

· 博士之窗 ·

白附子对人 T 细胞和单核细胞的调节活性*

单保恩¹ 张金艳¹ 李巧霞¹ 乔芳¹ 李宏¹ 叶静¹ 杜肖娜¹ 山下优毅² 黑田悦史²

内容提要 目的:研究中药白附子的免疫学调节活性。方法:用³H 介入法测定了中药白附子提取物(Rhizoma typhonii extract, RTE)对小鼠脾细胞和人淋巴细胞的增殖活性;用绵羊红细胞花结形成试验分离纯化淋巴细胞后,检测了 RTE 的效应细胞;用⁵¹Cr 游离实验测定了人杀伤细胞和自然杀伤细胞的杀伤活性,用 ELISA 法和生物法研究了单核细胞的细胞因子产生,并用³H 介入法分析了单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能;用层析法分析了白附子的化学成分,并用 SDS-PAGE 法测定了其有效成分的分子量。结果:RTE 对小鼠脾细胞和人淋巴细胞的增殖活性有很强的促进作用,并有较好的量效关系;RTE 的效应细胞是 T 细胞;RTE 增强人杀伤细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤活性和自然杀伤细胞的非特异性杀伤活性、增强单核细胞的细胞因子(肿瘤坏死因子和白细胞介素 1)产生,并增强单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能。白附子的化学成分为 66 道尔顿的糖蛋白。结论:RTE 对人的 T 细胞和单核细胞有免疫增强作用,并通过刺激机体的免疫系统杀伤或吞噬肿瘤细胞和外来抗原,这些活性可应用于临床调节免疫功能和治疗肿瘤等疾病。

关键词 白附子 T 细胞 单核细胞 抗肿瘤活性 糖蛋白

Human T Cell and Monocyte Modulating Activity of Rhizoma Typhonii in Vitro SHAN Bao-en, ZHANG Jin-yan, LI Qiao-xia, et al *The Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050011)*

Objective: To study the immunological modulating activity of Rhizoma typhonii (RT) on lymphocytes in vitro. **Methods:** Effect of RT extract (RTE) on mice spleen cells and human lymphocytes proliferation was detected by sheep erythrocytes rosette forming test after lymphocytes had been isolated and purified. The activity of human killer cells and natural killer (NK) cells was tested using ⁵¹Cr free test. The production of cytokine of macrophages was examined using ELISA test and biological test and the phagocytic function of macrophage on tumor cell was determined using ³H incorporation assay. The chemical ingredients of RT were analyzed using chromatography and the molecular weight of their active principle was determined using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE) method. **Results:** RTE could markedly stimulate the mice spleen cells and human lymphocytes to proliferate in a dose-effect dependent manner; the effector cell of RTE is T cells. RTE enhanced human killer cell, the allo-antigen specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) activity and the nonspecific activity of NK cells. Furthermore, RTE stimulated macrophages to produce tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1), and enhanced phagocytic activity of macrophage to tumor cells. The elution of RTE from chromatography showed that the active principle of RT was glycoproteins in nature and had an apparent molecular weight of 66kDa. **Conclusion:** RTE has immunoenhancing activity to human T cell and macrophage, through stimulating the killer cell and phagocytosis of tumor cell and allo-antigen, which could be used clinically for modulating immune responses and for treating tumor and other diseases.

Key words Rhizoma typhonii, T cell, macrophage, anti-tumor activity, glycoprotein

白附子为毛茛科多年生草本植物乌头的块根上所附生的块状子根,主要功效为强心、镇痛、抗炎、消炎和

扩张血管⁽¹⁾。有报道白附子有免疫学活性⁽²⁾,但都是应用动物模型所做的试验,而且其免疫调节机制还尚未明了。本研究应用小鼠脾细胞和人淋巴细胞研究了 RTE 对小鼠和人的免疫调节机制和抗肿瘤机制。

