

• 实验研究 •

人参花总皂甙对小鼠的某些免疫学效应及其机理探讨

白求恩医科大学 鲍 涛 杨贵贞

内容提要 本研究结果表明, 人参皂甙可增加初次免疫血清中特异性抗体滴度, 以对亚适当剂量抗原刺激的抗体水平增加更明显; 可在体内或体外促进 T、B 淋巴细胞致分裂原刺激的小鼠脾细胞的增殖反应; 可促进小鼠腹腔细胞吞噬鸡红细胞的活性和升高血清溶菌酶水平; 可升高未经抗原刺激之小鼠脾脏 cAMP 和 cGMP 水平, 但以升高 cAMP 的效应为主; 可升高抗原刺激后小鼠脾脏 cGMP 水平。并对这些结果的意义进行了讨论。

人参是著名的补益类中草药, 已发现其药理作用是十分广泛的, 但从免疫学角度研究人参, 目前国内开展的工作还不很多。至于其作用于机体免疫系统的药理机制更少有人触及。鉴于这种情况, 本实验分两部分进行, 第一部分在于观察人参的免疫学效应, 第二部分对其可能的药理机制进行初步的探讨。

已发现人参皂甙是人参的主要药物有效物质。本实验采用我国吉林人参花及花蕾中精制的总皂甙。其结果可为人参地上部分的综合利用和疗效提供实验根据, 并可为进一步分析人参植物中具有某些免疫学效应的特殊单甙的研究, 提供一定的线索。

材料与方法

一、主要试剂: (1) 人参皂甙 (ginsenoside 缩写 GS), 本校化学教研室制备, 鉴定后供给⁽¹⁾; (2) 植物血球凝集素 (PHA), 广东省医药工业研究所 780728 批; (3) 刀豆素 A (Con-A), SIGMA 化学公司 79c-7620 批; (4) 细菌脂多糖抗原 (LPS), 本室制备; (5) 精制吸附白喉类毒素, 长春生物制品研究所 79-2 批; (6) 同位素 ⁵¹Cr; (7) 氘标记胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR); (8) 环磷酸腺苷 (cAMP) 分析药盒; (9) 环磷酸鸟苷 (cGMP) 分析药盒, 北京原子能研究所。

二、动物: 除溶菌酶测定加一组 C₅₇BL/6 纯系小鼠外, 所有实验皆使用普通小鼠 (Swiss 种)。2~3 月龄, 性别不限, 本校动物室供给。

三、方法: 1. 用 ⁵¹Cr 标记鸡红细胞测定吞噬细胞吞噬活性的方法。给小鼠腹腔注射 2% 糖水 0.5ml, 48 小时后取腹腔渗出细胞计数, 用生理盐水将每份样品的细胞数调至 1,000 万/ml 后, 加入到酶标 ELISA 测定用塑料板孔内, 每孔 100 万/0.1ml, 再加入 ⁵¹Cr 标

记的鸡红细胞, 每孔加 1,500 万/0.1ml, 37°C 温育 30 分钟后, 用盐水充分洗去未粘附细胞, 锯下小孔, 置 γ 射线计数器中测定。每份样品 3 个复管, 变异系数小于 20%。

2. 血清溶菌酶含量测定, 按本室琼脂板法⁽²⁾。将琼脂改成琼脂糖。

3. 血清特异抗体测定, 本室间接血凝法⁽²⁾。

4. 脾淋巴细胞转化实验。取小鼠脾细胞后加入到含 10% 人 AB 型血清的 RPMI1640 培养液中, 使每培养管细胞数为 250 万/0.5ml, 分裂原加入终浓度分别为 PHA 50 μg/ml, Con-A 10 μg/ml, LPS 50 μg/ml, 培养全程 50 小时, 收获前 18 小时每管加 ³H-TdR 0.5 μci, 采用过滤法收获细胞后, 滤片置液体闪烁计数器中测定放射性 (用 CPM 表示), 每份样品 2~3 个复管。

