

also inhibited platelet thrombonane A_2 release induced by collagen, but did not affect the formation of aortic wall PGI_2 , PTS 50~200mg/kg significantly inhibited experimental thrombosis in rats. These results showed that the anti-thrombosis action of PTS may be due to its inhibitory action on platelet aggregation and TXA_2 release.

淫羊藿甙的体外免疫调节作用研究[△]

山东医学科学院基础所免疫室(济南 250001) 赵 勇* 张 玲 王 芸 毛海婷 崔正言

摘 要 淫羊藿甙是从朝鲜淫羊藿中提取的主要单体。采用依赖细胞株法和乳酸脱氢酶 4h 释放法,分别检测了淫羊藿甙协同诱导 IL-2、IL-3、IL-6,及对 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响。结果表明:淫羊藿甙可协同 PHA 诱导扁桃体单个核细胞产生 IL-2、3、6 呈剂量依赖关系,动力学观察表明:IL-2、IL-6 的分泌高峰时相为作用后 48h,IL-3 的分泌高峰时相为作用后 72h。淫羊藿甙可以提高扁桃体单个核细胞 NK、LAK 细胞杀伤活性;动力学观察表明:在诱导第 5 天时 LAK 细胞杀伤活性最强。提示淫羊藿甙是一种有效的生物反应调节剂。

关键词 淫羊藿甙 白细胞介素 2 白细胞介素 3 白细胞介素 6 NK 细胞 LAK 细胞

近年来,中药免疫调节作用的研究取得了很大进展,人们对中药的化学成分、结构和药效进行了深入的研究,发现了许多活性多糖和甙类物质^[1]。淫羊藿甙(icariin, ICA)是从朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)中提取的主要单体成分。文献报道^[2,3]:淫羊藿甙可以促进抗体的生成,对小鼠 Ts 细胞的产生有减弱作用。关于淫羊藿甙协同诱导白细胞介素 2、3、6,及对 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响,尚未见文献报道。现报告如下。

1 材料

1.1 淫羊藿甙:从朝鲜淫羊藿(*E. koreanum* Nakai)中提取,纯度在 96%以上。

1.2 细胞因子:rIL-2,军事医学科学院基础所和中化生物技术研究联合研制,批号 940205。rIL-3 购于北京医科大学免疫学教研室。rIL-6,由山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心田志刚博士赠送。

1.3 细胞株:CTLL-2 为 IL-2 依赖性细胞株,本室常规传代培养。TF-1 为人 IL-3 依

性细胞株,引自北京医科大学免疫学教研室。MH60·BSF2 为 IL-6 依赖性细胞株,引自日本大阪大学细胞工程中心。K₅₆₂为人红白血病细胞,本室常规传代培养。HL-60 为人急性早幼粒白血病细胞,引自中国医学科学院血液病研究所。

1.4 试剂:PHA 为广州医工所产品。MTT, 3-(4,5-二甲基噻唑-2-yl)-2,5-乙苯基-四唑溴盐〔3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide〕,Sigma。

2 方法

2.1 扁桃体单个核细胞的制备:扁桃体由山东医科大学附属医院耳鼻喉科门诊提供。三抗(青霉素 2000u/ml、链霉素 2000u/ml、二性霉素 B 25μg/ml)常规处理后,取组织块置于 200 目不锈钢网上研磨,细胞悬液层加于淋巴细胞分离液上,分离、洗涤,用培养液调细胞至适宜浓度,备用。

2.2 不同剂量 ICA 协同 PHA 诱导 IL-2、3、6 的观察:取 24 孔板,加入扁桃体单个核细

* Address: Zhao Yong, Institute of Basic, Shandong Provincial Academy of Medical Sciences, Jinan

[△] 山东省自然科学基金资助项目

胞悬液($2.5 \times 10^6/\text{ml}$)、ICA 和 PHA。ICA 的终浓度为 40、20、10、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ，PHA 的终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ，混匀后置 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱内培养，于 48、72、24h 收集上清，分别检测 IL-2、IL-3、和 IL-6 的活性单位。

