岛素样信号途径。氧化应激是指秀丽隐杆线虫抵抗双氧水(H_2O_2)损伤的能力。机体本身维持着活性氧产生和清除的动态平衡, 但受到较强氧化物刺激后, 平衡被打破, 主要是将分子氧大量快速的转变成高活性氧自由基, 由于这种活性氧过度产生和积累, 细胞膜等细胞组织无法耐受, 只有不停地消耗体内还原性谷胱甘肽等还原性物质来维持平衡。通过实验证明砂生槐种子多糖能提高线虫对抗急性热应激和急性氧化应激能力, 进一步证明砂生槐种子多糖的具有延长寿命、抗衰老效果。

第五章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫生殖的影响

5.1 材料和仪器

5.1.1 材料和试剂

实验动物

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*, the Bristol strain), 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验菌株

大肠杆菌 OP50 (*E.coli* OP50) 尿嘧啶渗漏缺陷型, 作为秀隐杆线虫的食物, 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验试剂

无水乙醇(分析纯), 氢氧化钠(分析纯), 氯化钠(分析纯), 硫酸镁(分析纯), 硫酸钾(分析纯), 磷酸二氢钾(分析纯), 磷酸氢二钠(分析纯), 氯化钙(分析纯), 甘油, 胆固醇(分析纯), H_2O_2 (分析纯) 均购自上海第二化工厂。

左旋咪唑, 购自兰大第一附属医院。

胰蛋白胨, 酵母粉, 琼脂粉均购自杭州木木生物有限公司。

砂生槐种子多糖 (SMpol), 来自本实验室制备。

砂生槐种子水提取物粉末 (SMdec) 来自兰州大学雒艳萍老师馈赠。

As₄S₄ 来自雄黄提取液。

吖啶橙试剂, 购自艾美捷科技公司。

吖啶橙染色剂配制: 称取 25mg 吖啶橙, 溶于 100ml M9 溶液中。用黑色塑料袋包好, 避光保存。

5.1.2 设备和仪器

连续变倍体视显微镜

上海一恒科技有限公司

倒置生物显微镜

重庆光电仪器总公司

生化培养箱

宁波江南仪器厂

电子精密天平 (AR2130)

Ohaus Corp. Pine Brook, NJ

台式离心机离心机 (TGL-16)

长沙湘仪离心机仪器有限公司

冰箱

海尔电器有限公司

手提高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
SW-CJ-IFD 型单人单面净化工作	苏州净化设备有限公司
台	
隔水式恒温培养箱	上海安亭科学仪器厂
恒温振荡器	上海一恒科技有限公司
漩涡振荡器 (XY-XWH 型)	上海昕仪公司
微量移液器	培养皿
0.22 微米滤膜	注射器
荧光显微镜 (DMM-300D)	蔡康公司
0.5ml 玻璃匀浆器	

5.2 实验方法

5.2.1 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫排卵的影响

实验分组参照 4.2.1。

每实验组随机选取 10 条雌雄同体的秀丽隐杆线虫（尾部呈线形）^[67]，转入不含药物的 NGM 平板。每隔一日更换一次 NGM 平板，将已挑走秀丽隐杆线虫的 NGM 平板放在 20℃生化培养箱培养，次日记录 NGM 平板上幼虫的数目。连续记录 8 天（线虫停止排卵），实验重复三次。

5.2.2 砂生槐种子多糖对 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡的影响

5.2.2.1 秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡模型建立

配制含有药物的 NGM 培养基：

向 NGM 培养基中加入砂生槐种子多糖（按照 NGM 培养基：多糖=10ml：40mg 的比例），得到含砂生槐种子多糖（4mg/ml）NGM 平板培养基的。同法配制砂生槐种子多糖 2mg/ml 的 NGM 平板培养基。

将已经同期化的秀丽隐杆线虫置于含有药物 NGM 培养基上培养 72h 至 L4 期。

每实验组随机选取 25 条秀丽隐杆线虫^[68]，转入含 As4S4（0.25μmol/ml）的 M9 缓冲液（含 OP50），在 20℃生化培养箱内培养 24h。

SMpol 药物组：用砂生槐种子多糖干预后，As4S4 诱导凋亡
多糖终浓度 2mg/ml、4mg/ml

As4S4 对照组：未用砂生槐种子多糖干预，As4S4 诱导凋亡

M9 缓冲液对照组：未做任何处理

5.2.2.2 秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡计数

As₄S₄ 干预后的秀丽隐杆线虫用 25μg/ml 吖啶橙溶液 (AO) 染色 2h^[69], 将秀丽隐杆线虫置于普通 NGM 平板培养基 (含 OP50) 上恢复 45min。挑取 20 条已染色的秀丽隐杆线虫置于含左旋咪唑 (10mg/ml) 的载玻片中央。荧光显微镜观察。实验重复三次。

5.2.3 统计学分析

使用 SPSS18.0 进行统计学分析, 对秀丽隐杆线虫在砂生槐种子多糖干预下排卵数目和排卵周期的数据进行分析, 全部试验数据用 T 检验和单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, 得出结论。

使用 SPSS18.0 进行统计学分析, 对秀丽隐杆线虫在 As₄S₄ 干预下的凋亡生殖细胞的数目进行统计分析, 全部试验数据用 T 检验和单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义, 得出结论。

5.3 结果

5.3.1 砂生槐种子多糖增强秀丽隐杆线虫的生殖能力

砂生槐种子多糖增强秀丽隐杆线虫的生殖能力, 不同浓度砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫生殖能力的影响不同, 所有实验数据用单因素方差分析, $p=0.014$ 。砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫生殖能力影响结果见图 5-1 和表 5-1。与对照组相比, 4 mg/ml 和 2 mg/ml 的砂生槐种子多糖组不仅分别增加了秀丽隐杆线虫的后代数至 1.04 倍 ($p=0.006$) 和 1.05 倍 ($p=0.006$), 而且延长了线虫排卵周期至第 8 天。而砂生槐种子水提取物对秀丽隐杆线虫的生殖能力无影响, 未增加排卵数目和延长排卵时程。在第 3 天, 砂生槐种子多糖组、砂生槐种子水提取物组和对照组均线虫的排卵达到高峰, 排卵数最多 (图 5-1)。表明经砂生槐多糖干预的秀丽隐杆线虫生殖高峰变化趋势与对照组一致, 砂生槐多糖增加了秀丽隐杆线虫排卵的数目, 并延长了秀丽隐杆线虫排卵时程。