* 与日本合作课题,为博士后工作

1. 河北医科大学第四医院科研中心(石家庄 050011); 2. 日本产业医科大学免疫学教研室(北九州市 807-8555)

材料和方法

1 实验动物 BALB/c 小鼠,购自 Seiwa 实验动物中心(Yoshitomi, Ohita, Japan)。雌雄兼用,6~8 周龄。

2 白附子的提取 1g 白附子浸泡于 100ml 蒸馏水中,过夜后用微火煮沸 60min,待凉后用滤纸过滤,并用一次性针头滤器(Nippon Millipore Ltd., Tokyo, Japan)抽滤后放冰箱备用。

3 脾细胞及人外周血淋巴细胞的分离和增殖反应分析 脾细胞:将小鼠折颈处死后,无菌操作取脾脏,并制成细胞悬液。人周围血淋巴细胞:肝素抗凝血用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(即淋巴细胞)。脾细胞和淋巴细胞(2×10^5)与 $10 \mu\text{g/ml}$ 刀豆素 A(Con A, EY Laboratories, San Moteo, CA, U.S.A.) 0.01% SAC(Staphylococcus aureus cowan I, Funakoshi Yakuhin Co., Tokyo, Japan)或不同稀释倍数的 RTE(对照组为 PBS)在含有 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI1640 培养基中,于 96 孔培养板(No. 3072, Falcon Plastics, Oxuard CA, U.S.A.)在 5% CO_2 和 95% 空气并在 37℃ 条件下(培养条件下同)培养 3 天。在培养结束前 15h 各培养孔加入 $0.5 \mu\text{Ci}$ (微居里)的 ^3H -胸腺嘧啶(^3H -TdR, 特异性活性为 6.0Ci/mmol , Amersham Plc, Buckinghamshire, U.K.)。用细胞收集器(上海跃进医疗器械厂)将细胞收集⁽³⁾。细胞内结合于 DNA 的放射线的量用多功能液体闪烁仪(LS6500, Beckman counter, U.S.A.)测定。结果用结合于小鼠脾细胞和淋巴细胞的 ^3H -TdR 和平均每分钟放射活性计数(cpm)表示。

4 人外周血 T 细胞、B 细胞和抗原提呈细胞(APC)的分离 采用文献⁽⁴⁾方法分离的淋巴细胞与绵羊红细胞(SRBC)以 1:100 的比例混合,37℃ 培养 15min,130g 离心 5min,置冰浴中培养 3h,轻轻将淋巴细胞/SRBC 悬起,采用密度梯度离心后,收集淋巴细胞分离液上之细胞层,经洗涤后,作为 B 细胞使用;收集管底与 SRBC 结合的 T 细胞,经用 Tris- NH_4Cl 溶解 SRBC 后,作为 T 细胞使用。未分离前抗 CD_{20}^+ 细胞为 70%,抗 CD_3 阳性细胞占 30%,经用流式细胞仪分析确认,T 细胞成分含有 $>90\%$ CD_3^+ 细胞, $<5\%$ CD_{20}^+ 细胞;B 细胞成分含有 $>90\%$ CD_{20}^+ 细胞, $<5\%$ CD_3^+ 细胞。单核细胞作为 APC 从外周血淋巴细胞中分离。将淋巴细胞于培养瓶中(No. 3050, Triangular Flask, Costar, U.S.A.)37℃ 培养 2h,弃去非贴壁细

