

- [6] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors signaling and modulation [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [7] Cain K, Bratton S B, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6067-6070.
- [8] Karajewska M, Wang H G, Krajewska S, et al. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(8): 1605-1607.
- [9] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: Definition, mechanism, and relevance to disease [J]. *Am J Med*, 1999, 107(5): 489-506.
- [10] Zamzami N, Brenner C, Marzo I, et al. Subcellular and sub-mitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins [J]. *Oncogene*, 1998, 16(7): 2255-2282.

淫羊藿苷伍用三七总皂苷对小鼠免疫功能的调节作用

肖幸丰, 王志强, 楼宜嘉*

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 研究淫羊藿苷 (icariin, ICA) 伍用三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 对小鼠免疫功能的调节作用, 为该组合药物改善阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 动物模型空间学习记忆能力的作用机制提供部分实验依据。方法 采用血清药理学方法观察小鼠连续 ig ICA + PNS [(40+320)、(80+640)、(160+1 280) mg/kg]、单用 ICA (80 mg/kg) 和 PNS (640 mg/kg) 7 d 制得的含药血清对伴刀豆蛋白 A (ConA) 和脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖、IL-2 分泌的影响, 并观察脏器指数的变化。结果 ICA 伍用 PNS [(80+640)、(160+1 280) mg/kg] 具有较强的协同作用, 其含药血清能明显促进 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖 ($P < 0.01, 0.05$), 量效曲线呈倒 U 形; 含药血清对 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖无显著促进作用 ($P > 0.05$)。ICA + PNS [(80+640) 和 (160+1 280) mg/kg] 含药血清能明显促进 IL-2 生成 ($P < 0.01$), 两组分合用作用强于单用, 提示具有较强的协同作用, 其量效曲线亦呈倒 U 形分布。单用 ICA、PNS 或两者合用均未明显影响小鼠脏器指数 ($P > 0.05$)。结论 ICA 伍用 PNS 对小鼠免疫系统具有一定的选择性调节作用, 主要增强 T 细胞功能。

关键词:淫羊藿苷; 三七总皂苷; 免疫调节作用; 血清药理学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)06-0888-04

Immunoregulation of icariin combined with *Panax notoginseng* saponins in mice

XIAO Xing-feng, WANG Zhi-qiang, LOU Yi-jia

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of icariin (ICA) combined with the *Panax notoginseng* saponins (PNS) on immunological function in mice and provide some experimental evidences for the combination mechanism improving the spatial learning and memory abilities of Alzheimer's disease (AD) animal model. **Methods** Based on serum pharmacological method, the ICR mice were individually ig administrated with ICA + PNS [(40+320), (80+640), and (160+1 280) mg/kg] or ICA (80 mg/kg), and PNS (640 mg/kg) only for 7 d. Drug-containing serum was prepared and effects on spleen lymphocyte proliferation of Bable/c mice induced by concanavalin-A (ConA) or lipopolysaccharide (LPS) and on interleukin-2 (IL-2) secretion were observed *in vitro*. Meanwhile, the immunological organ indexes of treated mice were evaluated. **Results** Drug-containing serum of ICA + PNS [(80+640) and (160+1 280) mg/kg] could improve the spleen lymphocyte proliferation induced by ConA ($P < 0.01, 0.05$), and its dose-effect curves were shapely similar to "∩". Proliferation of spleen lymphocyte induced by LPS in tested groups could not be enchanced ($P > 0.05$). Drug-containing serum of ICA + PNS [(80+640) and (160+1 280) mg/kg] could improve IL-2 production ($P < 0.01$). ICA combined with PNS showed synergistic effect and an upside-down U shaped dose-effect curve. Compared with the control group, however, there were no significant differences in the immunological organ indexes of all groups administrated by ICA, PNS or the combination of the two ($P > 0.05$), respectively. **Conclusion** ICA combined with PNS could

收稿日期: 2005-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472112); 浙江省中医药管理局重点资助项目 (2002KF001); 浙江省科技厅计划项目 (2004C33106)

作者简介: 肖幸丰 (1978—), 男, 浙江大学硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (0571) 87230372 E-mail: xiaoxf21st@sina.com

* 通讯作者: 楼宜嘉 Tel/Fax: (0571) 87217206 E-mail: yijialou@zju.edu.cn

improve immunological function selectively and promote T cell function in mice.

