

人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对微血管内皮细胞分泌 NO、IL-6 和 TNF- α 的影响

解慧梅^{1,2}, 胡 格², 索占伟², 刘易通¹, 尹 龙², 于同泉², 路 平², 穆 祥^{2*}, 黄会岭^{1*}

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; 2. 北京农学院动物科技系, 北京 102206)

摘 要: 取中药提取物人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖作用于体外培养大鼠肠黏膜微血管内皮细胞, 用硝酸还原酶法测定一氧化氮(NO)、ELISA 法测定白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的变化, 为分析其免疫作用机制提供试验依据。微血管内皮细胞在人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖的作用下, 细胞分泌 NO、IL-6 和 TNF- α 均增多, 并且随着浓度的增加内皮细胞分泌量也增加。

关键词: 黄芪多糖; 人参皂甙 Rb1; 微血管内皮细胞; NO; IL-6; TNF- α

中图分类号: S853.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)09-0903-05

Effect of Ginsenoside Rb1 and Astragalus Polysaccharide on the Excretion of NO, IL-6 and TNF- α in Micro-vascular Endothelial Cells

XIE Hui-mei^{1,2}, HU Ge², SUO Zhan-wei², LIU Yi-tong¹, YIN Long²,

YU Tong-quan², LU Ping², MU Xiang^{2*}, HUANG Hui-ling^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Department of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: Two Chinese herbal medicine extraction, ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide, were supplemented into *in vitro* culture system of rat micro-vascular endothelial cells. NO was detected by reduction of nitrate method and IL-6, TNF- α were detected by ELISA, the changes of those relevant factors provided experimental evidence for analyzing effect of ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide. The level of NO, IL-6 and TNF- α in micro-vascular endothelial cells were enhanced significantly by ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide, and showed concentration-dependent trend.

Key words: astragalus polysaccharide; ginsenoside Rb1; micro-vascular endothelial cells; nitric oxide; IL-6; TNF- α

微血管内皮细胞(Micro-vascular endothelial cells, MVECs)是位于循环血液与组织液之间的单层扁平上皮细胞,不但构成微血管通透性的主要物理屏障,保证微血管内、外正常的物质交换,而且是一种多功能的分泌细胞,通过合成、释放多种血管活性物质,在调节正常的血液循环、维持细胞环境的稳定方面具有十分重要的意义。随着显微镜、细胞培

养和分子生物学的发展发现内皮细胞在机体的免疫应答和炎性反应过程中起到非常重要的作用^[1]。人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖都具有提高机体免疫功能的作用,本试验通过研究人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对微血管内皮细胞分泌 NO、IL-6 和 TNF- α 的影响,为阐述人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖免疫作用机制提供一些试验数据。

收稿日期: 2005-10-14

基金项目: 农业应用新技术北京市重点实验室(KF2003-1)

作者简介: 解慧梅(1978-),女,河北人,硕士,主要从事中西医结合研究, E-mail: xhm20040715@126.com

* 通讯作者: 穆 祥, 黄会岭

1 材料与方 法

1.1 药品及材料

黄芪,产于山西,购自北京同仁堂;人参皂甙,购自中国药品生物制品检定所;DMEM 培养基、优质胎牛血清,购自 Gibco;NO 检测试剂盒、IL-6 试剂盒和 TNF- α 试剂盒购自深圳晶美生物工程公司。

黄芪多糖由本实验室按照水提醇沉法^[2]提取,其含量用硫酸蒽酮法测定;大鼠肠黏膜微血管内皮细胞由北京农学院免疫组化实验室培养。

720 型紫外分光光度计(UNICO 公司)、96 孔酶标仪(BIO-RAD 公司);MCO-17AC 型 CO₂ 恒温培养箱(日本三洋公司)、DMB5 型倒置显微镜(厦门麦克奥迪公司)。

1.2 复苏细胞的鉴定

复苏冻存细胞,待细胞铺成单层时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。经过 2 次传代,细胞 80% 铺成单层时进行鉴定,采用间接免疫荧光法-内皮细胞第 VIII 因子相关抗原(F-VIII RAg)鉴定和硝酸银鉴定为血管内皮细胞。

1.3 试验细胞的分组及处理

选取经鉴定的大鼠肠黏膜微血管内皮细胞于 48 孔培养板中培养。培养 2 d 后任意选择一孔用胰蛋白酶消化吹起混匀,吸取 0.1 mL 于细胞计数板中进行计数。经计数细胞密度为 1.0×10^5 /mL,可以用于试验。试验设人参皂甙 Rb1 低剂量组、人参皂甙 Rb1 高剂量组、黄芪多糖低剂量组、黄芪多糖高剂量组和对照组。

