

• 实验研究 •

绞股蓝总皂甙免疫调节作用的研究

湖南省中医药研究院 张崇泉 杨晓慧 徐琳本 朱绍雄

湖南医科大学免疫研究室 燕美玉 陈继嵩 郭实士

内容提要 本研究对湖南省绥宁产绞股蓝总皂甙进行了免疫药理研究。结果显示该总皂甙对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下有显著拮抗作用；对自然杀伤细胞活性有显著增强作用；对正常小鼠有一定双向免疫调节作用；并具有抗疲劳、耐缺氧等多种功效，值得开发利用。

关键词 绞股蓝总皂甙 小鼠 免疫药理 自然杀伤细胞

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)系葫芦科绞股蓝属植物，又名七叶胆。近年来国内外学者对其进行了广泛研究，从绞股蓝中分离出多种皂甙，其中6种与人参皂甙相同，因而作为人参代用品的研究亦受到重视。文献报道，绞股蓝有抗肿瘤、降血脂、抗溃疡、防治糖皮质激素副作用、镇静催眠等多种药理作用，但对免疫调节作用尚缺乏系统的研究^(1~3)。为开发我省丰富的绞股蓝资源，我们采用湖南省绥宁县产绞股蓝提取的总皂甙为样品，进行了免疫药理及抗疲劳、耐缺氧等实验研究，现将结果报告如下。

实验材料

一、样品：绞股蓝总皂甙溶液（简称“绞皂”），浓度100mg/ml。由本院中药所药化室提供。

二、动物：C57BL/6纯系小鼠和昆明系小鼠，体重18~22g（雌雄兼用），由湖南医科大学提供。

三、试剂：（1）环磷酰胺(Cy)：上海第十二制药厂产品；（2）¹²⁵I-UdR：中国原子能研究所产品；（3）5-FuR：SERVA产品；（4）SDS：十二烷基硫酸钠，SIGMA产品。

四、YAC-1瘤株：由Moloney病毒诱发的小鼠淋巴瘤细胞株，同济医科大学微生物教研室提供。

方法与结果

一、对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响：将昆明系小鼠配对分为四组。正常组和Cy组均每日1次蒸馏水灌胃，给药组参考临床用药量分别按200mg/kg和400mg/kg剂量每日1次绞股蓝皂甙灌胃；除正常对照组外所有动物于绵羊红细胞(SRBC)致敏前后各皮下

注射Cy 1次，连续给药10天，进行各项指标测定。

血清抗SRBC溶血素抗体含量测定按《药理实验方法学》“血清溶血素测定法”进行⁽⁴⁾。稀释血清加SRBC悬液及稀释豚鼠血清，温育10min后离心、比色、计算CH₅₀溶血值。活性特异性E-玫瑰花形成率测定按全国玫瑰花协作组制定的统一流程进行。取鼠脾淋巴细胞悬液加SRBC悬液及小牛血清，低速离心后固定、滴片、染色、计数。所有实验结果按配对t检验法进行统计。

实验结果表明Cy可使小鼠脾脏和胸腺的重量，产生溶血素的水平和活性E-玫瑰花形成率明显下降。在给Cy同时给绞股蓝皂甙则可明显对抗其抑制作用，不同程度地使胸腺重量、溶血素含量和E-玫瑰花率得以恢复，大剂量作用优于小剂量，与Cy组比较有显著差异。但胸腺和脾脏的重量及产生溶血素水平未能恢复至正常水平，只有E-玫瑰花形成率恢复至正常（见表1）。

二、对正常小鼠的免疫双向调节作用：动物按上述方法配对分为3组，给药组分别以50mg/kg和100mg/kg剂量每日1次灌胃给绞股蓝皂甙溶液，对照组给等体积蒸馏水，连续给药10天，然后进行各项指标测定。免疫指标测定方法同前。实验数据按易宁育观察药物双向调节作用统计法⁽⁵⁾，以对照组动物中位数为界，分离、低两个水平功能组，将3批对照组动物高、低于中位数的数值分别合并，与给药动物进行配对t检验。

实验结果表明，小剂量绞股蓝皂甙可使免疫器官脾脏重量和活性E-玫瑰花形成率高于中位数的下降，而低于中位数的上升，呈双向调节作用。大剂量绞股蓝皂甙可使脾脏重量、抗SRBC溶血素水平高于中位

