pharmacopoeias of Sichuan, Guizhou and Yunnan provinces, various *Ligularia* sp., including *L. hodgsonii*, *L. intermedia*, *L. wilsoniana* and *L. sibirica* var. *araneosa*, are defined as the authentic herbal plants for "Chuanziwan" in Sichuan and Guizhou provinces, clinically utilized as a replacement for Ziwan with similar antitussive and expectorant actions to those of Ziwan. However, there are no reported scientific evidence to support such a substitution. In the present studies, a comparison of the antitussive and expectorant effects between *Ligularia* sp. and *Aster tataricus* in mice has been conducted. The result showed that the aqueous extracts of both Shanziwan and Ziwan produce antitussive and expectorant effects with a similar potency at the same dosage.

Key words *Aster tataricus* L. f. *Ligularia hodgsonii* *L. intermedia* *L. wilsoniana* *L. sibirica* var. *araneosa* antitussive expectorant

云芝糖肽对人外周血淋巴细胞增殖 和 T 细胞亚群变化的调节作用[△]

苏州医学院药理教研室(215007) 梁中琴* 盛伟华** 王晓霞 杨吉成** 顾振纶

摘要 用流式细胞仪技术和 MTT 法观察了云芝糖肽(PSP)对由植物血凝素(PHA)诱导的人外周血淋巴细胞(PBL)增殖和 T 细胞亚群变化的调节作用。结果表明,50~100 μg/mL PSP 对经 PHA 诱导的人 PBL 增殖有显著的促进作用($P < 0.05$),该浓度的 PSP 也能促进细胞从 G₁ 期进入 S 期,并可使 CD₄⁺ 细胞明显升高,使 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞比例增加,提示 PSP 具有免疫促进作用。

关键词 云芝糖肽 人外周血淋巴细胞 增殖 T 细胞亚群

近年来实验研究证明,云芝糖肽(polysacchariopeptid, PSP)具有广泛的药理作用,特别对机体的免疫功能具有调节和增强作用^[1~3]。但 PSP 对人外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocytes, PBL)作用的体外实验研究迄今未见报道。我们研究了 PSP 对 PHA 诱导的人 PBL 的增殖作用和对 T 细胞亚群变化的影响,为云芝糖肽的免疫调节作用提供新的药效学资料。

1 材料

云芝糖肽系多孔菌科真菌云芝 *Coriolus versicolor* (L. ex. Fr.) Quel cov-1 菌株中提取的蛋白多糖肽,由上海师范大学微生物与免疫学研究所杨庆尧教授提供,淡褐色粉末,0.1 g 溶于 10 mL 1640 培养液中,经无菌过

滤后置冰箱保存;人白细胞取自昆山中心血站提供的健康人外周血;MTT、碘化丙啶(PI)为 Sigma 产品;CD₄⁺、CD₈⁺ 单抗为北京邦定生物医药公司产品。

2 方法

2.1 PBL 的分离:取健康人的白细胞 5 份,分别用含有 10 U/mL 肝素和 100 U/mL 双抗的无钙镁磷酸缓冲液(PBS)稀释后,再用淋巴细胞分层液(体积质量比为 1.077)分离淋巴细胞,用 PBS 离心洗涤 2 次,最后用 1640 培养液(含小牛血清 10%,双抗 100 U/mL)调细胞数为 1×10^6 /mL 备用。

2.2 PBL 增殖活性检测

2.2.1 MTT 比色法^[4]:将细胞加入 96 孔培养板中,加入不同浓度的 PSP(6~800 μg/

* Address: Liang Zhongqin, Department of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou

梁中琴 女,现为苏州医学院药理学教研室副教授,硕士。主要从事中药抗肿瘤及免疫调节作用的研究。负责或参与开发多个国家级新药,发表科研论文 10 余篇。

** 本院基因室

△香港保健协会研究项目

mL), 稳定培养 10 h 后加入 PHA (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 72 h, 在细胞培养结束前 4 h 加入 MTT (噻唑蓝, 使用浓度为 5 mg/mL, 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 4 h 后用酸化十二烷基磺酸钠 (SDS) 终止反应, 以 MR-710 型酶标仪测 OD 值 (参考波长 630 nm, 实验波长 570 nm)。