Key words: Icaritin (ICA); *Panax notoginseng* saponins (PNS); immunoregulatory effects; serum pharmacology

淫羊藿和三七均为补益中药,淫羊藿苷(icaritin, ICA)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)分别为其主要有效成分。近年来以淫羊藿或三七为主伍用其他药材改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者临床症状以及动物 AD 模型行为的研究时有报道^[1,2]。同时也有研究表明两药材及其活性成分分别具有增强免疫作用^[3,4]。鉴于 AD 的发病机制虽然迄今未明,但许多环节构成的病理过程已获得认同^[5],其中免疫功能与发病相关的学说已获得多数研究资料支持^[6~8]。本课题组前期研究结果显示,ICA 伍用 PNS 能显著改善 β 淀粉肽大鼠侧脑室注射所致的空间学习和记忆障碍^[9]。本实验采用血清药理学方法初步观察 ICA 伍用 PNS 对小鼠免疫功能的影响,旨在为该组合药物改善 AD 动物模型空间记忆障碍的作用机制提供部分实验依据。

1 材料

1.1 药物:淫羊藿苷(ICA,质量分数 50.0%)。三七总皂苷(PNS),质量分数(92.4 $\pm$ 0.8)%,均为本研究室提取纯化制备,经浙江大学药学院药物分析和代谢研究室测定。

1.2 动物:ICR 小鼠,雌雄各半,体重 18~20 g,浙江省医学科学院实验动物中心提供,二级,动物合格证号:SCXK(浙)2003-0001。Bable/c 小鼠,雄性,体重 18~20 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2003-0003。

1.3 试剂:伴刀豆蛋白 A (ConA)、脂多糖(LPS)和 MTT 为 Sigma 产品。RPMI-1640 细胞培养基为 Gibco 产品。小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。

1.4 仪器:1851 型层流超净工作站, Thermo Electron 公司; Medimachine, 丹麦 DAKO 产品; Labofuge 400R 离心机, Heraeus 公司; Elx800 型台式酶标仪, Bio-Tek 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药:根据血清药理学研究要求^[10],并参考前期 ICA 伍用 PNS 改善 β 淀粉肽大鼠侧脑室注射所致的空间学习和记忆障碍药效学实验剂量^[9],动物按以下方法分组给药:ICA+PNS 组,剂量分别为:(40+320)、(80+640)、(160+

1 280) mg/kg。另设单用 ICA 80 mg/kg 和 PNS 640 mg/kg 及(蒸馏水)对照组,每组 10 只动物。各组均连续 ig 给药 7 d,给药体积均为 0.2 mL/10 g。

2.2 小鼠含药血清制备及免疫器官脏器指数测定:第 7 日给药前称体重,给药后 1 h 无菌摘眼球取血,并立即颈椎脱臼处死,摘取脾脏和胸腺,称质量。取得的血液 3 000 r/min 离心 10 min,无菌分离血清后,经 56 $^{\circ}$ C、30 min 灭活,4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞悬液制备: BALB/c 小鼠颈椎脱臼处死,用 75% 酒精浸泡消毒,无菌取出脾脏,剪成 1~2 mm 小块,加 3~5 mL Hank's 液后用 Medimachine 处理成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 3 min,沉淀经 0.83% NH_4Cl 处理除去红细胞, Hank's 液洗 2 遍,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配成细胞悬液。显微镜下细胞计数,配成 5×10^6 /mL 脾淋巴细胞悬液。