表1 绞股蓝皂甙对Cy处理小鼠免疫功能影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	脾脏(mg/10g)	胸腺(mg/10g)	溶血素(HC ₅₀)	Ea-RFC(%)
正常对照	10	21.80±3.61	51.23±11.25	19.96±11.48	83.61±17.21	19.69±8.85
Cy对照	11	20.78±1.70	35.75±9.24 Δ	6.45±2.02 $\Delta\Delta$	18.29±2.78 $\Delta\Delta\Delta$	14.91±4.98 Δ
绞皂200mg/kg	8	21.71±2.80	37.19±6.65	7.56±1.63	24.70±6.69*	22.77±5.40***
绞皂400mg/kg	8	20.42±2.50	39.12±9.11	8.12±2.37*	21.82±3.45**	18.01±3.18*

注: 与正常组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与Cy组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$; n=动物数(下同)

数的下降、低于中位数的上升, 呈双向调节作用。说明绞股蓝皂甙有一定免疫双向调节作用。(见表2、表3、表4)。

表2 绞股蓝皂甙对小鼠免疫器官重量影响

剂量	器官	组别	n	$\bar{x} \pm s$ (mg/10g)	升降 (%)
50mg/kg	脾脏	对照组	<中位数	10 41.64±4.79	
			>中位数	10 61.97±13.24	
		绞皂	<中位数	10 49.58±10.33*	↑19
			>中位数	10 54.77±10.66*	↓12
	胸腺	对照组	<中位数	10 13.90±8.31	
			>中位数	10 32.94±13.04	
		绞皂	<中位数	10 16.29±7.60	↑17
			>中位数	10 19.85±13.73**	↓40
100mg/kg	脾脏	对照组	<中位数	12 41.97±4.88	
			>中位数	12 59.79±10.93	
		绞皂	<中位数	12 56.32±9.61**	↑34
			>中位数	12 51.18±10.99*	↓14
	胸腺	对照组	<中位数	12 14.37±8.54	
			>中位数	12 29.58±13.36	
		绞皂	<中位数	12 14.48±9.68	↑8
			>中位数	12 16.42±13.40***	↓44

注: 与对照动物比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$; n=动物数, (下同)

三、抗疲劳和耐常压缺氧作用: 动物配对分为3组, 对照组蒸馏水灌胃, 给药组按100mg/kg和200mg/kg两种剂量每日1次灌胃给药, 连续10天。抗疲劳试验, 于末次给药后1h进行。实验时动物尾部系一约相当于体重7%的重物, 将其置于水中, 记录游泳时间。实验结果, 小、大两种剂量绞皂组游泳时间分别为13.81min和20.84min, 较对照组的10.69min分别提高29%和95%, 经统计均有显著差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。耐常压缺氧实验, 末次给药后1.5h进行。实验时将动物放入盛有碱石灰的密闭容器中, 记录其存活时间。结果, 小、大两种剂量绞皂组存活时间分别为

表3 绞股蓝皂甙对小鼠抗SRBC

溶血素水平的影响

剂量	组别	n	溶血素HC ₅₀ ($\bar{x} \pm s$)	升降 (%)
50mg/kg	对照组	<中位数	10 81.90±37.24	
		>中位数	10 143.16±45.83	
	绞皂	<中位数	10 82.34±44.51	↑5
		>中位数	10 105.12±38.85*	↓26
100mg/kg	对照组	<中位数	12 80.50±35.91	
		>中位数	12 139.24±42.51	
	绞皂	<中位数	12 105.40±36.78*	↑31
		>中位数	12 114.71±21.66*	↓18

表4 绞股蓝皂甙对Ea-RFC形成率的影响

剂量	组别	n	Ea-RFC% ($\bar{x} \pm s$)	升降 (%)
50mg/kg	对照组	<中位数	6 7.34±1.63	
		>中位数	7 20.90±6.62	
	绞皂	<中位数	6 13.82±6.24*	↑88
		>中位数	7 11.84±3.94*	↓43
100mg/kg	对照组	<中位数	8 10.85±3.60	
		>中位数	8 20.93±6.67	
	绞皂	<中位数	8 14.87±7.24	↑37
		>中位数	8 16.17±5.83*	↓23

21.86min和22.26min, 较对照组的16.69min分别提高31%和33%, 经统计大剂量与对照组比较有显著差异($P < 0.05$), 提示该总皂甙有明显抗疲劳和耐缺氧作用。

四、对天然杀伤细胞(NK)活性的影响: 将C57纯系小鼠随机分为给药、正常对照和Cy三组, 给药组按400mg/kg剂量每日一次绞股蓝皂甙灌胃, 正常对照组和Cy组给等体积蒸馏水, 除正常组外其余动物均在第4和第8天皮下注射1次Cy, 给药12天后, 进行NK细胞活性测定。

