

• 中药研究 •

影响中药粗提剂体外淋巴细胞转化
试验的几个因素

中日友好医院临床医学研究所(北京 100013)

汪秀明¹ 钟慧平¹ 刘凯虹¹ 薛 智² 陈玉武² 杨守礼³

内容提要 研究中药粗提剂影响体外淋巴细胞转化试验时, 常因所含杂质多 浓度偏高或细胞收集不全, 使 ^3H 标记的胸腺嘧啶脱氧核糖苷 (^3H -TdR) 掺入受阻或细胞丢失而致 cpm 偏低, 造成假阴性。加用镜检观察细胞增殖为指标时, 它受上述因素干扰较小, 可有很高的可信性、重复性、较宽的检出浓度范围, 较易检测成功, 以及可多人同时评定使其客观性较强等特点, 它与 ^3H -TdR 掺入指标两者互相参比, 可获客观确切结果。增强细胞收集时所用负压、延长冲吸时间、镜检收集是否完全等, 可防止中药粗提剂增强细胞粘附培养板孔面而致收集不全之弊。

关键词 中药粗提剂 淋巴细胞转化试验 细胞增殖形态观察法

筛选中药免疫增强剂时, 在提纯、临床试用前, 须先检测中药粗提剂的免疫效应⁽¹⁾。体外淋巴细胞转化试验(以下简称淋转)是首选方法之一。但中药粗提剂含杂质多, 影响 ^3H -TdR 掺入, 干扰体外淋转实验结果, 被认为不宜采用。我们对1000多种中药筛选免疫增强剂时, 对粗提剂影响体外淋转试验的几个因素进行了探讨, 发现若能注意到这些因素, 用淋转试验检测中药粗提剂的免疫效应, 就能够获得确切可信的结果, 故可以采用。

材料与方 法

1000余种中草药水溶性粗制剂制备, 方法见前文^(2, 3)。主要是水浴煎剂, 过滤, 离心去渣, 上清液经水浴蒸干, 刮下置干燥器中保存。试验时称重, 配制20mg/ml浓度, 测 pH 值并调至中性, 离心去沉渣, 取上清液经流通蒸气消毒待检。

中药甲醇提取剂的制备: 对几种中药如狼毒、甘遂等, 先以乙醚、氯仿提取药粉中可溶部分, 药渣再用甲醇提取, 所剩药渣用水提取。由此可获甲醇溶部分、水溶部分。提取液均挥发(或水溶部分经蒸干)使干, 试验前称重、配制同上述。

髌质检查采用三氯化铁法。溶血、杀伤淋巴细胞检测采用微量板法^(2, 3)。对含髌质多, 或溶血及(或)

杀伤淋巴细胞的药物暂不做直接体外淋转试验。

健康人外周血淋巴细胞制备: 肝素抗凝血经淋巴细胞分离液分离出单形核细胞⁽⁴⁾, 经数次低速短时离心(1000rpm, 2 min), 以去除大部分血小板, 用含10%新生牛或胎牛血清RPMI1640或DMEM Eagles培养基配制成 1×10^6 细胞/ml 悬液待试。

药物对淋转作用试验⁽⁵⁾: 将健康人外周血淋巴细胞按10~20万个/孔加入96孔培养板(Nunc厂, Linbro厂产品)培养基为RPMI1640或DMEM Eagles含10%新生牛或胎牛血清、青霉素100u/ml、链霉素100μg/ml。植物血凝素(PHA)淋转对照采用 PHA-P(Pharmacia厂产品), 2 μg、1 μg、0.05 μg/孔。试验孔中加PHA0.05 μg/孔, 再加入待检药液10 μl/孔(加PHA0.05 μg/孔对照细胞增殖为可疑程度, ^3H -TdR 掺入较细胞对照略有增加), 于5%CO₂、37℃温箱中培养, 次日用倒置显微镜检测细胞增殖程度(见下述)。培养48h后加 ^3H -TdR 1 μCi/孔, 继续培养8~16h, 用细胞收集器(Titertek Multiharvester, Flow Labs)收集于49型玻璃纤维滤纸片, 为防止加药孔细胞收集不完全, 每排孔收集后镜检复查, 用收集较完全时所需负压、冲水量及抽集时间进行收集, 以达收集完全。标本滤纸片晾干后加入液闪液内, 经液闪仪(LS, 9800; Beckman)测 cpm。刺激指数 SI 以药物孔 cpm 除以对照孔 cpm(PHA0.05 μg/孔)表示。

