

# 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖及凋亡的影响

吕梦捷, 曾耀英\*, 宋 兵

暨南大学 组织移植与免疫中心, 广东 广州 510632

**摘 要:** **目的** 研究人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化及增殖的影响, 并对其免疫调节作用进行初步探讨。**方法** 分离制备小鼠淋巴结细胞悬液; 以双色荧光抗体染色技术结合流式细胞术检测在刀豆蛋白 A (ConA) 的刺激下, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对早期活化标志 CD3/CD69 和调节 T 淋巴细胞标志 CD4/CD25 表达的影响; 用羧基荧光素乙酰乙酸 (CFDA-SE) 染色结合流式细胞术和 MTT 法检测在 ConA 的刺激下, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 T 淋巴细胞增殖的影响; DIOC/PI 双染技术检测在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用下, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对淋巴细胞凋亡进程的影响。**结果** 终浓度为 5、10、20 μmol/L 的人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 ConA 刺激的调节 T 淋巴细胞 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 的表达具有促进作用, 而 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 的表达明显下调 ( $P<0.01$ ); 对 ConA 刺激的 T 淋巴细胞增殖具有明显的抑制作用 ( $P<0.05$ ), 且呈剂量依赖性; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的淋巴细胞的凋亡进程 ( $P<0.05$ )。**结论** 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对小鼠淋巴细胞的体外活化及增殖均具有明显的抑制作用, 是一种潜在的免疫抑制剂。

**关键词:** 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; T 淋巴细胞; 活化; 增殖; 凋亡

中图分类号: R392.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0743-06

## Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on activation, proliferation, and apoptosis of murine T lymphocytes *in vitro*

LV Meng-jie, ZENG Yao-ying, SONG Bing

Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on activation and proliferation of murine T lymphocytes *in vitro* and to elucidate the mechanism of the immunosuppressive effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub>. **Methods** Cell suspensions were prepared from murine lymph nodes. T lymphocytes were treated with different concentrations of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and stimulated with polyclonal activator concanavalin (ConA). Fluorescence conjugated monoclonal antibodies and flow cytometry were used to detect the expression of CD3/CD69 and CD4/CD25. After the staining with CFDA-SE, T lymphocytes were stimulated with polyclonal activator ConA. The proliferation of T lymphocytes, after stimulated by ConA, was detected using the method of MTT. The distribution of the cell apoptosis was analyzed by staining both DIOC and PI. **Results** In a dose-dependent manner, ginsenoside Rb<sub>1</sub> (5, 10, and 20 μmol/L) could significantly inhibit T lymphocytes activation index ( $P<0.01$ ) stimulated by ConA and proliferation index ( $P<0.05$ ) stimulated by ConA. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> could also reduce the apoptosis of T lymphocytes stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Conclusion** Ginsenoside Rb<sub>1</sub> can effectively inhibit the activation and proliferation of murine T lymphocytes, and ginsenoside Rb<sub>1</sub> is a potential effective immunoinhibitory agent.

**Key words:** ginsenoside Rb<sub>1</sub>; T lymphocyte; activation; proliferation; apoptosis

人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (ginsenoside Rb<sub>1</sub>) 是一种糖的衍生物, 相对分子质量 1 109.26, 是人参提取物中的主要有效成分。人参皂苷具有多重功效, 能治疗心血管系统疾病、调节内分泌、增强体力、调节中枢神经系统等<sup>[1-6]</sup>。近年来有实验研究表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 能

增强细胞免疫力<sup>[7]</sup>。但是有关人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对淋巴细胞和免疫功能影响的报道很少, 其免疫调节作用和机制还不是很清楚。本实验将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 体外作用于刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的 T 淋巴细胞, 探讨其对 T 淋巴细胞活化、增殖、凋亡的影响, 以进

收稿日期: 2010-07-13

基金项目: “973” 国家重大基础研究项目 (2006CB504200, 2004CB720100); 广东省基金项目 (2006B36030016); 广州市科技局科技攻关重点项目 (2006Z-E0091); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助