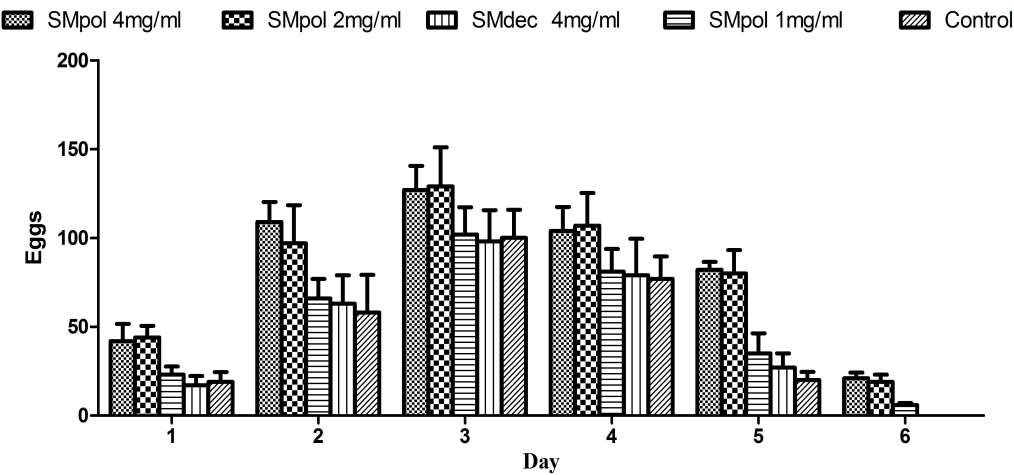


图 5-1 不同砂生槐种子提取物对线虫生殖能力的影响

注：相比与对照组，砂生槐种子多糖不仅增加了秀丽隐杆线虫排卵的数目而且延长了线虫排卵的时间，所有实验数据用单因素方差分析， $p=0.014$

SMdec：砂生槐种子水提取物、 SMpol：砂生槐种子多糖

表 5-1 砂生槐种子多糖增强秀丽隐杆线虫的生殖能力

	秀丽隐杆线虫产卵 数目 (n=45)	秀丽隐杆线虫产卵周 期 (day, n=45)
SMpol 4mg/ml	481.8±91.2**	8.0±1.8
SMpol 2mg/ml	486.4±91.3**	7.9±1.9
SMpol 1mg/ml	230.0±73.5	6.2±1.0
SMdec 4mg/ml	254.0±80.0	6.0±1.6
Control	237.7±85.0	6.0±1.2

注：高浓度砂生槐种子多糖增加秀丽隐杆线虫排卵数目和延长排卵周期， $*p < 0.05$ ，

** $p < 0.01$ 相比于对照组（Control）

SMdec：砂生槐种子水提取物、 SMpol：砂生槐种子多糖

5.3.2 砂生槐种子多糖对 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡无影响

砂生槐种子多糖对 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡的影响见图 5-3 和表 5-2，As4S4 组和多糖组生殖细胞凋亡数目并无明显差异， $p=0.109$ 。砂生槐种子多糖（4mg/ml 和 2mg/ml）可以显著增加线虫的排卵数目（图 5-1）和延长线虫排卵的时程（图 5-1 和表 5-1），但砂生槐种子多糖（4mg/ml 和 2mg/ml）对 As4S4 诱导的秀丽隐杆线虫急性生殖细胞凋亡无抑制作用。与 As4S4 组相比，砂生槐种子多糖组线虫的生殖细胞凋亡数无明显减少，经单因素方差分析无统计学

意义 ($p=0.109$)。

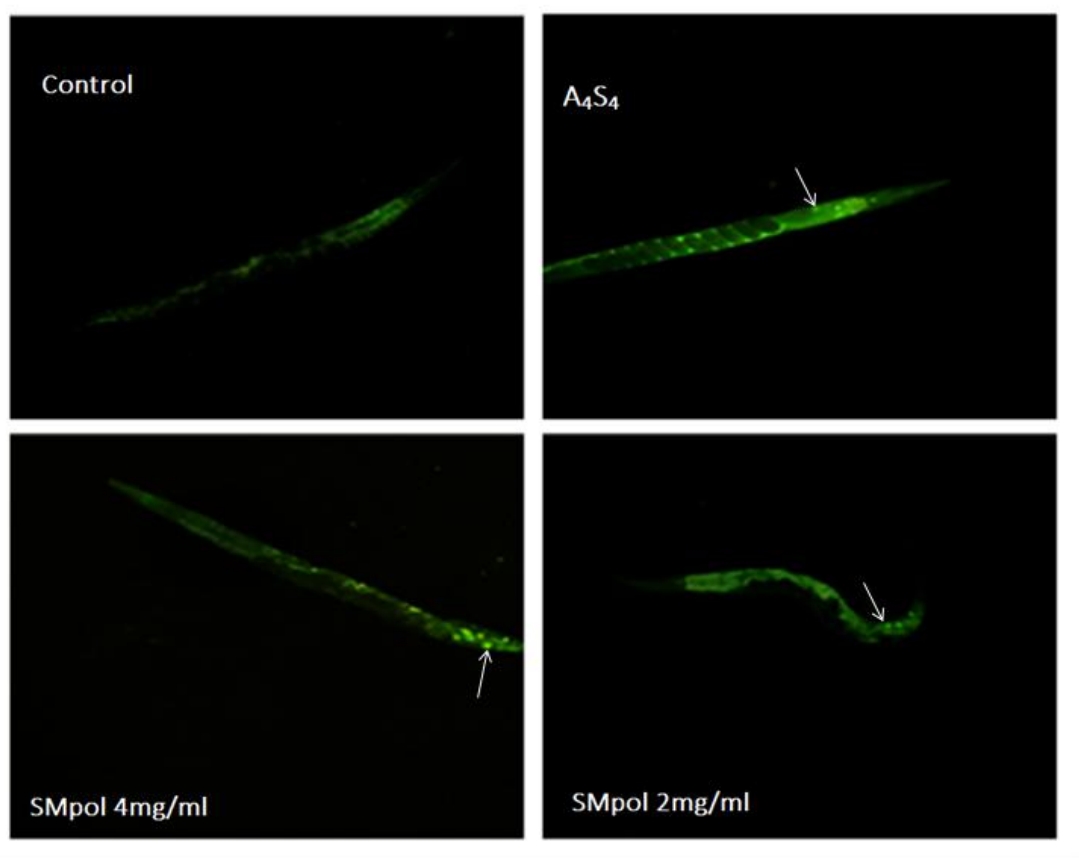


图 5-2 砂生槐种子多糖对 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡的影响

注：图中所示为秀丽隐杆线虫生殖细胞被诱导凋亡后在荧光显微镜下的照片，分别是砂生槐种子多糖 4mg/ml、2mg/ml、As4S4 和 M9 对照组。背景为黑色，秀丽隐杆线虫部分正常细胞被吖啶橙染料染成淡绿色，图中发亮的绿色荧光点（箭头所指）即为凋亡的生殖细胞，

