

# 槐胺碱对皮肤移植大鼠 T淋巴细胞的影 响

张 佩<sup>1</sup>, 纪丽丽<sup>2</sup>, 王晨光<sup>1</sup>, 李淑华<sup>1\*</sup>

(1. 锦州医学院免疫微生物学教研室, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州市妇婴医院病理科, 辽宁 锦州 121004)

**摘 要:** 目的 研究槐胺碱(SA)对移植排斥反应的影响并探讨其发生机制。方法 以同种皮肤移植大鼠作为动物模型, 免疫荧光法测定 T淋巴细胞及其亚群数量; MTT比色法测定 T淋巴细胞增殖反应。结果 SA减少 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub> 细胞数, 降低 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 抑制 T淋巴细胞的增殖, 延长移植物存活时间。结论 SA对移植排斥反应有抑制作用, 此作用与其减少 T淋巴细胞数量并抑制 T淋巴细胞功能有关。

**关键词:** 槐胺碱; 皮肤移植; T淋巴细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0230-03

## Effect of sophoramine on T lymphocytes in rats of skin allografting

ZHANG Pei<sup>1</sup>, JI Li-li<sup>2</sup>, WANG Chen-guang<sup>1</sup>, LI Shu-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Immunity and Microbiology, Jinzhou Medical College, Jinzhou Liaoning 121001, China; 2. Department of Pathology, Jinzhou Maternity and Infant Hospital, Jinzhou Liaoning 121004, China)

**Abstract Object** In order to obtain further evidence of therapeutic efficacy of sophoramine (SA)<sup>\*</sup>, its effect on transplantation rejection was studied with simultaneous exploration of its mechanism of action. **Methods** Number of T lymphocyte and its sub-sets of skin allografted rat model were determined by immunofluorescence technique, and proliferation of T lymphocyte was assessed by thiazolyl blue (MTT) assay. **Results** SA reduced the CD<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> cell counts, lowered CD<sub>4</sub>/C<sub>8</sub> ratio, inhibited T lymphocyte proliferation and prolonged the survival time of skin allografted rat. **Conclusion** SA could inhibit transplantation rejection by inhibiting the function of T lymphocyte with simultaneous reduction of lymphocyte count.

**Key words** sophoramine(SA); skin allografting; T lymphocyte

\* Sophoramine (SA), the active principle of *Sophora alopecuroides* L. has been reported to be an immunodepressive agent.

以往的研究表明, 从中药苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中提取的槐胺碱(sophoramine, SA)具有免疫抑制作用, 特别以对 T淋巴细胞介导的细胞免疫抑制作用更显著<sup>[1]</sup>。我们为了研究该药的抑制移植排斥反应, 因而采用大鼠皮肤移植模型, 观察 SA对移植排斥反应的影响, 并对其可能机制进行了探讨。

### 1 实验材料

1.1 动物: 受体为 Wister大鼠, 雄性, 体重(200±20)g, 由中国医科大学实验动物部提供。供体为 SD大鼠, 雌雄不限, 体重(250±20)g, 由本院实验动物中心提供。

1.2 抗体和血清: 小鼠抗大鼠单克隆抗体 MaR Pan T(CD<sub>3</sub>), MaR Th 1(CD<sub>4</sub>)和 MaR Ts/c(CD<sub>8</sub>), 荧光标记羊抗小鼠 Ig均为邦定公司产品。对照用正

常小鼠血清和羊抗大鼠血清均为自制。

1.3 药品: 槐胺碱为宁夏盐池制药厂产品, 淡黄色粉剂, 以生理盐水配成所需浓度。

1.4 培养液和试剂: RPMI 1640, Gibco产品, Con A: Sigma公司, MTT: Fluka, 瑞士包装。

### 2 实验方法

2.1 皮肤移植模型: 大鼠以异戊巴比妥麻醉, 胸背部剃毛, 碘酒、酒精消毒。在受体 Wister大鼠背部剪去全层皮肤一块, 形成直径约 2 cm的圆形创面, 同时自供体 SD大鼠背部剥离全皮层, 刮去皮下脂肪, 勿伤及血管, 制成大小相仿的圆形皮片, 贴于受体鼠植床上, 覆盖敷料以胶布加压包扎固定, 分笼饲养。移植后 9 d, 去除敷料, 观察局部反应, 以皮片坏死(皮片呈紫黑色, 干燥无光泽, 硬板样感觉或脱落大于 1/2)为排斥指标<sup>[2]</sup>。