作者简介: 吕梦捷 (1985—), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事免疫分子识别与疾病研究。

Tel: (020)85220732 E-mail: lvmengjie.0628@163.com

\*通讯作者 曾耀英 Tel: (020)85226219 E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn

一步了解其免疫抑制作用,初步探讨其免疫调节作用和机制,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级 Balb/c 近交系小鼠,雄性,6~8 周龄,体质量 (20±2) g,购自广东省实验动物中心。

### 1.2 试剂与仪器

人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (质量分数≥98%)、MTT、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、ConA、DIOC<sub>6</sub> (3)、碘化丙锭 (PI),美国 Sigma 公司;鼠抗 CD3-FITC、鼠抗 CD69-PE,美国 BD-PharMingen 公司;RPMI 1640、胎牛血清 (FBS),美国 GibcoBRL 公司;羧基荧光素乙酰乙酸 (CFDA-SE),美国 Molecular Probes 公司。流式细胞仪 (FACS Calibur),美国 Becton Dickinson 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 小鼠淋巴细胞悬液的制备** 将 Balb/c 小鼠脱颈处死,无菌分离双侧颌下、腋窝、锁骨下、腹股沟浅淋巴结和肠系膜淋巴结,去掉被膜,200 目筛网研磨滤过,收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次 (250×g, 5 min) 后,重悬于 PBS 中。

**1.3.2 MTT 法检测药物毒性** 分别设 2 个对照组:空白对照组 (单纯 RPMI 1640 完全培养基)、对照组 (细胞悬液未加药物刺激),设 4 个人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (终浓度为 2.5、5、10、20 μmol/L) 组,且每组分别设置 3 个复孔。将“1.3.1”项中的细胞悬液离心,用 RPMI 1640 完全培养基重悬,并调整细胞密度为 3×10<sup>9</sup>/L;接种于 96 孔板,每孔 90 μL 细胞悬液,加入 10 μL 不同浓度的人参皂苷 Rb<sub>1</sub>,每孔终体积为 100 μL,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL,混匀,继续培养 4 h;取出培养板,每孔加入 100 μL 三联裂解液,混匀后室温放置 16 h;酶标仪检测 (单波长 490 nm,中速,10 s) A 值,并计算细胞相对存活率。结果所设定浓度人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 作用于细胞 48 h 后,其存活率均能控制在 70%以上,计算其半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 102.26 μmol/L,故可以确定当人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 浓度控制在 2.5~20 μmol/L 时对其抑制免疫作用实验结果没有影响。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

**1.3.3 ConA 刺激 T 细胞早期活化 CD69 的检测** 设 5 个实验组:对照组、ConA 组、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (5、10、20 μmol/L) 组,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;4 h 后,除对照组外,每孔加入终质量浓度为 5 mg/L

的 ConA 培养;5 h 后取出各孔细胞悬液离心;采用直接免疫荧光标记法染色,加入适量的鼠抗 CD3-FITC、鼠抗 CD69-PE (最终使每 1×10<sup>6</sup> 个细胞各抗体用量为 1 μg),混匀后,4 ℃避光染色 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次 (250×g, 5 min),立即上机检测。FITC 为荧光 1 通道 (FL1),PE 为荧光 2 通道 (FL2)。以检测 CD69 为例:先在前散射 (FSC) 对侧散射 (SSC) 二维散点图中划出淋巴细胞区 R1,在 FL2 (CD3-PE) 对 SSC 散点图中划出 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞区 R2,然后在 FL2 对 FL1 散点图中划出 CD3<sup>+</sup>、CD69<sup>+</sup> T 淋巴细胞。

