

· 临床论著 ·

黄芪多糖增强人外周血单个核细胞产生肿瘤坏死因子的研究

陕西省人民医院(西安 710068) 赵克胜 丁丽轩 孔海燕 田淑媛

第四军医大学 金伯泉 刘雪松

内容提要 常规提取的黄芪多糖经液相色谱进一步分离后,发现其中分子量为20 000~25 000的组分,对正常人及肿瘤患者外周血单个核细胞(PBMC)在体外分泌肿瘤坏死因子(TNF)具有明显地促进作用。进一步将PBMC分离成粘附和非粘附细胞后发现,黄芪多糖的这一组分对二者分别产生TNF- α 和TNF- β 均有增强作用,表明对黄芪多糖的进一步研究将有利于其在肿瘤治疗中的应用。

关键词 黄芪多糖 外周血单个核细胞 肿瘤坏死因子 大肠杆菌脂多糖

黄芪是主要的扶正药物之一,具有增强机体免疫功能的作用。近年来在肿瘤治疗的实验研究中,发现经液相色谱进一步分离提纯的分子量为20 000~25 000的多糖成分与肿瘤患者外周血单个核细胞(PBMC)共同孵育后,患者淋巴细胞的体外增殖反应可增加2.6~5.8倍^①。此外黄芪多糖还能协助低剂量的白细胞介素2(IL-2)诱导淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)的活性,因而在IL-2/LAK细胞的过继免疫治疗中可减少IL-2的用量^②。我们以前的研究结果也证实,黄芪多糖的这一组分注射能使抗肿瘤药物所致的动物免疫抑制状态得到恢复^③。上述结果虽已提示黄芪多糖对肿瘤的治疗作用,但为了进一步探讨黄芪多糖有效成分抗肿瘤的机理及其临床应用的可能性,我们对黄芪多糖在体外影响PBMC分泌肿瘤坏死因子(TNF) α 和 β 进行了初步观察。

材料和方法

一、黄芪多糖 按文献介绍方法从内蒙黄芪粗提液中通过液相色谱分离出分子量为20 000~25 000的多糖组分^③。经过DEZ-亲和吸附内毒素凝胶层析柱处理后,内毒素含量低于0.01 ng/ml^③,糖浓度为5.0 mg/ml。

二、PBMC的分离及TNF的诱导 取30名健康人和10例肿瘤患者静脉血肝素抗

凝,按常规方法分离PBMC, RPMI-1640洗3次后重悬于完全细胞培养液内(含10%胎牛血清的RPMI-1640, 2mM L-谷酰胺,庆大霉素10 μ g/ml),调整细胞浓度为 2×10^6 /ml。取1 ml细胞悬液加于24孔培养板,诱导剂大肠杆菌脂多糖(LPS, Sigma公司产品)的终浓度为20 μ g/ml。实验孔加黄芪多糖0.1 ml, 5%CO₂, 37℃培养16 h后收集上清测定TNF活性。PBMC中粘附细胞和非粘附细胞的分离及其分泌TNF- α 和TNF- β 的诱导均按文献方法操作^④。

三、TNF活性测定 参照文献用L929细胞测定TNF细胞毒活性^④。每块板内设有阳性、阴性对照及重组TNF- α 参考标准(第四军医大学生物化学教研室惠赠),最后以0.5%结晶紫染色30 min, DG 3022酶标仪580 nm检测。黄芪多糖本身对L929细胞无任何影响。

四、中和实验 1:10 000稀释的鼠抗人TNF- α 单克隆抗体腹水(第四军医大学免疫教研室惠赠)与等量待测标本于37℃孵育2 h,再按上述方法测TNF活性。

结 果

一、黄芪多糖剂量对PBMC产生TNF的影响 见表1。在诱导健康人PBMC产生

TNF 活性时, 于实验各孔加入不同剂量的黄芪多糖以观察其量效关系。表 1 中的 TNF 活性为 10 份健康人平均值, 表明当黄芪多糖的终浓度为 10~20 $\mu\text{g/ml}$ 时, 培养上清中 TNF 活性最高, 并可被抗 TNF- α 单克隆抗体完全中和, 提示其活性部分主要为 TNF- α 。未加 LPS 和只加黄芪多糖各孔培养上清中 TNF 活性均小于 4 u/ml。