NK细胞测定采用¹²⁵I-UdR释放法⁽⁶⁾。取传代

24h的YAC-1细胞 2×10^5 悬于2ml培养基中,加入 ^{125}I -UdR $4\mu\text{l}$, 10^{-3}M 5-FudR $12\mu\text{l}$ 置 CO_2 温箱中孵育6h。取出后用Hanks'液洗2次,用培养基调整细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 即为靶(T)悬液。颈椎脱臼处死小鼠,无菌取脾,用钢网(120目)研磨法制备脾细胞悬液,用Hanks'液洗2次,用培养基将细胞调至所需浓度,即为效应细胞(E)悬液。取效应、靶细胞悬液各0.1ml加入96孔U型底培养板中, E/T比取100:1,每个样品设3个平行孔。用培养基代替效应细胞作为自然释放,用SDS代替效应细胞作为最大释放。培养板置 CO_2 温箱孵育18h后,从各孔吸出0.1ml上清置小试管中,用 γ -计数器计数其cpm,按下列公式计算NK活性。

$$\% \text{NK细胞活性} = \frac{\text{试验管cpm} - \text{自然释放管cpm}}{\text{最大释放管cpm} - \text{自然释放管cpm}} \times 100\%$$

实验结果表明: Cy可使鼠脾NK细胞活性由对照组的19.84%下降至12.60%,差别有显著性意义($P < 0.05$),但给Cy同时给绞股蓝皂甙可明显对抗Cy的抑制作用,提高小鼠脾脏NK细胞活性达到24.12%,与Cy组比较上升91%,差别有显著性意义($P < 0.01$)。说明该总皂甙可明显提高NK细胞活性。

讨 论

一、文献报道绞股蓝总皂甙对使用免疫抑制剂所致免疫低下有一定对抗作用^(7,8)。本实验结果表明,绞股蓝总皂甙可明显对抗环磷酰胺作用,部分恢复其处理过小鼠的免疫功能,使免疫器官重量,血清溶血素产生和活性特异性玫瑰花形成率均有不同程度提高,且大剂量作用优于小剂量;同时有明显抗疲劳、耐缺氧作用,与文献报道一致,说明湖南省绥宁绞股蓝有大力研究、开发、应用的前途。

二、近代医学研究表明,免疫功能失调将引起免疫性疾病,而该类疾病至今仍缺乏理想的治疗药物⁽⁹⁾。因而不少医药工作者正将注意力集中到双向免疫调节药物的研究。近年来,黄芪多糖、人参、参芦总皂甙、复方玉屏风散免疫双向调节作用研究的报道,引起人们关注^(10~13)。

国内外学者对绞股蓝进行了广泛、深入的研究,发现了多种药理活性,但未见有免疫双向调节作用的报道。本实验结果表明,两种剂量绞股蓝皂甙不同程度呈现免疫双向调节作用。提示该药是一种较好的免疫调节剂,似与人参、黄芪等补气类中药有相似的功效。在临床治病、防病、保健等方面将有广泛的开发前景。但该作用是由总甙中某单一成份起作用,还是

不同成份的协同作用,尚待进一步研究。

三、NK活性细胞是一种不需预先致敏就能溶解和破坏靶细胞的杀伤细胞。该细胞破坏的靶细胞主要为各种肿瘤细胞以及感染某些病毒或细菌的细胞,同时它还参与对机体免疫反应的调节。故NK细胞在抗肿瘤和防御疾病中起重要作用,是机体免疫监视功能的重要细胞成分⁽¹⁴⁾。因而检测NK细胞活性可反映机体非特异性免疫监视功能的强弱。

本实验结果表明,绥宁绞股蓝皂甙可明显对抗环磷酰胺作用,使C57小鼠脾脏NK细胞活性升高91%,提示该皂甙有明显增强机体免疫监视功能作用。文献报道绞股蓝皂甙有抗癌作用^(1,2,5),这与其提高NK细胞活性密切相关。这为绞股蓝的临床应用和开发研究,进一步提供了科学依据。

(本研究由湖南省科委资助,谨表谢意)

