

和 11. 8%。在胞外含 1 mmol/L Ca²⁺ 时,人参皂苷 -R_{g1}和阿司匹林均显著降低粘附率,其 IC₅₀分别为 81. 2 和 70. 3 μmol/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	人参皂苷 -R _{g1}		阿司匹林	
(μmol/L)	粘附率 (%)	IC ₅₀ (μmol/L)	粘附率 (%)	IC ₅₀ (μmol/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 -R_{g1}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 -R_{g1} 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 -R_{g1}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 -R_{g1}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 -R_{g1}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 Ca²⁺ 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 -R_{g1}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 -R_{g1}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 -R_{g1}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 SM, Chen JX. 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 AJ. Neutrophils inhibit platelet reactivating by multiple mechanisms: relevance to thromboregulation [J]. J Lab Clin Med, 1990, 116: 138-139.
[4] Charlton PA, Faint RW, 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 SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils [J]. Blood, 1990, 75: 550-554.
[6] Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, 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 KV, Rand N, Salmon JA, 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⁽²⁰⁾

(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

(20) 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

程中对 T-AK 细胞增殖活性、IL-2R 表达水平以及杀伤 Raji 细胞和 L₁₂₁₀ 细胞活性的影响。结果 6 种植物多糖 (1~100 μ g/mL) 单独对 T-AK 细胞的增殖无明显作用,但在 rIL-2 和 CD₃McAb 存在下,可不同程度地增强 T-AK 细胞的增殖能力和杀瘤活性,并增加 T-AK 细胞 IL-2R 的表达。结论 红景天、红芪、地黄、枸杞子、沙参和芦荟的多糖成分增强 T-AK 细胞的增殖和杀伤活性,其作用效应与其促进 IL-2R 的表达有关。

关键词: 多糖; T-AK 细胞; 增殖; IL-2 受体; 细胞毒活性

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0140-04

Enhancement of proliferation and tumoricidal activities of T-AK cells by plant polysaccharides

WEI Hu-lai^{1,2}, YAO Xiao-jian², ZHAO Huai-shun¹, JIA Zheng-ping³

(1. Medical Experimental Center, Lanzhou Medical College, Lanzhou Gansu 730000, China; 2. Institute of Hematology, Lanzhou Medical College, Lanzhou Gansu 730000, China; 3. Department of Chinese Medicinal Materials, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Lanzhou Gansu 730050, China)

Abstract **Object** To study the augmentation of the T-activated killer (T-AK) cell-proliferating and tumor-killing activities of the polysaccharide fraction from *Rhodiola kirilowii* (Regel) Regel, *Lycium barbarum* L., *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz., *Glehnia littoralis* F. Schmidt ex Miq., *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey. and *Aloe barbadensis* Mill. *in vitro*. **Methods** The T-AK cells were induced by anti-CD₃ antibody (CD₃McAb) and rIL-2 from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The effects of the above six plant polysaccharides (1~100 μ g/mL) on the proliferation of T-AK cell, the cytotoxicity to Raji cells and L₁₂₁₀ cells, and the IL-2 receptor (IL-2R) expression in T-AK cells were determined. **Results** The six polysaccharides alone had no obvious effect on the proliferation of T-AK cells. In the presence of rIL-2 and CD₃McAb, they could reinforce the proliferation of T-AK cells and its tumor-killing activities against Raji cells and L₁₂₁₀ cells at a different extent, and a 2%~68% increase of IL-2R expression in T-AK cells was observed. **Conclusion** The plant polysaccharides significantly enhance the proliferation and the tumoricidal activities of T-AK cells and the enhancing actions related to the increase of IL-2R expression.