5. 脾组织 cAMP 和 cGMP 含量测定, 按药盒说明书进行。

6. 投药方法, 每日每鼠皮下注射 GS 1mg。

7. 实验数据的统计学处理, 使用 student's t 检验方法 (双侧)。

结果与分析

一、人参皂甙的免疫学效应

1. 增强小鼠腹腔渗出细胞的吞噬活性。给小鼠连续用药 7 天, 第 8 天取腹腔渗出的细胞, 测定其吞噬 ⁵¹Cr 标记鸡红细胞的活性, 结果见图 1。

此实验利用吞噬细胞粘附特性, 即经一段时间温育后其可粘附在塑料板上而不能被盐水洗去, ⁵¹Cr 标记的鸡红细胞被吞噬的越多, 盐水洗后残留在板上的放射性就越强。图 1 结果说明, 用药组吞噬活性明显高于对照组。

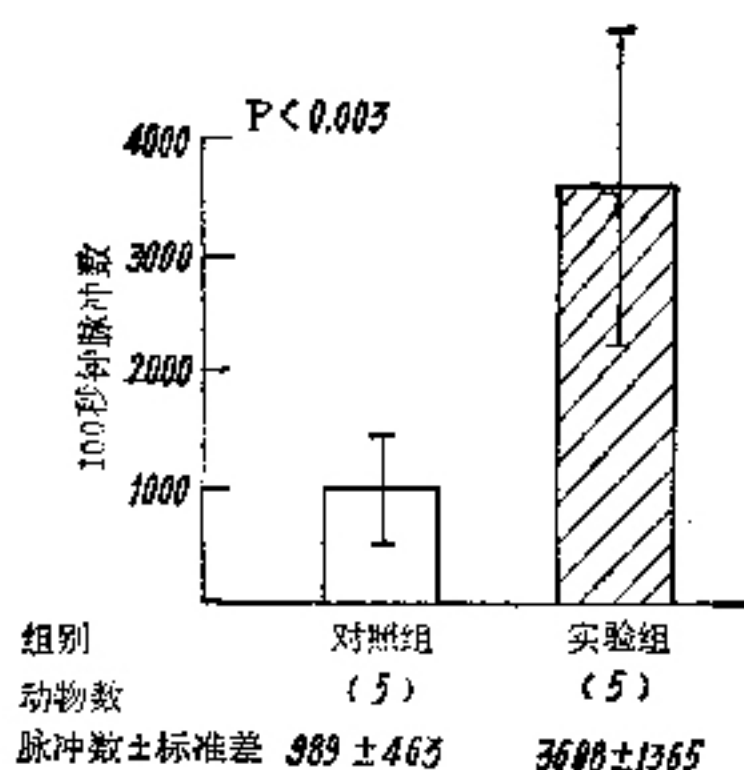


图1 GS对小鼠腹腔渗出细胞吞噬功能的影响

2. 增加小鼠血清中溶菌酶水平和特异性抗体的滴度。结果见图2。

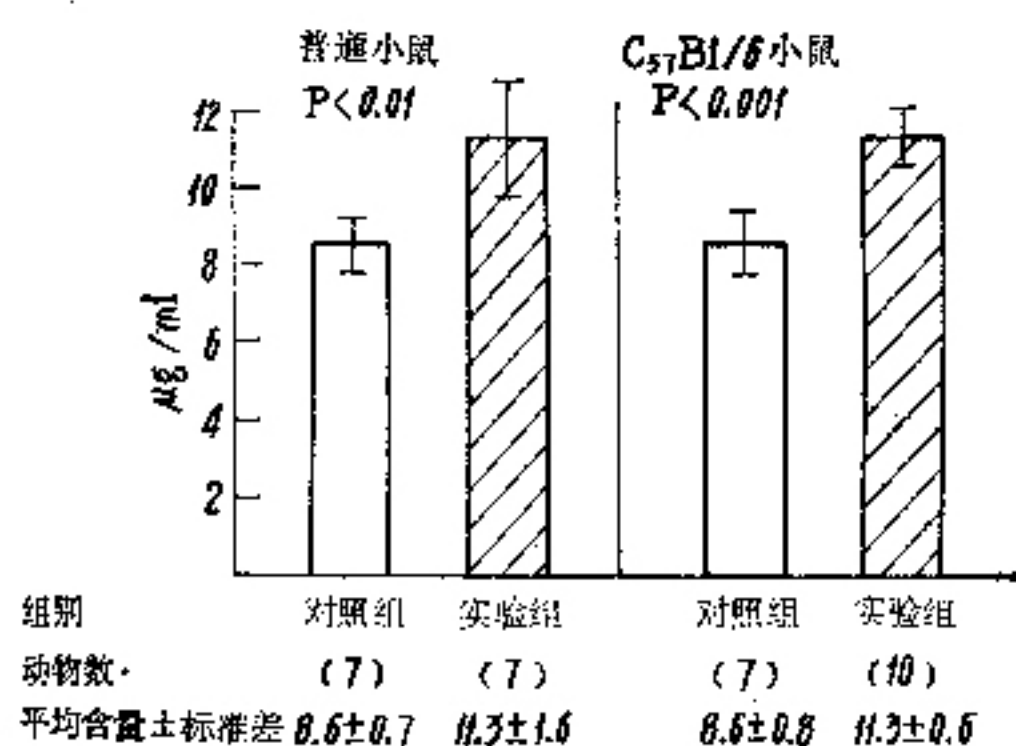


图2 GS对小鼠血清中溶菌酶水平的影响