2.3 ICA 协同 PHA 诱生 IL-2、3、6 的动力学观察：分 3 组（PHA 组，PHA + ICA 组，ICA 组）进行，ICA 终浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ，PHA 终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ，分别于 12、24、48、72、84h 收集上清， -30°C 保存，待测其活性。

2.4 MTT 比色分析法检测 IL-2、3、6 的活性单位：参考文献^[4]，采用二甲亚砜（DMSO）溶解甲臆。IL-2、3、6 的活性单位计算参考 Gillis 介绍的方法^[5]。

2.5 靶细胞的制备：取对数生长期的 K_{562} 和 HL-60 细胞，用 Hanks 液洗 3 次，以培养液调细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 备用。

2.6 LAK 细胞的制备：方法制备参考文献^[6]。

2.7 NK、LAK 细胞杀伤活性的测定：取上述靶细胞加入 96 孔 U 型底培养板中，同时加入效应细胞，使 E：T 比为 50：1，25：1，12.5：1，最大释放组为 1%NP-40 与靶细胞作用，同时设靶细胞自然释放组，及效应细胞自然释放组。乳酸脱氢酶活性测定及细胞毒杀伤百分率的计算参考文献^[7]。

3 结果

3.1 不同剂量 ICA 协同 PHA 诱生 IL-2、3、6 的观察：图 1~3 结果表明，随着 ICA 剂量

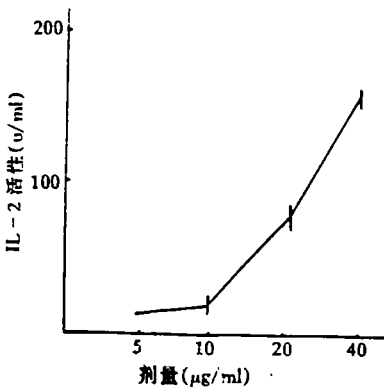


图 1 不同剂量 ICA 协同 PHA 对诱生 IL-2 的影响

增加协同 PHA 诱生 IL-2、3、6 的作用增强，呈剂量依赖关系。

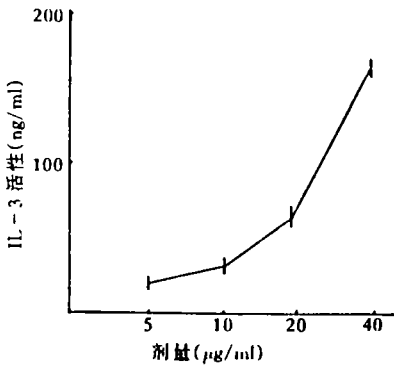


图 2 不同剂量 ICA 协同 PHA 对诱生 IL-3 的影响

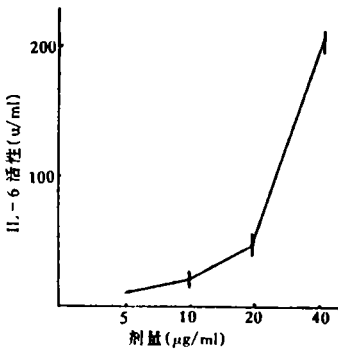


图 3 不同剂量 ICA 协同 PHA 对诱生 IL-6 的影响

3.2 ICA 协同 PHA 诱生 IL-2、3、6 的动力学观察：如图 4~6 所示，IL-2、IL-6 的分泌高