**1.3.4 ConA 刺激的调节 T 细胞 CD4/CD25 的检测** 按照“1.3.2”项中的方法分组、培养细胞;4 h 后,每孔加入终质量浓度为 5 mg/L 的 ConA 培养;20 h 后取出各孔细胞悬液离心;采用直接免疫荧光标记法染色,加入适量鼠抗 CD4-PerCP、鼠抗 CD25-FITC (最终使每 1×10<sup>6</sup> 个细胞各抗体用量为 1 μg),混匀后,4 ℃避光染色 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次 (250×g, 5 min),立即上机检测, FITC 为荧光 1 通道, PerCP 为荧光 3 通道。

**1.3.5 CFDA-SE 染色检测 T 细胞增殖** 小鼠淋巴细胞按文献方法进行 CFDA-SE 染色<sup>[8]</sup>, CFDA-SE 用二甲基亚砷 (DMSO) 溶解成 2 mmol/L 的储存液, -20 ℃保存。用 PBS 将细胞密度调整为 1×10<sup>10</sup>/L, 然后加入 CFDA-SE (终浓度为 1 μmol/L), 室温下轻轻振荡 10 min; 用 RPMI 1640 完全培养基洗涤细胞 2 次 (250×g, 5 min), 重悬, 并调整细胞密度为 3×10<sup>9</sup>/L; 接种于 96 孔板, 每孔 190 μL, 加入 10 μL 不同浓度 (终浓度为 5、10、20 μmol/L) 的人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 每孔终体积为 200 μL, 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h; 再加入终质量浓度为 5 mg/L 的 ConA 培养; 72 h 后收获细胞, 立即上流式细胞仪检测。

**1.3.6 MTT 法检测 T 细胞增殖** 分别设 2 个对照组:空白对照组 (单纯 RPMI 1640 完全培养基)、对照组 (细胞悬液未加药物刺激); 设 4 个人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (终浓度为 2.5、5、10、20 μmol/L) 组; 且每组分别设置 3 个复孔。按“1.3.2”项方法接种、加药处理细胞, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 作用 4 h 后, 每孔加入终质量浓度为 5 mg/L 的 ConA 培养; 48 h 后, 按“1.3.2”项方法测定 A 值, 计算细胞相对存活率。

**1.3.7 DIOC/PI 染色法检测 T 淋巴细胞凋亡** 分别设 2 个对照组:空白对照组 (单纯细胞悬液)、对照组 (细胞悬液+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激剂); 设 6 个给药组:人

参皂苷 Rb<sub>1</sub> (终浓度为 5、10、20 μmol/L) 组, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (终浓度为 5、10、20 μmol/L) 加刺激剂 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 组。同“1.3.5”项方法接种细胞; 加药培养 4 h 后, 每孔加入终浓度为 500 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养; 各组细胞培养 24 h 后, 取出各孔细胞悬液离心; 采用 DIOC6 (3) /PI 荧光标记法双染色, 加入 200 μL 的 DIOC 染料稀释液 (50 nmol/L), 混匀后, 37 °C 避光染色 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次 (250×g, 5 min), 加入 PI (1 μmol/L) 染色, 立即上机检测。

**1.3.8 流式细胞术分析** 所有样品经 FACS Calibur 流式细胞仪和 CELLQuest 软件获取。每管细胞悬液样品检测 10 000 个细胞, 获得的数据用 CELLQuest 及 ModFit LT 3.2 软件进行分析。

**1.3.9 统计学处理** 全部数据使用 Excel 进行处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用配对 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 对 ConA 诱导小鼠 T 淋巴细胞 CD69 表达的影响

