

芪的免疫增强作用可能是各个组分之间的协同作用。当归对正常小鼠的免疫作用比较复杂,其整体的免疫增强作用可能与各个组分之间的配伍有关,并非简单的协同作用。而对血虚模型小组中低下的 T 淋巴细胞免疫,当归黄酮和黄芪黄酮、黄芪皂苷的作用突出,说明当归补血汤的补益作用是建立在其单味药中较强活性物质的基础上。同时,当归黄酮在低剂量时有很强的免疫促进作用,但在高剂量时则表现为明显的免疫抑制作用,而对免疫低下的血虚模型小鼠则能将其降低的 T 淋巴细胞增殖率提高至接近正常,反映了当归黄酮极强的免疫调节作用,同时,也可以看出当归不同组分之间剂量配比的重要性。当归黄酮的免疫调节作用有待进一步的研究。

体外实验亦发现当归、黄芪不同组分产生免疫活性强弱不同,在 $2.5 \sim 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,黄芪挥发油、黄酮、皂苷以及当归挥发油均表现为显著的双向免疫调节作用,其中黄芪黄酮和皂苷的作用明显强于黄芪挥发油和当归挥发油,这与体内结果一致,说明二者是黄芪产生免疫增强作用的主要活性物质。两个多糖成分(黄芪多糖和当归多糖)则

表现为明显的浓度依赖性作用方式,其中二者对静息细胞和 B 淋巴细胞的增殖有明显的促进作用,而对 T 淋巴细胞增殖无明显作用,黄芪多糖的作用要强于当归多糖。

尽管黄芪多糖是目前公认的免疫促进剂,但是,本实验发现其对 T 和 B 淋巴细胞的增殖作用和抗体生成以及对血虚模型小鼠的调节作用均不如黄芪皂苷和黄芪黄酮两个组分。尤其是黄芪皂苷具有较强的免疫调节作用,可以认为是当归补血汤中药效的主要物质基础。

参考文献:

- [1] 郑虎占. 中药现代化研究与应用(第四卷)[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] 黄幼群. 当归补血汤研究概况[J]. 中成药,1989,11(9):39-40.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1994.
- [4] Bian T H, Wang X F, Li X Y, Effects of morphine and naloxone on proliferation of lymphocyte *in vitro* [J]. Acta Pharmacol Sin, 1995, 16(4): 315-318.
- [5] 向道斌. 牛膝多糖对小鼠体液免疫反应的增强作用[J]. 上海免疫学杂志,1994,14(3):134-136.

人参皂苷-Rg₁对中性粒细胞与血小板之间粘附的影响

沈志强¹,吴蓝鸥¹,雷伟亚¹,陈植和¹,刘吉开²

(1. 云南省天然药物药理重点实验室,昆明医学院,云南昆明 650031; 2. 中国科学院昆明植物研究所 开放实验室,云南昆明 650204)

摘要:目的 探讨人参皂苷-Rg₁对大鼠血小板与中性粒细胞之间粘附及颈动脉血栓形成的影响。方法 采用 Charlton 等方法评价人参皂苷-Rg₁对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的作用;应用玫瑰花结试验观察对大鼠血小板与中性粒细胞之间粘附的影响。结果 $25 \text{ mg}/\text{kg}$ 人参皂苷-Rg₁使血栓形成时间从对照组的 $(18.7 \pm 1.8) \text{ min}$ 延长到 $(36.4 \pm 2.1) \text{ min}$ ($P < 0.05$);显著降低凝血酶激活的血小板与中性粒细胞间的粘附率,其 IC_{50} 为 $81.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。结论 人参皂苷-Rg₁具有较强的抗血栓的作用,其机制可能与抑制中性粒细胞与血小板之间的相互作用有关。

关键词: 人参皂苷-Rg₁; 中性粒细胞;血小板;粘附;血栓形成

中图分类号: R286.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0138-03

Effects of ginsenoside-Rg₁ on adhesion of neutrophil to platelet

SHEN Zhi-qiang¹, WU Lan-ou¹, LEI Wei-ya¹, CHEN Zhi-he¹, LIU Ji-kai²

(1. Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650031, China; 2. Opening Laboratory, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