SMpol：砂生槐种子多糖

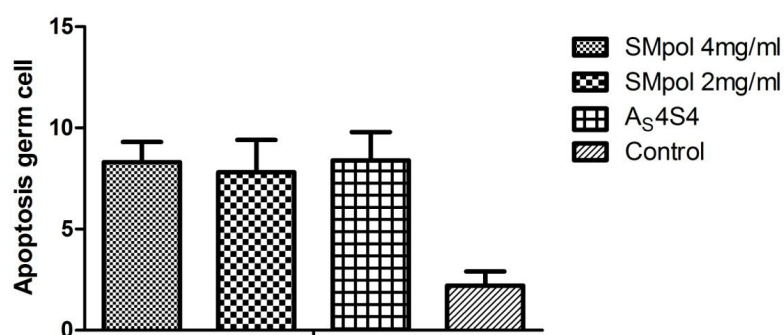


图 5-3 As4S4 诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡数目

注：从统计结果显示，As4S4 组和多糖组生殖细胞凋亡数目并无明显差异， $p=0.109$

SMpol：砂生槐种子多糖

表 5-2 As4S4 干预 24h 后线虫凋亡的生殖细胞数目

	SMpol 4mg/ml	SMpol 2mg/ml	As4S4	Control
凋亡细胞(个)	8.3±1.0	7.8±1.6	8.4±1.5	2.2±0.7

注：n=60，平均数±标准差

SMpol：砂生槐种子多糖

5.4 讨论

秀丽隐杆线虫有两种性别，雄性和雌雄同体。其中雄性通过与雌雄同体交配产生后代，而雌雄同体个体通过自体受精的方式产生后代，其中自体受精是其主要的生殖方式^[37]，所以在实验过程，我们选用雌雄同体的个体来进行试验。不同于砂生槐种子多糖抗衰老与多糖浓度呈剂量效应，多糖增强秀丽隐杆线虫生殖能力并不与多糖浓度关联密切，其中砂生槐种子多糖 4mg/ml 和 2mg/ml 对线虫生殖能力的改善表现出来几乎相同的效果，所以，我们得出，在生殖能力方面，随着砂生槐种子多糖浓度增高，线虫的产卵数目和产卵时间有明显的增加和延长，但是当砂生槐种子多糖超过 2mg/ml 时，线虫生殖能力的增强到一定程度（产卵约 480 个），之后不再发生改变，说明砂生槐种子多糖抗衰效果并没有以降低生殖力为代价。实验过程中需要注意，应每天更换线虫的 NGM 平板，利于计数，且试验周期较长需 8 天，应防止污染。

As4S4 来自雄黄提取液，是自然界中提取砷的主要原料。砷的化合物是环境污染的一种来源，主要存在与土壤，水和空气中，引起人类和家畜的各种疾病。大部分无机砷化合物均具有诱导细胞凋亡的能力，包括肿瘤细胞和正常细胞^[70-71]。近几年来秀丽隐杆线虫不仅被广泛用于生物学和遗传学，同时也被用于研究细胞凋亡及其调控途径。正常情况下，秀丽隐杆线虫的细胞也会发生凋亡也称为程序性死亡，是细胞内部的一种自杀机制，也是机体在恶略环境中一种自我保护机制。在秀丽隐杆线虫从幼虫发育至成虫过程中大约有 113 个细胞发生凋亡，而成虫体细胞数目保持恒定，为了维持生殖细胞的稳态，其生殖细胞终身进行有丝分裂，生殖细胞具有生理性细胞凋亡(physiological apoptosi)^[72]。

雌雄同体秀丽隐杆线虫的生殖腺包括前后两条，细胞凋亡发生于生殖腺的减数分裂区，易被 AO 活染。如图 5-2 所示，在荧光显微镜下，通过激发 FITC 波

段，对凋亡细胞进行观察并计数。线虫生殖腺凋亡细胞由于 DNA 裂解程度增加而呈亮绿色，而未凋亡呈现均匀的绿色。由于线虫咽部蓄积大量染料，也容易呈现亮绿色，干扰实验结果。所以，我们只对线虫尾部的生殖腺细胞进行检测和计数。实验结果显示，虽然砂生槐种子多糖在 2mg/ml 以上可以明显提升秀丽隐杆线虫的生殖能力，但是对于 As4S4 诱导的急性生殖细胞凋亡并没有产生抑制的作用。说明砂生槐种子多糖并未增强秀丽隐杆线虫生殖细胞对抗 As4S4 诱导生殖细胞凋亡的能力。

第六章 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫抑菌能力的影响

6.1 材料和仪器

6.1.1 材料和试剂

实验动物

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*, the Bristol strain), 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验菌株

大肠杆菌 OP50 (*E.coli* OP50) 尿嘧啶渗漏缺陷型, 作为秀隐杆线虫的食物, 由兰州大学药学院李红玉教授馈赠。

实验试剂

绿脓杆菌, 来自本实验室。

无水乙醇(分析纯), 氢氧化钠(分析纯), 氯化钠(分析纯), 硫酸镁(分析纯), 硫酸钾(分析纯), 磷酸二氢钾(分析纯), 磷酸氢二钠(分析纯), 氯化钙(分析纯), 甘油, 胆固醇(分析纯)均购自上海第二化工厂。

胰蛋白胨, 酵母粉, 琼脂粉, 肉汤培养基均购自杭州木木生物有限公司。

砂生槐种子多糖, 来自本实验室制备。

砂生槐种子水提取物粉末, 来自兰州大学雒艳萍老师馈赠。

肉汤培养基: 配制 100ml 营养肉汤液体培养基。120℃高压灭菌 20min 后待冷却, 接入绿脓杆菌单个菌落, 并置于 37℃培养 12h。

6.1.2 仪器和设备

连续变倍体视显微镜	上海一恒科技有限公司
倒置生物显微镜	重庆光电仪器总公司
生化培养箱	宁波江南仪器厂
电子精密天平 (AR2130)	Ohaus Crop. Pine Brook, NJ, USA
台式离心机离心机 (TGL-16)	长沙湘仪离心机仪器有限公司
冰箱	海尔电器有限公司
手提高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
SW-CJ-IFD 型单人单面净化工作	苏州净化设备有限公司

台

隔水式恒温培养箱	上海安亭科学仪器厂
恒温振荡器	上海一恒科技有限公司
漩涡振荡器 (XY-XWH 型)	上海昕仪公司
微量移液器	培养皿
0.22 微米滤膜	注射器
荧光显微镜 (DMM-300D)	蔡康公司

6.2 实验方法

6.2.1 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌体外抗菌实验

将滤纸片使用打孔机打成直径 0.5cm 的圆形纸片若干^[69], 高压灭菌。配制砂生槐种子多糖溶液 4mg/ml, 2mg/ml 和 1mg/ml, 抽滤除菌。将若干高压灭菌的滤纸片浸泡在多糖溶液中 1h。将含有绿脓杆菌的菌液按照麦氏比浊管稀释至 1×10^5 ml, 并使用无菌涂菌棒均匀涂在肉汤固体培养基上。将带有药物的滤纸片, 放在肉汤培养基表面, 37°C 生化培养箱内培养 24h。

6.2.2 实验分组和建立绿脓杆菌感染模型

配制含有药物的 NGM 培养基:

向 NGM 培养基中加入砂生槐种子多糖 (按照 NGM 培养基: 多糖=10ml: 40mg 的比例), 得到含砂生槐种子多糖 (4mg/ml) NGM 平板培养基的。同法配制含砂生槐种子多糖 2mg/ml、1mg/ml 和砂生槐种子水提取物 4mg/ml 的 NGM 药物平板培养基。

将已经同期化的秀丽隐杆线虫置于含有药物 NGM 培养基上培养 72h 至 L4 期。

每实验组随机选取 60 条秀丽隐杆线虫^[73], 转入绿脓杆菌 NGM 培养基上, 在 20°C 生化培养箱中培养 8h。

SMpol 药物组: 用砂生槐种子多糖干预后, 绿脓杆菌感染,

多糖终浓度 1mg/ml、2mg/ml、4mg/ml

SMdec 药物组: 用砂生槐种子水提取物干预后, 绿脓杆菌感染,

水提取物终浓度 4mg/ml

感染模型对照组: 未用药物干预, 绿脓杆菌感染

6.2.3 砂生槐种子多糖对被绿脓杆菌感染后的线虫生存率的影响

用灭菌 M9 缓冲液冲下绿脓杆菌培养板上的线虫^[74]，并且反复用 M9 缓冲液清洗 3 次，离心速度为 1000rpm/min 1min。清洗干净秀丽隐杆线虫体表的绿脓杆菌后，挑取线虫置于普通 NGM 琼脂板上（含 OP50）。每隔 24h 计数，记录存活的线虫数直至全部死亡。