胞,用 Hanks 液洗 2 次后,用刮刀收集贴壁细胞作为 APC 使用。

5 杀伤性 T 细胞的细胞毒活性测定 人淋巴细胞(2×10^6)与 Mitomycin C(MMC),处理过的成人 T 细胞白血病细胞株 MT-2(10^5)在 RTE(空白加 PBS)作用下,37℃ 培养 5 天,以诱导对 MT-2 有特异性的杀伤细胞。其杀伤活性用 ^{51}Cr 游离实验测定⁽⁵⁾;将用放射性铬酸钡(^{51}Cr)标记的 MT-2(10^4)细胞分别与 6.25×10^4 , 12.5×10^4 , 25×10^4 激活的杀伤性 T 细胞在 0.2ml 培养液中培养 5h,将培养板离心收集每孔之上清液,测定上清液中的放射线活性(cpm)。特异性杀伤百分率计算公式为[(试验孔 cpm - 对照孔 cpm) / (最大释放 cpm - 对照孔 cpm)] $\times 100\%$ 。最大释放值为 ^{51}Cr 标记的 MT-2 细胞与 1% Nonidet P-40 培养后所得的上清液 cpm,对照孔值为 ^{51}Cr 标记的 MT-2 细胞与未经激活的淋巴细胞培养后所得的上清液 cpm。

6 NK 细胞活性测定 NK 细胞活性测定系统与杀伤性 T 细胞活性测定方法相同,只是淋巴细胞没有经过 5 天的特异性杀伤活性诱导期,而且靶细胞使用的是人单核细胞性白血病细胞株 U937 细胞。

7 肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)的产生和分析 人淋巴细胞于培养瓶中培养 2h 后,弃去非贴壁细胞,用刮刀收集贴壁细胞并将其(5×10^5)与 $10 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, Sigma Chemical Co.)或 RTE 在 37℃ 培养 24h 后,培养上清液中的 TNF- α 含量采用对 TNF- α 敏感的纤维母细胞株(L929)用生物法测定⁽⁶⁾。IL-1 含量用 ELISA 法测定(试剂盒采用 Pharmingen 产品)。

8 单核细胞吞噬功能分析 人单核细胞(5×10^4)与 RTE(空白加 PBS)在 37℃ 培养 24h,加入肿瘤细胞(试验 1: X5563, 试验 2: Yac-1 细胞),37℃ 继续培养 48h,培养结束前 15h 各培养孔加入 ^3H -TdR,收集细胞并计数由细胞吸收的 ^3H -TdR 量⁽⁸⁾。结果用抑制百分率表示。对肿瘤细胞抑制率的公式为[1 - (肿瘤细胞 cpm + 单核细胞 cpm - 单独单核细胞 cpm) / 单独肿瘤细胞 cpm] $\times 100\%$ 。

9 有效成分的提取 将 2ml RTE 加样于 Sephacryl S-200 层析柱($2 \times 50\text{cm}$),用 PBS 平衡流速至 10ml/h。每管收集 2ml 层析液。各管中的蛋白质含量用紫外分光光度计测定 280nm 吸光光度值,糖含量用酚-硫酸法测定,结果用 492nm 吸光度值表示⁽⁹⁾。各成分的活性由 ^3H 介入法测定对人淋巴细胞的增殖反应作用,结果用 ^3H -TdR 吸入量(cpm)表示。对淋巴细胞有增殖活性的成分,采用 SDS-PAGE 测定其分

表 1 RTE 的效应细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

淋巴细胞 培养与处理	³ H-TdR 吸收量 (cpm)				
	未纯化淋巴细胞	单独 T 细胞	T 细胞 + APC	单独单核细胞	单独 B 细胞
PBS	466.0 ± 55.0	276.4 ± 15.6	334.5 ± 37.6	242.2 ± 19.2	641.3 ± 73.1
Con A	6770.0 ± 274.7*	948.7 ± 83.8*	1548.3 ± 159.8*	262.5 ± 39.5	730.2 ± 12.4
SAC	1825.8 ± 248.9*	355.8 ± 74.7	455.8 ± 11.3*	246.0 ± 11.0	1471.3 ± 175.0*
RTE	680.7 ± 11.6*	365.2 ± 30.2	742.6 ± 52.1*	293.3 ± 5.6	477.3 ± 62.7