Abstract Object To investigate the effects of ginsenoside-Rg₁ on adhesion of neutrophil to platelet, and on carotid thrombosis in rat. **Methods** Charlton and Rosette test were used to evaluate the effect of ginsenoside-Rg₁ on carotid thrombosis induced by electrical stimulation and to observe its effect on the

收稿日期: 2001-04-25

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目,课题号: 98C066M

作者简介: 沈志强,男,35岁,博士,副教授,研究方向:天然药物与心血管药理学,于国内外发表论文近 30篇 Tel (0871) 5332956
E-mail szq2000@yahoo.com Fax (0871) 5377271

adhesion of neutrophil to platelet in rat respectively. **Results** Ginsenoside-Rg₁ 25 mg/kg iv prolonged the thrombotic time from (18.7 ± 1.8) min in control group to (36.4 ± 2.1) min in treatment groups (P < 0.05); the adhesion of neutrophil to thrombin-stimulated platelets was inhibited significantly with IC₅₀ = 81.2 μmol/L. **Conclusion** The inhibition of ginsenoside-Rg₁ on the adhesion of neutrophil to platelet may contribute to its potent anti-thrombotic effects.

Key words ginsenoside-Rg₁; neutrophil; platelets; adhesion; thrombosis

人参皂苷-Rg₁对心肌缺血再灌损伤具有保护作用,并可防治心脑血管血栓栓塞性疾病^[1],近年关于其抗血栓机制的研究大多侧重探讨其抗血小板活化作用^[2]。目前,中性粒细胞与血小板之间的相互作用在血栓形成与发展中的地位倍受关注^[3],这为抗栓药新作用机制的研究开辟了新领域。本研究探讨了人参皂苷-Rg₁对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响,并从细胞分子水平探讨其抗血栓形成的作用机制。

1 材料

1.1 雄性 SD大鼠,体重 250~300 g,由云南省天然药物药理重点实验室动物室提供(合格证号:滇实动证 9805)。

1.2 药品及主要试剂:人参皂苷-Rg₁,由中科院昆明植物研究所杨崇仁教授提供(纯度:98.7%),用前以生理盐水溶解,pH值约 7.0 淋巴细胞分离液(质量体积比 1.077)购自上海华精生物高科技有限公司。凝血酶系 Sigma 公司产品。

1.3 仪器:电刺激仪 (SEN-7203型)、二道血流速度流量仪 (DVM-4200型)及 Olympus 像差显微镜均为日本生产。

2 方法与结果

2.1 对电刺激大鼠颈动脉血栓形成的影响:动物分 3组,每组 6只,即 0.9% 生理盐水组,10 mg/kg 阿司匹林组和 25 mg/kg 人参皂苷-Rg₁组。用改进的 Charlton 方法^[4],即 ip 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠后,上述各组均经股 iv,给药 10 min后,分离左颈总动脉,测定正常的血流量及血流速度,然后置两根银制电极于血管两端,通以直流电刺激,以 1.5 mA 连续刺激 7 min,同时于近头端测量血流量和速度。从刺激开始至血流量为零的时间为血栓形成时间 (occlusion time, OT) 结果 25 mg/kg 人参皂苷-Rg₁使 OT 从对照组的 (18.7 ± 1.8) min 延长到 (36.4 ± 2.1) min,阿司匹林亦有显著作用(表 1)。

2.2 血小板制备:大鼠颈动脉取血,以 2.7% EDTA 抗凝收集于塑料离心管中,血与抗凝剂体积比为 9:1 室温下以 1000 r/min 离心 10 min 得富

血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP)。PRP 以

表 1 人参皂苷-Rg₁ iv 对电刺激大鼠颈动脉

血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 药 物 | 剂 量 (mg/kg) | 栓塞时间 (min) |
|----------------------|-------------|-------------------------|
| 生理盐水 | - | 18.7 ± 1.8 |
| 人参皂苷-Rg ₁ | 25 | 36.4 ± 2.1 [#] |
| 阿司匹林 | 10 | 27.8 ± 1.6 |