6.2.4 秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌荷菌量的计数

建立绿脓杆菌感染秀丽隐杆线虫模型同 6.2.2。把绿脓杆菌感染的秀丽隐杆线虫挑至普通 NGM 培养基开始规定为第 0 天，以后每天从各不同浓度的砂生槐种子多糖组和细菌感染模型对照组挑取线虫 5 条，放入 0.5ml 玻璃匀浆器中并加入 500μl 灭菌 M9 缓冲液，研磨^[75]。

无菌条件下保存于灭菌 0.5mlEP 管中，此管标为 A1。另取 3 只无菌 0.5mlEP 管，每管加 450μlM9 缓冲液，分别标注 B1，C1，D1。使用微量移液枪从 A1 中吸取 50μl 液体（吸前需摇匀），加入 B1 EP 管中，混匀后吸取 50μl 液体（吸前需摇匀），加入 C1 EP 管中，重复上述步骤。即可得到 A1-原液，B1-10¹ 稀释液，C1-10² 稀释液，D1-10³ 稀释液。

从 A1，B1，C1 和 D1 中吸取 50μl（吸前需摇匀）混合液，滴加在适合绿脓杆菌生长的营养琼脂固体培养基上，并使用涂布棒均匀涂在表面。然后放入 37℃ 生化培养箱内培养 12h 后，计数琼脂培养基上绿脓杆菌菌落数目，连续记录直至感染模型对照组线虫全部死亡。

6.2.5 统计学分析

使用 SPSS18.0 进行统计学分析，对砂生槐种子多糖干预下感染绿脓杆菌的秀丽隐杆线虫生存率数据进行分析，统计方法为 Log-rank 检验统计分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义，得出结论。

使用 SPSS18.0 进行统计学分析，对砂生槐种子多糖干预下感染绿脓杆菌的秀丽隐杆线虫体内荷菌菌落数（CFU）数据进行分析，全部试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各种砂生槐种子多糖提取物和感染模型对照组进行单因素方差分析， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

6.3 结果

6.3.1 绿脓杆菌药敏试验结果

砂生槐种子多糖对绿脓杆菌的药敏试验结果见图 6-1。在涂有绿脓杆菌的营养琼脂固体培养基上，贴有含有不同浓度（1mg/ml-4mg/ml）砂生槐种子多糖的

滤纸片，培养 24h 后，含有多糖的滤纸片周围并未形成抑菌环，其边缘清晰可见，4mg/ml 及以下浓度的砂生槐种子多糖对于绿脓杆菌的生长繁殖没有杀灭和抑制作用。

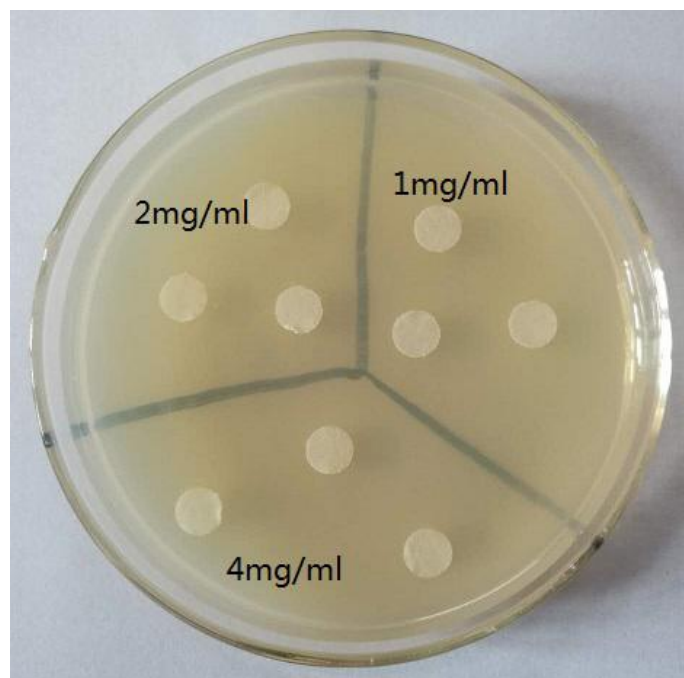


图 6-1 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌的药敏结果图

注：左上方是砂生槐种子多糖 2mg/ml，右上方是砂生槐种子多糖 1mg/ml，下方是砂生槐种子多糖 4mg/ml。

6.3.2 砂生槐种子多糖对绿脓杆菌 感染线虫的生存率影响

砂生槐种子多糖增强了秀丽隐杆线虫对抗绿脓杆菌感染的能力，砂生槐种子多糖高浓度组（4mg/ml）的秀丽隐杆线虫生存率明显高于感染模型对照组（图 6-2 和表 6-1）。未经多糖干预的绿脓杆菌感染模型对照组秀丽隐杆线虫秀丽隐杆线虫在 5 天内全部死亡，而经砂生槐种子多糖（4mg/ml、2mg/ml）干预后，秀丽隐杆线虫寿命分别延长至 12 天、8 天。通过 Log-rank 检验统计分析，砂生槐种子多糖可增强秀丽隐杆线虫自身免疫力对抗绿脓杆菌感染（ $p=0.013$ ）。砂生槐种子水提物（4mg/ml）药物干预组未延长绿脓杆菌感染秀丽隐杆线虫的生存寿命（ $p<0.05$ ）。

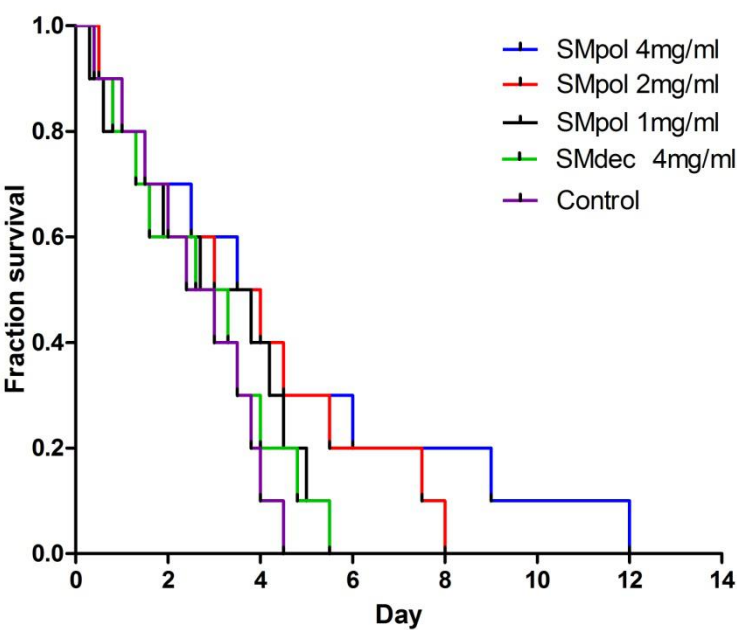


图 6-2 秀丽隐杆线虫感染绿脓杆菌后的生存率

注：SMdec：砂生槐种子水提取物、SMpol：砂生槐种子多糖、Control：感染模型对照组

表 6-1 绿脓杆菌感染后各实验组线虫生存的平均时间

	SMpol 4mg/ml	SMpol 2mg/ml	SMpol 1mg/ml	SMdec 4mg/ml	Control	<i>p</i>
时间 (day)	6.3±2.1*	4.6±1.7	2.8±2.1	3.0±1.1	2.4±0.8	0.013