Key words polysaccharides; T-activated killer (T-AK) cell; proliferation; IL-2 receptor (IL-2R); cytotoxicity

以免疫治疗为代表的肿瘤生物治疗是重要的肿瘤辅助治疗方法^[1~3]。在肿瘤生物治疗中应用增强肿瘤杀伤细胞活性的物质,是提高疗效的有效途径。研究表明许多中药或其有效成分具有多方面的免疫调节活性,能够增强免疫活性细胞的功能^[4~6]。本研究观察了狭叶红景天、红芪、枸杞子、地黄、沙参和芦荟等 6 种中药的多糖成分对 rIL-2 和抗 CD₃ 抗体 (CD₃McAb) 共刺激的高效杀瘤效应细胞——T-AK (T-activated killer) 细胞增殖和细胞毒活性的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中药材: 狭叶红景天 *Rhodiola kirilowii* (Regel) Regel 采自青藏高原,红芪 *Hedysari polybotrys* Hand.-Mazz., 枸杞子 *Lycium barbarum* L., 沙参 *Glehnia littoralis* F. Schmidt ex Miq., 地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey., 芦荟 *Aloe barbadensis* Mill. 为市

售,均为正品。

1.1.2 主要试剂: rIL-2 和 CD₃McAb (军事医学科学院); MTT (Sigma 公司); CD₃单抗 (中国医学科学院血研所); APAAP 试剂盒 (北京邦定生物医学公司)。

1.1.3 正常新鲜血液: 甘肃省红十字血液中心。

1.1.4 靶细胞: Raji 细胞和 L₁₂₁₀ 细胞均由本所传代保存。

1.2 方法

1.2.1 多糖制备: 参照文献^[4,5]改进。药材洗净后水煎提取,超滤、浓缩,分级醇提,80% 醇提组分经除蛋白纯化,乙醇、丙酮、乙醚洗涤,干燥即得总多糖粗品,共 6 种: 红景天多糖 (RKP),枸杞子多糖 (LBP),红芪多糖 (RHP),沙参多糖 (RGP),地黄多糖 (RRP),芦荟多糖 (ABP)。苯酚-硫酸法测定总糖含量分别为 RKP 92%, LBP 96%, RHP 93%, RGP 90%, RRP 92%, ABP 91%。实验时用 RPMI 1640 培养液溶解,调 pH 值,过滤除菌或高压灭菌,

4℃ 保存备用。

1.2.2 T-AK 细胞诱生: 参见文献^[1,3,7,8]。从正常外周血液分离出单个核细胞 (PBM C), 2×10^6 /mL 接种于含 rIL-2 (100 U /mL) 和 CD₃McAb (1.0 μ g /mL) 的 RPMI 1640 培养基中激活培养, 并适时传代扩增。观察多糖的作用时, rIL-2 和 CD₃McAb 量均减少一半。

1.2.3 T-AK 细胞的增殖活性: T-AK 细胞激活后扩增时加入不同浓度的多糖, 培养一定时间后用 MTT 法^[8]检测增殖指数 (GI)。

GE 多糖组 A₅₇₀ 对照组 A₅₇₀

1.2.4 T-AK 细胞杀伤活性: 在 T-AK 细胞的诱

表 1 6 种植物多糖对 T-AK 细胞增殖活性的影响 (n= 8)

浓 度 (μ g /mL)	多 糖 (GI)					
	RKP	LBP	RGP	ABP	RRP	RHP
0	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00
1.0	1.06± 0.02	1.0± 0.02	0.98± 0.02	1.08± 0.01	1.08± 0.03	1.02± 0.01
5.0	1.12± 0.04	1.18± 0.04	1.04± 0.02	1.15± 0.03	1.08± 0.02	1.09± 0.03
10.0	1.33± 0.05 *	1.28± 0.06 *	1.08± .05	1.2± 0.02	1.19± 0.04	1.20± 0.04
50.0	1.18± 0.04	1.19± 0.03	1.24± 0.06	1.29± 0.06 *	1.07± 0.03	1.05± 0.02
100.0	0.98± 0.03	1.10± 0.02	1.05± 0.03	1.15± 0.04	0.98± 0.06	1.05± 0.01

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

2.2 植物多糖增强 T-AK 细胞的细胞毒活性: 在 T-AK 细胞的诱生激活阶段和效、靶细胞作用过程中加入一定量的多糖, 可不同程度地增强 T-AK 细胞杀伤 Raji 细胞和 L₁₂₁₀ 细胞的活性, 以低效靶比