图2表示分别给普通小鼠和纯系小鼠用药两周后,测定其血清溶菌酶含量的结果。两种小鼠用药组溶菌酶水平都有所上升,差异显著。

GS对血清特异性抗体滴度影响的结果(见图3)。给小鼠用药3天后,用白喉类毒素免疫,将免疫抗原用量分为两个剂量组,一组为适当剂量(4Lf),一组

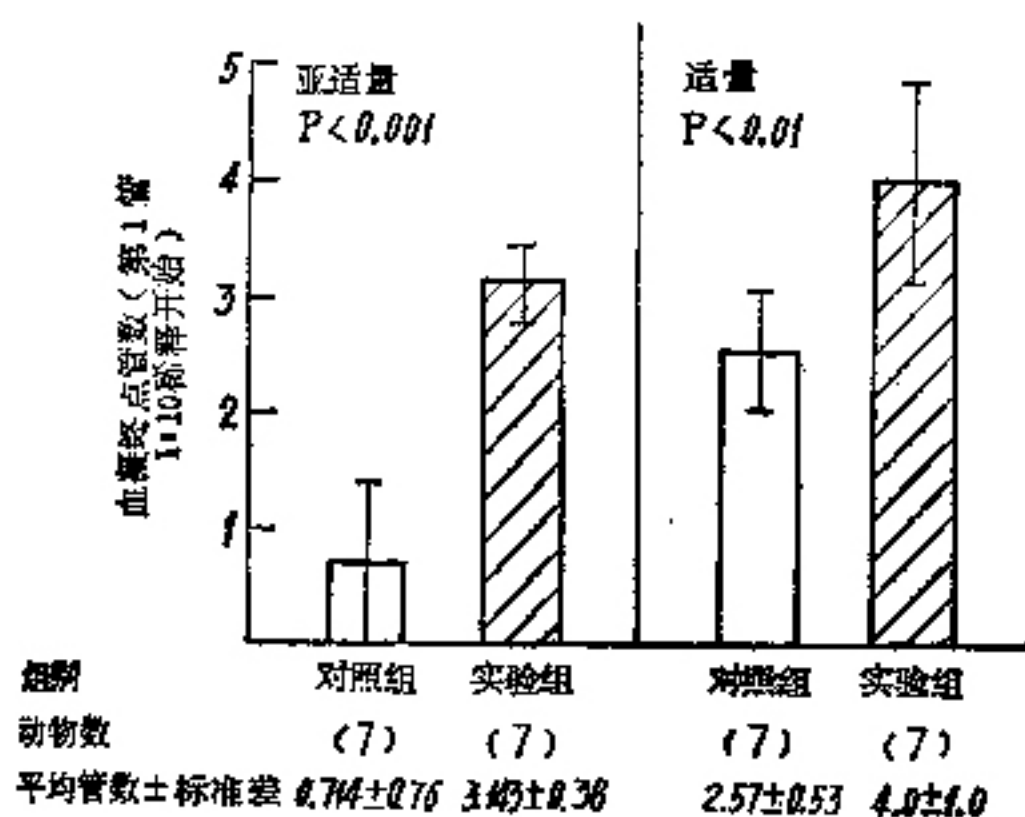


图3 GS对小鼠血清中特异性抗体的影响

为亚适当剂量(0.3Lf),免疫后仍继续给药。适量组在抗原刺激后15天测抗体,亚适量组在21天测抗体。

图3结果表明,GS对亚适量抗原刺激的抗体反应增加较明显,而对适量抗原刺激的抗体生成仅有轻度的增加效应。

3. GS体内给药或直接加在体外培养中对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

(1)体内给药组脾细胞对T、B淋巴细胞致分裂原刺激的反应性增强。给小鼠连续用药7天,第8天取脾细胞分别做PHA、Con-A、LPS刺激的淋转实验,结果见表1。从表上的数据看,用药组对PHA刺