注：n=45，平均数±标准差，**p* <0.05VS 对照组（Control）

SMdec：砂生槐种子水提取物、SMpol：砂生槐种子多糖、Control：感染模型对照组

6.3.3 被感染秀丽隐杆线虫体内 CFU 计数

为了进一步证明砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫免疫力的影响，计数秀丽隐杆线虫的绿脓杆菌载量（图 6-3 和图 6-4）。感染模型对照组的秀丽隐杆线虫体内菌落数在第 3 天时达到高峰，然后开始下降，但是体内的菌落数仍然处于一个较高的水平。与感染模型对照组相比，砂生槐种子多糖（4mg/ml）组秀丽隐杆线虫体内的菌落数在第 2 天达到高峰，然后开始下降，第 6 天，秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌已基本被清除干净（*p*=0.014）。砂生槐种子多糖（2mg/ml）组的秀丽隐杆线虫体内 CFU 计数也表现出与砂生槐种子多糖（4mg/ml）相同的变化趋势，与感染模型对照组比较，有明显统计学差异（*p*=0.022），但在第 6 天，秀丽隐杆线虫体内仍然残留有绿脓杆菌未被清除。砂生槐种子多糖（1mg/ml）组与感染模

型对照组比较，无统计学差异（ $p>0.06$ ）。表明砂生槐种子多糖能显著增强秀丽隐杆线虫抗细菌感染的免疫力，并呈浓度依赖性。

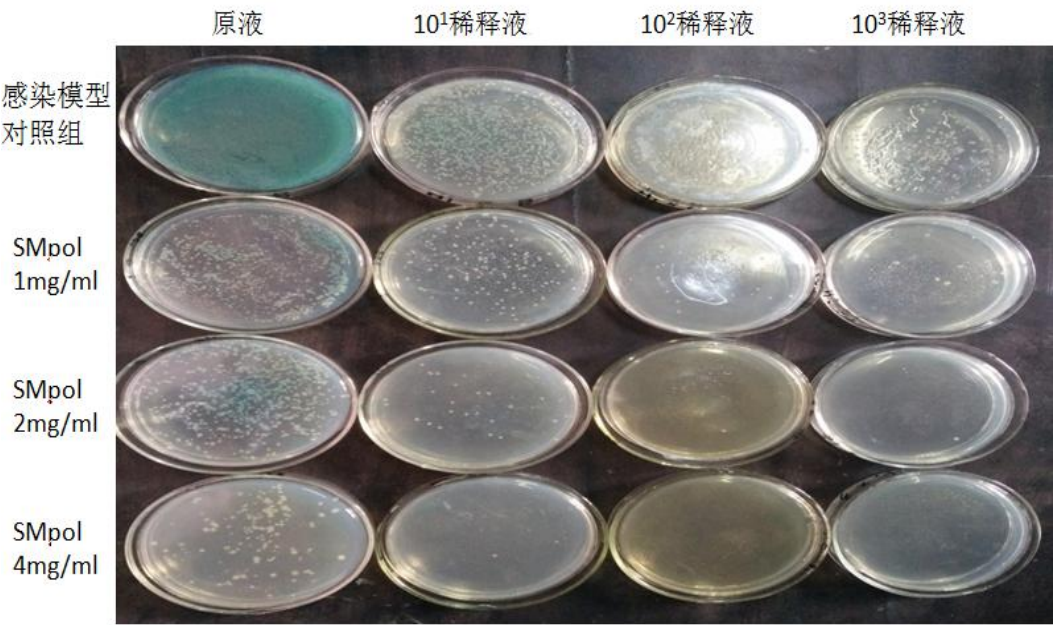


图 6-3 第 5 天秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌 CFU 菌落计数

注：从上到下依次为绿脓杆菌感染模型组

SMpol: 砂生槐种子多糖

表 6-2 秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌第 5 天体内 CFU 菌落计数

Group	原液	10 ¹ 稀释液	10 ² 稀释液	10 ³ 稀释液
感染模型对照组	无法计数	无法计数	492	176
SMpol 1 mg/ml	无法计数	259	70	21
SMpol 2 mg/ml	无法计数	96	32	10
SMpol 4 mg/ml	无法计数	81	4	0

注：SMpol: 砂生槐种子多糖

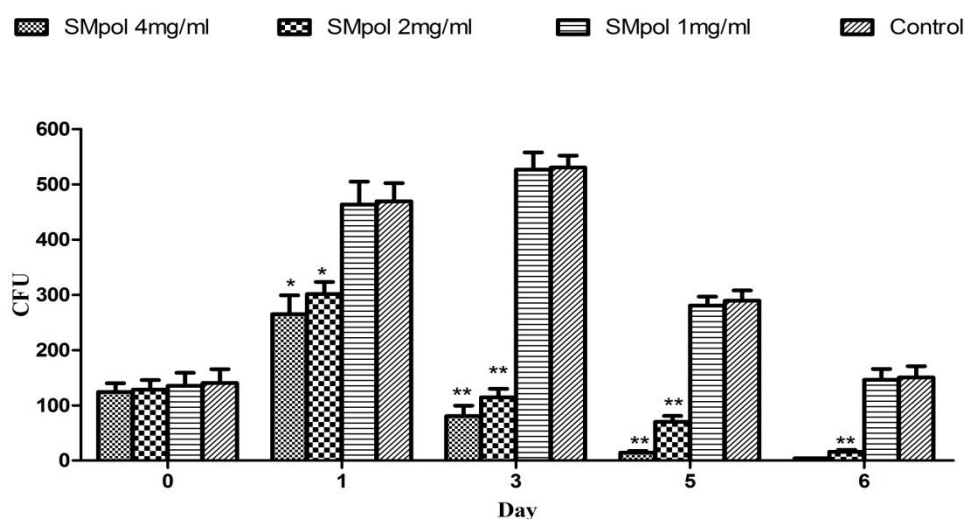


图 6-4 秀丽隐杆线虫体内绿脓杆菌 CFU 菌落数, 与对照组比较 (t 检验): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