表 1 不同浓度黄芪多糖对 PBMC 产生 TNF 活性的影响

黄芪多糖浓度($\mu\text{g/ml}$)	TNF 活性(u/ml)
0	<8
2.5	16
5	32
10	64
20	64
40	32

二、黄芪多糖促进 PBMC 中非粘附细胞产生 TNF- β 当 PBMC 被分成粘附和非粘附细胞后, 黄芪多糖能显著增强两种细胞培养上清中的 TNF 活性(见表 2)。鼠抗人 TNF- α 单克隆抗体可以完全中和粘附细胞培养上清中的 TNF 活性, 但对非粘附细胞产生的 TNF 活性则无影响。

表 2 黄芪多糖对 PBMC 中粘附细胞和非粘附细胞产生 TNF 活性的影响 (u/ml)

组别	例数	批次	粘附细胞 TNF 活性				非粘附细胞 TNF 活性			
			1	2	3	4	1	2	3	4
对 照	10		16	64	32	16	8	4	16	4
黄芪多糖	10		64	128	128	64	16	16	32	16

三、黄芪多糖增强肿瘤患者 PBMC 产生 TNF 共检测了 10 例正在化疗的晚期肿瘤患者 PBMC 在 LPS 诱导下产生的 TNF 活性。将 PBMC 接种于 24 孔培养板后, 其中 3 孔只加 LPS 作为对照, 另外 3 孔加 LPS 和黄芪多糖。结果发现, 加入黄芪多糖后, 肿瘤患者 PBMC 培养上清中的 TNF 活性除 1 例外均有不同程度的增加(见表 3)。

讨 论

实验和临床研究已经证实, 许多植物多糖具有免疫调节剂(Immunomodulator)性能,

表 3 黄芪多糖对肿瘤患者 PBMC 产生 TNF 活性的影响

病例序号	年龄(岁)	性别	诊断	TNF 活性(u/ml)	
				对照	黄芪多糖
1	53	男	贲门癌	4	16
2	63	男	胃 癌	16	16
3	42	男	食管癌	16	32
4	43	女	肺 癌	8	16
5	64	男	食管癌	4	32
6	57	女	食管癌	8	16
7	64	男	淋巴瘤	16	64
8	62	女	肺 癌	8	32
9	65	男	肝 癌	4	8
10	51	女	乳腺癌	8	32

称之为抗肿瘤多糖⁽⁵⁾。尽管这些多糖本身并没有直接杀伤癌细胞的功能, 但它们可以激活体内免疫系统释放具有抗肿瘤作用的细胞因子或增强自然杀伤细胞和 LAK 细胞对癌细胞的杀伤作用⁽⁶⁾。已知 TNF 具有多种生物学活性, 尤其是对人和动物多种肿瘤细胞有细胞毒性和细胞静止作用(Cytostatic effect), 也是机体炎症与免疫调节的重要因子⁽⁷⁾。但外源性 TNF 在体内半衰期仅 6~7 min, 因此寻找某些免疫调节剂促进机体产生适量的 TNF 对某些肿瘤的治疗可能具有辅助作用。我们首次利用液相色谱分离出分子量为 20 000~25 000 的黄芪多糖组分, 并证实其能在体外细胞培养中促进正常人和正在接受化疗的肿瘤患者 PBMC 产生 TNF- α 和 TNF- β 。由于肿瘤坏死因子在 LAK 细胞的诱导中与 IL-2 有协同作用, 因此这一研究结果不仅加深了黄芪多糖在抗肿瘤免疫中作用机理的认识, 而且也展示了黄芪多糖在过继免疫治疗肿瘤中的实际应用前景。

参 考 文 献

1. 王德昌, 等. 黄芪多糖 FB 对人血淋巴细胞免疫功能的影响. 中华肿瘤杂志 1989; 11(3): 180.
2. Chu DT, et al. Fractionated extract of astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb, potentiates LAK cytotoxicity generated by low dose of recombinant interleukin-2. J Clin Lab Immunol 1988; 26:183.
3. Zhao KS, et al. Enhancement of the immune response in mice by astragalus membranaceus extracts. Immunopharmacology 1990; 20:225.

