

·博士之窗·

黄芪提取物免疫调节活性的体外实验研究^{*}王润田¹ 单保恩² 李巧霞² 唐建发² 乔芳² 杜肖娜² 李宏² 叶静²

内容提要 目的:研究黄芪提取物(*Astragalus membranaceus* extract, AME)对人的外周血免疫细胞(PBIC)免疫功能的调节作用。方法:采用³H-TdR 掺入法分析 AME 对外周血单个核细胞(PBMC)的增殖活性及对外周血粘附单核细胞(PBAM)吞噬肿瘤细胞的影响;采用⁵¹Cr 释放法测定 AME 对杀伤性 T 细胞(CTL)杀伤肿瘤细胞的影响;用 ELISA 法和生物学法研究 AME 对外周血 B 细胞(PBBC)产生 IgG 及对 PBAM 产生细胞因子的影响;采用 SDS-PAGE 分析 AME 的蛋白组成。结果:AME 能促进 PBMC 的增殖;提高 CTL 对肿瘤细胞的杀伤活性;增强 PBAM 对肿瘤细胞的吞噬和产生细胞因子的功能;促进了 PBBC 产生 IgG;AME 含有多种蛋白成分。结论:AME 对人免疫功能有增强作用,提高了抗肿瘤免疫效应,可应用于临床调节免疫功能和治疗肿瘤等疾病。

关键词 黄芪提取物 免疫调节 人外周血免疫细胞 免疫功能

Extracorporeal Experimental Study on Immuno-Modulatory Activity of *Astragalus membranaceus* Extract
WANG Run-tian, SHAN Bao-en, LI Qiao-xia, et al Department of Immunology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)

Objective: To study the effect of *Astragalus membranaceus* extract (AME) in regulating the immune function of human peripheral blood immune cells (PBIC) in vitro. **Methods:** Effects of AME on the proliferation activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the tumor cell phagocytosis of peripheral blood adherent monocytes (PBAM) were measured by using ³H-TdR incorporation. Effect of the tumor-killing activity of cytotoxic T-lymphocyte (CTL) was determined by using ⁵¹Cr-releasing assay. Effects on production of IgG by peripheral blood B cells (PBBC) and IL-6 by PBAM were tested by means of ELISA, and effect on production of TNF- α by PBAM was studied by means of biological method. Besides, the protein elements of AME were analysed by SDS-PAGE. **Results:** AME could promote the proliferation of human PBMC, elevate the tumor cell-killing activity of CTL, strengthen the tumor cell phagocytosis and cytokines (TNF- α and IL-6) production of PBAM, and promote the IgG production of PBBC. AME contained multiple protein elements. **Conclusion:** AME has effect in enhancing human immuno-function and anti-tumor activity, it could be applied in clinical practice for immuno-modulation and tumor treatment.

Key words *Astragalus membranaceus* extract, immuno-modulation, human peripheral blood immune cells, immuno-function

黄芪为豆科多年生草本植物,主要功效为补气升阳,益气固表,托毒生肌,利水消肿。有报道黄芪有抗肿瘤和增强网状内皮系统吞噬功能的作用⁽¹⁾。近年来,对黄芪的研究多集中在强心作用和抗菌作用方面,对其免疫调节机制研究尚不充分。本研究采用人外周

血单个核细胞(PBMC)和粘附的单核细胞(PBAM)体外研究了黄芪提取物(*Astragalus membranaceus* Extract, AME)对免疫功能的调节活性。

材料和方法

1 药物 AME:lg 黄芪浸泡于 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)抽滤后放冰箱备用。

^{*} 河北省教育厅攻关课题基金(No. 2000112)