注: SMpol: 砂生槐种子多糖、Control: 感染模型对照组

6.4 讨论

中草药用于治疗微生物感染类疾病迄今为止已有上千年的历史, 西医偏向于病原体的鉴定分离, 与西医的理念不同, 中医将微生物感染分为不同的“证”^[76], 注重“辨证论治”, 强调患者单独的体质因素。一些中药汤剂在体外没有任何抗菌作用, 但是在体内表现出来很好的抗感染效果, 如传统汤剂白虎汤^[71], Moy 等^[78]建立了线虫-粪肠球菌感染模型, 高通量筛选了 6000 个化合物, 其中一项结果表明, 有些天然药物或化合物在体内表现出优于体外的抗菌活性。因此, 我们得出中药治疗微生物干扰通西药的主要区别在于, 西药单纯局限在杀菌或者抑菌方面的效果, 而中药是通过影响细菌感染过程中细菌的毒力、侵袭力以及机体对免疫功能调节共同作用的结果^[79]。不仅如此, 中药提取物在抗菌方面还有着副作用小、药效好的特点。绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种人类生活环境中普遍存在的 G⁻菌^[80], 是一种条件致病菌, 绿脓杆菌在营养物质缺乏的培养基中, 如 NGM 培养基, 可以导致线虫出现类似哺乳动物肠道感染的病理表现, 称为“缓慢致死”。“缓慢致死”的线虫会在数天内慢慢死亡, 主要的机理是绿脓杆菌在肠道中积累, 当积累的数量达到一定阈值, 激发永久感染导致死亡。但是如果绿脓杆菌在肠道内积累并不能到达阈值, 线虫则可通过自身免疫调节和机体的代谢, 恢复健康。

本实验的 CFU 计数主要是利用绿脓杆菌对线虫的“缓慢致死”原理, 大量绿

脓杆菌积累在线虫肠道中，我们使用玻璃匀浆器对线虫进行研磨，释放了肠道内的绿脓杆菌，从而进行计数得到线虫体内绿脓杆菌菌落数的结果。

通过砂生槐种子多糖对绿脓杆菌的抑菌试验，结果看出多糖对于绿脓杆菌的生长并无抑制作用，证明体外砂生槐种子多糖无抑菌或杀菌的作用。但是在线虫体内砂生槐种子多糖协助线虫抵抗绿脓杆菌的感染，不仅延长了绿脓杆菌感染线虫的寿命，而且帮助线虫抑制体内的绿脓杆菌增殖。4mg/ml 和 2mg/ml 的砂生槐种子多糖组的秀丽隐杆线虫，却在第 2 天时，体内 CFU 计数达到高峰，之后转而下降，说明砂生槐种子多糖经过在秀丽隐杆线虫体内代谢从而抑制了绿脓杆菌的增殖，进一步证明了砂生槐种子多糖的体内抗感染作用。实验在操作中应注意防止其他细菌的污染，对实验结果造成干扰，全程都要严格按照无菌操作原则执行。CFU 计数时，挑取的线虫需要选择活体，因为线虫死亡后体内的绿脓杆菌增殖就会发生变化，造成结果不准确。

结论与展望

本实验以砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 种子为原料, 采用醇沉法提取砂生槐种子多糖; 并对水溶性砂生槐种子多糖的化学成分和生物活性进行了初步的研究, 得到如下结论:

砂生槐种子多糖主要由葡萄糖, 半乳糖和肌醇组成, 其中葡萄糖为最主要的组成成分。砂生槐种子多糖 (4mg/ml) 可以延长秀丽隐杆线虫的生命周期, 并增强了线虫抵抗热应激和氧化的能力, 证明砂生槐种子多糖具有延长寿命、抗衰老作用。砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫秀丽隐杆线虫的生殖能力有显著的提升促进作用, 增加线虫排卵的数目并延长了线虫排卵周期。砂生槐种子多糖 (4mg/ml) 提高感染线虫的生存率, 增强线虫抗细菌感染的能力。

对砂生槐种子多糖的研究还有很多不足, 需要以后进一步探讨:

1. 砂生槐种子多糖的化学结构还没有分析完善, 它的二级和三级结构还没有被揭示。

2. 砂生槐种子多糖延长秀丽隐杆线虫寿命, 增强生殖能力和抗菌能力的机制、信号通路还需要进一步研究。砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫的生殖能力和抗菌能力都有增强的作用, 且线虫生殖和免疫的信号通路有部分共同的通路, 因此, 推测多糖对秀丽隐杆线虫的免疫功能也起作用。

3. 砂生槐种子多糖对秀丽隐杆线虫有明显的生物学作用, 但是未进行哺乳动物的验证, 还需要进一步的动物实验进行验证。

4. 砂生槐种子多糖是否值得开发, 作为食品保健品充分利用其药物价值。

通过本实验研究, 我们初步了解了砂生槐种子多糖的组成成分和含量, 也通过秀丽隐杆线虫, 验证了部分砂生槐种子多糖的生物学活性, 那么它与其他藏药多糖相比, 是否有着更加优良的抗衰和增强免疫功能, 是否有抗肿瘤, 降血糖等需要进一步验证, 来丰富砂生槐种子多糖的药物作用。

参考文献

- [1]中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志, 第二卷. 北京: 科学出版社.1985, 717.
- [2]许毓英. 西藏砂生槐种子营养成分的初步研究. 自然资源学报. 1992, 7(4):379-382.
- [3]李玉祥. 西藏砂生槐的生物学特性及综合利用. 自然资源学报. 1993, 8(5):75-79.
- [4]中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书·藏医学. 上海: 上海科技出版社. 1999:204.
- [5]郭君, 马兴铭, 安方玉, 等. 砂生槐种子水提物对荷瘤小鼠免疫功能的影响. 时珍国医国药. 2008, 19(4):3-4.
- [6]贺学强, 郭君. 砂生槐种子水提物的 S-(180)小鼠体内抗肿瘤及免疫调节作用. 华西药学杂志. 2008, 23(4):424-426.
- [7]安方玉, 刘英, 马兴铭, 等. 砂生槐水提取物对免疫抑制型小鼠免疫功能的影响. 时珍国医国药. 2008, 19(2):350-361.
- [8]田卫花, 马兴铭, 刘英, 等. 砂生槐水提取物对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响. 天然产物研究与开发. 2009, 21(3): 477-479.
- [9]马兴铭, 李红玉, 尹少甫, 等. 藏药砂生槐子生物碱抗炎抑菌活性的研究. 中医药学报. 2004, 32(5):23-25.
- [10]马兴铭, 于红娟, 雒艳萍, 等. 藏药砂生槐种子提取物抑菌和细胞毒活性的初步研究. 天然产物研究与开发. 2008, 20:888-891.
- [11]Ma X.M.. Antitumor Effects of Extracts from Wallich (*Sophora moorcroftiana*)Seeds. Research Gate. 2011:1133-1139.
- [12]马兴铭, 李红玉, 尹少甫, 等. 西藏砂生槐生物碱抑菌抑瘤的实验研究. 兰州大学学报. 2003, 39(6):74-77.
- [13]马兴铭, 李红玉, 尹少甫, 等. 砂生槐种子生物碱诱导 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究. 中成药. 2004, 26(8):654-657.
- [14] Ma X.M., Luo Y.P. Yu H.J., *et al.* Ethanolic extracts of *Sophora moorcroftiana* seeds induce apoptosis of human stomach cancer cell line SGC-7901 in vitro. Academic Journals. 2006, 5(18):1669-1674.
- [15]马兴铭, 李红玉, 尹少甫. 砂生槐子生物碱可使胃癌细胞凋亡. 中国医药报. 2005.
- [16] Ma X.M., Luo Y.P., Ying D., *et al.* Antitumor Effects of Ethanolic Extracts from *Sophora moorcroftiana* Seeds in Mice. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2009, 11(1):18-22.
- [17] Ma X.M., Bao G.SH., Wan J.M., *et al.* Therapeutic effects of *Sophora moorcroftiana* alkaloids in combination with albendazole in mice experimentally infected with protoscolices of *Echinococcus granulosus*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2007, 40:1403-1408.
- [18]马兴铭, 李红玉, 尹少甫, 等. 砂生槐种子生物碱杀灭原头蚴及抗炎作用. 中国寄生虫病防治杂志. 2004, 17(4):217-219.

