

猪苓多糖对肝损伤小鼠单核巨噬细胞的影响

中国中医研究院中药研究所(北京 100700) 张英华 刘玉兰 严述常

内容提要 本实验抽取小鼠腹腔渗出细胞, 体外培养, 用荧光测定法检测腹腔巨噬细胞释放的 H_2O_2 量。结果表明 CCl_4 所致肝损伤小鼠腹腔单核巨噬细胞数和释放 H_2O_2 能力明显下降, 猪苓多糖能增加和回升正常及肝损伤小鼠的腹腔巨噬细胞数量和释放 H_2O_2 能力。该药能提高机体的细胞免疫功能, 是治疗慢性肝炎的重要机理之一。

关键词 猪苓多糖 肝损伤 腹腔单核巨噬细胞

猪苓是常用中药, 有效成分是猪苓多糖。临床上治疗慢性病毒性肝炎有较好疗效^①。动物实验证明猪苓多糖对小鼠有保肝作用, 对豚鼠和熊猴产生抗-HBs 有较显著的促进作用^②。为了解猪苓多糖治疗慢性肝炎的作用原理, 我们进行了这一实验。

材料和方法

一、药品与试剂

猪苓多糖注射液(简称757, 含生药10mg/ml)本所实验药厂提供, 批号851126。

四氯化碳, 北京化工厂生产, 分析纯。用花生油配成10%浓度。

7-羟基6-甲氧基香豆素(Scopletin) Sigma 公司产品, 用无钙镁磷酸缓冲液(PD)配成1 mM的储存液, $-20^{\circ}C$ 储存。用前室温溶化。

辣根过氧化物酶(HRP) Sigma 公司产品。用 PD 配成每毫升含200活性单位的储存液, $-20^{\circ}C$ 储存, 用前室温溶化。

大戟酯二萜醇(PMA) Sigma 公司产品, 用二甲亚砜(DMSO)配成0.3mg/ml, $-20^{\circ}C$ 储存。

培养基 α -MEM(Alpha-minimal essential medium) 美国 Grand Island 产品, 含20%灭活的新鲜小牛血清、青霉素100万u/ml、链霉素100 μ g/ml。

二、动物及分组: 健康 C_{57} 小鼠, 雌性, 体重22~24g, 本院动物中心提供。随机分为4组。正常对照组, 每日1次灌喂自来水0.2ml/只, 腹腔注射生理盐水0.2ml/只, 连续2周。正常给药组, 每日1次灌喂自来水0.2ml/只并腹腔注射757 100mg/kg 体重, 连续2周。肝中毒组, 每日1次灌喂10% CCl_4 0.1ml/只(第一天灌喂0.2ml/只)和腹腔注射生理盐水0.2ml/只, 连续2周。肝中毒给药组, 每日1次灌喂10% CCl_4 0.1ml/只(第一天灌喂0.2ml/只)和腹腔注射 757 100mg/

kg, 连续2周。

三、腹腔巨噬细胞收集及培养方法: 给药2周后颈椎脱臼法处死各组动物。无菌条件下, 用磷酸缓冲液洗出全部腹腔渗出细胞, 加入一定量的培养液, 计数后将细胞加入24孔培养碟中, 每孔 2×10^6 个细胞。在 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中孵育24小时。用葡萄糖磷酸缓冲液洗去非贴附细胞。贴壁细胞90%以上为巨噬细胞^③。

四、巨噬细胞过氧化氢释放能力的测定: 按 Nathan 方法^④加以改进, 在巨噬细胞培养孔中加入5 ml 的磷酸缓冲液(PD), PD中含有0.01% PMA, 1 u 的 HRP 和 50nmol 的香豆素, $37^{\circ}C$ 水浴孵育1小时。用日立 MPF 型荧光分光光度计在激发光350nm、发射光460 nm 条件下, 检测上清液中荧光强度。根据荧光降低程度, 测出 H_2O_2 释放量。测试原理为: 还原型的7-羟基6-甲氧基香豆素具有荧光, 它在 HRP 作用下被巨噬细胞释放的 H_2O_2 氧化失去荧光。孔中贴于培养板底板上的细胞均为巨噬细胞, 加入1 N NaOH 水解, 按 Lowry 法^⑤测定蛋白含量, 用蛋白含量表示巨噬细胞的多少。巨噬细胞释放的 H_2O_2 量用 nmol/mg 蛋白表示。