细胞增殖程度判定: 细胞呈均匀单层、无增殖岛

1. 免疫室; 2. 药物药理室; 3. 同位素室

可见者为阴性(-);有细小的细胞岛(直径 $<0.5\text{mm}$ 测目计)形成者为可疑(±);有较多的小细胞岛形成者为阳性(+);有较多稍大的细胞岛形成者为(++);有较多较大的细胞岛形成者为(+++);有较多且很大的细胞岛形成者为(++++)。细胞岛数量及大小介乎上述各级阳性之间者,以右上方+表示略高于,以一表示略低于相应级阳性强度。

结 果

一、采用观察细胞增殖程度为指标,对检测中药影响淋转试验的作用

对1200余种中草药粗提剂进行三氯化铁法检测、杀伤淋巴细胞以及溶血试验等预试验。将 FeCl_3 试验强阳性或杀伤淋巴细胞、溶血的400种中草药暂不检测。对余下的800种中草药进行了影响淋转试验。结果表明,在较高药物浓度下($20\mu\text{g}/\text{孔}$)初筛,采用细胞增殖程度为指标,获得很可信的结果,因而是必要的。表1表示可有4种结果:(1)无细胞岛增殖、 $^3\text{H-TdR}$

表1 800种中草药粗提剂较高浓度下影响体外淋转结果分类

组别 (药物浓度 $20\mu\text{g}/\text{孔}$)	细胞增殖程度	$^3\text{H-TdR}$ 掺入	SI
1	-或±	-*	
2	+	-	
3	++或+++	-	
4	++或+++	+	>1.2

*-, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量较对照组 PHA $0.05\text{r}/\text{孔}$ 者无明显增高甚或较低;+, $^3\text{H-TdR}$ 掺入量较对照组 PHA $0.05\text{r}/\text{孔}$ 者有明显增高, $\text{SI}>1.2$

掺入不增高。(2)细胞略有增殖,与 PHA $0.05\mu\text{g}/\text{孔}$ 对照组相近(±~+), $^3\text{H-TdR}$ 掺入无增高。(3)细胞增殖呈(++~+++), $^3\text{H-TdR}$ 掺入无增高。(4)细胞增殖呈(+~+++), $^3\text{H-TdR}$ 掺入显著增高, $\text{SI}>1.2$ 及以上。由上可见,如仅以 $^3\text{H-TdR}$ 掺入显著增高为指标,则仅第(4)类结果为影响淋转阳性,而将第(2)、(3)类结果列为影响淋转阴性。但实际此两类结果,由于镜检细胞增殖明显,随后采用较低浓度药物复试,以及甲醇提取部分检证时, $^3\text{H-TdR}$ 掺入常显著增高,见表2。另一方面,第(1)类结果的药物未致细胞增殖,虽用较低浓度复测, $^3\text{H-TdR}$ 掺入也未有显著增高。此类药物占大多数。因此,以细胞增殖程度判断淋转是否阳性是可信的。实践证明,后者还有高度的可重复性。例如狼毒等属于第(3)类药