- [19]包根书, 史大中, 马兴铭. 砂生槐生物碱抗小鼠细粒棘球蚴作用的初步观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 2005, 23(6):471-472.
- [20]马兴铭, 李红玉, 王波, 等. 西藏砂生槐生物碱抑菌及杀虫活性的测定. 中国生物防治. 2005, 21(3):183-186.
- [21]崔建芳, 章观德. 苦参等四种槐属植物药中生物碱的分析. 中药通报. 1986, 2 (11):38-39.
- [22] Li X., Han J., Zhu RY., *et al.* Life Span and Motility Effects of Ethanolic Extracts from *Sophora moorcroftiana* Seeds on *Caenorhabditis elegans*. Pharmacogn Mag. 2016, 12(12): S228-S230.
- [23]曹伟国. 藏药多糖药理作用的研究进展. 中华中医药学会科普创作学术研讨会. 2005.
- [24]封士兰, 陈立仁, 孟彦, 等. 山生柳多糖的免疫增强作用. 中药药理与临床. 2001, 17(4): 23-25.
- [25]阮红, 吕志良. 女贞子多糖免疫调节作用研究. 中国中药杂志. 1999, 24(11):691-693.
- [26]樊俊杰, 贾正平. 瑞香狼毒多糖对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响. 西北国防医学杂志. 2000, 21(4):263-265.
- [27]王洪斌, 王劲, 郑钦岳, 等. 商陆多糖I对小鼠淋巴细胞 DNA 多聚酶 α 活性的影响. 第二军医大学学报. 1996(2):150-153.
- [28] 骆传环, 崔玉芳, 黄荣清, 等. 当归多糖的制备及抑瘤作用. 科学技术与工程. 2003, 3(6):551-552.
- [29]张俊平, 钱定华. 商陆多糖I抗瘤活性及对小鼠产生肿瘤坏死因子的作用. 中国药理学报. 1993(6):542-545.
- [30]甘璐, 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响. 营养学报. 2003, 25(2):200-202.
- [31]程丽芳, 刘瑾, 刘永志, 等. 冬虫夏草多糖对荷瘤鼠肿瘤细胞增殖周期及凋亡的影响. 中国药理学会补益药药理专业委员会学术研讨会. 2013.
- [32]程秀娟, 邸琳. 高山红景天多糖降血糖作用. 中国中药杂志. 1993, 18(9):557-559.
- [33] 陈亚东, 曹秀兰, 田长有, 等. 高山红景天对小鼠耐缺氧、抗疲劳及耐低温作用的影响. 中国中医药科技. 2002, 9(3):157-158.
- [34] 戴寿芝, 王慕娣. 枸杞及其多糖对果蝇和小鼠寿命的影响. 中国老年学杂志. 1990(2):94-96.
- [35] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 枸杞多糖对正常小鼠及四氧嘧啶致高血糖小鼠血糖的影响. 解放军药理学学报. 1998(1):11-13.
- [36]Johnson T.E., Wood W.B.. Genetic analysis of lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of American. 1982, 79(21): 6603-6607.
- [37]Artalsanz M., De J.L., Tavernarakis N.. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. Biotechnology journal. 2006, 1(12):1405-1418.
- [38]Dubois M., Cilled K.A., Hamilion J.K.. Colorimetric method for determinaion of sugars and related substances. Anal Chem. 2002, 28(3):350-356.
- [39]徐光域, 颜军, 郭晓强, 等. 硫酸一苯酚定糖法的改进与初步应用. 食品科学. 2005, 26(8):342-346.
- [40]扈瑞平, 张兴夫, 杜玲, 等. 沙葱多糖 Sevage 法除蛋白工艺的研究. 内蒙古大学学报. 2009, 40(6):658-662.

- [41]Jia X., Ding C., Yuan S., *et al.* Extraction: purification and characterization of polysaccharides from Hawk tea. *Carbohydr Polym.* 2014, 99:319-324.
- [42]Pang X.B., Yao W.B., Yang X.B., *et al.* Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium. *Carbohydrate Polymers.* 2007, 70(3): 291-297.
- [43] Soria A.C., Ruiz-Matute A.I., Sanz M.L.. Improvement of a gas chromatographic method for the analysis of iminosugars and other bioactive carbohydrates. *Journal of Chromatography A.* 2013, 1289(9):145-148.
- [44]王维香, 王晓君, 黄潇, 等. 川芎多糖脱色方法比较. 离子交换与吸附. 2010, 26(1):72-82.
- [45]王波, 付伟光. 气相色谱在医药检测中应用的研究进展. 医药卫生:全文版. 2016(1):00021-00021.
- [46]丁晓霞. 以秀丽隐杆线虫作为模式生物对雄黄微生物浸出液活性和毒性的研究. 兰州大学. 2009.
- [47]Kumarasingha R., Palombo E.A., Bhawe M., *et al.* Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening tools. *Int J Parasito.* 2014, 44(5): 291-298.
- [48]吕婷. 利用模式生物秀丽隐杆线虫作对植物提取物抗衰老的研究. 南京师范大学. 2014.
- [49]成大荣, 卞红春, 陈海霞, 等. 猪水肿病大肠杆菌分离、鉴定及药敏试验. 动物医学进展. 2004, 25(2):99-101.
- [50]Mohammed E.H., Wang G., Jiang J.. The effects of nickel on the reproductive ability of three different marine copepods. *Ecotoxicology.* 2010, 19(5): 911-916.
- [51]王宇光, 马增春, 梁乾德, 等. 中药毒性研究的思路与方法. 中草药. 2012, 43(10):1875-1879.
- [52]Ye L., Tang L., Gong Y., *et al.* Characterization of metabolites and human P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of mesaconitine. *Xenobiotica.* 2011, 41(1): 46-58.
- [53]孙蓉, 张丽美, 王丽, 等. 毒理芯片技术在中药毒理学研究中的应用及前景. 中国药物警戒. 2008, 5 (3):158-161.
- [54]陆倍倍. 液质联用及药物筛选技术在中药毒性研究中的应用探索. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院. 2011.
- [55]王卓, 张青山, 毛茜, 等. 代谢组学在中药毒性评价中的应用. 中医药学报. 2014, 42(6): 85-89.
- [56]Reckziegel P., Chen P., Caito S., *et al.* Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology.* 2016, 90(3): 633-645.
- [57]李贞景, 张金阳, 王昌禄, 等. 4 种有毒中药对秀丽隐杆线虫致死率和产卵数的影响. 毒理学杂志. 2013, 04:297-299.
- [58]Qiao Y., Zhao Y.L., Wu Q.L., *et al.* Full toxicity assessment of Genkwa Flos and the underlying mechanism in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plos One.* 2014, 9(3):e91825.
- [59]Swain S.C., Keusekotten K., Baumeister R., *et al.* *C.elegans* Metallothioneins: New Insights into the Phenotypic Effects of Cadmium Toxicosis. *Journal of Molecular Biology.* 2004, 341(4): 951-59.