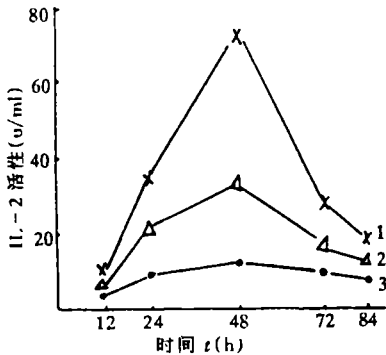


图 4 IL-2 诱生动力学
1-PHA+ICA 2-PHA 3-ICA

峰时相为 48h，IL-3 的分泌高峰时相为作用

后 72h。ICA 可以促进 PHA 对 IL-2、3、6 的诱生效应。ICA 有较弱的诱生 IL-2、3、6 的作用。

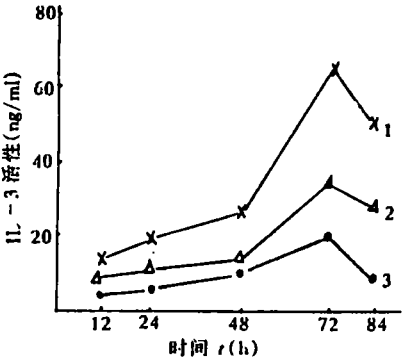


图 5 IL-3 诱生动力学
1-PHA+ICA 2-PHA 3-ICA

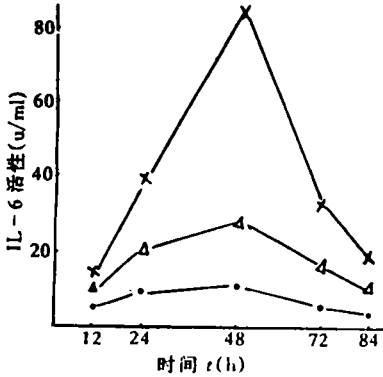


图 6 IL-6 诱生动力学

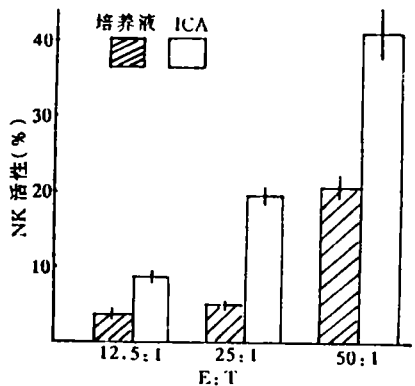


图 7 ICA 对 NK 活性的影响
ICA: 20μg/ml, 培养 1d 后检测

3.3 ICA 对 NK 活性的影响: 如图 7 所示, ICA 可显著提高 NK 细胞的杀伤活性, 以 E :

T=50 : 1 时杀伤活性最高。
3.4 不同剂量 ICA 协同 rIL-2 对 LAK 细胞杀伤活性的影响: 如图 8 所示, 随 ICA 剂量增加, LAK 细胞对 K₅₆₂ 和 HL-60 细胞的杀伤活性增强, 呈剂量依赖关系。

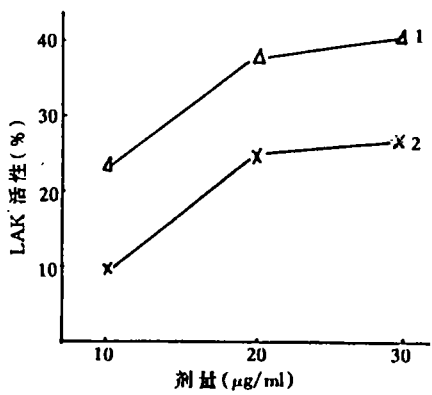


图 8 不同剂量 ICA 和 rIL-2 对 LAK 细胞活性的影响 (E : T=25 : 1; 第 5 天检测)
1-HL-60 2-K₅₆₂

3.5 ICA 协同 rIL-2 对 LAK 细胞杀伤活性的影响: 如图 9 所示, ICA+rIL-2 对 K₅₆₂ 和 HL-60 细胞的杀伤活性以 E : T=50 : 1 时明显, 随效靶细胞比例降低, LAK 细胞杀伤活性也降低。

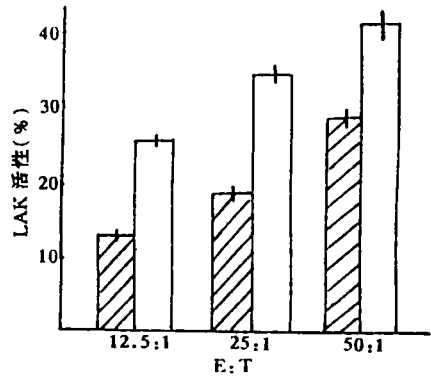


图 9 ICA+rIL-2 对 LAK 细胞活性的影响

3.6 LAK 细胞杀伤活性的动态观察: 如图 10, 11 所示, ICA 可提高 LAK 细胞杀伤活性, 与 rIL-2 有协同作用。观察 1、3、5d 的 LAK 细胞杀伤活性, 可见第 5 天时 LAK 细胞对 K₅₆₂ 和 HL-60 细胞的杀伤活性最高。