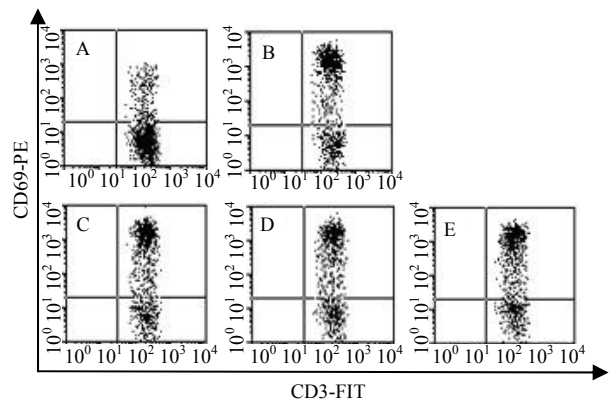
小鼠 T 淋巴细胞培养 5 h 后, 用双抗体染色法结合流式细胞术检测 T 淋巴细胞早期活化抗原 CD69 的表达 (图 1), ConA 刺激组 T 细胞的活化率为 (68.06±3.28) %, 而对照组 (未经 ConA 刺激) T 细胞的活化率为 (8.77±2.25) %, 两者差异非常显著 (*P*<0.01, 表 1)。5、10、20 μmol/L 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 均可明显抑制 ConA 介导的 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 分子的表达, 与 ConA 组相比差异显著 (*P*<0.01, 表 1), 且呈剂量依赖性。

### 2.2 对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞 CD4/CD25 表达的影响

小鼠 T 淋巴细胞培养 20 h 后, 用双抗体染色法结合流式细胞术检测调节 T 淋巴细胞抗原 CD25 的表达 (图 2), ConA 组 T 淋巴细胞的活化率为 (60.50±11.25) %, 而对照组 T 淋巴细胞的活化率为 (7.96±1.37) %, 两者差异非常显著 (*P*<0.01, 表 1)。5、10、20 μmol/L 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 均可明显上调 ConA 介导的 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 分子的表达, 与 ConA 组相比差异显著 (*P*<0.01, 表 1), 且呈剂量依赖性。

### 2.3 对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响

**2.3.1 CFDA-SE 染色检测 T 淋巴细胞增殖** CFDA-SE 染色后, 在荧光 1 通道 (FL1) 中可检测出均一染色的细胞群。根据细胞分裂 1 次其荧光强度减半的原理, 动态追踪了 T 细胞增殖的情况<sup>[9]</sup>。细胞培养 72 h 后, 对照组仅见一个亲代峰, 无增殖峰, 未出现 CFSE 荧光强度减弱, 而 ConA 组的细胞则出现 4 个子代峰 (图 3)。用 ModFit LT 3.2 软件拟



A-对照 B-ConA C~E-ConA+5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>  
A-Control B-ConA C-E-ConA+5, 10, and 20 μmol·L<sup>-1</sup> ginsenoside Rb<sub>1</sub>

图 1 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 ConA 刺激的 T 细胞 CD3/CD69 表达的影响

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on CD3/CD69 expression of murine T lymphocytes activated by ConA

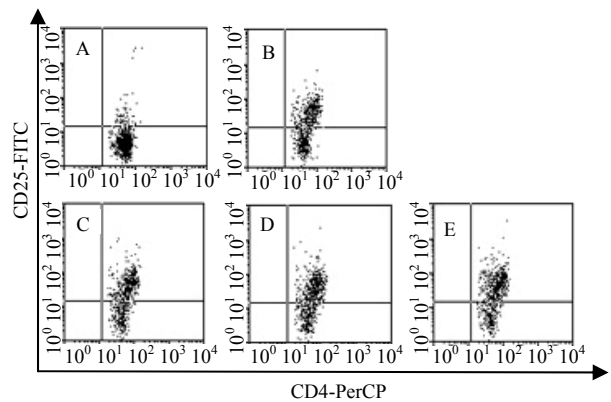
表 1 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 ConA 刺激的小鼠 T 细胞 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

Table 1 Effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on expression of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> of murine T lymphocytes activated by ConA ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

| 组别                   | C/<br>(μmol·L <sup>-1</sup> ) | (CD3 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup><br>T/CD3 <sup>+</sup> T)/% | (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup><br>T/CD4 <sup>+</sup> T)/% |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 对照                   | —                             | 8.77±2.25                                                      | 7.96±1.37                                                      |
| ConA                 | —                             | 68.06±3.28                                                     | 60.50±11.26                                                    |
| 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 5                             | 67.20±3.71*                                                    | 63.96±10.81**                                                  |
|                      | 10                            | 64.57±3.55**                                                   | 65.59±10.58**                                                  |
|                      | 20                            | 64.01±3.50**                                                   | 66.49±10.84**                                                  |