2.2.2 流式细胞仪 (FACS) 检测细胞周期^[5]: 以不同浓度的 PSP (5 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与人 PBL ($5 \times 10^6/\text{mL}$)、PHA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共同培养 72 h 后收获细胞, 以冷的 PBS 洗涤 2 次, 细胞沉淀用 70% 乙醇混匀备用, 上机前用 PBS 洗涤后再用 PBS 调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 加入 RNA 酶 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 30 min 后置冰浴终止反应, 每毫升细胞悬液加 PI 染液 100 μL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 暗室中放置 30 min 后, 用流式细胞仪分析细胞周期。

2.3 T 细胞亚群的双标记检测^[6]: 选择促进增殖效应最佳浓度的 PSP (50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与人 PBL 及 PHA 混合培养至 48 h, 调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 每个样品分别加入 CD_4^+ 、 CD_8^+ 单抗, 同时加入荧光素标记的羊抗鼠 IgG 抗体及抗体稀释液各 100 μL , 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 min, 洗涤 2 次后用流式细胞仪检测, 每份标本测 5×10^4 细胞, 在荧光直方图上分别计算出 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞峰的百分率。

2.4 统计学处理: 实验结果用方差分析统计处理。

3 结果

3.1 PSP 对 PHA 活化的人 PBL 增殖的调节作用: 经 PHA 活化后的人 PBL 在不同浓度的 PSP 作用下培养 72 h, MTT 比色法检测, 结果见表 1。其 OD 值的变化与浓度不呈正相关, 高浓度的 PSP (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 促增殖作用较低, 而低浓度 PSP (12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用显著, 其 OD 值明显高于 PHA 对照组, 经统计学处理差异显著 ($P < 0.05$), 呈现明显的促进作用, 最佳促进效应浓度为 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 随着 PSP 浓度的降低, 增殖活性

也随之降低, 但最小浓度 6.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 仍有增殖效应, 提示 PSP 对活化的人 PBL 增殖有明显的促进作用。

表 1 PSP 对人 PBL 增殖的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	PSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值
PHA 对照组	—	0.138 $\pm$ 0.025
PHA+PSP 处理组	400	0.193 $\pm$ 0.022
	200	0.244 $\pm$ 0.021*
	100	0.268 $\pm$ 0.026*
	50	0.256 $\pm$ 0.035*
	25	0.245 $\pm$ 0.025*
	12.5	0.248 $\pm$ 0.031*
	6.25	0.226 $\pm$ 0.028

与对照组比较: * $P < 0.05$

流式细胞仪检测细胞周期的结果显示, PSP 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可使 PHA 活化的人 PBL 有 10.67% 细胞进入 S 期, PSP 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时有 14.3% 细胞进入 S 期, 而单加 PHA 对照组仅有 5.93% 进入 S 期。提示 PSP 明显促进经 PHA 活化的细胞进入 S 期, 进一步表明 PSP 可促进人 PBL 的 DNA 合成 (表 2)。

表 2 PSP 对 PHA 诱导的人 PBL 进入细胞周期的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	PSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	不同时期细胞百分数		
		G ₁	S	G ₂
PHA 对照	—	81.67 $\pm$ 4.39	5.93 $\pm$ 1.16	12.43 $\pm$ 4.01
PHA+PSP	100	74.93 $\pm$ 4.71	14.30 $\pm$ 1.90*	10.80 $\pm$ 3.83
	50	76.16 $\pm$ 3.59	10.67 $\pm$ 3.08*	13.20 $\pm$ 3.30

与 PHA 对照组比较: * $P < 0.05$

3.2 PSP 对经 PHA 活化后的 T 细胞亚群变化的影响: 见表 3。

表 3 PSP 对细胞亚群变化的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	PSP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CD_4^+	CD_8^+	$\text{G}_4^+/\text{CD}_8^+$
PHA 对照	—	13.65 $\pm$ 3.04	4.85 $\pm$ 2.76	2.95 $\pm$ 1.17
PHA+PSP	100	25.85 $\pm$ 6.01*	5.35 $\pm$ 0.16	5.02 $\pm$ 2.15
	50	21.20 $\pm$ 4.81*	5.16 $\pm$ 0.71	4.08 $\pm$ 0.91