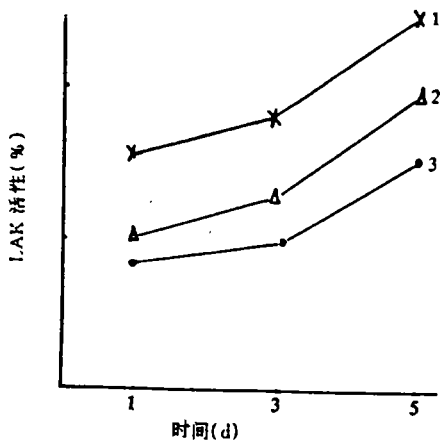


图 10 LAK 细胞杀伤动力学(E:T=25:1 靶细胞:K₅₆₂ 第 5 天检测)
1-rIL-2+2CA 2-rIL-2 3-ICA

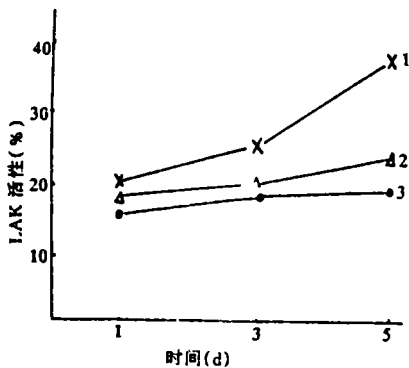


图 11 LAK 细胞杀伤动力学(E:T=25:1 靶细胞:HL-60, 第 5 天检测)
1-rIL-1+ICA 2-rIL-2 3-ICA

3 讨论

本文研究了淫羊藿甙对人扁桃体单个核细胞产生白细胞介素 2、3、6 及对 NK、LAK 细胞杀伤活性的影响。结果表明,淫羊藿甙有协同 PHA 促进 IL-2、3、6 分泌的作用,还可以提高 NK、LAK 细胞杀伤活性。由于细胞

因子的生物活性广泛,不同细胞因子之间相互作用,构成了细胞因子调节网络^[8]。IL-6 可以协同 IL-3 支持多能造血干细胞的增殖^[9]。淫羊藿甙能促进 IL-3、IL-6 的产生。因此有促进造血的功能。这与传统医学认为,淫羊藿可以“补肾壮阳”、“肾主骨藏精,生髓化血”的观点^[10]是一致的。同时,为临床应用淫羊藿治疗再障及缓解化疗后骨髓造血功能抑制提供了实验依据。

目前,IL-2/LAK 细胞生物疗法,用于临床治疗肿瘤取得了一定的疗效,因大量使用 IL-2 和 LAK 细胞,可引起发烧、毛细血管渗漏综合征等一系列剂量限制性的毒副作用,在一定程度上限制了其应用。淫羊藿甙可促进 IL-2、IL-6 的产生,增强 LAK 细胞的杀伤活性,因此,为改进 IL-2/LAK 细胞疗法,提高其疗效,提供了一种较理想的生物反应调节剂。

本文为淫羊藿在免疫调节和提高造血功能方面的研究和应用提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 赵 勇,等.中草药,1994,25(11):603
- 2 王天然,等.药学通报,1987,22(9):533
- 3 王天然,等.中国免疫学杂志,1986,2(2):74
- 4 Mosmann T,et al. J Immunol Methods,1983,65:55
- 5 Gillis S,et al. J Immunol,1978,120:2027
- 6 Cui ZY,et al. Biotherapy,1993,7:1797
- 7 陈丙莺,等.上海免疫学杂志,1989,9:218
- 8 曹雪涛.国外医学免疫学分册,1990,13:238
- 9 Wang G G,et al. Immunol Today,1988,9:137
- 10 杨医亚主编.中医学.北京:人民卫生出版社,1987. 27、197

(1995-04-19 收稿)