与生理盐水比: * P < 0.05; 与阿司匹林比: # P < 0.05

3 000 r/min 离心 10 min 得血小板团块。用含 1% 小牛血清蛋白及 1.4 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤血小板 3 次,最后悬浮于上述含 1 mmol/L CaCl₂ 的 PBS 中。上述试验,血小板数控制在 10⁸ cell/mL 左右,用台盼蓝排斥试验证实其成活率 > 95%。

2.3 中性粒细胞的制备:在上述吸出 PRP 后的抗凝血中,加入与 PRP 等体积的生理盐水,再加入 1/6 体积的 6% 右旋糖酐 (dextran T 500) 混匀。37℃ 静置 30 min,沉淀红细胞,将上层白细胞吸出轻浮于 3 mL 淋巴细胞分离液中,2 000 r/min 离心 30 min,取出底部中性粒细胞,加入 1 mL 双蒸水溶血 30 s,使红细胞破膜,再加 2 倍浓度的 PBS 1 mL,离心 10 min,中性粒细胞团块用 PBS 洗 3 次,悬浮于 Hanks 液中(生理盐水组胞外含 1 mmol/L CaCl₂ 或 5 mmol/L EGTA 分别反应有钙或无钙的情况)并调数 2 × 10⁶ cell/mL,用台盼蓝排斥试验证实其成活率 > 95%。

2.4 玫瑰花结试验:改良 Hamburger^[5]和 Jungi^[6] 等方法,即取 50 μL 血小板与凝血酶 (0.2 U/mL) 37℃ 温育 15 min,然后分别加入 0.9% 生理盐水或药液各 50 μL,继续静置 15 min,再加入中性粒细胞悬液 100 μL,于 4℃ 振荡 30 min 取出少许细胞悬液,在常规计数板上于 40 倍镜下随机计数 100 个中性粒细胞,其周围粘附有 2 个或 2 个以上血小板者为玫瑰花结试验阳性。每样本计数 3 次,取其均值,并计算花结形成百分率,以反映粘附率大小。结果显示,胞外存在 1 mmol/L CaCl₂ 或 5 mmol/L EGTA 时,生理盐水组用凝血酶激活的血小板与中性粒细胞之间形成的玫瑰花结比率分别为 65.4%

和 11.8%。在胞外含 1 mmol/L Ca^{2+} 时,人参皂苷-Rg₁和阿司匹林均显著降低粘附率,其 IC₅₀分别为 81.2 和 70.3 $\mu\text{mol/L}$ (表 2)。

表 2 对凝血酶 (0.2 U/mL) 激活的大鼠血小板与中性粒细胞间粘附的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) | 人参皂苷-Rg ₁ | | 阿司匹林 | |
|-----------------------------|----------------------|--|--------------------------|--|
| | 粘附率 (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) | 粘附率 (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) |
| 生理盐水 | 65.4 ± 6.4 | | 65.4 ± 6.4 | |
| 37.5 | 46.3 ± 7.3 | | 52.3 ± 3.4 | |
| 75 | 33.8 ± 4.3 * | | 27.9 ± 3.1 * | |
| 150 | 19.5 ± 4.5 * | | 17.7 ± 1.6 * | |
| 300 | 14.6 ± 4.1 * | 81.2 | 13.7 ± 2.5 ³³ | 70.3 |

与生理盐水比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

国内就人参皂苷-Rg₁的药理研究基本侧重其对血小板活化这一单一因素的探讨。近来研究表明血栓形成是由包括血小板、白细胞及内皮细胞等多细胞间相互作用所致^[3],因此有必要从多细胞多因子去探讨血栓的形成与发展,以阐明药物作用的新机制。