表2 中草药提取物浓度及纯度影响体外淋转结果举例

组别、举例	形态观察 细胞增殖	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 (cpm $\pm S$)	SI
细胞对照组	±	3933 ± 49.4	
PHA $2\text{r}/\text{孔}$	++++	45773.5 ± 1081.1	
PHA $1\text{r}/\text{孔}$	++++	43082.0 ± 681.6	
PHA $0.05\text{r}/\text{孔}$	+	4921.0 ± 304.0	
狼毒粗提剂1:1	+++	2696.5 ± 92.6	0.54
($20\text{mg}/\text{ml}$)1:5	++**	6399.5 ± 1644.0	1.30
1:10	++	9036.5 ± 666.8	1.83
1:20	++	3951.5 ± 419.5	1.81
狼毒甲醇提取剂			
1:1	+++	6518.0 ± 988.5	1.32
1:5	++++	17948.5 ± 1151.8	3.64
1:10	+++	13408.5 ± 987.8	2.72
1:20	++	7503.0 ± 1361.8	1.52
1:40	++	6855.0 ± 823.0	1.39
甘遂粗提剂1:1	++	8943.5 ± 23.3	1.81
1:5	++	17537.0 ± 255.9	3.56
1:10	++	6257.5 ± 1967.8	1.27
1:20	++	8386.5 ± 57.2	1.70
甘遂甲醇提取剂			
1:1	++++	596.0 ± 55.1	0.12
1:5	++++	13051.5 ± 1672.3	2.65
1:10	++++	16353.5 ± 306.1	3.32
1:20	++++	16985.5 ± 3021.4	3.45
1:40	+++	10866.0 ± 3990.0	2.20
1:80	++	9509.0 ± 910.7	1.93

* * 右上方+号表示略高于相应级阳性强度

物,先后试验5~10次,细胞增殖程度结果各次间大致一致(资料未列出)。实践还表明,干扰细胞增殖程度显示的因素远较能干扰 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的因素为少,故结果常可在首次试验中获得。例如属第(2)、(3)类药物,在药物浓度较高时,常干扰 $^3\text{H-TdR}$ 掺入而致假阴性,此时细胞增殖呈显著增强。

二、药物浓度对淋转试验的影响

人们已熟知过高药物浓度下 $^3\text{H-TdR}$ 掺入受抑制,过低药物浓度下掺入也少,以及已知高浓度中药粗提剂常因杂质多而抑制 $^3\text{H-TdR}$ 掺入,而其提纯的部分常不干扰其掺入。我们对800种中草药粗提剂影响淋转试验也获相似结果(表2)。推理增强免疫有效成份含量少的药物,偏低浓度下当呈假阴性淋转结果。我们的经验得出,使细胞增殖显著增强的药物的适宜浓度范围较使淋巴细胞对 $^3\text{H-TdR}$ 掺入增强的药物适宜浓度范围为宽,后者一般在5~ $10\mu\text{g}$ 中药粗提剂/孔,而前者常可达20~ $40\mu\text{g}$ 中药粗提剂/孔,故药

物初试时, 应包括较高浓度药物, 虽 ^3H -TdR 掺入受干扰, 但细胞增殖仍显著增强而被检出, 这样可增强检出率。

三、细胞收集不完全时对淋转试验的影响

当用细胞收集器收集细胞时, 如收集所用负压不高、冲吸时间偏短, 会造成细胞收集不完全, ^3H -TdR 掺入cpm 值低的假结果。我们经大量初筛工作发现, 当用 400~500mmHg 负压, 每排冲吸 40~50s 时, 镜检复查发现, PHA 对照孔在多数情况下大部分或近

全部细胞岛被收集, 但多数加中药孔者, 常呈收集不完全或大部未被收集, 此时 PHA 对照组 cpm 值显示很高, 常给人以“试验各因素正常”的结论。但此时中药粗提剂组, 即使细胞增殖明显, 但 ^3H -TdR 掺入量仍不高, 造成假阴性而致漏检。我们的经验, 当采用负压 700mmHg、收集 1.5~2 min 时, 中药组常可大部或近全部细胞被收集, 见表 3。有时中药组使粘附板孔表面很紧, 需逐孔用毛细管冲下细胞后始可被收集大部。

表 3 细胞收集不全时影响 ^3H -TdR 掺入率检测 (示例)