参 考 文 献

1. 郭生桢,等. 绞股蓝研究进展. 中草药 1987; 18(7): 37.
2. 邹春杰,等. 寻找人参代用药的研究. 国外医学·中医中药分册 1983; 5(1): 1.
3. 王庆勇. 绞股蓝介绍. 陕西中医学院学报 1984; 7(2): 45.
4. 徐叔云,等. 药理实验方法学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 945—946.
5. 易宁育,等. 中医扶正方剂玉屏风散的药理研究. 中药通报 1981; 6(1): 33.
6. 石卫,等. 天然杀伤(NK)细胞活性的测定. 中国免疫学杂志 1986; 2: 14.
7. 钱伯初,等. 绞股蓝总皂甙对免疫低下动物免疫功能的影响. 浙江医学情报 1986; 5: 38.
8. 马炳宣,等. 绞股蓝皂甙抗糖皮质激素过盛作用. 西北药学杂志 1987; 2(2): 13.
9. 史敏吉. 免疫学基础与临床. 第1版. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1980: 1.
10. 易宁育,等. 中医扶正方剂玉屏风散的药理研究II——对免疫功能双向调节作用有效组分的探讨. 上海免疫学杂志 1983; 3(2): 82.
11. 吴友耿,等. 黄芪对免疫功能的双向调节作用. 上海免疫学杂志 1983; 5(3): 138.
12. 楼兰花,等. 参芦总皂甙对小鼠免疫功能的双向调节作用. 上海免疫学杂志 1986; 6(5): 280.
13. 林瑞,等. 人参免疫调节作用的实验研究. 中国卫生信息报 1988; 2: 17, 第2版.
14. 李永琴. NK细胞及其生物学意义. 贵州医药 1984; 8(6): 55.
15. 陈一廷. 植物药绞股蓝在日本的研究概况. 浙江药学 1986; 3(4): 45.

Congestive Heart Failure Treated by Combination of Cyclovirobuxine D with Digoxin

Yan Mingyu(严铭玉), et al

Shanghai Jin-An District Central Hospital, Shanghai (200040)

The patients with congestive heart failure which were treated by combination of digoxin with cyclovirobuxine D were described, with good result, of which promoting effect was 45.5%. Researchful result of 11 patients showed serum concentration of digoxin before and after combined treatment was not obviously different ($P < 0.05$). Basis of pharmacokinetics was provided for using combined treatment of these drugs, with long time and greater safeness.

(Original article on page 88)

Preliminary Research of Senility Index of TCM and Age of TCM

Lin Zhaoxue(林朝晖), Lin Qiucheng(林求诚)

Fujian College of TCM, Fuzhou (350003)

According to the senile theory of TCM and the experience of the old generation, the authors chose 14 items which could represent the body's senility level. These items were graded. The total grade of these items were named "Senility Index of TCM" (SITCM). The age calculated from the regression equation of SITCM and age were named "Age of TCM", and the authors tried to estimate the body's senility level with it. According to the correlation analysis: with the rising of SITCM, lipid peroxide and viscosity of blood increase, function of heart, lung, brain decline and ATPase of RBC reduce, etc.

(Original article on page 90)

Therapeutic Effects of Borneol-Walnut Oil in Treatment of Purulent Otitis Media

Liu Shulin(刘叔林), et al

The First People's Hospital of Jining, Jining (272111)

170 patients were treated with borneol-walnut oil of various concentrations, and the controls (108 patients) were treated with neomycin compound. As a result, the total effective rates were 98.06% and 84.26% respectively ($P < 0.001$). This indicated that the therapeutic effects of borneol-walnut oil for the treatment of purulent otitis media were superior to that of neomycin compound.

The most optimal concentration of borneol-walnut oil was 20% through clinical and laboratory observations. Due to its simple composition, significant therapeutic effects and nontoxic reactions, the borneol-walnut oil has been proved a promising external remedy for the treatment of purulent otitis media.

(Original article on page 93)

Study on the Immunomodulatory Action of the Total Saponin of *Gynostemma pentaphylla*

Zhang Chongquan(张崇泉), Yang Xiaohui(杨晓慧), Xu Linben(徐琳本), et al

Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changsha, (410006)

The specimen of the total saponin for this experimental study was extracted from *Gynostemma pentaphylla* growing in Suining county in Hunan province. Weight of immune organs, content of anti-SRBC hemolysin, rate of special Ea-RFC formation and percentage of NK cell activity had been employed for the study as experimental indices, both the normal healthy mice and the mice with immunity impairment due to Cyclophosphamidum(Cy) management as experimental models. The results of the study exhibited: (1) The total saponin of *Gynostemma pentaphylla* could markedly act against the immunity inhibition due to Cy management in the experimental animals, showing a variant recovery in mice treated by Cy in weight of the immune organs, content of hemolysin, forming rate of Ea-RFC and unequivocally elevating NK cell activity, by significant difference in comparison with the Cy control groups ($P < 0.05 \sim 0.01$). (2) The total saponin showed a definiteness of