\* 收稿日期: 2000-06-12

基金项目: 辽宁省教委资助

作者简介: 张 佩(1963-), 女, 辽宁省锦州市人, 副教授, 硕士学位, 1990年毕业于锦州医学院, 主要从事中草药免疫调节研究

联系电话: 0416-4581332/4161817 E-mail: 3861@163.com

2.2 T细胞亚群免疫荧光染色及测定: 无菌取脾, 制成单细胞悬液, 在 4支试管中各加脾细胞  $\times 10^6$ , 每管加羊抗大鼠血清  $50\mu\text{L}$ , 置  $4^\circ\text{C}$  封闭 30 min, 洗涤后分别加入正常小鼠血清和小鼠抗大鼠  $\text{CD}_3$   $\text{CD}_4$   $\text{CD}_8$  McAb  $50\mu\text{L}$ , 振荡后在  $4^\circ\text{C}$  下作用 30 min, 洗涤后各管加入荧光标记的羊抗小鼠  $\text{I}_g$  作用 30 min, 洗涤后以甲醛固定, 在荧光显微镜下计数

2.3 T细胞增殖反应测定: 脾细胞浓度  $\times 10^6$  cfu/ml 加入 96孔板, 每孔  $100\mu\text{L}$ , 加入 ConA使终浓度为  $6\mu\text{g}/\text{mL}$ , 设不加 ConA对照孔,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养 48 h, 每孔加入 MTT  $20\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 离心洗涤, 用酶标仪测定吸光度 (A) 值, 结果以刺激指数表示。

刺激指数 (SI) = 加 ConA孔 A值 / 不加 ConA对照孔 A值

### 2.4 实验分组

2.4.1 SA药效分组: 皮肤移植大鼠随机分为生理盐水对照、SA实验 1和 SA实验 2组, 每组 8只。对照组术后当日起 ip生理盐水, 实验 1和实验 2组, 术后当日起分别 ip给予 SA 15和  $25\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 至第 9天停药, 观察皮片存活时间。

2.4.2 免疫检测分组: 将大鼠随机分为非移植组、移植组、移植用药 1组和移植用药 2组, 每组 10只。非移植组不移植, 只制成植床; 移植组行皮肤移植, 术后当日起 ip生理盐水, 移植用药 1组和移植用药 2组行皮肤移植术后当日起分别 ip SA 15和  $25\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 均于第 9天停药, 第 10天进行免疫指标测定。

2.5 统计学处理: 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验和  $F$  检验。

## 3 实验结果

3.1 SA对移植皮肤片存活时间和存活率的影响: 生理盐水对照组皮片平均存活时间为  $(11.75 \pm 1.67)\text{d}$  SA实验 1和 SA实验 2组皮片平均存活时间为  $(13.56 \pm 1.91)$  和  $(15.57 \pm 1.72)\text{d}$ , 与生理盐水对照组相比, 均差异显著 ( $P < 0.01$ )。生理盐水对照组术后 12 d和 15 d皮片存活率分别为 25% 和 0, SA实验 1组为 62.5% 和 37.5%, SA实验 2组则分别达 100% 和 75%, SA实验组与生理盐水对照差异均有显著意义 ( $P < 0.01$ )。

3.2 SA对 T细胞亚群的影响: 结果见表 1 移植组  $\text{CD}_3$   $\text{CD}_4$   $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  均明显高于非移植组, 移植用药组  $\text{CD}_3$   $\text{CD}_4$   $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  则显著降低。

3.3 SA对 T淋巴细胞增殖反应的影响: 移植组脾

淋巴细胞对 ConA刺激的增殖反应明显高于非移植组, 而移植用药组脾淋巴细胞对 ConA刺激的增殖反应均明显降低, 结果见表 2

表 1 大鼠脾 T淋巴细胞 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$\text{CD}_3(\%)$	$\text{CD}_4(\%)$	$\text{CD}_8(\%)$	$\text{CD}_4/\text{CD}_8$
非移植	$40.4 \pm 2.4$	$22.6 \pm 1.4$	$17.8 \pm 1.1$	$1.3 \pm 0.03$
移植	$46.8 \pm 2.2$	$28.1 \pm 1.5$	$18.7 \pm 1.5$	$1.5 \pm 0.05^*$
移植用药 1	$41.7 \pm 2.0^\Delta$	$23.5 \pm 1.8^\Delta$	$18.2 \pm 1.6$	$1.2 \pm 0.07^\Delta$
移植用药 2	$38.4 \pm 1.4^\Delta$	$20.0 \pm 1.5^\Delta$	$18.4 \pm 1.3$	$1.1 \pm 0.10^\Delta$

