

• 药理与临床 •

人参多糖和猪苓多糖对大鼠肠道黏膜淋巴细胞功能的影响

张皖东¹, 吕 诚¹, 刘振丽¹, 赵宏艳¹, 杨大坚², 陈士林², 吴志鹏³, 吕爱平^{1,2,3*}

(1. 中国中医科学院基础理论研究所, 北京 100700; 2. 香港理工大学深圳现代中药研究所, 广东 深圳 518057; 3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 观察人参多糖和猪苓多糖对大鼠肠道黏膜淋巴细胞功能的影响。方法 分离 SD 大鼠外周血单个核细胞 (PBMC)、派伊尔结淋巴细胞 (PPL)、肠道上皮内淋巴细胞 (IEL) 和黏膜固有层淋巴细胞 (LPL), 分别与不同质量浓度的人参多糖和猪苓多糖共同培养, 检测上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 水平变化。结果 人参多糖和猪苓多糖均可以使 PBMC 和 PPL 培养上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 水平升高; 2 mg/mL 猪苓多糖可以使 IEL 培养上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 水平升高; 人参多糖和猪苓多糖可以使 LPL 培养上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 水平降低。结论 人参多糖和猪苓多糖对大鼠肠道黏膜淋巴细胞功能具有调节作用。

关键词: 人参多糖; 猪苓多糖; 肠道黏膜免疫; 淋巴细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)02-0221-04

Effect of ginseng polysaccharide and *Polyporus umbellatus* polysaccharide on function of lymphocytes in enteric mucosa of rats

ZHANG Wan-dong¹, LÜ Cheng¹, LIU Zhen-li¹, ZHAO Hong-yan¹,

YANG Da-jian², CHEN Shi-lin², WU Zhi-peng³, LÜ Ai-ping^{1,2,3}

(1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Modern Chinese Medicine, The Hong Kong Polytechnic University, Shenzhen 518057, China; 3. National Pharmaceutical Engineering Research Center for Solid Preparation of Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ginseng polysaccharide and *Polyporus umbellatus* polysaccharide on function of T-lymphocytes in enteric mucosa of rats. **Methods** The peripheral blood mononuclear cells (PBMC), Peyer's Patch lymphocyte (PPL), intraepithelial lymphocyte (IEL), and lamina propria lymphocyte (LPL) of SD rats were isolated. These lymphocytes were co-cultured with ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide of different concentrations. The changes of TNF- α and IFN- γ level in supernatants were observed with ELISA. **Results** Ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide increased the level of TNF- α and IFN- γ in the supernatants of PBMC and PPL; *P. umbellatus* polysaccharide in the dosage of 2 mg/mL increased the level of TNF- α and IFN- γ in supernatant of IEL; ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide decreased the level of TNF- α and IFN- γ in supernatant of LPL. **Conclusion** Ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide can regulate the function of lymphocytes in enteric mucosal immune system.

Key words: ginseng polysaccharide; *Polyporus umbellatus* polysaccharide; intestinal mucosal immunity; lymphocyte

中药成分复杂、具有多途径、多靶点发挥药理作用的特点。研究表明,多糖类物质是中药复杂成分之一,在中药治疗中起着重要作用。研究发现多糖及多糖复合物参与和介导了多种细胞功能的调节,它们能够刺激多种免疫细胞,促进白细胞介素、肿瘤坏死

因子、干扰素等细胞因子的合成,调节抗体和补体等来调节免疫系统^[1]。但对于多糖类的肠道黏膜免疫调节途径和机制仍不清楚。肠道黏膜免疫系统是当今许多学者共同研究的热门领域。肠道黏膜免疫系统是指分布于机体胃肠道内表面黏膜内相关的淋巴

收稿日期: 2006-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171133)

作者简介: 张皖东(1977-),男,安徽省滁州市人,主治医师,在读医学博士,主要从事中医药防治类风湿性关节炎和黏膜免疫研究。

* 通讯作者 吕爱平 Tel: (010) 64067611 E-mail: lap64067611@126.com

组织 (gut-associated lymphoid tissue, GALT), 由派伊尔结 (Peyer's Patches, PP)、肠系膜淋巴结以及分散在黏膜固有层 (lamina propria, LP) 和肠上皮中的大量淋巴细胞组成^[2]。研究表明肠道黏膜免疫系统是产生免疫耐受作用的重要部位, 通过激活肠道黏膜免疫, 达到免疫耐受或者免疫抑制是治疗自身免疫性疾病的可能途径之一。