- [60]Tsalik E.L., Hobert O.. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. J Neurobiol. 2003, 56(2):178-197.
- [61]Wilson M.A., Shukitt-Hale B., Kalt W., *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermo tolerance in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell. 2006, 5(1): 59-68.
- [62]Razzaque M.S., Sitara D., Taguchi T., *et al.* Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. Faseb J. 2006, 20(6):720-722.
- [63]Ewbank J.J.. Signaling in the immune response. Wormbook. 2006, 1143(1):1-12.
- [64]Kaletta T., Hengartner M.O.. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nature Rev Drug Discov. 2006, 5(5):387-398.
- [65]Li J., Le W.. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. Experimental Neurology. 2013, 250(4):94-103.
- [66]Kurino C., Furuhashi T., Sudoh K., *et al.* Isoamyl alcohol odor promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. Biochem Biophys Res Commun. 2017.
- [67]Miller D.L., Roth M.B.. *C. elegans* are protected from lethal hypoxia by an embryonic diapauses. Curr Biol. 2009, 19(14):1233-1237.
- [68]滕笑雪. 三氧化二砷对秀丽隐杆线虫生殖细胞周期停滞和细胞凋亡作用的研究. 安徽大学. 2013.
- [69]Kasten F.H.. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. Int Rev Cytol. 1967, 21:141-202.
- [70]Landolph J.R.. Molecular and cellular mechanisms of transformation of C3H/10T1/2 Cl 8 and diploid human fibroblasts by unique carcinogenic, nonmutagenic metal compounds. A review. Biological Trace Element Research. 1989, 21(1):459-467.
- [71]Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., *et al.* The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondriain Fas/APO-1/CD95 and Ceramide-induced apoptosis. Journal of Experimental Medicine. 1997, 186 (1):25-37.
- [72]Sheng Y., Tang L., Kang L., *et al.* Membrane ion Channels and Receptors in Animal lifespan Modulation. J Cell Physiol. 2017.
- [73]Liu J., Hafting J., Critchley A.T., *et al.* Components of the Cultivated Red Seaweed *Chondrus crispus* Enhance the Immune Response of *Caenorhabditis elegans* to *Pseudomonas aeruginosa* through the pmk-1, daf-2/daf-16, and skn-1 Pathways. Appl Environ Microb. 2013, 79(23): 7343-7350.
- [74]Tan M.W., Rahme L.G., Sternberg J.A.. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 95(5): 2408-2413.
- [75]Tomino M., Nagano K., Hayashi T., *et al.* Antimicrobial efficacy of gutta-percha supplemented with cetylpyridinium chloride. J Appl Oral Sci. 2016, 58(2):277-282.
- [76]谢存柱. 柴胡白虎汤治疗急性化脓性扁桃腺炎. 云南中医中药杂志. 1993(6):16-16.
- [77]张双斌. 柴葛白虎汤治疗外感高热 44 例. 江西中医药. 1990(3).
- [78]Moy T., Ball A.R., Anklesaria Z., *et al.* Identification of novel anti microbials using a live-animal infection mode. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006, 103(27):10414-10419.
- [79] 中药药理学

[80]Irazoqui J.E., Troemel E.R., Feinbaum R.L., *et al.* Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Plos Pathogens*. 2010, 6(7): e1000982.

在学期间的研究成果

一、发表论文

1. **Yuan Zhang**, Danyang Mi, Jin Wang, Yanping Luo, Xu Yang, Shi Dong, Xingming Ma*, Kaizhong Dong. Constituent and effects of polysaccharides from *Sophora moorcroftiana* seeds on lifespan, reproduction, stress resistance and antimicrobial capacity in *Caenorhabditis elegans*, Chinese Journal of Natural Medicines (SCIE 收录, 已录用)
2. Xinfang Dong, Yanping Luo, Qi Gao, Xiaoling Lu, Qian Wang, **Yuan Zhang**, Xun Liu, Lifeng Zhang, Jingqiu Wang, Xingming Ma*, Bingdong Zhu. Effects of MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) on liquefaction and ulceration in rabbit skin model of tuberculosis. Microbial Pathogenesis. 2016, 99:282-286.
3. Jie Fu, Jingqiu Wang, Yanping Luo, Lifeng Zhang, **Yuan Zhang**, Xinfang Dong, Hongjuan Yu, Mingqiang Cao, Xingming Ma*. Association between MASP-2 gene polymorphism and risk of infection diseases: A meta-analysis. Microbial Pathogenesis. 2016, 100: 221-228.

二、参与课题

- 1.国家自然科学基金面上项目, 31360604, 藏药砂生槐种子生物碱抗囊性包虫病的机理研究, 2014.02-2017.12。

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AO	Acridine orange	吖啶橙
CFU	Colony Forming Units	菌落形成单位
E.coliOP50	Escherichia coil OP50	大肠埃希菌 OP50
Gal	Galactolipin	半乳糖
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry	气相色谱质谱联用法
Glu	Glucose	葡萄糖
IL	Interleukin	白介素
LB	Lysogeny broth	溶菌肉汤
MIC	Minimun inhibitory concentration	最低抑菌浓度
NGM	Nematode Growth Medium	培养基线虫
OD	Optical density	光密度
SMchl	Chloroform extracts from <i>Sophora moorcroftiana</i> seeds	砂生槐种子氯仿提取物
SMeth	Ethanol extracts from <i>Sophora moorcroftiana</i> seeds	砂生槐种子乙醇提取物
SMdec	Decoction from <i>Sophora moorcroftiana</i> seeds	砂生槐种子水提取物
SMpol	Polysaccharides from <i>Sophora moorcroftiana</i> seeds	砂生槐种子多糖
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子

致 谢

时光冉冉，毕业在即，三年的研究生求学生活即将结束，比起刚入校是，自己更加成熟和努力。在读研期间不仅学到了知识和技能，更主要学到了做人做事的方法，坚持不懈的努力是通往成功的必备条件。

这次毕业论文能够得以顺利完成，并非我一人之功劳，是所有指导过我的老师，帮助过我的同学和一直关心支持着我的家人对我的教诲、帮助和鼓励的结果。我要在这里对他们表示深深的谢意！

感谢我的指导老师——马兴铭老师和雒艳萍老师，没有你们的悉心指导就没有这篇论文的顺利完成，三年期间不仅让我学习到了很多实验技能和论文写作方法，更教会了我作为一个学者应有的学习态度。

感谢祝秉东老师，谭继英老师及其他帮助过我完成学业和实验的各位老师，您的宝贵经验和指导，帮助我顺利完成我的实验，并丰富了自己的专业知识。

感谢我的父母，没有你们，就没有我的今天，你们的支持与鼓励，永远是支撑我前进的最大动力。

感谢学弟学妹，米丹阳，张国超，高琪是你们协助我完成我的课题，和我一起探讨方案，筛选试验，我们共同的进步才帮助我的实验和论文可以顺利完成。