弃掉原来培养基,人参皂甙 Rb1 低剂量组加入 0.5 mL 终浓度为 40 μ g/mL 的细胞培养基、人参皂甙 Rb1 高剂量组加入 0.5 mL 终浓度为 80 μ g/mL 的细胞培养基、黄芪多糖低剂量组加入 0.5 mL 终浓度为 450 μ g/mL 的细胞培养基、黄芪多糖高剂量组加入 0.5 mL 终浓度为 900 μ g/mL 的细胞培养基、对照组加入 0.5 mL 维持培养基。每组设 5 孔重复(即 n=5)。

1.4 指标及测定

细胞继续培养 1、3、6 h 测 NO,继续培养 4、9 h 测 IL-6,继续培养 9、12 和 24 h 测 TNF- α 。

采集培养上清液,经 3 000 r/min 离心 10 min,将细胞上清液无菌分装于 1.5 mL 的离心管中,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

NO 的测定(硝酸还原酶法)按照试剂盒说明操作,于 530 nm 处检测^[3];TNF- α 和 IL-6(ELISA 法)

检测按照试剂盒说明操作,于 450 nm 处检测。

1.5 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 *t* 检验及方差分析。

2 结 果

2.1 大鼠肠黏膜微血管内皮细胞鉴定

内皮细胞形态扁平,呈多边形。复苏细胞待铺成单层时经免疫荧光染色后,在倒置显微镜下观察,细胞核周围均出现阳性的黄绿色荧光,胞质与胞核间界限明显,细胞多数呈饱满的短梭形。可见内皮细胞第 VIII 因子相关抗原(F-VIII RAg)阳性,见图 1。经过硝酸银染色后,硝酸银颗粒沉积在细胞间隙中,呈棕黄色,细胞排列整齐,细胞间以锯齿状结构连接,胞质着色较浅,胞核呈蓝色,椭圆形,位于细胞中间,见图 2。经第 VIII 因子相关抗原和硝酸银鉴定为内皮细胞。

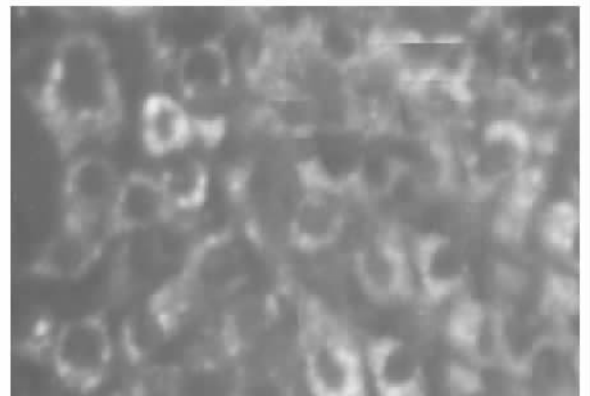


图 1 微血管内皮细胞第 VIII 因子相关抗原免疫荧光染色 200 \times

Fig. 1 Immunofluorescent dyeing of F-VIII RAg in MVECs 200 \times

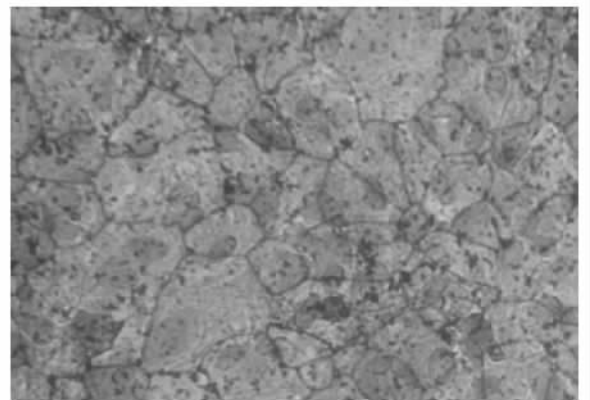


图 2 MVECs 硝酸银染色 200 \times

Fig. 2 The result of silver nitrate dyeing in MVECs 200 \times

2.2 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖对内皮细胞分泌 NO 的影响

由表 1 可知,黄芪多糖高剂量组在 1 和 3 h 时细胞分泌 NO 量极显著高于对照组($P<0.01$),在 6 h 时 NO 分泌量显著高于对照组($P<0.05$);黄芪多糖低剂量组在 1 和 6 h 时细胞分泌 NO 量显著高于