1. 河北医科大学基础研究所免疫室(石家庄 050017) 2. 河北医科大学第四医院科研中心

2 PBMC 的分离和增殖反应分析 取肝素抗凝血用淋巴细胞分离液分离 PBMC。取 PBMC(2×10^5)分别与终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 刀豆素 A(Con A, EY Laboratories, San Moteo, CA, USA)、0.005% SAC(*Staphylococcus aureus* cowan I, Funakoshi Yakuhin CO. Tokyo, Japan)或不同稀释倍数的 AME 一起,以含 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 为培养基,在 96 孔培养板(No. 3072, Falcon Plastics, Oxuard, CA. USA)孔内进行培养,一式 3 个复孔,5% CO_2 , 饱和湿度, 37°C (培养条件下同)培养 3 天(阴性对照孔加 PBS)。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 $6.0 \text{Ci}/\text{mmol}$, 中国原子能研究所)。用细胞收集器(上海跃进医疗器械厂)将细胞收集,用多功能液体闪烁仪(LS6500, Beckman counter, USA)测定 cpm 值⁽²⁾。

3 CTL 活性测定 PBMC(2×10^6)与 Mitomycin C 处理过的成人白血病细胞株 MT-2(1×10^5)在终浓度为 1:40 稀释的 AME(对照加 PBS)作用下, 37°C 培养 5 天,以诱导对 MT-2 有特异性杀伤活性的 CTL。其杀伤活性用放射性铬酸钠(^{51}Cr)释放实验测定⁽³⁾;将 ^{51}Cr 标记的 MT-2(1×10^4)细胞分别与 6.25×10^4 、 12.5×10^4 、 25×10^4 上述诱导的杀伤性细胞在 0.2ml 培养液中培养 5h,离心培养板,收集每孔之上清液,测定上清液中的放射线活性(cpm)。特异性杀伤活性百分率计算公式: $[(\text{试验孔 cpm} - \text{对照孔 cpm}) / (\text{最大释放 cpm} - \text{对照孔 cpm})] \times 100\%$ 。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。

4 外周血粘附单核细胞(PBAM)产生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的测定 PBMC 于培养瓶中培养 2h 后,弃去非粘附细胞,用刮刀收集贴壁细胞并将其(5×10^5)与终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, Sigma Chemical Co.)或终浓度为 1:40 稀释的 AME,对照加 PBS, 37°C 培养 2h,上清液中的 $\text{TNF-}\alpha$ 含量用对 $\text{TNF-}\alpha$ 敏感的纤维母细胞株(L929)采用生物学法测定⁽⁴⁾。IL-6 含量采用 ELISA 法测定。

5 外周血 B 细胞(PBBC) IgG 的产生和分析 PBBC(5×10^3)与终浓度为 0.005% SAC 或终浓度为 1:40 稀释的 AME,对照加 PBS,在 37°C 培养 7 天,收集上清液。用 ELISA 法⁽⁵⁾测定其中的 IgG 的含量。

6 PBAM 对肿瘤细胞吞噬功能的分析 按文献⁽⁶⁾方法操作,主要是如上制备的人外周血贴壁单核细胞(5×10^5 ,对照用完全培养基代替)与终浓度为 1:40 稀释的 AME(对照用 PBS 代替), 37°C 培养 24h,加

入肿瘤细胞(X5563 细胞 5×10^5 ,对照用完全培养基代替), 37°C 继续培养 48h,培养结束前 15h 各培养孔加入 ^3H -TdR,收集细胞测定 cpm 值。

7 AME 蛋白成分分析 采用 SDS-PAGE 法⁽³⁾分析,蛋白 marker 用日本产中高分子量(MW: 14.4kD-200.0kD)蛋白标准(日本和光纯药工业株式会社,日本大阪)。

8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验组与对照组间采用成组设计两个样本均数比较的 t 检验。

结 果

1 AME 对 PBMC 增殖活性的影响 见表 1。与 PBS 比较,AME 显著地刺激了 PBMC 的增殖并有浓度依存性($P < 0.01$)。由于 1:40 稀释的 AME 作用最强,所以在以后的实验中均采用 1:40 稀释的 AME。