4. Nedwin GE, et al. Effect of interleukin-2, interferon- γ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors. J Immunol 1985; 135:2492.
5. 刘瑞梅, 等. 从生药药理的观点看抗癌药的现状与未来. 国外医学中医中药分册 1989; 11: 16.
6. Haranaka K, et al. Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese

medicine and crud drugs. Cancer Immunol Immunother 1985; 20:1.

7. 童善庆, 等. 肿瘤坏死因子研究进展. 上海免疫学杂志 1989; 9: 236.
8. 曹雪涛. 白细胞介素 2 的基础与临床. 北京: 北京科学技术出版社, 1990: 9.

针刺四缝穴治疗小儿脾虚疳积 D-木糖排泄率及疗效观察

福建省德化县医院(福建 362500) 周江宁 洪延山*

福建省中医药研究所 蔺云桂[△]

为了对针刺四缝穴治疗小儿脾虚疳积进行机理探讨和疗效观察, 我们采用能反映小肠吸收功能, 并可用来作为脾虚诊断及治疗观察客观指标的 D-木糖吸收排泄试验, 初步观察了 75 例正常儿童和 30 例脾虚疳积患儿针刺四缝穴前后尿中的 D-木糖排泄率, 并进行疗效观察。现小结如下。

资料与方法

一、研究对象 治疗组 30 例患儿均符合脾虚疳积诊断标准, 西医诊断为营养不良或吸收不良综合征。年龄 1~8 岁, 其中男 14 例, 女 16 例。

二、脾虚疳积患儿诊断标准及评判标准 (1)形体消瘦(体重低于同年岁的标准体重 10%以上); (2)食欲不振或无食欲; (3)大便次数较多(每天 2 次以上)或不成形, 或不消化便; (4)肚腹胀大; (5)精神疲倦; (6)嗜食异物; (7)易出汗、自汗或盗汗; (8)口干喜饮; (9)面色萎黄。

(1)~(4)为主要症状, 必备 3 个以上; (5)~(9)为次要症状, 有 1 个以上, 即可诊断为脾虚疳积。

以上症状的评判标准参照脾虚见症积分法〔中医杂志 1984; 25(6): 37〕分为 4 个等级: 症状显著为 3 分; 症状时轻时重或反复出现为 2 分; 症状较轻或偶尔出现重症状为 1 分; 无症状为 0 分。用针刺前后的疳积见症积分值比较疳积程度的变化。积分评判在治疗前后均由同一人进行。

三、健康对照组 75 例健康儿童均为我县城关幼儿园及实验幼儿园的小儿, 经体检身体健康。年龄 1~8 岁, 男 39 例, 女 36 例。

四、D-木糖排泄率实验方法 采用金敬善报道的方法〔中华医学检验杂志 1979; 2(2): 91〕。D-木糖排泄率试验在针刺前及针刺结束后 3 天内各进行 1 次, 以比较小肠吸收功能的变化。

五、治疗方法 常规消毒皮肤后, 用三棱针浅刺双手四缝穴 1~2 mm 深, 每穴各 1 针, 挤出少许黄

白色油脂状液体或血液, 随即用消毒棉签擦净, 直至不能再挤出液体为止。隔 2 天针 1 次, 连续 4 次, 共 12 天为 1 个疗程。全部病例均治疗 1 个疗程, 在此期间, 除病情急需外, 停用其他药物。

结果

一、两组针刺前尿中 D-木糖排泄率比较 对照组 D-木糖排泄率平均值为 17.27 mg%; 治疗组 D-木糖排泄率平均值为 10.27 mg%, 两组比较差异显著 ($P < 0.001$)。

二、治疗组 30 例针刺前后尿中 D-木糖排泄率变化 治疗前 D-木糖排泄率最低值为 0.63 mg%, 最高值为 19.40 mg%, 平均值为 10.27 mg%; 治疗后最低值为 2.9 mg%, 最高值为 53.43 mg%, 平均值为 24.68 mg%。治疗前后比较差异显著 ($P < 0.001$)。

