

日本灵芝对小鼠脾细胞产生白细胞介素-2 的影响

上海医科大学药学院药理教研室(上海 200032) 张罗修 孟虹 周贤飏

日本和汉生药研究所(东京) 森昌夫 黄维蓉

内容提要 本实验研究日本灵芝对小鼠脾细胞产生白细胞介素-2(IL-2)的影响。结果表明在试管内氢化考的松 $0.025 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 及环孢霉素 A $0.05 \mu\text{g/ml}$ 可明显抑制小鼠脾细胞产生 IL-2, $P < 0.01$ 。灵芝在试管内能明显对抗氢化考的松及环孢霉素 A 的抑制作用而促进 IL-2 产生增加, 其作用与药物浓度有关, $10 \mu\text{g/ml}$ 以上有显著作用, $P < 0.01$ 。灵芝不同浓度与氢化考的松同时对脾细胞进行预处理 8 h 后, 灵芝可以明显减轻氢化考的松的抑制作用。整体研究亦证明灵芝可以促进脾细胞产生 IL-2, 即使在同时用免疫抑制剂的条件下, IL-2 的产生仍有显著增加。

关键词 灵芝 白细胞介素-2 氢化考的松 环孢霉素 A

灵芝具有多种药理作用, 受到中外学者的重视。在日本已广泛用作保健药品。本室与日本和汉生药研究所协作研究日本培育的灵芝(*Ganoderma Lucidum* Fr. Karst)的药理作用, 已经证明其热水提取物具有免疫调节作用, 影响多种免疫功能⁽¹⁻³⁾。白细胞介素-2(IL-2)是最重要的淋巴因子之一, 在免疫调节网络中占重要地位。IL-2 主要由 T 辅助性细胞产生, 所以 IL-2 的水平亦间接地反映了 T 细胞的功能。本实验目的是研究灵芝对小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响。

材料与方法

一、动物: C57 BL/6 小鼠 8~12 周龄; 昆明种小鼠体重 16~20 g, 雌雄兼用, 由本校实验动物部供应。

二、药品: 灵芝热水浸出物由日本和汉生药研究所提供, 为棕黄色粉末。取一定量提取物加 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC)研磨后配成混悬液置于 80°C 水浴中振荡 4 h, 临用时适当稀释以备整体研究之用。另取少量灵芝提取物溶于生理盐水, 于 80°C 水浴中振荡 4 h 后, 离心 2000 rpm, 10 min, 取上清液煮沸灭菌, 低温保存, 临用时适当稀释供试管内研究用。

RPMI-1640 培养基, GIBCO 产品, 含青霉素 100 u/ml, 链霉素 $100 \mu\text{g/ml}$, Hepes 15 mmol 及 10% 小牛血清(NCS)。刀豆蛋白(ConA)Sigma 产品。环孢霉素 A(Cyclosporin A)为瑞士 Sandoz 药

厂产品, 静脉注射用制剂(每毫升含环孢霉素 A 50 mg, Polyoxyethylated castor oil 650 mg 及 33% alcohol), ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)中国科学院原子能研究所提供, 比活性为 1110 GBq/mmol, α -甲基-D-甘露糖苷(α -mm)上海试剂二厂产品。

三、试管内诱导 IL-2 产生⁽⁴⁾

小鼠处死后, 取脾脏, 释放脾细胞, 脾细胞于破坏红细胞后洗涤 2 次, 调节细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 加入 24 孔培养板, 同时每孔加入不同浓度药物及 ConA $3 \mu\text{g/ml}$, 对照组不加药物, 加生理盐水。于 37°C 5% CO_2 中培养 24 h, 取上清液, 离心, 置 -30°C 待测上清液中含有 IL-2, 测定时稀释至适当浓度。

四、整体给药对 IL-2 产生的影响 取昆明种小鼠随机分组, 对照组口服 0.5% CMC, 每日 1 次, 共 6 次; 灵芝组分别口服 150 及 300 mg/kg 灵芝, 每日 1 次, 共 6 次; 两组口服灵芝联合氢化考的松或环磷酰胺, 另加氢化考的松或环磷酰胺, 于第 7 天处死小鼠, 取脾脏, 如前方法调节脾细胞数, 然后加入 24 孔培养板中, 经 ConA $3 \mu\text{g/ml}$ 作用下培养 24 h 后, 取上清液置 -30°C 待测上清液中含 IL-2。