表1 给小鼠注射GS后对小鼠脾淋巴细胞转化的影响

组别(动物数)	PHA	Con-A	LPS
对照组(*) (6)	2.985 ± 1.284	10.3 ± 4.19	16.3 ± 2.59 11.43 ± 1.8
实验组(*) (6)	3.543 ± 0.63	17.65 ± 7.2	30.15 ± 10.45 17.57 ± 4.34
P 值	>0.1	<0.01	<0.02 <0.01

注:表内数据均为平均指数±标准差 * Con-A 刺激的实验10只动物, LPS刺激的实验5只动物。

激的淋转反应增加得不明显,但对Con-A和LPS(两次实验)刺激的淋转反应增加得都很明显。

(2)体外培养中直接加入GS,可促进T、B淋巴细胞致分裂原刺激的淋转反应。结果见表2。

如表2所示,当不同浓度的GS加入到淋转培养中时,以每毫升1微克浓度的GS对各种分裂原刺激的淋巴细胞增殖反应促进作用最明显,浓度过高或过低都会影响这一效应。同时也注意到,GS对未加分裂原刺激的自发淋转也有微弱的促进作用。

二、人参皂甙免疫学效应的机理探讨

1. GS可影响抗原注射前后小鼠脾组织环核苷酸的动态变化。结果见表3。

表3是在抗原(白喉类毒素0.3Lf)注射之前和之后至测定血清抗体之前的不同时间,对用药组与对照组脾组织环核苷酸含量测定的结果。根据表上数据可得出下述几个结论:(1)GS可明显地升高未经抗原注射之小鼠脾cAMP和cGMP水平,但从升高幅度上来看,以cAMP升高更明显,所以在cGMP与cAMP比值上低于对照组的数值;(2)注射抗原后,小鼠脾cAMP处于持续低水平,两组间无明显的差别,说明人参在抗原注射后即失去了继续升高cAMP水平的效

表 2 GS加在体外培养中对小鼠脾细胞淋转的影响

GS $\mu\text{g/ml}$	空 白		PHA		Con-A		LPS	
	平均 CPM $\pm$ SE	促 进 %	平均 CPM $\pm$ SE	促 进 %	平均 CPM $\pm$ SE	促 进 %	平均 CPM $\pm$ SE	促 进 %
0	238 $\pm$ 9	0	687 $\pm$ 40	0	3501 $\pm$ 268	0	4154 $\pm$ 176	0
0.01	271 $\pm$ 28	14	920 $\pm$ 34	34	5652 $\pm$ 804	62	6283 $\pm$ 309	51
0.1	354 $\pm$ 28	49	1380 $\pm$ 111	101	7894 $\pm$ 1062	126	6735 $\pm$ 667	62
1	373 $\pm$ 55	57	1753 $\pm$ 65	155	9038 $\pm$ 615	158	7557 $\pm$ 611	82
10	320 $\pm$ 36	34	1472 $\pm$ 67	114	6847 $\pm$ 733	96	7282 $\pm$ 1178	75
100	250 $\pm$ 8	5	779 $\pm$ 44	13	6269 $\pm$ 601	79	4591 $\pm$ 466	11

表 3 GS对抗原注射前后小鼠脾组织环核苷酸含量的影响

取 样 时 间		对 照 组			实 验 组		
		cAMP	cGMP	cGMP/cAMP	cAMP	cGMP	cGMP/cAMP
注射抗原之前		5.51 $\pm$ 1.54	0.415 $\pm$ 0.05	0.0753	11.11 $\pm$ 3.64*	0.559 $\pm$ 0.09*	0.0503
注射抗原之后	3 小时	5.86 $\pm$ 3.16	0.379 $\pm$ 0.07	0.0647	3.52 $\pm$ 0.76	0.298 $\pm$ 0.06	0.0847
	22小时	2.88 $\pm$ 1.66	0.33 $\pm$ 0.06	0.1146	2.90 $\pm$ 1.36	0.355 $\pm$ 0.08	0.1224
	6 天	4.02 $\pm$ 2.0	0.413 $\pm$ 0.05	0.1027	4.10 $\pm$ 1.62	0.498 $\pm$ 0.05*	0.1215
	14 天	3.52 $\pm$ 1.22	0.391 $\pm$ 0.07	0.1111	3.36 $\pm$ 0.7	0.578 $\pm$ 0.11*	0.1720