三、治疗组针刺前后临床症状积分比较 治疗前临床症状积分最低 8 分, 最高 24 分, 平均 15.5 分; 治疗后最低 2 分, 最高 15 分, 平均 7.43 分。与治疗前比较, 差异显著 ($P < 0.001$)。

讨论

一、以上结果表明, 30 例疳积患儿尿中 D-木糖排泄率明显低于健康小儿, 说明疳积患儿小肠吸收功能低于健康儿童。机体所需要的营养物质不能被小肠吸收, 导致营养不良。这与中医认为疳积患儿是由于各种原因导致脾胃虚损, 运化失司, 气血化生乏源, 影响小儿生长发育的认识是一致的。

二、临床症状的轻重程度与 D-木糖排泄率呈正比例关系。各种临床症状较重, D-木糖排泄率低, 经针刺四缝穴后, 临床症状减轻, D-木糖排泄率也明显升高。这说明疳积患儿病情轻重与小肠吸收功能有密切关系, 可以从 D-木糖排泄率的变化反映出来。还说明针刺四缝穴对提高疳积患儿的小肠吸收功能有良好作用。

* 现在厦门市中医院检验科; [△] 指导

Abstract of Original Articles

Effect of Astragalan on Secretion of Tumor Necrosis Factors in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Zhao Ke-sheng (赵克胜), Kong Hai-yan (孔海燕), et al

Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an (710068)

The extracts of *Astragalus membranaceus* have been further isolated by liquid chromatography. One of the fractions (Astragalan, M.W. 20,000—25,000) could enhance the secretion of tumor necrosis factor (TNF) from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro. After isolation of adherent and nonadherent mononuclear cells from PBMC, Astragalan increased the secretion of TNF- α and TNF- β respectively. These results suggest further study of Astragalan would promote the application of Astragalan in cancer immunotherapy.

Key words *Astragalus membranaceus*, peripheral blood mononuclear cells, tumor necrosis factor, lipopolysaccharide of coli bacillus

(Original article on page 263)

LPS-induced Cellular Immunity Response and Effect of Herbal Purgation Method in Intra-abdominal Infection

Qin Ming-fang (秦明放), Wu Xian-zhong (吴咸中), et al

Dept. of Surgery, Nan Kai Hospital, Tianjin (300100)

The alterations of cytokines (TNF, PGE₂), plasma lipopolysaccharide and their prognostic influences in 58 patients with intra-abdominal infection were observed with ELISA and RIA. The effect on physiopathologic process with herbal purgation method was explored. The results showed that as the level of plasma LPS raised the serum TNF, plasma PGE₂ elevated obviously and the cellular immunity inhibited elevated in treatment and control groups. There was a linear positive correlation between the plasma LPS and the serum TNF in control group. Between the plasma PGE₂ and CD4 lymphocytes of peripheral blood, it existed a linear negative correlation in treatment group. After two treatment courses, the recovery of abnormal indexes in treatment group was earlier than that in control group accompanied by escalation of lessened toxicity rate of LPS, more rapid in reducing the level and detectable rate of serum TNF, and the lowering of complication rate successively and the inhibition of cellular immunity tended to be relieved in treatment group.

Key words herbal purgation method, lipopolysaccharide, tumor-necrosis factor

(Original article on page 266)

Clinical and Experimental Study on Effects of Man-Shen-Ling (慢肾灵) Oral Liquid in Treating 100 Cases of Chronic Nephritis

Su Zong-ze (苏宗泽), He Yong-yuan (何永元), Chen Gao (陈 高), et al

Worker's Hospital of the 5th Metallurgical Construction Company, Chengdu (610081)

A new Chinese herbal preparation, Man-Shen-Ling (慢肾灵, MSL, consisted of medicinal herbs such as *Astragalus* and *Rehmannia*) in treating 100 cases of chronic nephritis. The effective rate was 91% in comparing to 66.7% in the control group, $P < 0.001$. It was markedly effective for proteinuria, hematuria, improvement and recovery of renal functions, edema, anemia, anorexia etc in comparing