Studies on the Immuno Modulatory Action of Icararin

Zhao Yong,Zhang Ling,Cui Zhengyan,et al

Icararin is the main monomer extracted and purified from *Epimedium koreanum* Nakai. Using dependent cell lines and LDH release assay, the synergistic effects of icararin on inducing IL-2,3,6 and enhancing NK, LAK cell activity were studied. Results showed that icararin can induce tonsil mononuclear cells to produce IL-2, IL-3, and IL-6 in collaboration with PHA in a dose-dependent manner. IL-2 and IL-6 peaked at 48h after re-action, and IL-3 peaked at 72h. Icararin enhanced NK and LAK cell activity dose-dependently; the LAK activity

南沙参多糖对小鼠免疫器官辐射损伤的防护

兰州医学院病理生理教研室(730000) 葛明珠* 赵亚莉 任少林**

摘 要 口服南沙参多糖 1g/kg、0.5g/kg 一周后能明显对抗⁶⁰Co-γ 线所致小鼠外周血白细胞总数降低和胸腺、脾脏重量减轻;使照射小鼠外周血酸性 α-萘酚醋酸酯酶染色法(ANAE)显示淋巴细胞(ANAE⁺)比率升高,T_H/T_S 比值升高,腹腔巨噬细胞吞噬功能明显增强;显著减轻小鼠胸腺、脾脏病理损伤,使修复加速,从而使 6.0 Gy 照射小鼠 30d 存活率提高 15%。

关键词 南沙参多糖 辐射损伤 免疫 淋巴细胞亚群 巨噬细胞 存活率

中等以上⁶⁰Co-γ 剂量全身照射引起免疫功能抑制,导致内源性感染的发生和外源性感染的加重,合理应用抗生素是国内七八十年代研究治疗急性放射综合征有效方案重要组成部分^[1],近十多年来对中药增强免疫功能的报道较多,我们观察南沙参多糖对小鼠免疫器官辐射损伤的防护作用。

1 材料与方法

1.1 动物:昆明种小鼠,雄性 18~22g,兰州生物制品研究所提供。

1.2 药品:南沙参多糖由 *Adenophora potaninii* Korsh 中提得,分子量 9 900~59 362,棕黄色,溶于水,pH6,由兰州大学化学系提供。

1.3 方法

1.3.1 外周血 WBC 总数及胸腺、脾脏指数测定:小鼠分 4 组:正常对照组、照射组、1g/kg 南沙参多糖+照射组、0.5g/kg 南沙参多糖+照射组。同等条件下饲养,除正常对照组外,其余 3 组每天灌胃 1 次,分别给予盐水及南沙参多糖,共 1 周,第 8 天用⁶⁰Co-γ 线一次性全射照射,总吸收剂量 6.0Gy,照射后 32h 眼眶采血,做 WBC 计数。处死小鼠,取出胸

腺、脾脏,扭力天平称重,结果分别以胸腺指数及脾脏指数表示(mg/10g 体重)。

1.3.2 免疫功能的测定:小鼠分 4 组,饲养用药同前,第 8 天 3 组灌胃小鼠一次性⁶⁰Co-γ 线全射照射,总剂量 4.0Gy,照射后再饲养 10d,第 11 天按文献^[2]的方法做腹腔巨噬细胞功能测定,计腹腔巨噬细胞吞噬率及吞噬指数;同时眼眶采血,按文献^[2]的方法做外周血淋巴细胞酯酶染色,油镜下计数 T、B 淋巴细胞,计算 ANAE⁺ 百分率,T_H/T_S 比值;最后取胸腺、脾脏福尔马林固定,HE 染色,光镜下观察病理改变。

1.3.3 30d 存活率观察:小鼠 60 只分 3 组,不设正常对照组,饲养用药同前,第 8 天一次性⁶⁰Co-γ 线全射照射,总剂量 6.0Gy,照后再饲养 30d,观察各组存活率见表 1。

表 1 各组小鼠 30d 存活率

组别	小鼠数(只)	30d 存活率(%)
照射组	20	0
南沙参多糖(1g/kg)+照射组	20	15
南沙参多糖(0.5g/kg)+照射组	20	15

数和正常小鼠相比有显著降低, $P<0.01$

2 结果

* Address: Ge Mingzhu, Laboratory of Physiology and Pathology, Lanzhou Medical College, Lanzhou
现在工作单位北京医科大学病理生理教研室

** 海南医学院附属医院中心药房