五、IL-2 活力测定⁽⁵⁾

利用活化的脾细胞测定 IL-2。C57BL/6 小鼠颈椎脱位处死, 无菌取脾, 脾细胞悬液经破坏红细胞后洗涤 3 次, 调节细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 ConA $3 \mu\text{g/ml}$ 于 37°C 5% CO_2 中培养 48 h, 然后收集此活化的脾细胞, 用含有 $20 \mu\text{g/ml}$ α -mm 的 RPMI-1640 洗涤 2 次以消除残存 ConA 的影响, 然

后以台盼蓝计数, 调节细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 于 96 孔培养板中, 每孔加 $100 \mu\text{l}$, 同时加入经对倍稀释的上述的待测上清液(含 IL-2) $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液, 于 37°C $5\%\text{CO}_2$ 中培养 24 h, 于培养结束前 6 h, 每孔加入 ^3H -TdR $1 \mu\text{Ci}$, 然后以多头细胞收集仪将细胞收集至醋酸纤维薄膜, 测定结合的 ^3H -TdR 的量。

结 果

一、灵芝在试管内对氢化考的松或环孢霉素 A 抑制 IL-2 产生作用的影响。 结果见表 1、2。氢化考的松 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及环孢霉素 A $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 均可明显抑制细胞产生 IL-2, 灵芝促进受抑制的脾细胞产生 IL-2, 其作用与灵芝的浓度呈正相关, 灵芝 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作用显著, 与氢化考的松组及环孢霉素 A 组比较均有显著差别。

表 1 灵芝对氢化考的松抑制 IL-2 产生的影响 ($\bar{x} \pm S$)

灵芝 $\mu\text{g}/\text{ml}$	氢化考的松 $\mu\text{g}/\text{ml}$	cpm/ 1×10^6 细胞
—	—	8389 ± 6588
—	1	$3944 \pm 262^{\Delta}$
1	1	4348 ± 482
10	1	$5396 \pm 260^*$
100	1	$5450 \pm 426^*$

注: N=4, 与对照组相比较 $\Delta P < 0.01$; 与氢化考的松组相比较 $^* P < 0.01$

表 2 灵芝对环孢霉素 A 抑制 IL-2 产生的影响 ($\bar{x} \pm S$)

灵芝 $\mu\text{g}/\text{ml}$	环孢霉素 A $\mu\text{g}/\text{ml}$	cpm/ 1×10^6 细胞
—	—	8389 ± 6588
—	0.05	$5667 \pm 450^{\Delta}$
1	0.05	5763 ± 395
10	0.05	$6495 \pm 446^*$
100	0.05	$6539 \pm 557^*$