收集器负压 (mmHg)	收集 时间 (s)	细胞镜检 (^3H -TdR 掺入量 cpm, $\bar{x} \pm S$)		
		细胞+PHA 0.05 μg 对照孔	细胞+PHA 1~2 μg 对照孔	细胞+PHA 0.05 μg +中药粗提剂试验孔
400~600	40	细胞收集较完全 (794.5 $\pm$ 266.5)	细胞收集较完全 (12611.5 $\pm$ 689.9)	细胞收集小部分 (291.0 $\pm$ 31.1)*
	60~90	细胞收集完全 (3953.6 $\pm$ 460.3)	细胞收集完全 (59611.0 $\pm$ 9109.2)	细胞收集大部分 (55176.0 $\pm$ 1976.4)*
650~730	120~180	细胞收集完全 (10859.0 $\pm$ 1141.2)	细胞收集完全 (67789.0 $\pm$ 1518.8)	细胞收集完全或接近完全 (11813.5 $\pm$ 562.1)*

* 本次示例为淨小变粗提剂, 按 200 μg /孔加入, 并加 PHA 0.05 μg 为引发剂下的 ^3H -TdR 掺入量

讨 论

我国在80年代前, 检测常用染色法计算每 200 淋巴细胞中呈母细胞转化的百分比为指标。此法耗时, 且受检测者主观因素影响较多。随后 ^3H -TdR 掺入率指标问世, 省时且客观性强, 重复性好, 采用者日益增多⁽⁶⁾。但用后者为指标检测中药粗提剂影响淋转效应时, 因影响 ^3H -TdR 掺入的因素很多, 以至被认为不宜以淋转做为中草药免疫增强初筛之用。我们的实践也证明, 药物浓度、杂质、药物影响细胞粘附孔面强度等, 均可很强地影响 ^3H -TdR 掺入指标, 造成假阴性机会很多。我们的工作证明, 采用细胞增殖观察为指标时, 受干扰的因素显著减少, 它有很高的可信性、可重复性、较宽的检出浓度范围及较易检测成功。此外, 它还可提供对照孔与药物孔同时对比观察、可多人评定等, 使其客观性较染色法检测母细胞转化率显著为高。而且, 采用本指标本来就是在逐日检查细胞增殖状况下可以完成, 不需另外操作检测。近来已有报道, 加用细胞计数法测具体细胞增殖数量⁽³⁾, 此法固更精确, 唯需有相应检测仪器。形态观察法虽不精确, 但大体可有所区别。故我们认为做药物影响淋转时, 应采用两项指标: 观察细胞增殖与 ^3H -TdR 掺入。两者互相参比, 可得出客观结果。

在做中草药药物影响淋转试验时, 常加次适量的 PHA。许多中草药在加有后者的情况下始显著增强淋

转效应。我们选用的 PHA 剂量为 0.05 μg /孔, 它本身仅引起微弱可见的细胞增殖及 ^3H -TdR 掺入量增加。我们的工作也发现若干种中草药在加有此剂量的 PHA 下始呈显著淋转增高。按近年研究得知, 淋巴细胞被激活的早期机制为, 胞内磷脂酰肌醇二磷酸酯(Phosphatidy inositol biphosphate) 分解为 1, 2-二酰基丙三醇(1, 2-diacylglycerol) 及肌醇三磷酸酯(inositol triphosphate), 前者可激活蛋白激酶, 后者使胞内储存Ca释放, 必需有此两种效应一起发生, 始引起IL-2受体及IL-2的合成, 导致细胞增殖⁽⁶⁾。PHA等有丝分裂原引起淋巴细胞激活的起始信号也同上述。有的中药本身可引起淋转增强, 当系引起上述两种效应所致。有的中药需在次适量的 PHA 协助下始呈淋转增强, 可能仅能引起一种效应所致。果如此, 则体外淋转试验尚可试用于几种中药组方的效应检测, 推论此时采用细胞增殖指标以帮助 ^3H -TdR 掺入指标, 更为合理。

(本工作系中国药材公司科研资助课题, 并承中日友好医院临床医学研究所陈惟昌研究员帮助, 特此致谢)

参 考 文 献

1. Wanger H, et al. Advances in Chinese medicinal materials research, World Scientific Publication Co, Singapore, 1985:159—170.
2. 汪秀明, 等. 120 种中草药 Lea 样物质检测. 科学通报 1985; 8:597.