对照组($P<0.05$),人参皂甙 Rb1 高剂量组在 1 h 时细胞分泌 NO 量极显著高于对照组($P<0.01$),在 3 和 6 h 时 NO 分泌量显著高于对照组($P<0.05$);人参皂甙 Rb1 低剂量组在 1 h 时细胞分泌 NO 量显著高于对照组($P<0.05$),其它组 NO 分泌量与对照组比较差异不显著($P>0.05$)。

表 1 人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对肠黏膜微血管内皮细胞分泌 NO 的影响($n=5$)

Table1 Effect of ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide on the excretion of NO in micro-vascular endothelial cells of intestine mucous membrane($n=5$)

时间 Time	人参皂甙 Rb1 低剂量组 Low dose group of ginsenoside Rb1	人参皂甙 Rb1 高剂量组 High dose group of ginsenoside Rb1	黄芪多糖低剂 量组 Low dose group of APS	黄芪多糖高剂 量组 High dose group of APS	对照组 Control group
1 h	25.60 \pm 0.08*	26.25 \pm 0.12**	25.51 \pm 0.25*	26.35 \pm 0.20**	24.95 \pm 0.10
3 h	24.11 \pm 0.01	24.81 \pm 0.05*	24.48 \pm 0.31	25.23 \pm 0.32**	23.37 \pm 0.15
6 h	22.81 \pm 0.01	23.92 \pm 0.30*	23.22 \pm 0.21*	24.01 \pm 0.31*	22.62 \pm 0.10

与对照组比较, * . $P<0.01$, * . $P<0.05$, 下表同

Compared with control group, * . $P<0.01$, * . $P<0.05$. The same as below

2.3 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖对内皮细胞分泌 IL-6 的影响

由表 2 可知,黄芪多糖高剂量组在 4 和 9 h IL-6 分泌显著高于对照组($P<0.05$);人参皂甙 Rb1 高剂量组在 9 h 时 IL-6 分泌量与对照组差异极显

著($P<0.01$),4 h 时差异显著($P<0.05$);人参皂甙 Rb1 低剂量组细胞在 9 h 时分泌 IL-6 量显著高于对照组($P<0.05$),其它组分泌 IL-6 与对照组比较差异不显著($P>0.05$)。

表 2 人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对肠黏膜微血管内皮细胞分泌 IL-6 的影响($n=5$)

Table2 Effect of ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide on the excretion of IL-6 in micro-vascular endothelial cells of intestine mucous membrane($n=5$)

时间 Time	人参皂甙 Rb1 低剂量组 Low dose group of ginsenoside Rb1	人参皂甙 Rb1 高剂量组 High dose group of ginsenoside Rb1	黄芪多糖低剂 量组 Low dose group of APS	黄芪多糖高剂 量组 High dose group of APS	对照组 Control group
4 h	63.92 \pm 5.09	64.73 \pm 9.08*	64.07 \pm 2.06	65.61 \pm 3.12*	63.92 \pm 2.98
9 h	65.75 \pm 2.12*	66.87 \pm 5.07**	65.11 \pm 7.06	66.17 \pm 6.23*	65.04 \pm 6.49

2.4 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖对内皮细胞分泌 TNF- α 的影响

由表 3 可知,黄芪多糖高剂量组细胞在 12 h 分泌 TNF- α 量极显著高于对照组($P<0.01$),在 9 和 24 h 分泌 TNF- α 显著高于对照组($P<0.05$);人参皂甙 Rb1 高剂量组在 12 和 24 h 时分泌 TNF- α 的量与对照组比较差异显著($P<0.05$),其它组分泌 TNF- α 与对照组比较差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖影响内皮细胞一氧化氮(NO)分泌的意义

NO 在神经信息的传递和免疫功能的调节等方面具有重要生物学功能,通过与各种细胞因子间错综复杂的相互作用,使机体免疫调节处于恰当的水平^[3,4]。NO 可调节多种免疫活性介质,如肿瘤坏死因子(TNF)、前列腺素 E₂(PGE₂)、白介素(IL)、干

扰素(IFN)等合成分泌,从而更广泛地影响着机体的免疫功能^[5]。

表 3 人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖对肠黏膜微血管内皮细胞分泌 TNF- α 的影响(n=5)

Table 3 Effect of ginsenoside Rb1 and astragalus polysaccharide on the excretion of TNF- α in micro-vascular endothelial cells of intestine mucous membrane(n=5)