生、杀瘤和扩增阶段分别加入多糖, MTT 法^[3,7]检测多糖对 T-AK 细胞杀伤活性的影响。

1.2.5 T-AK 细胞 IL-2 受体 (IL-2R, CD₂₅⁺) 表达: 采用 APAAP 法^[3], 结果以阳性细胞百分数表示。

2 结果

2.1 植物多糖增强 T-AK 细胞的增殖活性: 所用 6 种多糖 (1~ 100 μ g /mL) 单独对 PBM C 的增殖无明显影响; 对激活的 T-AK 细胞的增殖有轻微的刺激作用 (2%~ 15%, 数据未列), 但当 rIL-2 和 CD₃McAb 存在时, 这些多糖对 T-AK 细胞的增殖有较明显的促进作用 (表 1)。

(E/T) 时尤为明显, 最高可达 2 倍 (表 2); T-AK 细胞与 Raji 细胞或 L₁₂₁₀ 细胞作用过程中加入多糖, 可使 T-AK 细胞的杀伤活性提高 7.1%~ 26% (表 3)。

表 2 激活过程中多糖对 T-AK 细胞杀伤活性的影响 (n= 8)

多糖	浓 度 (μ g /mL)	不同 E/T 杀伤活性 (%)			
		20: 1	10: 1	5: 1	2.5: 1
对 照	-	84.36± 6.50	70.13± 8.14	44.19± 4.04	25.00± 5.52
RKP	10.0	89.23± 7.33	83.88± 6.55	68.00± 6.50 *	44.87± 5.19 *
LBP	10.0	90.49± 9.18	83.61± 5.05	64.99± 6.66	42.08± 3.34 *
ABP	50.0	89.34± 4.26	75.48± 3.36	58.14± 3.87	39.2± 2.20
RRP	10.0	88.88± 6.64	86.16± 8.04	62.09± 4.54	41.19± 3.16
RGP	50.0	87.76± 6.55	84.08± 8.35	55.16± 4.33	39.94± 4.91
RHP	10.0	88.6± 8.10	75.35± 2.98	58.17± 7.31	43.09± 4.99 *

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

表 3 效、靶作用过程中多糖对 T-AK 细胞杀伤活性的影响 (n= 4)

多 糖	浓 度 (μ g /mL)	杀伤活性 (E/T= 10 ² : 1%)	
		Raji	L ₁₂₁₀
对 照	-	71.43± 4.24	50.50± 2.71
RKP	10.0	80.25± 2.28	63.65± 2.96
ABP	50.0	79.75± 3.56	57.43± 6.23
RHP	10.0	76.53± 1.85	58.43± 6.25
RRP	10.0	78.62± 2.16	59.83± 5.75

与对照组比较: * P < 0.05

2.3 植物多糖促进 T-AK 细胞 IL-2R 的表达: 在 T-AK 细胞的培养体系中加入适量的多糖, T-AK

细胞 IL-2R (CD₂₅⁺) 的表达量明显增加, 提高 21%~ 68% 不等 (表 4), 基本与其对 T-AK 细胞增殖活性和杀伤活性的促进作用一致。

表 4 多糖对 T-AK 细胞 IL-2R 表达的影响 (n= 3)

多 糖	浓 度 (μ g /mL)	CD ₂₅ ⁺ (%)	多糖 /对照
对 照	-	40.67± 1.89	1.00
RKP	10.0	68.36± 4.38	1.68
ABP	50.0	58.00± 7.78	1.43
LBP	10.0	64.00± 3.74	1.57
RHP	10.0	60.67± 8.18	1.43
RRP	10.0	61.00± 3.74	1.50
RGP	50.0	49.33± 7.41	1.21

与对照组比较: * P < 0.05

3 讨论

抗 CD₃抗体和 rIL-2共激活的 T-AK细胞是具有 LAK细胞和 CD₃AK细胞共同特性的异质细胞群体,是一类较为理想的可用于白血病(肿瘤)生物治疗的高效杀瘤效应细胞,在小白鼠白血病等肿瘤的生物治疗中取得了较好的效果^[1-3,8]。

免疫调节剂可增强免疫活性细胞和杀瘤效应细胞的活性,许多植物多糖成分具有生物反应调节剂(BRM)样作用,具有广谱防癌抗癌和调节免疫功能的作用^[4-6,8]。本研究证实, RKP LBP ABR RGP RRP RHP等 6种植物多糖在 rIL-2和 CD₃McAb存在下,可不同程度地促进 T-AK细胞的增殖活性和杀伤 Raji 细胞 L₁₂₁₀细胞的活性,在低 E/T时尤为显著,可达 2倍。同时适量的多糖能增加 T-AK细胞 IL-2受体的表达量,说明植物多糖对 T-AK细胞活性的增强作用可能通过增加 IL-2R的表达量,协同 IL-2对 T-AK细胞的刺激作用,提示植物多糖对 T-AK细胞活性的增强效应部分与促进 IL-2R的表达有关。