注：表中数据为平均每毫克脾组织所含 cAMP 或 cGMP 微微克分子数 $\pm$ 标准差。每组动物数为 8 只。

* 与平行对照组相比 $P < 0.005$ 。

应，并对由抗原刺激所引起的 cAMP 水平持续性降低没有影响；(3)GS 可升高抗原注射后小鼠脾脏 cGMP 水平，这一现象在抗原刺激后 6 天和 14 天最明显；(4)在抗原刺激后 cGMP/cAMP 比值表现出升高的趋势，由于 GS 有升高 cGMP 水平的效应，所以使这一趋势更明显。

2. 已知可升高淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的药物对小鼠细胞淋转和抗体生成的影响。

(1) 用已知可升高淋巴细胞内 cAMP 水平的药物——前列腺素 E_1 和氨茶碱与分裂原同时加入到淋转培养中，随着两种试剂浓度增大对 T、B 淋巴细胞增殖的抑制作用也逐渐增强。

(2) 用已知可升高淋巴细胞内 cGMP 水平的药物——左旋咪唑与分裂原同时加入到淋转培养中，在合适浓度时 (10 $\mu\text{g/ml}$)，可出现促进 T、B 淋巴细胞增殖的效应。

(3) 在抗原刺激后，继续给小鼠每日注射前列腺素 E_1 200 μg ，可抑制适量抗原 (白喉类毒素 4Lf) 刺激的抗体反应；继续给小鼠每日注射左旋咪唑 100 μg ，可增加亚适量抗原 (0.3Lf) 刺激的抗体反应。

讨 论

人参的促吞噬效应国内已有作者叙及。但由于已知有多种多糖类，包括人参多糖都具有这一效应⁽³⁾，本实验用较可靠的指标证明人参皂甙成分也具有这一效应。血清溶菌酶是巨噬细胞系所分泌的一种非特异性杀菌酶，它本身也可刺激吞噬活性，因此有人提出可以此测定来评价巨噬细胞的功能。本实验证实了两者具有平行关系。

据报告，人参皂甙可促进血清中白蛋白、 γ 球蛋白的合成，并将其称之为“蛋白质合成刺激因子”(Pro-stisol)⁽⁴⁾。也有报告证明，人参的某些单甙促进了 ^3H 标记的亮氨酸掺入到脾脏蛋白质合成中⁽⁵⁾。但人参的这种促进血清和脾脏中蛋白质合成的效应，是否适用于抗原刺激的特异性抗体生成，未见到国外的报告。国内已做了这一工作。本实验观察到，GS 明显地增加了亚适量抗原刺激的抗体反应，而对适量抗原刺激的抗体生成仅有轻度的增加效应。

人参体内用药后淋转增强的结果，尚未见到国外类似报告。将人参加在体外培养中，国外有人发现，

人参单甙 Rg₁ 可促进分裂原刺激的淋巴细胞有丝分裂反应⁽⁶⁾。我们认为, GS 体内用药和在体外加入到培养中促进淋转的意义是不同的。前者说明, 用药后小鼠的 T、B 淋巴细胞对分裂原刺激的反应性增强, 这意味着人参在体内可能作用于淋巴细胞分化成熟这一过程。而后者反映了人参对淋巴细胞增殖过程本身的影响。