与 ConA 组比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01

\**P*<0.05 \*\**P*<0.01 vs ConA group



A-对照 B-ConA C~E-ConA+5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>  
A-Control B-ConA C-E-ConA+5, 10, and 20 μmol·L<sup>-1</sup> ginsenoside Rb<sub>1</sub>

图 2 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 ConA 刺激的 T 细胞 CD4/CD25 表达的影响

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on CD4/CD25 expression of murine T lymphocytes activated by ConA

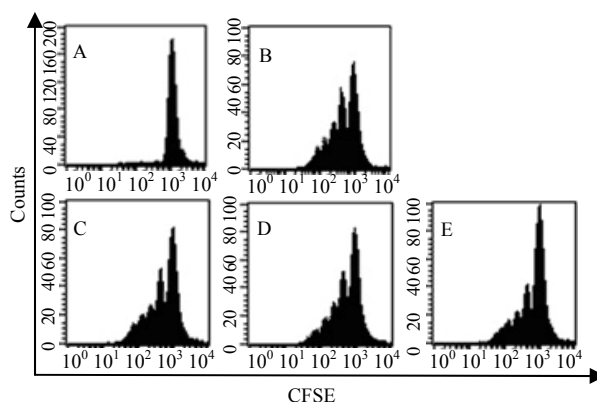
合后,得到增殖的 T 细胞各代的百分率及增殖指数 (PI),见表 2。加入 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷  $\text{Rb}_1$  后,细胞分裂的代数及 PI 值均递减,与相应时间点 ConA 组 T 淋巴细胞的 PI 比较有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**2.3.2 MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖** ConA 刺激的淋巴细胞培养 48 h 后,ConA 组细胞相对存活率为 100%,在人参皂苷  $\text{Rb}_1$  作用下细胞存活率相应下降,2.5、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷  $\text{Rb}_1$  组细胞相对存活率分别为  $(91.88\pm 3.91)\%$ 、 $(84.14\pm 7.72)\%$ 、 $(78.58\pm 10.59)\%$ 、 $(71.32\pm 9.93)\%$ ,说明药物对细胞增殖有一定的抑制作用 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),且呈剂量依赖性。

## 2.4 对 T 淋巴细胞凋亡进程的影响

与空白对照组相比,单纯加药组细胞的凋亡率随着药物浓度的增加而递增。与对照组相比,由  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激剂诱导的细胞死亡随着药物浓度的增大而递减。人参皂苷  $\text{Rb}_1$  能够明显抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细

胞凋亡进程,且呈剂量依赖性。结果见图 4 (R2 为坏死细胞, R3 为凋亡细胞) 和图 5。



A-对照 B-ConA C~E-ConA+5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  人参皂苷  $\text{Rb}_1$   
A-control B-ConA C~E-ConA+5, 10, and 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ginsenoside  $\text{Rb}_1$

图3 人参皂苷  $\text{Rb}_1$  对 ConA 刺激的小鼠 T 细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 Effect of ginsenoside  $\text{Rb}_1$  on proliferation of murine T lymphocytes activated by ConA

表2 人参皂苷  $\text{Rb}_1$  对 ConA 刺激的小鼠 T 淋巴细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Inhibition of ginsenoside  $\text{Rb}_1$  on proliferation of murine T lymphocytes activated by ConA ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