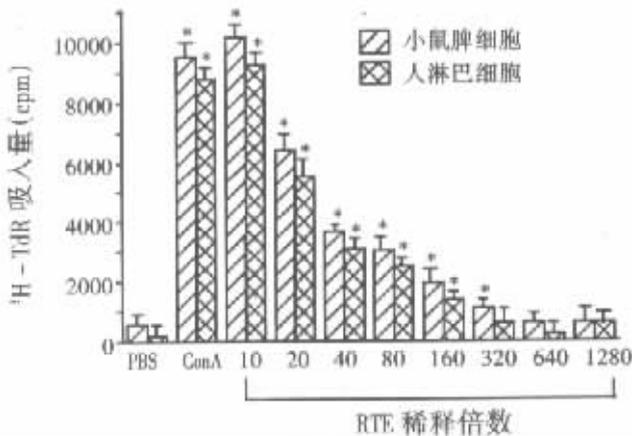
注:与 PBS 处理比较, *P < 0.01

子量。

10 统计学处理 数据用均值 ± 标准差表示。计量资料用 *t* 检验, 两组数据计算相关系数的显著性检验。

结 果

1 RTE 对小鼠脾细胞和人淋巴细胞的增殖活性作用 见图 1。RTE 显著地刺激了小鼠脾细胞的增殖并有较好的量效关系 (*P* < 0.01)。RTE 也显著地刺激了人淋巴细胞的增殖 (*P* < 0.01)。



注:与同组 PBS 处理比较, *P < 0.01

图 1 不同浓度 RTE 对小鼠脾细胞和人淋巴细胞的增殖反应作用

2 RTE 的效应细胞测定 见表 1。未处理的淋巴细胞对 Con A、SAC 和 RTE 的刺激有较强的增殖活性 (*P* < 0.01); Con A 作为 T 细胞的特异性有丝分裂原可使单独的 T 细胞增殖, 但 SAC 和 RTE 不能引起单独 T 细胞的增殖; 当加入 APC 后, RTE 可使 T 细胞增殖活性增强; SAC 作为 B 细胞的特异性有丝分裂原可使 B 细胞增殖, 而 RTE 则不能; 该结果表明 RTE 的效应细胞是 T 细胞。

3 RTE 对杀伤性 T 细胞和 NK 细胞的细胞毒活性的影响 见表 2。RTE 显著地增强了人杀伤性 T 细胞对 alo-antigen 特异性细胞毒活性 (*P* < 0.01)。

RTE 也增强了 NK 细胞的杀伤活性 (*P* < 0.01)。

4 RTE 对单核细胞细胞因子产生的影响 见表 3。RTE 显著刺激人单核细胞产生 TNF- α 和 IL-1 (*P* < 0.01)。

5 RTE 对单核细胞对肿瘤细胞吞噬功能的影响 见表 4。RTE 对人单核细胞的增殖无抑制作用 (*P* > 0.05), 单独对肿瘤细胞也无明显抑制作用 (*P* > 0.05), 当加入单核细胞后对肿瘤细胞显示了较强的抑制作用 (*P* < 0.01)。这说明 RTE 是通过刺激机体的免疫系统来抑制肿瘤生长的。

6 RTE 的有效成分分析 提取了白附子的有效成分, 通过 Sephacyrl S-200 层析柱分离后, 从层析分离曲线上看, 对人淋巴细胞有增殖活性的峰由蛋白质和糖成分重叠, 该峰成分的活性对蛋白酶消化和 NaIO₄ 处理都敏感 (结果未显示), 证明该成分为糖蛋白物质, 经用 SDS-PAGE 测定分析该糖蛋白的分子量为 66KDa (图 2), 泳道 M 为标准蛋白质, 泳道 A 为蛋白染色 (CBB 染色); 泳道 B 为糖染色 (periodic acid-schiff, PAS 染色)。

表 2 RTE 对人杀伤性 T 细胞和 NK 细胞杀伤作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