3. 钟蕙平, 等. 用微量淋巴细胞毒试验方法对 60 种中草药直接杀伤 T 与 B 淋巴细胞检测的初步观察. 湖南医学院学报 1982; 7: 445.
4. Terasaki PI, et al. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigen Am J Clin Pathol 1978; 69: 103.
5. Leung SO, et al. The immunosuppressive activities of two abortifacient proteins isolated from the seeds of bitter melon. Immunopharmacology 1987; 13: 159.

6. 沈美玲, 等. PHA 淋转试验³H-TdR 掺入法. 临床免疫学检验(上册), 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 73.
7. Shenker B. J, et al. Suppression of human lymphocyte responsiveness by forskolin, reversal by 12-O-tetradecanoyl phorbolacetate, diacyl glycerol and ionomycin. Immunopharmacology 1987; 13: 73.
8. Truneh A, et al. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. Nature 1985; 313: 318.

部分省市中西医结合儿科 疾病研讨会纪要

由中国中西医结合研究会桂林市分会主办的部分省市中西医结合儿科疾病研讨会于 1989 年 11 月 28 日至 12 月 4 日在桂林召开。来自 24 省的 164 名代表参加了会议, 大会收到论文 320 篇, 进行专题发言 12 篇。会议中心议题是如何提高中西医结合治疗儿科常见病的水平。与会代表就肺炎、哮喘、肾炎、肾病、小儿消化疾病、新生儿黄疸、心肌炎、结缔组织病及儿科危重症等进行了经验交流。天津医学院韩忠副教授作了“酮替芬与氯唑非松治疗小儿哮喘 112 例前瞻性观察”的专题发言, 此方法可使强的松的剂量缩减到常规剂量的 1/2~1/4。既防止了长疗程导致的激素副作用, 又能收到满意的效果。北京儿童医院用血液流变学检查了结缔组织病、紫癜、肝炎、心肌炎等疾病, 证实了血瘀证的客观存在, 为防治血瘀证提供了新方法; 上海市中医院孟仲法报告了“小儿感染后脾虚证的探讨”, 受到代表们的好评。湖北黄石冶钢医院在治疗前后测定血 β_2 微球蛋白, 为中西医结合治疗小儿急性肾炎时监测肾小球功能提供了理论依据。广州红十字会医院对 787 例急性肾炎采用大黄为主的复方制剂高位点滴、保留灌肠收效满意。并对本组中 129 例合并急性肾衰者加用山莨菪碱改善与疏通肾微循环, 增加肾小球滤过率与中医活血化瘀疗法起协同作用, 使疗效提高。长沙市第三医院介绍了中药六君子汤的酸碱度和钠钾含量, 即类似世界卫生组织推广的口服补液盐又有别于 ORS 液, 为儿科临床治疗消化性疾病与脾虚证提供了实验指标。桂林医学院介绍了自拟“益气养阴补肾方”(黄芪、山药、茯苓、女贞子、旱莲草、生地、丹参、益母草)治疗小儿急性肾炎 250 例, 取得了较好的疗效。

(杨方源)

编 后 语

本期共设 13 个主要栏目, 登载了 37 篇论著及短文。其中临床论著栏目的“针刺阳经六穴与口服卡兰片治疗脑梗塞的对照研究”一文和实验研究栏目两篇关于中药复方抗病毒、诱生干扰素的论文尤其值得一读。