2 AME 对 CTL 杀瘤活性的作用 见表 2。与 PBS 比较,AME 显著地增强 CTL 细胞对 MT-2 肿瘤细胞特异性杀伤活性($P < 0.01$)。

3 AME 对 PBBC 产生 IgG 的影响 见表 2。与 PBS 比较,AME 显著地刺激 B 细胞 IgG 的产生($P < 0.01$),且效力与 SAC 相当。

4 AME 对 PBAM 产生细胞因子的影响 见表 3。与 PBS 比较,AME 显著刺激人外周血粘附单核细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6($P < 0.01$)。

5 AME 对 PBAM 吞噬肿瘤细胞功能的影响 见表 4。AME 单独对人外周血粘附单核细胞的 ^3H -TDR 摄取无抑制作用($P > 0.05$),单独对肿瘤细胞的 ^3H -TDR 掺入量也无明显抑制作用($P > 0.05$),但却能使其作用的 PBAM 加肿瘤细胞培养孔的细胞的 ^3H -TDR 掺入量显著降低,说明 AME 显著促进了 PBAM 对肿瘤细胞的吞噬。

6 AME 的有效成分分析结果 见图 1。图中右泳道为 AME,左泳道为蛋白 marker。经 SDS-PAGE 分离,AME 显示有多种蛋白组成成分,分子量从 14.4kD 到 97.4kD 之间大小不等。

表 1 AME 对人 PBMC 增殖作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PBMC 的 cpm 值
PBS	31	293.5 ± 94.0
ConA	31	$1632.0 \pm 217.7^*$
SAC	31	$3098.0 \pm 56.0^*$
AME 1:80	31	$516.0 \pm 8.7^*$
1:40	31	$621.1 \pm 50.6^*$
1:20	31	$472.3 \pm 40.7^*$

注 与 PBS 组比较, * $P < 0.01$

表 2 AME 对 CTL 活性和对 PBBC 产生 IgG 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CTL (%)	IgG ($\mu\text{g/L}$)
PBS	23	2.3 $\pm$ 0.1	30.7 $\pm$ 19.0
SAC	23	—	74.0 $\pm$ 2.4 *
AME	27	18.7 $\pm$ 1.3 *	74.5 $\pm$ 2.3 *

注 与 PBS 组比较, * $P < 0.01$

表 3 AME 对 PBAM 产生 TNF- α 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF- α (U/ml)	IL-6 ($\mu\text{g/L}$)
PBS	20	38.7 $\pm$ 10.3	ND
LPS	18	160.6 $\pm$ 25.5 *	44.0 $\pm$ 2.5 *
AME	20	96.2 $\pm$ 5.7 *	6.0 $\pm$ 0.5 *

注 与 PBS 组比较, * $P < 0.01$; ND 表示未测出

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

组别	样本数	^3H -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	
PBS	18	20318.4 ± 1105.4	136.0 ± 48.5	21191.1 ± 637.1	4.7 ± 0.7
AME	18	12358.3 ± 349.5 *	166.0 ± 8.4	19724.0 ± 708.1	38.1 ± 1.2 *