时间 Time	人参皂甙 Rb1 低剂量组 Low dose group of ginsenoside Rb1	人参皂甙 Rb1 高剂量组 High dose group of ginsenoside Rb1	黄芪多糖低剂 量组 Low dose group of APS	黄芪多糖高剂 量组 High dose group of APS	对照组 Control group
9 h	15.33±0.98	15.89±0.99	15.61±4.22	16.44±4.01*	15.26±3.22
12 h	14.01±1.02	14.68±2.01*	14.14±5.01	15.23±2.03**	13.74±2.01
24 h	12.30±1.12	13.18±1.35*	12.64±2.31	13.46±6.01*	12.36±1.78

据报道黄芪多糖可通过调节 NO 的量减轻糖尿病对内皮细胞(VECs)的损伤^[4]。蒋德菊等^[6]研究发现,黄芪、当归、丹参、川芎等益气活血的中药组成的健胎液使人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分泌的 ET 明显下降,而 PGI₂、NO 的量显著升高,起到保护 VECs 的生物活性功能。Kim^[7]发现人参通过增加 NO 的生成引起血管舒张和阻断氧自由基损伤。Chen^[8]报道人参皂甙增加 NO 释放,保护肺血管内皮细胞免受自由基的损害。但有关黄芪多糖和人参皂甙 Rb1 对肠黏膜微血管内皮细胞分泌 NO 的影响还未见报道。本研究发现二者均使内皮细胞 NO 分泌增多,黄芪多糖和人参皂甙 Rb1 可能是通过调节内皮细胞 NO 分泌参与免疫调节的。据报道黄芪多糖能通过 NO 介导的信号传递通路调节脾淋巴细胞内 Ca²⁺ 浓度,升高蛋白激酶活性而影响免疫细胞的信号传导,从而发挥免疫调节作用^[9]。

3.2 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖影响内皮细胞白介素-6(IL-6)分泌的意义

IL-6 是免疫-内分泌网络中的关键因子,与机体的细胞免疫、体液免疫密切相关。

IL-6 可促使 B 细胞分化、Ig 的分泌和再次免疫应答,促进 CTL 分化,协同 IL-2 增强杀伤性 T 细胞(CTL)中穿孔素基因的表达,并增强 T 细胞产生^[1]。体外试验证实,IL-6 可促进 T 细胞分化增殖,增强 T 细胞、LAK 细胞和 NK 细胞活性^[10]。IL-6 除了具有免疫增强作用和促进造血外,还可参与炎症反应,主要表现在刺激肝细胞产生急性期蛋白参与炎症反应,使造血干细胞或粒细胞/巨噬细胞形成克隆,并刺激其生长等^[11]。

Scaglione 等^[12]和 Concha 等^[13]分别报道了人参提取物能增强人和动物的细胞免疫功能。有关人

参皂甙 Rb1、黄芪多糖影响内皮细胞 IL-6 分泌未见报道。本研究发现黄芪多糖和人参皂甙 Rb1 均能不同程度地引起内皮细胞 IL-6 分泌量增加,推测二者的免疫增强作用与内皮细胞 IL-6 分泌增多有关。

3.3 人参皂甙 Rb1、黄芪多糖影响内皮细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)分泌的意义

TNF- α 能活化单核细胞和巨噬细胞,提高其杀伤活性,也可增强 T 细胞、自然杀伤细胞(NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的细胞毒活性,释放超氧阴离子和 NO,以及产生白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)等细胞因子^[1]。另外,TNF- α 可提高中性粒细胞的吞噬能力,刺激中性粒细胞释放超氧阴离子和分泌过氧化物酶;并通过刺激内皮细胞表达主要组织相容性复合物-I(MHC-I)类抗原以及多种黏附分子,促进中性粒细胞的黏附^[14,15]。总之,TNF- α 生物活性相当广泛,除了具有抗肿瘤作用外,对免疫反应、机体代谢、炎症反应等都具有调节和介导作用。

郝钰等^[16]报道,黄芪多糖可增强 VECs 与白细胞的黏附,并对 IL-1、TNF- α 促进内皮细胞与白细胞黏附有协同增强作用,促使白细胞渗出,促进局部炎症反应。刘轩等^[17]研究表明,人参皂甙 Rb1 作用于肺泡巨噬细胞 TNF- α 分泌和对对照组无显著差异。有关人参皂甙 Rb1、黄芪多糖影响内皮细胞 TNF- α 分泌未见报道,本试验中两种成分均能使得内皮细胞分泌 TNF- α 的量有所增加。故人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖能调节内皮细胞 TNF- α 的分泌,可能是其免疫增强机制的一方面。