笔者设想难于被吸收的多糖可能部分是通过与肠道黏膜系统接触, 刺激黏膜系统淋巴细胞, 发挥其免疫调节作用。本研究选用临床常用的抗肿瘤中药猪苓多糖、研究较多的人参多糖作为多糖的代表, 探讨它们对肠道黏膜免疫相关细胞的作用。

1 材料与与方法

1.1 动物: 雄性 SD 大鼠 12 只, 清洁级, 体重 (190 ± 10) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供 (许可证号: SCXK 粤 20050001), 饲养于 SPF 级动物房。

1.2 药物: 人参多糖, 6 mg/2 mL, 沈阳双鼎制药有限公司产品 (批号 05030102); 猪苓多糖 10 mg/2 mL, 江苏正大天晴药业股份有限公司产品 (批号 0404231)。

1.3 细胞分离方法

1.3.1 分离外周血单个核细胞: 取大鼠外周血 3 mL, 肝素抗凝, 用 ficoll (美国 Pharmacia 公司产品) 分离出单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。加入 0.85% NH₄Cl 溶液溶解残存的红细胞, 获得纯化的 PBMC。

1.3.2 分离 PP 结淋巴细胞 (Peyer's Patches lymphocyte, PPL): 参照文献方法^[3]获取 PP, 机械粉碎后, 制成 PBS 混悬液, 300 目筛网滤过, 再利用 ficoll, 分离出 PP 中 T 淋巴细胞。

1.3.3 分离小肠上皮内淋巴细胞 (intraepithelial lymphocyte, IEL): 参考 Wyatt CR 等^[4]报道的方法, 取出大鼠全部小肠, 用含抗生素的 D-Hank's 液冲洗肠腔, 翻转小肠使黏膜面向外, 置于盛有消化液的离心管中。消化 1 h, 消化液滤过后, 离心 1 min (1 000 r/min), 去除上清液, 加入 RPMI-1640 培养液, 调整体积至 5.4 mL, 再加入 100% percoll (美国 Pharmacia 公司产品) 至 9 mL, 充分混匀后成为 40% 细胞-percoll 混悬液, 在试管底部轻轻加入 1 mL 70% percoll, 制成 percoll 梯度分离液, 离心 20 min (600 × g)。收集 40% 与 70% percoll 界面间的细胞, 即为 IEL。

1.3.4 分离小肠固有层淋巴细胞 (lamina propria lymphocyte, LPL): 将上述消化 1 次后的肠道组织

加入含有 0.1% I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司产品) 的 RPMI-1640 培养液中。再次消化 1 h, 滤过、离心、去除上清液, 加入培养液, 调整体积至 5.4 mL, 再加入 100% percoll 至 9 mL, 充分混匀后成为 40% 细胞-percoll 混悬液, 在试管底部轻轻加入 1 mL 70% percoll, 制成 percoll 梯度分离液。离心 20 min (600 × g), 收集 40% 与 70% percoll 界面间的细胞, 即为 LPL。

1.4 流式细胞仪检测: 取分离出的细胞悬液 100 μL, 参照产品说明书配好三色标记的抗大鼠单抗 (FITC 标记 CD3 单克隆抗体、RPE 标记 CD4 单克隆抗体、RPE-Cy5 标记 CD8 单克隆抗体, 美国 Serotec 公司产品), 室温避光反应 0.5 h, 上流式细胞仪检测, 收集、分析数据。

1.5 细胞培养: 将上述分离出的淋巴细胞加入含 10% 胎牛血清培养液, 调节细胞浓度为 1 × 10⁶/mL, 取细胞悬液分别置于 96 孔培养板中, 每孔 200 μL, 分别加入不同质量浓度猪苓多糖、人参多糖 (50 μL), 对照组加入等量培养液。细胞置 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中孵育 48 h, 定期观察淋巴细胞生长情况, 留上清液备用。