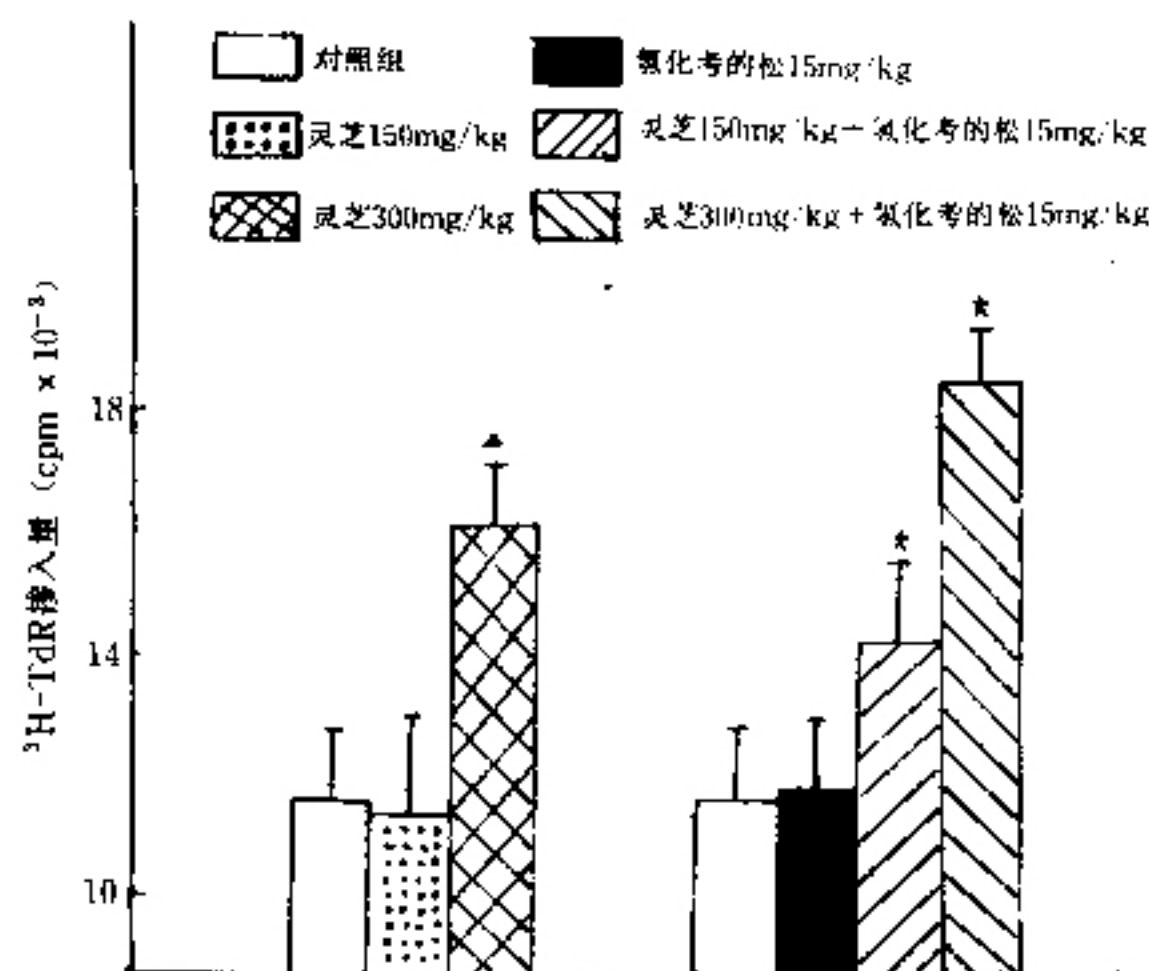
注: N=4, 与对照组比较 $\Delta P < 0.01$; 与环孢霉素 A 组相比较 $^* P < 0.05$

二、药物预处理的作用 脾细胞与不同浓度药物共同培养 8 h 后洗去药物, 加入新鲜 RPMI-1640 培养基及 ConA 后诱导 24 h, 然后取上清液测 IL-2 的活力。本实验之目的是为了消除在待测样品中所含药物可能产生的影响。结果表明灵芝 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 单独预处理脾细胞 8 h 并不影响 IL-2 产生之量。对照组的 cpm 为 34724 ± 1702 , 灵芝 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 与 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 组的 cpm 分别为 35157 ± 949 及 $35178 \pm$

1076 , $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ 氢化考的松预处理脾细胞 8 h 则可明显抑制 IL-2 的产生, cpm 为 24438 ± 2004 与对照相比有显著差别, $P < 0.01$ 。如灵芝 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 与氢化考的松同时处理脾细胞 8 h, 则灵芝可以减轻氢化考的松抑制作用, 促进 IL-2 产生, 使 cpm 数由 $31811 \pm 1639 \rightarrow$ 上升至 33744 ± 2850 , 与氢化考的松组差别非常显著, $P < 0.01$ 。

三、灵芝整体给药对小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响 昆明种小鼠随机分组, 每组 4 只, 口服灵芝 150 及 $300 \text{ mg}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续用 6 天, 腹腔注射氢化考的松组 $15 \text{ mg}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续用 6 天; 灵芝联合氢化考的松组分别口服灵芝 150 或 $300 \text{ mg}/\text{kg}$, 同时腹腔注射氢化考的松 $15 \text{ mg}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续用 6 天, 于第 7 天处死小鼠, 取脾脏, 调节脾细胞数, 按前法加入 ConA 诱导 IL-2 待测。

结果见附图, 单独口服灵芝 $300 \text{ mg}/\text{kg}$, 每日 1 次, 连续用 6 天可以促进 IL-2 产生。在本实验条件下氢化考的松抑制作用不明显, 但是当灵芝联合氢化考的松时, 则可以明显促进小鼠脾细胞产生 IL-2。



附图 灵芝整体给药对小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响, 与对照组比 $\Delta P < 0.01$, 与氢化考的松组比较 $^* P < 0.01$