关于前一效应机理解释: 本实验发现, 在抗原刺激之前, GS 具有以升高 cAMP 为主的效应。国外大量类似的研究已证明, 在淋巴细胞分化成熟过程中, 作为细胞内的信使, cAMP 居主导作用。有的作者发现, 胸腺的某些激素诱导 T 细胞成熟是通过升高细胞内 cAMP 水平而实现的⁽⁷⁾, 而多种已知的能升高 cAMP 水平的药物, 如前列腺素、氨茶碱、异丙肾上腺素等, 都可模拟胸腺激素的这一作用, 促进小鼠的前 T 细胞分化成具有 Th1 抗原的较成熟的 T 细胞⁽⁸⁾。同样这些药物也可使 Ia⁻ 的 B 细胞分化成 Ia⁺ 的较成熟的 B 细胞⁽⁹⁾。并且, 如将淋巴细胞预先用这些试剂处理, 并除去这些试剂后, 可增强处理后淋巴细胞在分裂原或抗原刺激下的增殖反应。抗原注射前, 体内投以人参所产生的效应, 可能类似于上述药物的作用, 即通过促进淋巴细胞在功能上的成熟而出现淋转增强的结果。在体内人参的这种效应是直接的, 还是间接的通过有关激素的作用而实现的, 是值得考虑的。

关于后一种效应的解释: 据研究, 增殖过程中淋巴细胞 cGMP 水平升高, 因此 cGMP 与 cAMP 的比值在未分裂的细胞中是低的, 而在进行分裂的细胞中是较高的。受抗原和分裂原刺激后淋巴细胞进入增殖周期。本实验发现 GS 可升高抗原刺激后小鼠脾组织 cGMP 水平, 增大 cGMP 与 cAMP 之比, 因此而有利于淋巴细胞增殖和抗体产生。为证实这一设想, 本实验使用正、负调节药物加入到淋转培养中, 结果表明在分裂原刺激后继续升高淋巴细胞内 cAMP 水平将抑制淋巴细胞的增殖反应; 反之, 升高淋巴细胞内 cGMP 水平将促进淋巴细胞的增殖反应。这一结果与国外的大量研究一致, 即高剂量外源性的 cAMP 和其激活剂(如前列腺素和氨茶碱等)可拮抗分裂原所诱导的 T、B 淋巴细胞的增殖反应^(10,11)。外源性的 cGMP 和其激活剂(如咪唑、左旋咪唑等)可增强 T、B 淋巴细胞的增殖反应^(10~12)。并发现, 左旋咪唑增加小鼠脾 T 细胞 cGMP 水平的剂量曲线与它的促增殖效应相平行。有趣的是 GS 和左旋咪唑对未加分裂原刺激的自发淋转都有较弱的增加作用。关于这一点 Hadden 对

左旋咪唑的解释认为: 左旋咪唑本身不是分裂原, 它只是调节了总细胞中少量活跃亚群的增殖⁽¹²⁾。综上所述, GS 的体外促淋转效应, 可能是通过升高细胞内 cGMP 水平而实现的。

环核苷酸对抗体合成的影响与其对淋转的影响是一致的。即前列腺素等 cAMP 激活剂可抑制抗体的合成⁽¹³⁾, 而左旋咪唑却可促进抗体反应⁽¹⁴⁾。最近有报告证明, 促进有丝分裂的试剂同时也可促进抗体合成。这可能由于抗体产生需经过淋巴细胞增殖过程所致。

参 考 文 献

1. 邵春杰等: 吉林人参花蕾中人参皂甙的分离与鉴定。药学通报 17(8):52, 1982
2. 杨贵贞主编: 《医用免疫学》, 345, 368 页, 1980
3. 王本祥等: 人参多糖对免疫机能的影响。药学学报 17(1):66, 1982
4. Oura H, et al: Effect of radix ginseng extract on serum protein synthesis. Chem Pharm Bull 20:980, 1972
5. Shibata Y, et al: Stimulated incorporation of ¹⁴C amino acids and ¹⁴C fatty acids in various tissues of ginsenoside treated rats, ibid 26:3832, 1978
6. Tong L S, et al: Am J Chin Med 8(3):254, 1980 [引自: 国外医学(中草药分册)(译文)(5):27, 1981]
7. Kook AI & Trainin N: Hormone-like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in lymphoid cells. J Exp Med 139:193, 1974
8. Scheid MP, et al: Lymphocyte differentiation from precursor cells in vitro. Ann N Y Acad Sci 249:531, 1974
9. Hammerling U, et al: The ontogeny of murine B lymphocytes I. induction of phenotypic conversion of Ia⁻ to Ia⁺ lymphocytes. J Immunol 115:1425, 1975
10. Diamantstein T & Ulmer A: The antagonistic action of cyclic GMP and cyclic AMP on proliferation B and T lymphocytes. Immunol 28:113, 1975
11. Watson J: The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. J Exp Med 141:97, 1975
12. Hadden JW, et al: Effect of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. Cell Immunol 20:98, 1975
13. Melmon KL, et al: Hemolytic plaque formation by leukocytes in vitro. J Clin Invest 53:13, 1974
14. Spreafico F, et al: Characterization of the immunostimulants levamisole and tetramisole. Eur J Cancer 11:555, 1975