1.6 γ-干扰素 (IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平检测: 参照试剂盒 (IFN-γ、TNF-α ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司) 说明书检测培养上清液中 IFN-γ 和 TNF-α 水平。方法如下: 向 96 孔板中分别加入 100 μL 的待测上清液和标准品, 室温下孵育 2 h; 用洗涤缓冲液洗 5 次, 加入 100 μL 的检测抗体, 室温下孵育 1 h; 用洗涤缓冲液洗 5 次, 加入 100 μL 的辣根过氧化物酶底物, 室温下孵育 30 min; 用洗涤缓冲液洗 7 次, 加入 100 μL 底物, 室温孵育 15 min 后, 加入 50 μL 终止液, 上酶标仪检测吸光度 (A) 值。

1.7 统计学方法: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同部位 T 淋巴细胞亚群流式检测结果: 见表 1。外周血和 PP 淋巴细胞中 CD4⁺ 细胞水平高于 CD8⁺ 细胞, 在肠上皮内和肠黏膜固有层淋巴细胞中 CD8⁺ 细胞占绝大多数。

2.2 人参多糖和猪苓多糖对淋巴细胞上清液 TNF-α 水平的影响: 见表 2。人参多糖和猪苓多糖均可以使 PBMC 和 PPL 上清液中 TNF-α 水平升高, 与对照组比较, 差异显著 (*P* < 0.05、0.01), 并在一定范围内呈剂量-效应正相关。2 mg/mL 猪苓多糖

表 1 不同部位 T 淋巴细胞亚群 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 CD4⁺ and CD8⁺ cells of T lymphocytes in different parts ($\bar{x} \pm s, n=12$)

部 位	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%
外周血	46.58±6.29	17.54±2.85
PP	48.38±6.55	19.61±2.91
IEL	20.95±3.02	76.28±10.38
LPL	8.29±1.36	71.33±10.01

表 2 人參多糖和猪苓多糖对淋巴细胞上清液中 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide on TNF-α level in supernatants of lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	TNF-α (A 值)			
		PBMC	PPL	IEL	LPL
对照	-	0.252±0.023	0.240±0.047	0.232±0.047	0.232±0.036
猪苓多糖	0.5	0.326±0.087▲	0.305±0.040▲▲	0.248±0.056	0.200±0.023▲
	1.0	0.356±0.042▲▲	0.319±0.038▲▲	0.260±0.050	0.205±0.014▲
	2.0	0.378±0.066▲▲	0.341±0.031▲▲	0.294±0.030▲	0.196±0.016▲▲
	人參多糖	0.15	0.334±0.034▲	0.320±0.051▲▲	0.227±0.030
	0.30	0.372±0.046▲▲	0.322±0.044▲▲	0.257±0.041	0.197±0.016▲▲
	0.60	0.398±0.108▲▲	0.347±0.034▲▲	0.263±0.031	0.201±0.016▲

与对照组比较: ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01

▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01 vs control group

可以使 IEL 上清液中 TNF-α 水平升高 (*P*<0.05), 而 1、0.5 mg/mL 猪苓多糖和人參多糖对 IEL 上清液中 TNF-α 水平无明显影响。人參多糖和猪苓多糖与 LPL 共同培养时, 上清液中的 TNF-α 水平下降, 差异显著 (*P*<0.05、0.01)。

2.3 人參多糖和猪苓多糖对淋巴细胞上清液中 INF-γ 水平的影响: 见表 3。人參多糖和猪苓多糖均可以使 PBMC 和 PPL 上清液中 INF-γ 水平升高, 与对照组比较, 差异具有显著性 (*P*<0.05、0.01), 并在一定范围内呈剂量-效应正相关。2 mg/mL 猪苓多糖可以使 IEL 上清液中 INF-γ 水平升高 (*P*<0.05), 而 1、0.5 mg/mL 猪苓多糖和人參多糖对 IEL 上清液中 INF-γ 水平无明显影响。人參多糖和猪苓多糖与 LPL 共同培养时, 上清液中的 INF-γ 水平下降, 差异具有显著性 (*P*<0.05)。