2.4 含药血清对 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞增殖的影响:在 96 孔培养板中每孔加入脾淋巴细胞悬液 100 μL ,再加入 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA 溶液 100 μL 或 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 溶液,以及 20 μL 不同剂量组的含药血清,各设 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 48 h。培养结束前 4 h 每孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT,培养结束弃去上清液,每孔加入 100 μL DMSO,充分振荡后静置 10 min,酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度(A_{570})值。

2.5 含药血清对 BALB/c 小鼠脾细胞分泌白细胞介素 2 (IL-2) 的影响:按 2.3 项方法制备脾淋巴细胞悬液,调浓度为 1.0×10^7 /mL,加入 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,同时加入 20 μL ConA 溶液(终质量浓度 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 20 μL 不同剂量组的含药血清,培养 48 h 后取上清液,即为待测 IL-2 样品。无菌取 Bable/c 小鼠胸腺,同脾淋巴细胞悬液操作方法制备 5×10^6 /mL 胸腺淋巴细胞悬液。于 96 孔培养板中每孔加入 100 μL 胸腺淋巴细胞悬液、100 μL 待测样品和 20 μL ConA (终质量浓度 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 48 h,培养结束前 4 h 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL ,培养结束弃去上清液,每孔加入 100 μL DMSO,充分振荡后静置 10 min,酶标仪测定 A_{570} 值(以激活的胸腺淋巴细胞的增殖反映 IL-2 的量)。

2.6 统计学处理:实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间显著性检验采用 ANOVA 检验。

3 结果

3.1 ICA 伍用 PNS 对小鼠免疫器官脏器指数的影响:单用 ICA (80 mg/kg) 或 PNS (640 mg/kg) 及 ICA 伍用 PNS [(40+320)、(80+640)、(160+1280) mg/kg] 对小鼠体重、脾脏和胸腺脏器指数均无显著影响 ($P>0.05$)。

3.2 含药血清对 Bable/c 小鼠脾淋巴细胞增殖的促进作用:与溶剂对照组比较,ICA 伍用 PNS [(80+640)、(160+1280) mg/kg] 具有较强的协同作用,其含药血清能明显促进 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖 ($P<0.01, 0.05$),量效曲线呈倒 U 型;单用 ICA (80 mg/kg) 和 PNS (640 mg/kg) 所得含药血清能促进脾淋巴细胞增殖,但和对照组比差异无显著性 ($P>0.05$)。和对照组相比,各剂量组合含药血清对 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖无显著促进作用 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 ICA 伍用 PNS 对 ConA 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of ICA combined with PNS on spleen lymphocyte proliferation of mice induced by ConA or LPS ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖		LPS 诱导的脾淋巴细胞增殖	
		A ₅₇₀	促进率/%	A ₅₇₀	促进率/%
对照	—	0.323±0.093	—	0.281±0.031	—
ICA	80	0.371±0.066	14.8	0.284±0.037	1.1
PNS	640	0.353±0.056	9.2	0.305±0.067	8.5
ICA+PNS	40+320	0.385±0.088	19.2	0.323±0.050	11.7
	80+640	0.434±0.090**	34.4	0.314±0.057	14.9
	160+1280	0.411±0.070*	27.2	0.324±0.059	15.3

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 含药血清对 Bable/c 小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的影响:与溶剂对照组比较,ICA 伍用 PNS [(80+640)、(160+1280) mg/kg] 具有较强的协同作用,其含药血清能明显促进 IL-2 产生增加 ($P<0.01$),量效曲线亦呈倒 U 型分布。单用 ICA (80 mg/kg) 和 PNS (640 mg/kg) 所得含药血清虽也能促进 IL-2 产生,但与溶剂对照组比较,无显著差异 ($P>0.05$)。见表 2。