concentration above 150 mg/dl was lower than the content of the group with blood sugar level below 150 mg/dl. These data show that the longer the disease duration and the severer the case, the more appreciable would be the lowering of the serum cAMP content. Such an observation seems rather consistent with the saying in Chinese traditional medical science that long illness usually leads to deficiency of both "Qi" and "Yin". In 22 cases, the 17-OHCS, 17-KS, VMA content of 24 hour urine was found considerably higher than normal ($P < 0.01$, in all the cases). In 11 cases, the serum IgG was lower ($P > 0.05$), while IgA, IgM was appreciably higher ($P < 0.001$ in both cases). These results show that this type of diabetes has a certain relationship both with the strengthening of the function of adrenal cortex and medulla, and with the change in the immunological function of body fluids.

(Original article on page 166)

Clinical Observation on Antihypertensive Effect of Semen Lactucaе Sativae

Shen Dexin (申德鑫), et al

Department of Medicine, the First Municipal Hospital of Jinzhou

187 patients with hypertension were separately treated with Semen Lactucaе Sativae or verticilum at random. The results showed that Semen Lactucaе Sativae lowered the blood pressure of cases in stage I and stage II and brought about over-all effective rates of 76.47% and 67.28% respectively. Verticilum (the control group) had an over-all effective rate of 73.33%, which, as compared with that of the group treated with Semen Lactucaе Sativae, showed no significant difference after statistical treatment ($P > 0.05$). It was evident that Semen Lactucaе Sativae was as efficacious as verticilum in lowering the blood pressure. In hypertensive patients in stage I and stage II, both diastolic and systolic pressures were reduced significantly with this herb ($P < 0.01$). No side-effects were found during treatment. Animal experiment proved that the extract of Semen Lactucaе Sativae obtained through extraction of water-soluble alkaloids was the active portion for lowering the blood pressure.

(Original article on page 169)

Immune Effect of Ginsenoside on Mice and A Research into Its Mechanism

Bao Tao (鲍 涛), Yang Guizhen (杨贵贞)

N. Bethune Medical University, Changchun

On immunization with low dose of antigen, a markedly immunopotentiating effect of Ginsenoside (GS) on primary antibody reaction was found, which was slight when high immunization dose of antigen was used. Practically no effect of GS on secondary antibody reaction could be observed. Besides, GS can also enhance the mitogenic action of spleen cells in normal mice either in vivo or in vitro. The enhancement of serum lysozyme and phagocytosis of chicken RBC is striking too. Finally, GS elevated the cAMP and cGMP level of the spleen in non-Ag-stimulated mice, but cGMP only in Ag-stimulated mice. The significance of these findings is briefly discussed.

(Original article on page 172)

Effect of Pollen Typhae on Macrophage Activity and Regression of Cholesterol Granuloma of Rats

Ren Wenhua (任文华), et al

Department of Pathophysiology, Shanghai Second Medical College, Shanghai

Pollen Typhae is a traditional Chinese herb medicine which has the action of "invigorating blood circulation and eliminating venous stasis". It can prevent the hypercholesterolemia of human beings, rats and rabbits, and alleviate rabbit experimental atherosclerotic plaques formation. In order to clarify whether the effects of the drug are due to the activation of macrophage, we have carried out the present studies. An experimental cholesterol granuloma model in Wistar rats was created and the regressive effect of Pollen Typhae on it was observed and compared to that of the immunostimulants Freund adjuvant, lipopolysaccharide, and high molecular dextran.

The results showed: (1) Like other immunostimulants, Pollen Typhae per os could activate the monocyte-macrophage system, which is shown in the increase of phagocyte activity and the lysozyme level. (2) Activation of the monocyte-macrophage system contributed to the regression of atherosclerotic plaques by increasing the absorption of the cholesterol.

(Original article on page 176)