3 讨论

多糖是一类结构复杂的高分子化合物, 是构成生命的四大基本物质之一, 同时也是一类具有免疫调节活性的生物大分子物质。研究表明, 多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、降血糖、免疫调节等作用^[5,6]。多糖不但可通过刺激机体的杀伤性 T 细胞, 活化巨噬细胞毒作用来发挥抗肿瘤作用; 还可以影响肿瘤细胞的分裂、增殖、生长周期以及某些相关基因的表达^[7,8], 同时, 作为一种免疫调节剂, 多糖能起到刺激

表 3 人參多糖和猪苓多糖对淋巴细胞上清液中 INF-γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of ginseng polysaccharide and *P. umbellatus* polysaccharide on INF-γ level in supernatants of lymphocytes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	INF-γ (A 值)			
		PBMC	PPL	IEL	LPL
对照	-	0.284±0.026	0.272±0.041	0.258±0.034	0.248±0.025
猪苓多糖	0.5	0.334±0.048▲	0.324±0.035▲	0.260±0.024	0.212±0.033▲
	1.0	0.353±0.034▲▲	0.335±0.054▲	0.267±0.027	0.216±0.014▲
	2.0	0.386±0.035▲▲	0.353±0.037▲▲	0.302±0.049▲	0.213±0.025▲
	人參多糖	0.15	0.338±0.035▲	0.324±0.036▲	0.263±0.024
	0.30	0.363±0.043▲▲	0.333±0.044▲	0.275±0.032	0.213±0.018▲
	0.60	0.379±0.050▲▲	0.364±0.035▲▲	0.290±0.037	0.215±0.024▲

与对照组比较: ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01

▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01 vs control group

机体的各种免疫活性细胞的成熟、分化和增殖, 增加巨噬细胞非特异性细胞毒, 诱导白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子、干扰素等细胞因子的产生和细胞因子受体的表达, 促进抗体形成, 活化补体系统的经典途径及变更途径等作用。但对于口服制剂的多糖类, 被消化成单糖的部分可以吸收入血发挥其作用, 而难于被消化的多糖部分的作用却不明确, 笔者认为可能是通过与肠道黏膜系统接触, 刺激黏膜系统淋巴细胞, 发挥其免疫调节作用。

肠道黏膜处于沟通机体内外环境的重要位置, 具有消化、吸收、分泌和防御等重要功能。由于肠内的淋巴细胞比任何器官的都多, 且肠道接触抗原的表面积最大, 所以肠道是体内最大的免疫器官。肠道相关的淋巴组织包括 PP、黏膜归巢受体、分散在黏膜固有层和肠上皮中的大量淋巴细胞^[2]。肠道黏膜免疫系统主要有 3 个功能: 参与抗原刺激的应答过程; 产生分泌型 IgA; 介导口服抗原诱导的免疫耐受。本实验结果表明, 外周血和 PP 淋巴细胞的亚型与肠道黏膜淋巴细胞亚型有显著不同, 也提示肠道黏膜免疫系统起着不同的作用。

TNF-α 和 IFN-γ 均是免疫反应中非常重要的细胞因子。TNF-α 主要由单核巨噬细胞产生, 自然杀伤细胞 (NK 细胞)、T 细胞也可以产生 TNF-α; 而 IFN-γ 主要来自活化的 Th1 淋巴细胞, 亦可由 NK 细胞产生。本实验结果表明猪苓多糖和人參多糖与 PBMC 和 PPL 共同培养, 均可以促进 TNF-α 和 IFN-γ 的分泌, 并在一定质量浓度范围内呈量-效正相关。说明猪苓多糖和人參多糖均可以激活外周血和 PP 中的单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞, 诱导