| 组别                 | C/<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | G <sub>1</sub> /%  | G <sub>2</sub> /% | G <sub>3</sub> /%  | G <sub>4</sub> /%  | G <sub>5</sub> /% | PI                |
|--------------------|---------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| 对照                 | —                                           | 96.16 $\pm$ 0.71   | 0.81 $\pm$ 0.06   | 1.06 $\pm$ 0.18    | 0.96 $\pm$ 0.03    | 0.20 $\pm$ 0.29   | 1.04 $\pm$ 0.01   |
| ConA               | —                                           | 45.45 $\pm$ 2.51   | 22.07 $\pm$ 1.27  | 16.71 $\pm$ 0.49   | 12.25 $\pm$ 0.46   | 4.95 $\pm$ 0.68   | 1.61 $\pm$ 0.02   |
| 人参皂苷 $\text{Rb}_1$ | 5                                           | 45.63 $\pm$ 1.23   | 24.15 $\pm$ 1.02  | 17.49 $\pm$ 0.33*  | 10.43 $\pm$ 0.25** | 3.54 $\pm$ 0.10*  | 1.55 $\pm$ 0.01** |
|                    | 10                                          | 50.22 $\pm$ 1.01*  | 25.33 $\pm$ 1.28* | 15.51 $\pm$ 0.21** | 8.06 $\pm$ 0.42**  | 2.70 $\pm$ 0.16** | 1.50 $\pm$ 0.05** |
|                    | 20                                          | 57.44 $\pm$ 2.03** | 21.33 $\pm$ 2.67  | 13.30 $\pm$ 0.42** | 8.56 $\pm$ 0.98**  | 2.44 $\pm$ 0.15** | 1.43 $\pm$ 0.01** |

与 ConA 组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

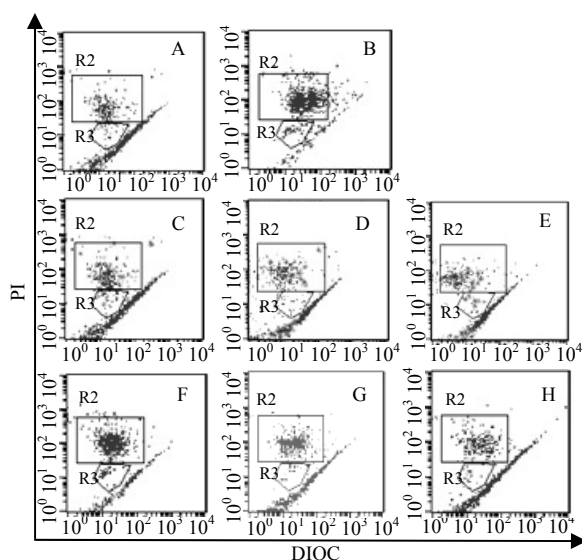
\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs ConA group

## 3 讨论

T 淋巴细胞是免疫系统发挥作用的核心, T 淋巴细胞的活化与增殖是免疫反应系统中最基础和最关键的事件,在免疫防御、免疫调节、炎症性疾病和自身免疫疾病当中起到相当重要的作用<sup>[8-10]</sup>。本实验通过体外研究人参皂苷  $\text{Rb}_1$  对小鼠 T 淋巴细胞早期活化及增殖的影响,初步探讨人参皂苷  $\text{Rb}_1$  在免疫方面的调节作用及其机制。本实验结果发现人参皂苷  $\text{Rb}_1$  明显抑制 T 淋巴细胞表达 CD69,并明显抑制由 ConA 诱导的 T 淋巴细胞的分裂代数和子代细胞数目,降低细胞增殖指数,同时对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的死亡进程有抑制作用。

CD69 为 T 淋巴细胞早期活化的表面标志性抗原,其本身是一种细胞表面的磷酸化的同二聚体蛋白,它的表达依赖于新的 RNA 合成和翻译。静息 T

淋巴细胞极少表达 CD69,而活化后的 T 淋巴细胞通过编码基因的转录活化可大量表达 CD69,并产生大量的 IL-2 和高亲和力的 IL-2R。IL-2 和 IL-2R 结合后选择性支持经抗原刺激而活化的 T 淋巴细胞进行扩增,因此 CD69 可作为 T 细胞早期活化标志<sup>[11-13]</sup>。一定浓度范围内的人参皂苷  $\text{Rb}_1$  能够抑制 CD69 的表达,这与其能够抑制 T 淋巴细胞增殖的结果一致,为人参皂苷  $\text{Rb}_1$  抑制 T 淋巴细胞活化提供了直接证据。CD25 除了是非 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞中期活化的标志,同时也是 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞的标志。CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> 调节 T 淋巴细胞的主要功能是通过抑制性调节 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化与增殖,达到免疫调节作用。其可能的机制有:与靶细胞接触而发挥抑制作用;下调靶细胞 IL-2R  $\alpha$  链的表达从而抑制靶细胞的增殖;通过抑制 APC 的抗原递呈