结 果

一、用 CCl_4 灌胃2周的小鼠, 肝脏明显增大, 是正常鼠肝系数的128%, 与正常鼠肝系数比较 $P < 0.001$ 。肝叶灰白色, 变硬。肝损伤模型成立。肝中毒给药组比肝中毒组肝系数下降了3%, 肝叶颜色有所好转, 但无显著性差异。

二、757对腹腔渗出细胞数的比较: 腹腔渗出细胞中大部分为巨噬细胞, 少数为淋巴细胞等。猪苓多糖能增加这些细胞生成的数量。正常给药组与正常对照组比较, 腹腔渗出细胞数明显升高, 是正常对照组

的138%。肝中毒组腹腔渗出细胞数明显减少,只有正常对照组的64%。肝中毒给药组腹腔渗出细胞数明显回升,是肝中毒组的198%,是正常对照组的127%,有显著性差异,见附表。

三、757对腹腔巨噬细胞释放 H_2O_2 功能的比较:正常给药组腹腔巨噬细胞释放 H_2O_2 量比正常对照组提高了2.31倍。肝中毒组巨噬细胞释放 H_2O_2 量比正常对照组下降了36%。中毒给药组有明显回升,比中毒组提高了2.18倍,比正常对照组提高了1.21倍。结果表明猪苓多糖能明显增高正常的和免疫机能下降的小鼠腹腔巨噬细胞释放 H_2O_2 的能力,增强巨噬细胞的活力,从而恢复肝中毒的损害,保护机体,提高机体的免疫功能。见附表。

附表 757对小鼠腹腔渗出细胞和巨噬细胞释放 H_2O_2 量的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	n	腹腔渗出细胞 (1×10^6 个)	n	巨噬细胞释放 H_2O_2 (nmol/mg蛋白)
正常对照	6	14.06 $\pm$ 0.70	19	392.93 $\pm$ 17.15
正常给药	6	19.47 $\pm$ 1.28*	8	1301.45 $\pm$ 68.17***
肝中毒	6	9.00 $\pm$ 0.42**	20	273.22 $\pm$ 14.81***
肝中毒给药	6	17.78 $\pm$ 0.81*△	20	869.40 $\pm$ 17.65***

注:与正常对照组比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与肝中毒组比△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

讨 论

近年来对病毒性肝炎的研究进展较迅速,在治疗方面采用了不少保肝降酶等药物,进行了一些免疫治

疗的探索,虽取得一定效果,但疗效仍不满意。我们用猪苓多糖治疗慢性病毒性肝炎取得了较满意的疗效,特别是对免疫功能低下的患者,效果更为明显。

我们对猪苓多糖治疗肝炎的作用机制进行了多方面的研究。本实验主要研究了该药对细胞免疫功能的影响。巨噬细胞在免疫应答和免疫调节中起重要作用。巨噬细胞在吞噬过程中消耗能量,糖代谢加速,需氧量增高,此时巨噬细胞内的氧分子在氧化酶作用下被还原为超氧离子,超氧离子本身对细菌和病毒有毒性作用,它还能被还原为 H_2O_2 释放出细胞外, H_2O_2 在过氧化氢酶作用下可以产生高活性的羟基或醛基,氧化细菌表面的一些结构,有更强的杀菌抗病毒作用。巨噬细胞不仅有吞噬功能还有重要的分泌功能,与淋巴细胞配合,在机体免疫应答中起重要的调节作用。根据药物的有效剂量和给药时间,本实验对小鼠腹腔注射猪苓多糖100mg/kg 2周,不但能增加正常小鼠腹腔巨噬细胞数量和释放 H_2O_2 能力,而且还能使 CCl_4 引起肝损伤小鼠下降的腹腔巨噬细胞数和释放 H_2O_2 能力明显回升。这表明提高机体的免疫功能是猪苓多糖治疗肝炎的主要机理之一。

参 考 文 献

1. 严述常,等。猪苓多糖治疗慢性病毒性肝炎的临床和实验研究。中西医结合杂志 1988; 8(3):141.
2. Nathan CF, et al. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. Exp Med 1977; 146: 1648.
3. Lowry OH. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265.