TNF- α 和 IFN- γ 的生成,发挥免疫促进活性,与以往研究一致^[9]。猪苓多糖与 IEL 共同培养时,仅在 2 mg/mL 时可以得到 TNF- α 和 IFN- γ 水平升高的结果,而在 1、0.5 mg/mL 时,TNF- α 和 IFN- γ 水平无明显变化,人参多糖则对 IEL 分泌 TNF- α 和 IFN- γ 的水平无明显影响,这可能与多糖的相对质量浓度过低,不足以活化该部位的 Th1 细胞,抑或与 Th2 细胞活化有关。研究表明^[10]低剂量的抗原可以导致 T 细胞介导的主动抑制,当抗原进入黏膜后,被抗原呈递细胞摄取,经过复杂的加工,呈递,诱导 Th2 细胞分泌抑制性细胞因子 IL-4、IL-5 和 TGF- β 等,在这些细胞因子的作用下,引导免疫应答的主动抑制,导致 TNF- α 和 IFN- γ 的分泌减少。猪苓多糖和人参多糖与 LPL 共同培养时,淋巴细胞分泌 TNF- α 和 IFN- γ 的能力均受到不同程度的抑制。这种抑制的原因可能是:(1) Th2 细胞活化,分泌 IL-4、IL-10、TGF- β 等抑制因子,使得机体对外来抗原的特异性的免疫应答被抑制;(2) 由于在固有层的淋巴细胞中 CD4⁺ 细胞仅有 8.06%,使得抗原的相对水平升高,从而导致 CD4⁺ 细胞凋亡。

本研究结果说明猪苓多糖和人参多糖对 PBMC 和 PP 淋巴细胞具有活化作用,可以诱导 TNF- α 和 IFN- γ 生成;同时在一定的质量浓度下,引起肠上皮内和黏膜固有层的淋巴细胞的免疫功能低下,这种低下是否能减少肠道黏膜免疫通常反映的免疫抑制作用,以及这种免疫影响形成的机制有

待于进一步研究。

References:

- [1] Ooi V E, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. *Curr Med Chem*, 2000, 7(7): 715-729.
- [2] Sato A, Iwasaki A. Peyer's Patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(12): 1333-1338.
- [3] Zhou J, Xiao C, Zhao L, et al. The effect of triptolide on CD4⁺ and CD8⁺ cells in Peyer's patch of SD rats with collagen induced arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(2): 198-203.
- [4] Wyatt C R, Brackett E J, Perryman L E, et al. Identification of gamma delta T lymphocyte subsets that populate calf ileal mucosa after birth [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, 52(1-2): 91-103.
- [5] Tzianabos A O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(4): 523-533.
- [6] Gao X R, Liu P X. Reviews on the structure-activity relationships of polysaccharide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 229-231.
- [7] Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, et al. Direct tumor growth suppressive effect of melanoidin extracted from immunomodulator-PSK [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 1997, 12(5): 341-344.
- [8] Pelley R P, Strickland F M. Plants, polysaccharide, and the treatment and prevention of neoplasia [J]. *Crit Rev Oncog*, 2000, 11(3-4): 189-225.
- [9] Ernst P B, Song F, Klimpel G R, et al. Regulation of the mucosal immune response [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60(4 suppl): 2-9.
- [10] Xiao B G, Link H. Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, 85(2): 119-128.

汉防己甲素大鼠在体肠吸收机制研究

张颖^{1,2}, 蒋学华^{1*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610051)

摘要:目的 研究汉防己甲素在大鼠在体肠吸收机制。方法 采用大鼠在体肠段灌流实验,利用紫外分光光度法和 HPLC 法分别测定酚红和汉防己甲素的量,分别研究药物质量浓度和吸收部位对汉防己甲素吸收的影响。结果 在 5.4~21.8 $\mu\text{g/mL}$ 药物质量浓度对小肠吸收速率常数 (K_a) 无影响;各肠段的 K_a :回肠>空肠>结肠>十二指肠,分别为 0.168 6、0.126 0、0.125 4、0.110 9 h^{-1} 。结论 汉防己甲素的吸收符合一级动力学特征,吸收机制为被动扩散;汉防己甲素在各肠段均有较好的吸收。

关键词:汉防己甲素;在体肠灌流;吸收速率常数;膜表观渗透系数

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0224-05

收稿日期:2006-06-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271614; 30572373)

作者简介:张颖,女,硕士研究生,副研究员,从事药物新制剂研究。

* 通讯作者 蒋学华 Tel: (028) 85501370 E-mail: jxh1013@vip.163.com