淋巴细胞的处理	刺激细胞及其靶细胞	对靶细胞的特异性杀伤率 (%)		
		反应细胞与靶细胞的比率		
		25:1	12.5:1	6.25:1
杀伤性 T 细胞				
PBS	MT-2	40.0 ± 1.3	28.3 ± 1.6	16.4 ± 0.6
RTE	MT-2	59.4 ± 3.8*	39.0 ± 3.8*	32.1 ± 0.1*
NK 细胞				
PBS	U937	14.3 ± 1.3	10.1 ± 1.1	2.6 ± 0.6
RTE	U937	22.4 ± 1.0*	23.6 ± 0.4*	10.4 ± 0.2*

注:与 PBS 处理比较, *P < 0.01

表 3 RTE 对人单核细胞 TNF- α 、IL-1 产生的影响 ($\bar{x} \pm s$)

单核细胞 培养与处理	TNF- α (U/ml)	IL-1 (μ g/L)
PBS	26.4 ± 1.2	18.0 ± 0.5
LPS	319.2 ± 9.2*	520.1 ± 5.5*
RTE	266.0 ± 5.2*	560.7 ± 33.5*

注:与 PBS 处理比较, *P < 0.01

表 4 RTE 对人单核细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

反应细胞的处理	$^3\text{H-TdR}$ 吸收量 (cpm)			抑制率 (%)
	单核细胞 + 肿瘤细胞	单独单核细胞	单独肿瘤细胞	
试验 1				
PBS	20318.4 ± 121.3	136.0 ± 48.5	22191.1 ± 637.1	9.1 ± 2.4
RTE	16290.3 ± 34.3	143.3 ± 18.3	21977.3 ± 896.1	26.3 ± 0.4*
试验 2				
PBS	55142.7 ± 342.5	124.6 ± 54.9	58481.6 ± 683.9	5.9 ± 0.5
RTE	40895.7 ± 227.8	379.1 ± 27.2	52624.9 ± 365.1	23.0 ± 1.5*

注:与 PBS 处理比较, * $P < 0.01$

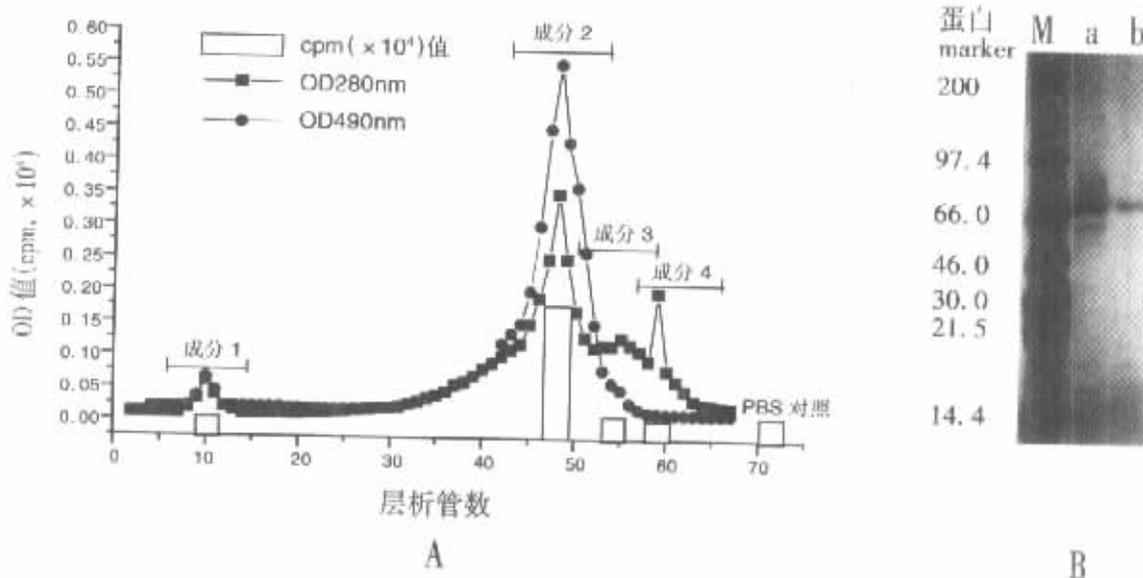


图 2 RTE 有效成分提取 A 为层析曲线和细胞增殖曲线 ;B 为成分 2 的 SDS-PAGE 电泳结果 ;M :标准蛋白质 ;a :CBB 染色 ;b 糖染色。与 PBS 对照组相比有显著性差异, * $P < 0.01$