人参在中医上是一味补气药,人参的补气作用和人参提高机体的免疫功能有关。人参具有改善微

循环、促进网状内皮细胞的吞噬作用、提高机体免疫功能的作用,而皂甙是人参的主要成分,其中人参皂甙 Rb1 含量最高。黄芪味甘,性微温。从黄芪根中提取得到的 APS 毒性很低,具广泛的免疫增强和抗病毒作用。NO、IL-6 和 TNF- α 在机体的免疫功能方面起着非常重要的作用。本研究提示人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖的免疫增强作用可能是通过改善微血管内皮细胞 NO、IL-6 和 TNF- α 的分泌来实现的,通过改变微血管内皮细胞分泌细胞因子最终改善微血管的免疫状态。但是人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖能否在血液中的浓度和其在血液中能持续多长时间还需进一步研究。本研究为人参皂甙 Rb1 和黄芪多糖免疫作用机制的解析提供了一些试验依据。

参考文献:

- [1] 窦肇华,张远强,郭顺根. 免疫细胞学与疾病[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004,9(1):771.
- [2] 倪 艳,苏 强,刘 霞,等. 黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(5):284~286.
- [3] 段慧琴,乔 健,张永东,等. LPS 对大鼠肠黏膜微血管内皮细胞分泌 NO 的影响[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(9):974~976.
- [4] 吴 勇,欧阳静萍,涂淑珍,等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠微血管病变的作用及机制的研究[J]. 湖北中医学院学报,2001,9(3):16~18.
- [5] 赵红卫,李晓玉. 一氧化氮与免疫调节[J]. 上海免疫学杂志,1996,16(6):373~376.
- [6] 蒋德菊,黄光英,郝天玲. 健胎液对人脐静脉内皮细胞分泌血管活性物质的影响[J]. 微循环杂志,2000,10(1):15~17.
- [7] Kim H,Chen X,Gillis C N. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical-induced injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992,189(2):670~676.
- [8] Chen X. Cardiovascular protection by ginsenosides and their nitric oxide releasing action[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,1996,23(8):728~732.
- [9] 胡庭俊,程富胜,陈昊然,等. 黄芪多糖对小鼠免疫细胞信号转导相关分子的影响[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(6):616~619.
- [10] 姜开余,杨吉成,顾振纶. 白细胞介素-6 的作用与临床应用前景[J]. 临床肿瘤学杂志,1997,3(2):71~73.
- [11] 崔治中,崔保安. 兽医免疫学[M]. 北京:中国农业出版社,2004. 59.
- [12] Scaglione F,Ferrara F,Dugnani S, et al. Immunomodulatory effects of two extracts of Panax ginseng [J]. Drugs Exp Clin Res,1990,10(16):537~542.
- [13] Concha C, Hu S, Holmberg O, et al. The proliferative responses of cows tripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng in vitro [J]. Vet Res, 1996,27(2):107~115.
- [14] Bone R C. Sepsis, sepsis syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Gulliver in Laputa [J]. JAMA, 1995,273(2):155~156.
- [15] 王金华,喀蔚波,孙大公,等. 病理条件下白细胞与内皮细胞的粘附[J]. 中国血液流变学杂志,2000,10(4):187~191.
- [16] 郝 钰,邱全瑛,吴 珺. 黄芪多糖对淋巴细胞与血管内皮细胞粘附的影响及其分子机制[J]. 免疫学杂志,2000,16(3):206~209.
- [17] 刘 轩,魏育林,李 波,等. 人参皂甙对脂多糖诱导小鼠肺泡巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子的作用及机制探讨 [J]. 中日友好医院学报,2001,15(2):83~86.

动物疫情速递

摩洛哥发生马泰氏孢子虫感染

摩洛哥 2006 年 8 月 9 日向 OIE 报告了马泰氏孢子虫病疫情,病原是马泰氏孢子虫 (*Marteilia refringens*), 宿主是野生的平牡蛎 (*Ostrea edulis*)。感染始于 2006 年 4 月 13 日,于 2006 年 7 月 17 日确认,疫区位于纳祖尔省 Atalayoun 的一个礁湖的半封闭农事系统。组织病理学诊断由摩洛哥国家渔业研究所和法国国家海洋开发研究院 (IFREMER, 系 OIE 软体动物疾病参考实验室) 负责。采取的措施:国内限制移动,依照动物卫生监督体系加强 1 区 (Saïdia, Cap de Trois Fourches) 的流行病学监测。