A-对照 B-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C~E-5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

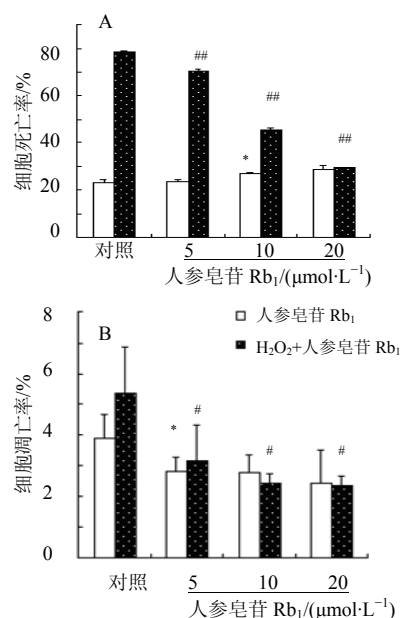
F~H-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+5、10、20 μmol·L<sup>-1</sup> 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

A-control B-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C~E-5, 10, and 20 μmol·L<sup>-1</sup> ginsenoside Rb<sub>1</sub>

F~H- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+5, 10, and 20 μmol·L<sup>-1</sup> ginsenoside Rb<sub>1</sub>

图 4 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的小鼠 T 细胞凋亡的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Inhibition of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on apoptosis of murine T lymphocytes stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group

图 5 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的小鼠 T 细胞死亡 (A) 和凋亡 (B) 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Inhibition of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on death (A) and apoptosis (B) of murine T lymphocytes stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

功能,使靶细胞得不到足以活化的刺激信号<sup>[14-15]</sup>。一定浓度的人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 能够上调 CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> 的表达,从而抑制 T 淋巴细胞的活化和增殖,达到免疫负调节作用。

人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 ConA 刺激的增殖均具有明显的抑制作用。ConA 是 T 细胞多克隆刺激剂,其刺激途径是 Ca<sup>2+</sup> 依赖性的,通过作用于 T 淋巴细胞表面的 TCR/CD3 复合体而诱发活化及增殖反应。很可能需要通过 ZAP270、Fyu、Lck 等上游蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 进行信息传递,进一步诱导细胞内信号转导使 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高而导致细胞增殖<sup>[16]</sup>。本实验结果表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 可能会抑制 ConA 与细胞表面 TCR/CD3 的交联,但其作用位点也可能位于 PTK 上游或下游,从而抑制 T 淋巴细胞的活化、增殖及一系列的下游事件,具体机制还有待进一步研究。

有研究表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对胞内外 Ca<sup>2+</sup> 的转运有着调节作用。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 可通过 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase 及 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>-ATPase 等酶降低胞内钙能,从而导致 Ca<sup>2+</sup> 浓度降低,细胞增殖受到抑制,这与人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 抑制 ConA 刺激的淋巴细胞增殖的结果一致。同时胞内 Ca<sup>2+</sup> 的增加与自由基的生成密切相关,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 能降低胞内 Ca<sup>2+</sup> 的量,对改善自由基所造成的膜流动性的降低有重要作用<sup>[17]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种强氧化剂,可转变成自由基使线粒体膜脂质过氧化,线粒体跨膜电位耗散,细胞色素释放,进而引起 Caspase3 活化和 DNA 的断裂,从而引起细胞凋亡<sup>[18]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 能显著抑制由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的淋巴细胞凋亡,说明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对活性氧自由基有一定的清除作用,有较强的抗氧化作用。