讨 论

中药可以治疗很多疾病尤其是自身免疫性疾病和肿瘤等而且以副作用小而著称。然而许多中药的作用机制和有效成分尚未明了。本研究应用小鼠脾细胞和人外周血淋巴细胞检测了 RTE 对小鼠和人体的免疫调节活性和抗肿瘤活性并提取了其有效成分。RTE 可显著刺激小鼠脾和人淋巴细胞进行增殖,并有较好的量效关系。RTE 不但刺激人淋巴细胞增殖还增强了其功能如 T 细胞的细胞毒活性和 NK 细胞活性; RTE 刺激单核细胞产生细胞因子如 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 等,并增强单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能。以上这些结果可以说明 RTE 对人体的免疫功能有调节作用,并通过刺激机体的免疫系统抵抗肿瘤的生长和外界抗原的入侵。

有些中药被报道有抗诱变和抗肿瘤活性⁽⁹⁾,抗肿瘤活性是与其增强免疫功能有关。本研究我们着重进行了体外实验研究,但作为预实验我们也发现向患肿瘤小鼠体内投入 RTE 后明显抑制了肿瘤的生长,恢复

了被抑制的免疫功能,与对照组比较,寿命明显延长(结果未显示)。这说明 RTE 不仅在体外,在体内也有免疫调节作用和抗肿瘤作用。另外, RTE 对人淋巴细胞和小鼠脾细胞都有免疫调节活性,证明 RTE 的活性对人和小鼠没有种属特异性,这样就可以用小鼠作系统的体内试验研究。我们认为在体内 RTE 作用于免疫系统使 T 细胞和单核细胞发挥协同作用更加增强了免疫效应。

有报道,一些从高等植物由来的多糖提取物作为生物反应修饰剂有免疫调节活性和抗肿瘤活性^(10,11);肉桂如同其多糖或糖蛋白提取物一样可增强单核细胞的吞噬作用并抑制肿瘤的生长。本结果显示白附子的有效成分其分子量约为 66 道尔顿,在其活性峰上有蛋白质和糖质峰重叠,为了进一步证实该有效成分是一种糖蛋白,对该成分分别进行了蛋白酶消化和 NaIO_4 处理,结果该成分对这两种处理均敏感(结果未显示),证明该有效成分是一种糖蛋白。

《新华本草纲目要》和《全国中草药汇编》上记载白附子主要功效为强心和镇痛,我们也分析了白附子化

学成分,结果显示白附子对小鼠和人有免疫调节作用,并通过刺激机体的免疫系统抵抗肿瘤的生长和其他疾病的发生。该结果对更有效地开发白附子的药理活性提供有效的数据。

参 考 文 献

1. 崔树德. 中药大全. 哈尔滨. 黑龙江科学出版社, 1989:302.
2. 吴厚铭, 黄胜余, 劳霞飞, 等. 白花蛇舌草免疫多糖研究. 有机化学 1992 ;12(4):43.
3. Shan BE, Zeki K, Sugiura T, et al. Chinese medicinal herb, *acanthopanax gracilistylus*, extract induces cell cycle arrest of human tumor cells in vitro. *Jpn J Cancer Res* 2000 ;91:383—389.
4. Tanaka Y, Shirakawa F, Ota T, et al. Mechanism of spontaneous activation of B cell in patients with systemic lupus erythematosus: Analysis with anti-class II antibody. *J Immunol* 1998 ;140:761—767.
5. Ruff RM, Gifford EG. Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J Immunol* 1980 ;12:1671—1677.
6. Shan BE, Yaoshida Y, Kuroda E, et al. Immunomodulating

- activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1999 21:59—70.
7. Kurata S, Tsuchiya T, Norimura T, et al. Evidence for cytostatic T cell activity in the effect or mechanism against syngeneic TMT mammary tumor cells in mice. *J Immunol* 1983 ;130:496—500.
8. Oka S, Shigeta S, Ono K, et al. An epitope residing in carbohydrate chains of sea squirt antigen termed Girep. *J Allergy Clin Immunol* 1987 ;80:57—63.
9. Ye J, Ding M, Zhang X, et al. On the role of hydroxyl radical and the effect of tetrandrine on nuclear factor-kappa B activation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Ann Clin Lab Sci* 2000 ;30:65—71.
10. Ohtake N, Suzuki R, Diakuhara H, et al. Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saoko-to. *Int J Immunopharmacol* 2000 ;22:419—430.
11. Liu JW, Nagao N, Kageyama K, et al. Anti-metastatic effect of an autooxidation-resistant and lipophilic ascorbic acid derivation through inhibition of tumor invasion. *Anti Cancer Res* 2000 20:113—118.

(收稿 2001-03-05 修回 2001-06-03)

透参汤外用治疗输液后局部皮肤瘀血肿胀 50 例

张 萍 张建昆

长期接受静脉输液患者,由于多种原因常造成局部皮肤瘀血、肿胀,从而影响了治疗的顺利进行。传统习惯用硫酸镁湿敷,但效果不佳。我们采用中药透参汤外洗湿敷取得较好疗效。报道如下。

临床资料 100 例均为内科住院患者。均因接受静脉输液而造成进针局部瘀肿,瘀肿范围直径 >2cm 者。随机平均分为两组,每组各 50 例。治疗组 50 例,男 30 例,女 20 例,年龄 55~89 岁,平均 74 岁。对照组 50 例,男 30 例,女 20 例,年龄 50~75 岁,平均 65 岁。两组资料差异无显著性,具有可比性。

治疗方法 治疗组采用透参汤(由透骨草 50g,丹参 30g,黄芪 30g 组成,将上述药物先用开水浸泡 30min,再煎煮 30min,取汁 1000ml,水温约 30~40℃)将患处浸泡于药汁中,每次 15min,对照组采用硫酸镁 50g 溶于 200ml 温开水中,然后湿敷患处,每次 15min;两组均为每天 3~4 次,治疗 3~5 天。统计学方法采用 *Ridit* 检验。

结 果 (1)疗效标准:治愈:局部皮肤瘀血、肿胀消失。

有效:局部皮肤瘀血减轻、肿胀基本消失。无效:局部皮肤瘀血、肿胀无改善。(2)结果:治疗 1 周后治疗组 50 例,治愈 28 例,有效 21 例,无效 1 例,总有效率 98%。对照组 50 例,治愈 18 例,有效 20 例,无效 12 例,总有效率 76%。两组比较,差异有显著性($u = 2.52, P < 0.05$)。

体 会 静脉输液后局部皮肤瘀血、肿胀情况临床较为常见,传统的治疗方法为硫酸镁湿敷患处,从疗效来看,硫酸镁仅能减轻局部的肿胀,而对皮下瘀血几乎无治疗作用。我们采用中药外洗的办法,解决了这一问题,特别对皮下瘀血的消散有显著的疗效。透参汤具有祛风除湿通络、活血祛瘀消肿之功效。从现代药理来看,透骨草含挥发油,其主要成分为水杨酸甲酯,具有镇痛、抗炎消肿之功(蔡永敏,任玉让,王黎等主编. 中药药理与临床应用. 北京:华夏出版社,1999:574);丹参含丹参酮及维生素 E,能改善微循环而达到活血祛瘀;黄芪具有营养和保护血管的作用,可增强消肿之功(张昭原. 袖珍中药手册. 石家庄:河北科学技术出版社,1996:386,387,429)。

(收稿 2001-05-25 修回 2001-07-16)

昆明市盘龙区中医院(昆明 650051)