植物多糖对免疫活性细胞无直接刺激作用。研究发现巨噬细胞表面存在多糖受体,多糖成分可与巨噬细胞上的受体结合^[9],启动和活化巨噬细胞使其分泌细胞活性因子,活化巨噬细胞及其释放的活性因子的间接作用促进淋巴细胞等免疫活性细胞的功能;同时,淋巴细胞被 rIL-2等第一信号活化后也

可表达多糖受体,与多糖类物质结合而产生协同效应。植物多糖由于其广谱作用和低毒性的特点,可作为 BRM 用于肿瘤生物治疗。

参考文献:

- [1] Loeffler C M, Plant J L, Anderson P M, *et al.* Antitumor effects of interleukin-2 liposomes and anti-CD₃-stimulated T-cells against murine MCA-38 hepatic metastasis [J]. Cancer Res, 1991, 51: 2127-2132.
- [2] Katsanis E, Xu Z, Anderson P M, *et al.* Short-term *ex vivo* activation of splenocytes with anti-CD₃ plus IL-2 and infusion post-BMT into mice results *in vivo* expansion of effector cells with potent anti-lymphoma activity [J]. Bone Marrow Transplant, 1994, 14: 563-572.
- [3] Wei H L, Su H X, Yao X J. Biological feature of human T-activated killer cells [J]. Chin J Cancer Res, 1999, 11: 111-114.
- [4] 方圣鼎,陈燕,徐小异,等. 中药黄芪有效成分的研究I: 多糖体的分离、性质及生理活性 [J]. 有机化学, 1982, 1: 26-29.
- [5] 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定 [J]. 药学通报, 1984, 19: 622-625.
- [6] 王文涛,周金黄,邢善田,等. 海藻硫酸多糖对正常及免疫低下小鼠的免疫调节作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8: 199-202.
- [7] 魏虎来. MTT法和 LDH法检测 T-AK细胞活性的研究 [J]. 兰州医学院学报, 1996, 22(3): 9-11.
- [8] 魏虎来,贾正平,赵怀顺,等. T-AK细胞和 IL-2脂质体联合硒酸酯多糖抗白血病效应的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18: 410-413.
- [9] Goldman R. Characteristics of the β -glucan receptor of murine macrophages [J]. Exp Cell Res, 1988, 174: 481-490.

海嘧啶毒性的实验研究

季宇彬,高世勇,孔琪,张秀娟,杨宝峰⁽²⁰⁾

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究海嘧啶的毒性作用。方法 通过海嘧啶对 FC小鼠和 S₁₈₀, H₂₂荷瘤小鼠胸腺和精囊重量及指数的研究,观察海嘧啶的毒性作用。结果 海嘧啶可使不同荷瘤小鼠胸腺及精囊萎缩,使不同荷瘤小鼠白细胞及血小板数量下降,但其萎缩及下降程度均小于 5-Fu。结论 海嘧啶在毒性方面产生了拮抗作用,使 5-Fu 的毒性明显下降,即海嘧啶在增强 5-Fu 抗肿瘤作用的同时,显著降低了 5-Fu 的毒性。

关键词: 海嘧啶;荷瘤小鼠;毒性作用

中图分类号: R285.53; R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0143-03

Studies on toxicity of haimiding

Ji Yu-bin, GAO Shi-yong, KONG Qi, ZHANG Xiu-juan, Yang Bao-feng

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

⁽²⁰⁾ 收稿日期: 2001-06-11

基金项目: 由国家科委生命中心博士基金资助(项目号: 96-901-06-10);中国优秀博士后基金资助(中博号[1999]17号);黑龙江省杰出青年基金资助(J9906);黑龙江省自然科学基金项目资助(项目号: D-0018)

作者简介: 季宇彬,男,教授,硕士、博士研究生导师,44岁,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究,1999年进入哈尔滨医科大学博士后工作流动站工作

* 哈尔滨医科大学博士后导师