已有研究表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对蛋白激酶 C (PKC)、蛋白激酶 A (PKA)、CaMKII 均有调节作用,其相关的信号通路均与细胞的增殖活化密切相关<sup>[19-20]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 T 细胞早期活化和增殖具有明显的抑制效应,因此推测其对 T 淋巴细胞活化的影响可能是通过调节蛋白激酶的活性,从而干扰了早期活化事件;也可能是由于对 CD69 等早期活化抗原表达的抑制而干扰了随后的活化事件,从而抑制了 T 淋巴细胞的增殖反应。这都提供了人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 抑制细胞免疫功能的直接证据。但 T 淋巴细胞的活化和增殖是一个复杂的动态过程,涉及多种酶和信号转导途径参与其中,因此人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的免疫作用机制及其潜在的免疫调节作用值得进一步研究。

## 参考文献

- [1] Hou W, Chai H, Lin P H. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41(5): 861-868.
- [2] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-149.
- [3] 徐晓军, 石淑文, 汤永民, 等. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗白血病多药耐药细胞 K562/VCR 作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1131-1135.
- [4] 高 艳, 刘汉清, 苗宁舒, 等. 人参皂苷 C-K 对心脏蛋白激酶 C 信号转导通路的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2049-2051.
- [5] Wu J, Jeong H K, Bulin S E, *et al.* Ginsenosides protect striatal neurons in a cellular model of Huntington's Disease [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87: 1904-1912.
- [6] 周超群, 周 珮. 人参皂苷 Rd 的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 832-836.
- [7] Luo Y M, Cheng X J, Yuan W X. Effects of ginseng root saponins and ginsenoside Rb<sub>1</sub> on immunity in cold water swim stress mice and rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1993, 14(5): 401-404.
- [8] 肇静娴, 曾耀英, 何贤辉. 活体染料 CFDA-SE 在淋巴细胞增殖研究中的应用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 109-111.
- [9] Fulcher D, Wong S. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory [J]. *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(6): 559-564.
- [10] Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, *et al.* The mechanism of action of cyclosporin A and FK506 [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 80(3): 40-45.
- [11] Craston R, Koh M, Dermott A M, *et al.* Temporal dynamics CD69 expression on lymphoid cells [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 209(1): 37-45.
- [12] Altman A, Isakov N, Baier G. Protein kinase C $\theta$ : a new essential superstar on the T cell stage [J]. *Immunol Today*, 2000, 21(11): 567-573.
- [13] Van Leeuwen J E, Samelson L E. T cell antigen receptor signal transduction [J]. *Cur Opin Immunol*, 1999, 11(3): 242-248.
- [14] 陈慰峰. 医学免疫学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2000
- [15] Shevach E M, Mchugh R S, Piccirilo C A, *et al.* Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells [J]. *Immunol Rev*, 2001, 182: 59-67.
- [16] Sun Z, Arendt C W, Ellmerier W, *et al.* PKC- $\theta$  is required for TCR-induced NF- $\kappa$ B activation in mature but not immature T lymphocytes [J]. *Nature*, 2000, 404(6776): 402-407.
- [17] Jiang X Y, Zhang J T, Shi C Z. Mechanism of action of ginsenoside Rb<sub>1</sub> in decreasing intracellular Ca<sup>2+</sup> [J]. *Acta Pharm Sin*, 1996, 31(5): 321-326.
- [18] 王 晖, 张 杰, 张淑华, 等. 甜杏仁对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导大鼠外周淋巴细胞 DNA 损伤的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(5): 609-612.
- [19] Chang Y, Wang S J. Ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> enhance glutamate exocytosis from rat cortical nerve terminals by affecting vesicle mobilization through the activation of protein kinase C [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590(1-3): 74-79.
- [20] Park J K, Namgung U, Lee C J, *et al.* Calcium-independent CaMKII activity is involved in ginsenoside Rb<sub>1</sub>-mediated neuronal recovery after hypoxic damage [J]. *Life Sci*, 2005, 76(9): 1013-1025.