《肝脏病学进展—1990》

由全国内科学会主任委员、著名的肝脏病学专家王宝恩教授主编、著名专家江绍基、田庚善教授审阅的《肝脏病学进展—1990》即将由上海科技文献出版社出版。该书共二十七个专题,由国内外知名的有关专家就肝脏病的最新进展。内容包括甲、乙、丙、丁、戊型肝炎,肝纤维化,肝硬化的并发症如腹水、门脉高压症、肝性脑病的诊治和预防,肝癌的早期诊断、治疗等。本书有别于教科书的编写,既包括了近代分子生物学的新发展,又总结了近年西医及中西医结合的治疗经验,理论与实践并重,深入浅出。全书约30万字。定价7.50元。约1991年第一季度出版,读者可向当地新华书店预订,也可直接汇款(另加15%邮寄、包装费)至上海武康路2号(邮政编码200031)上海科技文献出版社发行科邮寄。

《当代中国名医高效验方 1000首》出版

一部集近500位当代中国名医治内、外、妇、儿、皮肤、骨伤、五官科及部分急症近200种常见病和疑难杂症之名验良方1000首的《当代中国名医高效验方1000首》已由中国中医药出版社出版。该书所选方剂全部是副主任医师或副教授以上或民间著名祖传老中医数十年经验的结晶。全书以病为纲,以病统方,每病下均选方剂5首以上,每方下按组成、功效、主治、加减、用法、注意事项、来源七栏编写,条理清晰、查阅方便、读者按病索骥便可找到理想的方剂。该书适合于各级各科中医、中西医结合医务工作者、研究人员及大专院校师生、广大患者参考应用。欲购者可汇款至河南省开封市第二中医院(邮政编码:475004)李军武收,每册定价8.0元(含邮资)。

production of plague forming cells (PFC), the DTH response induced by allogeneic splenocytes. The mixed lymphocyte reaction was much stronger in the drug-receiving group than that in the control group. Further study indicated that KSSF was able to enhance the activities of cytotoxic T lymphocyte and the production of interleukin 2.

Key Words Kang Shuai Sen Fang, cytotoxic T lymphocyte, interleukin 2

(Original article on page 223)

Effect of *Polyporus umbellatus* Polysaccharide on Function of Macrophages in the Peritoneal Cavities of Mice with Liver Lesions

Zhang Ying-hua(张英华), Liu Yu-lan(刘玉兰), Yan Shu-chang(严述常)

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing (100070)

The cells in peritoneal cavities of mice were taken out and cultured in vitro. The amount to release H_2O_2 of the macrophages was assayed by fluorimetry. *Polyporus umbellatus* polysaccharide (PUP) could not only increase the number of macrophages and the amount of H_2O_2 release in the peritoneal cavities of normal mice, but also raise the lowered number of macrophages and the ability to release H_2O_2 in the peritoneal cavities of the mice with liver lesions caused by CCl_4 significantly. So PUP could improve the cellular immunity of normal mice and the mice with liver lesions.

Key Words *Polyporus umbellatus* polysaccharide, liver lesions, macrophages of peritoneal cavities

(Original article on page 225)

The Effect of Allitridi on cAMP Level of Artery Wall and Plasma of Hypercholesterolemic Rabbits

Gao Chun-yi(高春义), Xu Ying-jie(徐英杰), et al

Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan (250001)

30 New Zealand rabbits weighing 1.5~2.5 kg were all fed a common diet and subdivided into 3 groups. Group I (the control), group II received cholesterol (0.5 g/kg · d), while group III was added cholesterol (0.5 g/kg · d) and the allitridi (20 mg/kg · d). Blood cholesterol, cAMP and artery cAMP were determined by the usual technique. The results showed that serum cholesterol level was significantly reduced by allitridi during the 15 weeks period of study and the artery wall cAMP level of group I and group III were significantly higher than group II. But there was no significantly difference between group I and III. The difference of cAMP level in plasma was not significant.

Key Words allitridi, artery wall, cyclic adenosine monophosphate, hypercholesterolemia

(Original article on page 227)

Effect of Promoting Biliation Mixture on E. Coli under Electron Microscopy

Qin Ming-fang(秦明放), Li Le-tian(李乐天)*

Dept. of Surgery, First Affiliated Hospital, Tianjin Medical College, Tianjin (300052)

**Dept. of Surgery, Third Affiliated Hospital, Hebei Medical College, Shijiazhuang (050051)*

With electron microscopy this article observed the effect of promoting biliation mixture (PBM) and polymyxin B on E. coli lipopolysaccharide (LPS). The result showed that PBM could breakdown the typical structure of E. coli LPS with only short sections or partially disaggregate it. The morphology changes were similar to the effect of polymyxin B. It would appear that the loss of endotoxicity caused by PBM may be due to the loss of structural integrity of the E. coli LPS. The result may also give some evidence for the clinical effects of PBM theoretically.

Key Words electron microscopy, endotoxin, promoting biliation mixture, polymyxin B

(Original article on page 229)