注 与 PBS 组比较, * $P < 0.01$

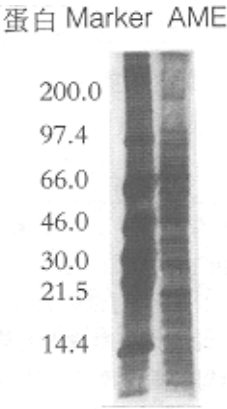


图 1 AME 经 SDS-PAGE 分离后 CBB 染色结果

讨 论

本研究用人外周血 PBMC 和 PBAM 等免疫细胞检测 AME 的免疫调节活性并分析其蛋白组成。发现 AME 显著地刺激人 PBMC 增殖。PBMC 中主要是淋巴细胞,在淋巴细胞中又主要是 T 和 B 细胞。从我们的结果可以看出,我们所制备的 PBMC 淋巴细胞对 T 细胞特异性有丝分裂原 Con A 和对 B 细胞特异性有丝分裂原 SAC 的刺激都有很强的反应性,证明所用 PBMC 淋巴细胞功能正常。虽然本实验未再从 PBMC 中分出 T 和 B 细胞分别测定 AME 对它们各自的刺激增殖作用,但从本实验 AME 可增强肿瘤细胞从 PBMC 诱导特异 CTL 杀伤功能以及能提高 PBMC 中 B 细胞(PBBC)产生 IgG,特别是我们将另文发表的 AME 能显著刺激小鼠脾细胞增殖,且刺激效力与 Con A 和 SAC 基本相当的结果,提示 AME 对 T 和 B 细胞

都有刺激增殖的能力。本实验中 AME 对 B 细胞刺激活性不是来自 LPS 的污染,因为,虽然小鼠脾细胞对 LPS 呈低反应性,但 AME 仍能显著刺激其增殖和 IgG 产生。Polymycin B 可以抑制 LPS 的反应,但不能抑制 AME 的活性。至于 AME 提高 PBMC 中 CTL 特异杀伤肿瘤细胞的活性是因其单纯刺激了 CTL 的增殖,使 CTL 数量增加所致,还是同时也增强了 CTL 功能效力所致,以及 AME 提高 PBBC 产生 IgG 是其直接作用于 B 细胞产生的效应所致,还是通过 Th₂ 产生 IL-4、IL-5、IL-6 等间接刺激 B 细胞产生抗体所致,都有待于进一步研究。

本研究还发现 AME 对外周血粘附的单核细胞(PBAM)没有促增殖作用,但却可提高其产生 TNF- α 和 IL-6,以及促进其对肿瘤细胞的吞噬作用。因此,就我们这些体外实验研究而言,AME 对 T、B 和单核细胞都有免疫增强作用。有报道有些中药有抗诱变和抗肿瘤活性⁽⁷⁾,且抗肿瘤活性是与其增强免疫功能有关⁽⁸⁾。我们在做这些体外实验的同时,还发现向荷肿瘤小鼠体内投入 AME 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(结果将另文发表)。这说明 AME 不仅在体外,在体内也有免疫调节作用和抗肿瘤作用。我们认为在体内 AME 作用于免疫系统使 T 细胞、B 细胞和单核细胞发挥协同作用更增强了免疫效应。这些结果提示,黄芪可用于刺激机体免疫系统抵抗肿瘤的生长和其他免疫相关疾病的发生,此为进一步开发黄芪的临床作用提供了有益的实验依据。

本研究用 SDS-PAGE 分析发现 AME 含有多重蛋白成分,还有多糖等多种其他药理成分,因此,其真正有效的免疫调节活性成分还有待于进一步的分离、纯化和研究。

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. 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.
3. Shan BE, Yaoshida Y, Sugiura T, et al. Suppressive effect of Chinese medicinal herb, Acanthopanax gracilistylus, extract on human lymphocytes in vitro. Clin Exp Immunol 1999 ;118: 41-48.
4. Ruff RM, Gifford EG. Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. J Immunol 1980 ;12: 1671-1677.

5. 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.

6. Kurata S, Tsuchiya T, Norimure T, et al. Evidence for cyto-static T cell activity in the effector mechanism against syngeneic TMT mammary tumor cells in mice. *J Immunol* 1983 130: 496-500.

7. 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.

8. 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.