讨 论

1976 年 Morgen 报道在致裂原刺激的淋巴细胞培养上清液中存在一种因子, 它能维持激活后的 T 细胞在体外长期生长, 该因子被称为 T 细胞生长因子 (TCGF), 此因子在 1979 年国际淋巴因子专题会议上被统一命名为白细胞介素-2 (IL-2)。IL-2 在免疫调节中占重要地位, 它可调节多种功能, 提高 NK 细胞活力, 激活 T 杀伤性细胞, 亦介导 B 细胞与巨噬细胞的活化, 因此对 T 细胞的活化过程有了新的

假设,亦产生了治疗肿瘤的新思维、新措施。由此考虑到免疫调节剂会间接通过影响 IL-2 的产生而发挥作用是很自然的。

本室已报道日本灵芝的热水提取物能作用于免疫系统,影响多种免疫功能,有免疫调节作用,本文研究证明灵芝无论在试管内及整体均可刺激脾细胞产生 IL-2,亦能对抗免疫抑制剂的作用,恢复受抑制的细胞产生 IL-2 的能力。据临床报道,晚期肿瘤患者、老年人、原发性或获得性免疫缺陷病人的淋巴细胞产生 IL-2 的能力低下,给这些患者以促进 IL-2 的产生的免疫调节剂理应是有益的。

参 考 文 献

1. 张罗修,等.日本灵芝的护肝作用.中药药理与临床 1992; 8(1): 32.
2. 张罗修,等.灵芝对同种异位心肌移植及巨噬细胞功能的影响.中药药理与临床 1992; 8(3): 27.
3. 张罗修,等.日本灵芝对抗体形成细胞及变态反应的影响.中药药理与临床 1992; 8(2): 10.
4. Gearing AJH, et al. Production and assay of the interleukines. J Immunol Methods 1985; 83: 1.
5. Ding GF, et al. Measurement of IL-2 by activating mouse spleen cells. Shanghai J Immunol 1988; 8: 64.

生脉注射液对房室结双通道不应期的影响

重庆市铜梁县人民医院心内科(四川 632560) 王厚明 刘 兰 姚小林 李国富

华西医科大学 罗德诚

自 1991 年 7 月以来,我们采用同个体前后对照试验,对食道心房调搏检查发现房室结双通道者使用生脉注射液,观察用药前后双通道有效不应期(ERP)的变化,现报告如下。

临床资料 凡 S_1S_2 刺激检出房室结双通道者均作为试验对象。其中男 4 例,女 3 例;年龄 28~64 岁,平均 52.3 岁;冠心病 3 例,心神经官能症 2 例,慢性支气管炎并阻塞性肺气肿 1 例,十二指肠球部溃疡 1 例。全部患者均有发作性心悸史,其中 1 例因阵发性室上性心动过速入院。

方 法 在食道心房调搏检查时,用 S_1 同步 S_2 程控扫描法检测房室结双通道,如果 S_1S_2 间期缩短 10 ms,而 S_2R 间期突然延长 >60 ms 诊断为房室结双通道。对检出房室结双通道者,静脉推注 50% 葡萄糖 20 ml 加生脉注射液 20 ml;用药后 15 min、30 min、45 min 重复 S_1S_2 刺激,测定用药前后房室结双通道 ERP。用药前后保持插管深度、刺激电压幅度、基础刺激 S_1 频率一致。

结 果 本组 7 例,6 例用药前房室结双通道有效不应期之差最大为 190 ms,最小为 10 ms,平均 76.7 ms,用药后 45 min ERP 之差最大为 20 ms,最小为 0 ms,平均 3.3 ms,其中 4 例为 0 ms,1 例用药前 ERP 之差为 10 ms,用药后增大为 50 ms。

讨 论 房室结双通道是形成房室结折返的基础,有房室结双通道不一定引起阵发性室上性心动过

速,但房室结双通道的存在为激动折返提供了结构基础。文中 4 例用药后双通道消失;其中 1 例反复发作的室上性心动过速也随之终止,正是由于消除了双通道,去除了房室结折返的结构基础,从而起到了终止及预防阵发性室上性心动过速的作用。文中 2 例用药后 ERP 之差明显缩小,1 例由原 130 ms 变为 10 ms,另 1 例由 110 ms 变为 20 ms。房室结双通道的传导性和有效不应期的相互关系是发生室上性心动过速的基础;有人认为,慢通道 ERP 虽然较快,通道 ERP 短,但如差距不明显,可能不发生室上性心动过速。此 2 例患者虽未使双通道消失,却缩小了双通道 ERP 差距,使诱发窗口缩小,不利于折返形成。研究表明,生脉注射液可增加冠脉血流量,降低心肌耗氧量,增加心肌对缺血缺氧的耐受性;通过抑制毛细血管的通透性,有非特异性抗炎作用;我们认为生脉注射液可能有调节心脏神经,恢复神经支配平衡的作用。生脉注射液通过这些作用去除了双通道的形成原因,使双通道消失或 ERP 之差缩小。