针刺治疗中风(包括脑梗塞), 一直是针灸临床研究的一个非常重要和十分活跃的课题, 尤其近十年来取得了长足的进展。但是, 也暴露出不少不可忽视的问题, 其中最为突出的莫过于不少文章疗效观察缺乏对照, 使研究结论缺乏很强的说服力。本期发表的“针刺阳经六穴与口服卡兰片治疗脑梗塞的对照研究”一文, 以治疗脑梗塞公认的有效药物卡兰片作为对照, 并采用全国统一的疗效评定标准, 证实了针刺疗效显著高于卡兰片, 是一项科学性较强, 价值较高的工作, 很值得针灸临床、科研人员一读。

干扰素是具有正常生理功能的细胞在适宜的诱导剂作用下产生的一种糖蛋白, 其作用非常广泛, 除具有广谱的抗病毒繁殖活性外, 还有一系列的细胞调节功能, 在一定条件下对免疫反应起增进或抑制作用, 对肿瘤细胞生长也有明显抑制作用。曾有人观察到中药黄芪有明显的抗病毒、诱生干扰素作用, 中药复方的研究将更具潜力、更有前景。本刊 1988 年特 I 集和 1988 年第 12 期分别发表了两篇关于小柴胡汤、柴胡煎剂及抗戾散诱生干扰素的文章, 本期又发表了“防感合剂抗病毒及诱生干扰素的作用观察”、“扶正解毒冲剂诱生干扰素和抑制病毒的作用”两篇论文, 这是从中药中寻找干扰素诱生剂, 也是从干扰素角度研究中医药的良好开端, 是一个很有苗头的课题, 值得广泛深入地研究。

(Original article on page 222)

Prevention and Treatment of Emphysema Model of Guinea Pig with Ligustrazine

Wang Gang (王 刚), Tang Qisheng(唐启盛), Zhu Yuelan(朱跃岚), et al
Heilongjiang College of TCM, Harbin (150040)

This study demonstrated that ligustrazine possesses inhibitory effect obviously on elastic enzyme in vitro, and it can be used to prevent and treat emphysema instead of serum. Using light microscope and electron microscope, the authors observed morphological indexes and analyzed the indexes with stereology and statistics in lung tissues of guinea pigs. The results showed that there was no obvious difference between the ligustrazine administration group and the saline control group as pathological changes were not found in the ligustrazine administration group under microscope. The shapes of elastic proteins were the same under electron microscope observation. Aerosol inhalational method induced emphysema model of elastic enzyme in guinea pig could be improved with ligustrazine treatment.

(Original article on page 227)

Study on Prevention of Radiation on Lung Injury by *Salvia miltiorrhiza* in Mice

Du Hongwen(杜红文), Qian Zhizhong(钱致中), Wang Zhengming(王争鸣)
Dept. of Radiology, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an (710061)

The lungs and thymus of mice received X-ray irradiation on the right thorax were observed. It was found that lung injury was lighter and got recovered more rapidly in mice given *Salvia miltiorrhiza* than that in the control group. Microscopic thymus changes showed no difference in the two groups. The results indicated that *Salvia miltiorrhiza* could prevent radiation-induced pulmonary injury, but could not prevent thymus injury.

(Original article on page 230)

Study on Factors Influencing in Vitro Lymphocyte Transformation for Screening Immunomodulation Drugs among Crude Herbal Extracts

Wang Xiuming(汪秀明), et al
*Dept. of Immunology of Clinical Research Institute,
China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100013)*

When in vitro lymphocyte transformation test was used to investigate the immunologic effects of crude herbal extracts, false negative results of ^3H -TdR uptake usually were obtained due to the high content of impurities, higher concentration of drugs or incomplete harvest of cells. Microscopic examination of cell growth to be additional index proved very useful because of being less interfered by factor mentioned above. Cell growth examination has high reliability, reproducibility, wider range of suitable drug concentration detectable (20~40 μg crude extract/well) and high objectivity of being capably examined by several observers for comparison. Therefore both ^3H -TdR uptake and cell growth examination should be adopted for indications of this test to obtain accurate objective results. In case of increasing adhesion of cells with surfaces of plate wells by crude herbal extract it is necessary to elevate negative pressure (700 mmHg) and prolong the time of wash-suction (1.5~2 min) during cell harvesting.

(Original article on page 236)