与 PHA 对照组比较: * $P < 0.05$

结果表明在加入 PSP 的实验组中 T 细胞亚群有明显的变化, CD_4^+ 细胞明显增加, CD_8^+ 细胞也略有增加, 但主要呈现为 CD_4^+ 细胞的增加, 故使 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比值升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

PSP 能明显抑制肿瘤生长,初步的研究表明,其抑瘤机制与免疫调节作用相关^[1,2]。本文用 MTT 比色法和流式细胞仪分析法检测了不同浓度 PSP 对 PHA 活化的人 PBL 增殖的影响,两种检测方法均显示出 PSP 对人 PBL 的增殖有明显的促进作用。与 MTT 比色法相比,流式细胞仪分析法不仅能直接观察细胞内 DNA 的含量,而且可确定细胞周期,能较准确地定位药物的作用时相,结果表明 PSP 主要作用于细胞周期的 S 期,提示 PSP 对活化的人 PBL 增殖有明显的促进作用。研究结果还表明,经 PHA 活化后的人 PBL 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 PSP 作用下,T 细胞亚群发生明显改变,使 CD_4^+ 细胞大量增多,而 CD_8^+ 细胞增加的幅度较少,因此

$\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比值升高,说明 PSP 可使细胞免疫功能增强,由此表明 PSP 能增强机体免疫功能,是一种有效的免疫增强剂。

致谢:香港保健协会主席周文轩教授、理事郭次仪教授及上海师范大学杨庆尧教授关心、指导本课题研究,谨致衷心谢意。

参考文献

- 1 周金煦,等.上海师范大学学报自然科学版,1988,17:71
- 2 杨庆尧,等.国际学术研讨会论文和论文摘要集.1993:89
- 3 杨吉成,等.中草药,1991,22(5):237
- 4 Mosmanu T, *et al.* J Immunol Methods,1983,65:55
- 5 Blus M L, *et al.* J Immunol,1988,4:70
- 6 Lakhapal P, *et al.* J Immunol Methods, 1987,96:35

(1998-01-23 收稿)

Regulatory Effect of Polysacchariopeptide on Human Peripheral Blood Lymphocyte Proliferation and T Lymphocyte Subpopulation

Liang Zhongqin, Sheng Weihua, Wang Xiaoxia, *et al.* (Department of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

Abstract Regulatory effect of polysaccheriopeptide (PSP) on human peripheral blood lymphocyte (PBL) proliferation and T lymphocyte subpopulation was studied.

The results showed that: phytohemagglutinin (PHA)-activated human PBL could increase proliferation especially after treated with PSP in concentrations of 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In this study, the effect of PSP on cell cycling induced by PHA was investigated, DNA synthesis measured by a flowcytometer was shown to be increased but not in a dose-dependant manner. Cell cycling analysis demonstrated that the increment was mainly at the stage when cells enter S phase.

It was observed that in PSP treated cases CD_4^+ cell group increased, suggested that PSP has certain immunoregulatory effect in improving proliferation of activated human PBL, and increasing the CD_4^+ cell group.

Key words polysacchariopeptide human peripheral blood lymphocyte T lymphocyte subpopulation

《中草药》杂志 1998 年第 29 卷增刊(总第 310 期)征订启事

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家科学技术部(国科发信字[1998]217号文)批准,我们编辑出版了《中草药》杂志 1998 年第 29 卷增刊(总第 310 期)。本增刊共收载论文 80 篇,并以当今国际研究的热点“银杏叶的开发研究”为专论重点,包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面的科研论文 26 篇,并特邀国内从事银杏叶研究的知名专家和中青年学科带头人撰写综述文章,充分反映了国内、外在“银杏叶的开发研究”方面的新成果、新进展和新动态。另外收载反映我国中药植化、药理、分析、制剂、药材和临床等方面的新理论、新方法、新成就的科研论文和有关综述文章 54 篇。本增刊选题广泛,内容丰富,学术水平较高,科学性较强,集中反映了我国中草药研究领域近 1~2 年的新进展。

增刊为 16 开本,采用激光照排,胶版印刷,彩色封面,160 页(约 30 万字左右),天津市报刊增刊特许准印证(98)第 122 号,本部发行,定价 50 元;另加包装费、邮费 5 元,订阅请向我部索取订单。

电话:(022)27474913 邮政编码:300193 天津市南开区鞍山西道 308 号《中草药》杂志编辑部