电刺激大鼠颈动脉所形成的血栓与人体动脉血栓相似。采用血流量仪替代点式温度计来判断 OT,则排除了室温的影响,其结果更精确可靠。人参皂苷-Rg₁ 25 mg/kg 明显延长动脉 OT,效果明显强于 10 mg/kg 阿司匹林,表明人参皂苷-Rg₁具有较强的抗动脉血栓形成作用。

本研究结果表明,人参皂苷-Rg₁显著降低凝血酶激活的血小板与白细胞间的粘附率,提示人参皂苷-Rg₁的抗栓作用与其抑制该两细胞间的粘附作用密切相关。在细胞外存在 1 mmol/L Ca^{2+} 时生理盐水组的粘附率为 65.4%,而胞外含有 5 mmol/L EGTA 时,则粘附率仅为 11.8%,说明激活的血小

板与白细胞间的粘附是钙离子依赖性的,同时揭示人参皂苷-Rg₁抑制两细胞间的粘附可能与阻抑血小板或白细胞内的钙动员有关,本研究组将对此作进一步的探讨。心肌梗死时的血循环中的血小板-白细胞花结明显增加,加重梗死程度和范围^[7],人参皂苷-Rg₁能显著减少花结形成,显然为其防治缺血性心脑血管等疾病提供了又一科学依据。

综上所述,人参皂苷-Rg₁通过抑制白细胞与血小板间的粘附而发挥较强的抗血栓形成作用,这为其用于防治心脑血管血栓栓塞性疾病提供了进一步的科学依据。

参考文献:

- [1] 吴葆杰. 中草药药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [2] Zhang S M, Chen J X. Effects of several ingredients of San Qi (*Panax notoginseng*) on platelet aggregation and cAMP content [J]. Acta Acad Med Zhong Shan, 1984, 5(1): 71-74.
- [3] Marcus A J. Neutrophils inhibit platelet reactivating by multiple mechanisms: relevance to thromboregulation [J]. J Lab Clin Med, 1990, 116: 138-139.
- [4] Charlton P A, Faint R W, Bent F, et al. Evaluation of a low molecular weight modulator of human plasminogen activator inhibitor-1 activity [J]. Thrombosis and Haemostasis, 1996, 75: 808-815.
- [5] Hamburger S A, McEver R P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils [J]. Blood, 1990, 75: 550-554.
- [6] Jung T W, Spycher M O, Nydegger U E, et al. Platelet-leukocyte interaction: Selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines [J]. Blood, 1986, 67: 629-632.
- [7] Mullane K V, Rand N, Salmon J A, et al. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs; relationship to myocardial salvage by antiinflammatory drugs [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1984, 228: 510-522.

植物多糖增强肿瘤杀伤效应细胞的增殖活性和细胞毒活性

魏虎来^{1,2}, 姚小健², 赵怀顺¹, 贾正平³

(1. 兰州医学院 医学实验中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州医学院血液病研究所, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州军区总医院 药材科, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 观察红景天、红芪、地黄、枸杞子、沙参和芦荟的多糖成分对 T-AK 细胞增殖活性和杀瘤活性的增强作用。方法 用抗 CD₃ 单抗 (CD₃McAb) 和 rIL-2 激活诱生 T-AK 细胞, 观察 6 种植物多糖在诱生、扩增和杀瘤过

收稿日期: 2001-05-01

作者简介: 魏虎来 (1962-), 男, 甘肃人, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 甘肃省高等学校跨世纪学科带头人, 甘肃省跨世纪学术技术带头人 ("333 科技人才工程"), 甘肃省免疫学会常务理事, 中国民主同盟兰州医学院委员会副主任委员。主要研究方向为白血病的细胞分子生物学研究、白血病细胞耐药干预对策研究和免疫血液学研究。主持和参与多项科研项目, 发表学术论文 40 余篇; 获甘肃省科技进步二等奖 1 项, 三等奖 2 项, 甘肃省高校科技进步二等奖 2 项, 甘肃省医药卫生科技进步二等奖和三等奖各 1 项, 并荣获第三届甘肃青年科技奖。Tel: 0931-8761779 E-mail: weihl@public.lz.gs.cn