与非移植组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与移植组比较:  $\Delta P < 0.01$

表 2 大鼠脾淋巴细胞对 ConA刺激的增殖反应 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SI
非移植	$3.16 \pm 0.12$
移植	$4.53 \pm 0.14$
移植用药 1	$3.39 \pm 0.11^\Delta$
移植用药 2	$3.22 \pm 0.08^\Delta$

与非移植组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与移植组比较:  $\Delta P < 0.01$

## 4 讨论

组织器官移植时, 由于组织相容性抗原的差异而引起的移植排斥反应常常导致移植植物不能长期存活。筛选高效低毒的免疫抑制药物是解决这一问题的关键。实验动物的皮肤移植模型操作简便, 排斥反应易于观察, 常用于药物对移植排斥反应抑制作用的研究<sup>[3]</sup>。我们采用这种模型观察了 SA对大鼠同种皮肤移植排斥反应的影响。结果显示 SA 15~25  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  可延长大鼠同种移植皮片存活时间, 提高皮片存活率, 说明 SA对移植排斥反应有抑制作用。

急性排斥反应主要由 T淋巴细胞介导, T细胞各亚群在排斥反应中的作用说法不一。普遍的观点认为  $\text{CD}_4$  细胞在排斥反应中起更大的作用<sup>[4]</sup>。临床已将 T细胞亚群及其比例变化作为移植术后急性排斥反应的监测指标广为利用。一般移植术后急性排斥反应发生时, 外周血中  $\text{CD}_4$  细胞及  $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  往往升高。本实验的结果也显示, 在移植术后 10 d排斥反应即将发生前, 脾  $\text{CD}_3$   $\text{CD}_4$   $\text{CD}_8$  细胞均高于非移植组。其中  $\text{CD}_4$  细胞升高的幅度较大, 致  $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  升高。而移植后应用 SA组, 在术后 10 d时, 脾  $\text{CD}_3$   $\text{CD}_4$  细胞均明显低于移植组,  $\text{CD}_8$  细胞变化则不明显, 致  $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  降低。这既证实了  $\text{CD}_4$  细胞在排斥反应中的作用, 也说明 SA能延长大鼠移植皮片存活时间, 提高皮片存活率, 对移植排斥反应表现抑制作用, 此作用与其减少移植受者参与排斥反应的  $\text{CD}_4$  细胞数量有关。实验中还发现, SA除影响 T细胞及其亚群的数量外, 还明显抑制移植受鼠 T细胞对分裂原刺激的增殖反应, 因而对 T细胞的功能

也表现抑制作用。其中 SA 25 mg/(kg·d)的抑制作用强于 SA 15 mg/(kg·d)。关于 SA对移植排斥反应的其它可能机制尚在进一步探讨中。

参考文献:

[1] 张佩,金英,李淑华,等.槐胺碱对小鼠免疫功能的影响

[J]. 中草药, 1996, 27(1): 25-27.

[2] 王德斌,张权人,刘卓如.细胞免疫学方法选编[M].北京:人民卫生出版社,1986.

[3] 刘立华,杨贵贞.雷公藤延长小鼠同种皮肤移植存活时间[J].中国免疫学杂志,1985 1(3): 40-44.

[4] Steinmuller D. Which T cells mediate allograft rejection? [J]. Transplantation, 1985, 40: 229-231.