4 讨论

本实验以中药血清药理学方法从量效关系角度出发,在细胞水平上对 ICA 伍用 PNS 的免疫药理学活性进行研究,旨在为该组合药物用于治疗 AD 提供部分实验依据。

表 2 ICA 伍用 PNS 对小鼠脾淋巴细胞中 IL-2 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of ICA combined with PNS on IL-2 production in spleen lymphocyte of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	A ₅₇₀	促进率/%
对照	—	0.116±0.014	—
ICA	80	0.126±0.010	8.6
PNS	640	0.125±0.014	7.8
ICA+PNS	40+320	0.130±0.015	12.9
	80+640	0.161±0.015**	38.8
	160+1280	0.140±0.013*	20.7

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

目前认为,衰老是 AD 发生最为危险的因素,而免疫功能减退则是衰老的最明显特征之一。文献报道^[8],AD 患者淋巴细胞的某些功能减低,主要表现为 T 细胞对有丝分裂原 (ConA) 刺激的反应降低等,并与免疫炎症反应具有一定相关性。本研究显示,ICA 伍用 PNS 能促进 ConA 诱导的脾淋巴细胞增殖,并能促进脾淋巴细胞分泌 IL-2。提示其可能有免疫促进作用,此作用可能与本课题前期研究中组合药物改善 AD 大鼠行为异常有关。

文献报道^[11],ICA 能通过降低抑制性 T 淋巴细胞 (Suppressor T cell, Ts) 影响淋巴细胞转化而发挥免疫调节作用,提示 ICA 可能通过抑制 Ts 细胞促进体液免疫。本研究所用的 PNS 主要由人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re、及三七皂苷 R₁组成,其中人参皂苷 Rg₁、Rb₁是其主要成分。文献报道^[4],PNS 主要成分人参皂苷 Rg₁主要经肠道细菌代谢成 Rh 被吸收的。Rg₁本身具有促进 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖而不促进 B 淋巴细胞增殖的作用。而其代谢产物 Rh 对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖有抑制作用,且不促进 B 淋巴细胞增殖。此外,经证实人参皂苷 Rb₁、Re 对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖有显著的促进作用^[12]。这些研究提示选择性地促进 T 淋巴细胞增殖作用主要与 ICA、人参皂苷 Rb₁、Re 或其代谢产物有关。本研究结果显示,单用 ICA 和 PNS 均无上述作用,但两者伍用后,则体现协同促进作用,提示 ICA 伍用 PNS 可能有利于改善 AD 患者免疫功能异常。

本研究结果还表明,ICA 伍用 PNS 能显著提高脾细胞 IL-2 的产生,而单用其中任何一种,均无显著促进作用。由于 IL-2 对自然杀伤 (NK) 细胞、抗体依赖性杀伤细胞和淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞等均有促进其分化增殖作用,提示

ICA 伍用 PNS 对 AD 形成过程中淋巴细胞由于免疫衰老所致其数量减少的改善有重要意义。

本研究量效关系中呈现的免疫调节作用,在高剂量体现回落的趋势,该作用可能与两者伍用的多靶点多层次作用特点有关。

References:

- [1] Zhao C A, Zhou G P, Li E, *et al.* Effect of formula for replenishing kidney and filling-up essence on learning-memory-behavior of rat models with Alzheimer's disease [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(19): 3911-3913.
- [2] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnesic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005, 26(2): 143-149.
- [3] Liang H R, Vuorela P, Hiltunen R. Isolation and immunomodulatory effect of flavonol glycosides from *Epimedium hunanense* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(4): 316-319.
- [4] Wang Y, Jiang Y. Effects of ginsenoside Rg1 and its metabolite Rb1 on the function of immunocyte in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(12): 927-929.
- [5] Cummings J L. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(1): 56-67.
- [6] Wisniewski T, Frangione B. Immunological and anti-chaper-