(收稿 2001-06-25 修回 2002-02-26)

脾胃气虚与胃下垂关系的探讨

赵金勇 王朝晖

本研究通过对 138 例胃下垂患者进行中医辨证,分析胃下垂与脾胃气虚程度的相关性,将脾胃气虚进行量化评分,分组测量其胃下垂的距离进行分析,从而得出胃下垂程度与脾胃气虚程度呈正相关,现报告如下。

资料和方法

1 诊断与辨证标准 胃下垂诊断标准以上海第一医学院编写《X 线诊断学》胃下垂标准:立位时胃角低于双侧髂嵴连线。

中医辨证参照全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会于 1986 年 5 月制定的“中医虚证辨证参考标准”[《中西医结合杂志》1986 36(10):598]。

评分标准参照李明山等的标准(1994 年 9 月全国中医内科学会第六届脾胃病学术会议论文汇编),症状评分如下 神疲乏力 10 分,少气懒言 10 分,自汗 8 分,舌胖有齿痕 10 分,脉虚无力 10 分,大便溏泄 8 分,食后腹胀 4 分,面色萎黄 6 分,食欲减退 4 分,肌瘦无力 8 分,胃脘痛喜按得食则安 10 分,食入停滞 10 分,共 98 分,最低标准为 42 分。

2 临床资料 我们对 1995 年 6 月~2001 年 6 月在我院放射科进行上消化道钡餐造影,确诊为胃下垂的患者 138 例进行分析,其中男 67 例,女 71 例,年龄分布为 20 岁以下 28 例,21~40 岁 68 例,41~60 岁 37 例,60 岁以上 5 例。

3 观察方法 先对 138 例患者进行中医辨证评分,随后使用日本岛津胃肠机进行透视及摄片(晨起空腹禁食水,术前肌肉注射 654-2 20mg,15min 后,将青岛产硫酸钡 200g 与 50ml 温水调匀,让患者一次服下,拍摄立位腹平片,测量胃角与双侧髂嵴连线的垂直距离)。

4 统计学方法 采用 χ^2 检验及 *t* 检验。

结 果 脾胃气虚与胃下垂程度的关系比较 见表 1。对上述数据进行 χ^2 检验发现脾胃气虚患者胃角与髂嵴连线距离

差异有显著性($P<0.01$)。脾胃气虚分数越高,胃角离髂嵴连线的距离越远。说明胃下垂程度与脾胃气虚程度呈正相关。

表 1 脾胃气虚与胃下垂程度的关系比较 ($\bar{x} \pm s$)

脾胃气虚评分 (分)	例数 (例)	胃角与髂嵴连线距离 (mm)
42~50	24	12±5
51~60	27	25±19
61~70	36	34±11
71~80	34	41±7
81~98	17	53±6

讨 论 胃小弯弯曲最明显之处称为角切迹又称胃角。正常情况下,胃小弯由于小网膜的悬吊,位置比较固定,而胃大弯活动性较大。当胃下垂时,胃角降到髂嵴连线下。所以观察胃小弯与髂嵴连线的距离比观察胃大弯侧胃下极与髂嵴连线的关系更能准确判断胃下垂的程度。胃下垂中医又称“胃缓”,首见于《内经》,《灵枢·本藏篇》“脾应肉,肉 坚大者胃厚,肉 么者胃薄。肉 小而么者胃不坚,肉 不称身者胃下,胃下者,下管约不利,肉 不坚者胃缓”。中医学认为脾主升,具有升阳举陷的作用,从而维持体内脏器处于一定高度,脾胃气虚,升举无力,从而导致胃下垂。因而脾胃气虚是胃下垂的根本。本文通过胃钡餐摄影,观察胃角与髂嵴连线的距离,来判断脾胃气虚与胃下垂的关系,从而验证了脾虚下陷的中医理论,为中医辨证提供了客观依据。另外,在对以上胃下垂患者进行观察的同时,我们也发现,所有胃下垂患者,均有不同程度的胃炎表现。表现为胃粘膜纹增粗,胃小区大小不均,胃小沟增粗,甚而出现胃粘膜脱垂。其原因我们考虑为:胃下垂后,胃壁蠕动减弱,胃排空延迟,食物在胃内存留时间较长所致。这也从另一方面证实了胃下垂患者,为什么多具有食后腹胀,食欲减退,食入停滞及胃脘痛喜按等脾胃气虚症状。

(收稿 2000-03-17 修回 2001-01-15)