## 人参皂苷对人体骨肉瘤细胞 U<sub>2</sub>OS增殖的影响

张有为,窦德强,陈英杰\*,姚新生

(沈阳药科大学天然药物化学教研室,辽宁 沈阳 110015)

**摘要:**目的 为寻找人参中抑制骨肉瘤细胞增殖的活性成分。方法 采用细胞计数法检测了 27种从人参中得到的单体化合物对体外培养的人体骨肉瘤细胞 U<sub>2</sub>OS增殖的影响;以流式细胞术分析 DNA含量,选择有抑制肿瘤细胞增殖作用的化合物对肿瘤细胞的细胞增殖周期的变化进行研究;另外,以荧光染色法检测了人参皂苷对细胞死亡率变化的影响。结果 对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用研究表明,在 5 $\mu$ mol/L浓度下,人参皂苷-Ro, -Rh<sub>1</sub>, -Rh<sub>2</sub>, -F<sub>1</sub>和 -L<sub>8</sub>较明显地抑制了肿瘤细胞的增殖,人参皂苷-Rg<sub>1</sub>, -F<sub>3</sub>, -Rf, PPT和 PT显著地抑制了肿瘤细胞的增殖;进一步对骨肉瘤细胞有抑制作用的化合物检测其对细胞增殖周期影响发现:人参皂苷-Ro, -Rf, -Rg<sub>1</sub>, -F<sub>1</sub>, -Rh<sub>2</sub>, PPT和 PT使处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞数目明显增多,伴随着 S期和 G<sub>2</sub>+M期的细胞明显减少,说明这些化合物抑制了肿瘤细胞增殖周期的进行;与对照相比人参皂苷-Rf<sub>1</sub>, -Rg<sub>1</sub>, -F<sub>1</sub>和 PPT显著地促进了肿瘤细胞的细胞死亡现象。结论 人参皂苷是通过阻止细胞增殖周期的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期或促使细胞死亡两种方式抑制了肿瘤细胞 U<sub>2</sub>OS的增殖。

**关键词:** 人参皂苷;骨肉瘤细胞 U<sub>2</sub>OS;细胞增殖;细胞周期;细胞死亡

中图分类号: R285.5; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0232-05

## Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on proliferation of human osteosarcoma cell U<sub>2</sub>OS

ZHANG You-wei, DOU De-qiang, CHEN Ying-jie, YAO Xin-sheng

(Department of Natural Pharmaceutical Chemistry, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang Liaoning 110015, China)

**Abstract Object** To find out which of the 27 ginsenosides isolated from *Panax ginseng* C. A. Mey that may inhibit the proliferation of human osteosarcoma cell line U<sub>2</sub>OS. **Methods** Effects of each individual ginsenoside on the proliferation of U<sub>2</sub>OS cell were studied by determining the viability of cancer cells during culture with or without the presence of the test compound. DNA assay was determined by flow cytometry. **Results** Ginsenosides -Ro, -Rh<sub>1</sub>, -Rh<sub>2</sub>, -F<sub>1</sub> and -L<sub>8</sub> at concentrations of 5 $\mu$ mol/L could obviously suppress the proliferation of U<sub>2</sub>OS cells while ginsenosides -Rg<sub>1</sub>, -F<sub>3</sub>, -Rf, PPT and PT significantly inhibited the cancer cells. Flow cytometry revealed that ginsenosides -Ro, -Rg<sub>1</sub>, -Rf, -F<sub>1</sub>, -Rh<sub>2</sub>, PPT and PT induced cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase with obvious decrease of cell count at S and G<sub>2</sub>+M phase. Moreover, ginsenosides -Rf<sub>1</sub>, -Rg<sub>1</sub>, -F<sub>1</sub> and PPT induced significantly high rates of cell death as compared with the control. **Conclusion** These data suggested that ginsenosides inhibited U<sub>2</sub>OS proliferation via cell cycle arrest or induction of cell death.

**Key words** ginsenosides; osteosarcoma U<sub>2</sub>OS; cell proliferation; cell cycle; cell death

近十余年来研究表明人参有较好的抗癌抗肿瘤效果<sup>[1-3]</sup>,而且这种作用大多是非器官特异性的<sup>[4]</sup>。人参的主要活性成分是人参皂苷,有关人参

皂苷抗癌作用的报道不少,但主要是针对 -Rh<sub>2</sub>而言,它既能抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[5,6]</sup>,又能诱导肿瘤细胞的分化<sup>[7,8]</sup>。另外,人参皂苷-Rh<sub>1</sub><sup>[8]</sup>, -Rb<sub>1</sub><sup>[9]</sup>, -Rb<sub>2</sub>和

\* 收稿日期: 2000-06-26

作者简介: 张有为(1972-),男,2000年在沈阳药科大学药物化学专业获得博士学位,目前在日本东京医科大学分子生物学专业攻读博士学位。E-mail: zywlcell@yahoo.com; Fax: 81-3-5694-4940

\* 通讯联系人