- one therapeutic approaches for Alzheimer's disease [J]. *Brain Pathol*, 2005, 15(1): 72-77.
- [7] Mruthinti S, Buccafusco J J, Hill W D, *et al.* Autoimmunity in Alzheimer's disease; increased levels of circulating IgGs binding Aβ and RAGE peptides [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(8): 1023-1032.
- [8] Ferrari E, Fioravanti M. Variability of interactions between neuroendocrine and immunological functions in physiological aging and dementia of the Alzheimer's Type [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 917: 582-596.
- [9] Xiao X F, Zheng M, Lou Y J, *et al.* Effects of icariin combined with the *Panax notoginseng* saponins on behavior and acetylcholinesterase activity induced by β-amyloid peptide₂₅₋₃₅ lateral ventricle injection in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2005, 22(3): 178-181.
- [10] Liang C M, Wang X X, Dong Q, *et al.* A serum pharmacological study on the immunoregulatory effects of Yu Ping Feng Pulvis in mice [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 2003, 23(6): 385-388.
- [11] Shen Z Y, Chen Y. Comparative study of effect and kidney-tonifying recipe on regulatory effect of T lymphocytes apoptosis genes in corticosterone-treated rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2002, 18(3): 187-190.
- [12] Cho J Y, Kim A R, Yoo E S, *et al.* Ginsenosides from *Panax ginseng* differentially regulate lymphocyte proliferation [J]. *Planta Med*, 2002, 68(6): 497-500.

川芎嗪对 rd 和 rds 小鼠视网膜光感受器细胞干预作用的光镜观察

邓新国¹, 胡世兴^{1,2}, 贾小芸¹, 张清炯¹, 罗琳¹

(1. 中山大学中山眼科中心 教育部重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040)

摘要:目的 通过 rd 和 rds 小鼠视网膜光感受器细胞的病理变化探讨盐酸川芎嗪对遗传性视网膜色素变性小鼠可能的治疗作用。方法 rd 和 rds 新生鼠各 84 只, 随机分为两组, 实验组和对照组, 每组 42 只小鼠。实验组小鼠从出生当天开始, ip 盐酸川芎嗪 80 mg/kg, 每日 2 次, 至出生后 35 d; 对照组 ip 等量生理盐水。分别于 0 d 和注射后 3、7、14、21、28、35 d 取眼球, 立即经 10% 中性甲醛固定, 光学显微镜下观察水平视网膜近赤道部位光感受器细胞的厚度。结果 病理结果显示, 经盐酸川芎嗪治疗后 14、21、28、35 d, 与未用药的对照组相比较, rd 和 rds 小鼠光感受器细胞层数明显增加 ($P < 0.01$)。结论 川芎嗪可延缓 rd 和 rds 小鼠视网膜光感受器细胞的破坏。

关键词: 川芎嗪; rd 小鼠; rds 小鼠; 光感受器细胞

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)06-0891-04

Interventional effect of tetramethylpyrazine on retinal photoreceptor cells of rd and rds mice by observation with light microscopy

DENG Xin-guo¹, HU Shi-xing^{1,2}, JIA Xiao-yun¹, ZHANG Qing-jiong¹, LUO Lin¹

(1. Key Laboratory of Ophthalmology, Ministry of Education, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Eye Hospital, Chinese Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100040, China)

Abstract: Objective To determine whether tetramethylpyrazine hydrochloride has an efficacy on hereditary retinitis pigmentosa of rd and rds mice by the observation of the photoreceptor cells with light microscopy. **Methods** Eighty-four rd and rds mice were randomly divided into two groups, experimental group and control group. Each group had 42 mice. From postnatal day 0 to 35, animals in experimental

收稿日期: 2005-11-13

基金项目: 广东省中医药管理局基金资助项目 (1050178)

作者简介: 邓新国 (1961—), 男, 河南郑州市人, 副研究员、博士, 从事眼科学基础和临床研究 10 余年, 发表学术论文 40 余篇, 研究方向为视网膜变性的药物治疗研究和眼科药物的开发。Tel: (020) 87330289 E-mail: dengxg61@163.net