文中 1 例显示了相反的结果,其双通道 ERP 之差由 10 ms 增加为 50 ms,其机理不清。现认为抗心律失常药有双相调节作用,既有抗心律失常又有致心律失常作用;虽然生脉注射液不是抗心律失常药物,但许多资料证实它有抗心律失常作用;上述相反结果可能是生脉注射液双相作用的一种表现形式。

improved and lung index, value of LPO, TXB₂ decreased significantly, 6-keto-PGF₁α increased slightly, the ratio of TXB₂/6-keto-PGF₁α was stabilized. It was suggested that TMP has definite therapeutic effects on AHNIP-related lung injury in rats, and exerted by scavenging oxygen free radical, inhibiting synthesis of TXA₂, augmenting production of PGI₂ and maintaining balance between TXA₂ and PGI₂.

Key words tetramethylpyrazine, acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, thromboxane, oxygen free radical (Original article on page 610)

Effect of Japanese *Ganoderma Lucidum* on Production of Interleukin-2 from Murine Splenocytes

Zhang Luo-xiu (张罗修), Mong Hong (孟虹), Zhou Xian-biao (周贤彪), et al
School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai (200032)

The purpose of this study was to determine the effect of *Ganoderma lucidum* (GL) planted in Japan on the production of Interleukin-2 (IL-2) from murine splenocytes. It was observed that hydrocortisone (HC) 0.025–1 μg/ml could significantly antagonize the inhibitory activity of IIC and CSA to increase the production of IL-2 in vitro, $P < 0.01$. When the splenocytes pretreated with GL alone or in combination with HC, it was shown that pretreatment alone had no significant effect on IL-2 production, but preincubating splenocytes with IIC and GL resulted in a significant increase of IL-2 production when compared with that of HC group, $P < 0.01$. In vivo, GL 300 mg/kg could increase the production of IL-2 when oral taken GL alone or in combination of IIC.

Key words *Ganoderma lucidum*, interleukin-2 (Original article on page 613)

Effect of *Astragalus Membranaceus* on Myoelectric Activity of Small Intestine

Yang De-zhi (杨德治), et al
Nanjing Railway Medical College, Nanjing (210009)

Astragalus membranaceus (AM) is one of the important Chinese medicinal herbs which are widely used and well known for its invigoration of vital energy. In the present experiment, the cycle duration of interdigestive myoelectric complex (IDMEC) and the durations of every phase were observed electrophysiologically before and after the 25% concentrated solution (1ml/kg) was instilled into the empty stomach of the healthy, awakened dog. Signals of IDMEC were recorded by microcomputer. No significant change was found in duodenum in each criteria except for phase which became slightly longer ($P < 0.05$). While in jejunum the shortening of phase I and the prolonging of phase II were both significant ($P < 0.01$) and the cycle duration was also extended ($P < 0.05$) as well as increase of action potential on phase II and within the cycle ($P < 0.05$), with phase III and IV remained unchanged ($P > 0.05$). These results indicated that AM could strengthen the movement and muscle tonus in intestine (esp. in jejunum) and might serve as the scientific evidences to elucidate the effects of AM on the movements in digestive tracts.

Key words *Astragalus membranaceus*, invigoration, intestine electroactivity, drug effect, computer (Original article on page 616)

• 消息 •

《中国中医药情报杂志》将于11月创刊,本刊由国家中医药管理局主管,全国中医药图书情报工作委员会和中国中医研究院中医药信息研究所主办。本刊为双月刊,48页,16开本,逢双月出刊。本刊开辟的主要栏目有:政策与管理、发明与专利、技术开发与科研成果、环球医风、求医指南、专题论坛、中外杏林之星、民族医药撷英、国内信息总汇等。竭诚欢迎各位热心读者踊跃投稿,欢迎订阅。联系地址:北京东直门内北新仓18号 中国中医研究院中医院信息研究所《中国中医研究院中医药情报杂志》编辑部。邮政编码:100700。