

商陆多糖 I 对小鼠脾淋巴细胞增殖及脾淋巴细胞、巨噬细胞分泌细胞因子的影响

王洪斌 郑钦岳 鞠佃文 方军

(第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433)

提要 商陆多糖 I (*Phytolacca acinosa* polysaccharides I, PAP-I) 体外能显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖, 促进丝裂原诱导的淋巴细胞转化及双向混合淋巴细胞反应。检测 PAP-I 和小鼠脾淋巴细胞培养上清液发现 PAP-I 可显著促进小鼠脾淋巴细胞产生白细胞介素 2 (IL-2) 及集落刺激因子 (colony stimulating factor, CSF)。PAP-I 和小鼠腹腔巨噬细胞培养上清液中也存在 CSF 活性及促进重组粒单系集落刺激因子诱导骨髓细胞增殖的细胞因子。PAP-I, ip 可显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖及 IL-2 产生。

关键词 商陆多糖; 脾淋巴细胞; 巨噬细胞; 集落刺激因子; 白细胞介素 2

商陆多糖 I (*Phytolacca acinosa* polysaccharides I, PAP-I) 是从中国商陆科植物商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb) 块根中提取的总多糖, 经进一步分离纯化后得到的一种酸性多糖。PAP-I 经醋酸纤维薄膜电泳和凝胶层析证实为均一组分, 内含半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖成分。其分子比为 1 : 0.18 : 0.32 : 0.16, 分子质量为 10 kDa⁽¹⁾。ip 商陆总多糖及 PAP-I 对小鼠 S₁₈₀ 均有显著抑瘤效应, PAP-I 合用环磷酰胺可显著减轻后者对小鼠造血功能影响⁽²⁾。PAP-I 还能增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 促进白细胞介素-1 (IL-1) 分泌, 并可作为启动剂促进肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 产生⁽³⁾。本文进一步在体内外观察 PAP-I 对小鼠脾淋巴细胞增殖及淋巴细胞和 MΦ 分泌 IL-2 及 CSF 等细胞因子的影响, 现将有关实验报道如下。

材 料 和 方 法

动物 ICR, BALB/c 小鼠由本校实验动物中心提供, BALB/c 及 NC 裸鼠由本校病理解剖教研室陶文照老师提供, ♀♂ 不拘, 体重 19.0 ± 1.7 g, 6~8 周龄。

药品及试剂 刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A), 细菌脂多糖 (lipopolysaccharides LPS), RPMI-1640 完全培养基购自美国 Sigma 公司, 小牛血清由本校病理解剖教研室提供, 临用前 56℃, 30 min 灭活, [³H]TdR 为中国科学院原子核研究所产品, 比活度为 841 TBq · mol⁻¹, rIL-2 由本校长海医院杨康医生提供, 重组鼠粒单系集落刺激因子 (recombinant murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor, RMGM-CSF) 由澳大利亚 Burgess AW 博士惠赠, CTLL-2 细胞由上海医科大学提供, PAP-I 由本校植物化学教研室陈海生副教授提供, 培养基溶解后过滤除菌备用。

淋巴细胞制备及淋巴细胞增殖实验 参见文献(2)。

IL-2 的诱生及活性单位测定 参见文献(2,4)。

巨噬细胞的制备 ICR 小鼠腹腔注射 3% TG 1 ml, 4 d 后处死,用 D-Hanks 液充分洗出腹腔细胞,计数调至一定浓度经 2 h 贴壁后即得实验中 MΦ。

巨噬细胞 CSF 活性的诱生 24 孔板中加一定浓度 PAP-I 和浓度为 10^6 ml^{-1} MΦ 各 0.5 ml,培养一定时间,收集上清液测定或 -20°C 冻存。

脾细胞 CSF 活性的诱生 24 孔板中加一定浓度药物和浓度为 $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 脾细胞悬液各 0.5 ml,培养 5 d,收集上清液测定或 -20°C 冻存。

骨髓细胞制备及 CSF 活性测定 参见文献(4)

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验测定用 *t* 检验。

结 果

PAP-I 对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

PAP-I, $10 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 单独或和一定浓度 ($2.5, 5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) Con A 或 LPS ($5, 20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 与脾细胞共同培养 3 d, PAP-I 可呈剂量依赖促进脾淋巴细胞增殖,并可促进不同浓度 Con A 或 LPS 诱导的淋巴细胞增殖(表 1)。PAP-I 和 ICR 与 BALB/c 小鼠混合的脾淋巴细胞共同培养到 d 3 后, PAP-I 可显著促进混合淋巴细胞反应(表 2)。

Tab 1 Effect of PAP-I on splenic lymphocyte proliferation *in vitro* ($n=3, \bar{x} \pm s$)

PAP-I ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation (cpm)					
	Con A ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)			LPS ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		
	0	2.5	5	0	5	20
0	4194 ± 158	11912 ± 2389	41985 ± 5018	4513 ± 559	5235 ± 337	4364 ± 308
10	6078 ± 660**	21495 ± 1021**	60360 ± 6985*	5876 ± 793	5783 ± 731	5589 ± 545*
100	6737 ± 1427*	27192 ± 617**	57823 ± 3146**	7225 ± 1912	7209 ± 784**	6630 ± 854**
200	9672 ± 1659**	21453 ± 876**	60866 ± 3827**	8073 ± 201**	7554 ± 719**	6801 ± 838**
500	6560 ± 485**	22967 ± 1595**	67582 ± 3332**	9000 ± 974**	10166 ± 1349**	8612 ± 1684**
1000	3316 ± 764	16327 ± 4002	61382 ± 7745*	8728 ± 1051**	10179 ± 113**	9518 ± 1473**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

Tab 2 Effect of PAP-I on mixed lymphocyte reaction *in vitro* ($n=3, \bar{x} \pm s$)

	$[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation (cpm)				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
Control	1237 ± 286	1637 ± 447	2532 ± 831	5412 ± 214	6051 ± 1933
PAP-I ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1308 ± 451	2207 ± 451	5699 ± 996**	6740 ± 517**	10865 ± 1211**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

PAP-I 对裸鼠脾细胞增殖的影响

PAP-I, $15.6 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Con A $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, LPS $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和正常 BALB/c 小鼠, BALB/c 及 NC 裸鼠淋巴细胞共同培养 3 d, 结果(表 3)表明 PAP-I 和 LPS 对这三品系小鼠淋巴

细胞增殖均有显著促进作用,Con A 对正常 BALB/c 及 BALB/c 裸鼠淋巴细胞增殖有促进作用,而对 NC 裸鼠淋巴细胞增殖呈现抑制作用。

Tab 3 Effect of PAP-I on splenic lymphocyte proliferation in normal BALB/c, nude BALB/c and NC mice *in vitro* (n=3, $\bar{x}\pm s$)

PAP-I ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	[³ H]TdR incorporation (cpm)		
	Normal BALB/c	Nude BALB/c	NC
0	443±35	480±146	846±44
15.6	557±35*	636±39	1233±68*
32	695±100**	716±73	1258±180*
64	627±38**	773±72*	1455±33**
125	859±132**	1125±161**	1775±326**
250	1111±145**	1088±166**	2325±533**
500	1317±202**	1434±57**	3255±462**
1000	917±76**	898±119*	3241±84**
Con A (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	36834±4114**	3774±225**	619±84*
LPS (12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	6428±617**	6476±944**	9943±325**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control.

PAP-I 对三品系小鼠脾细胞产生 CSF 的影响

PAP-I, 30~300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Con A 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, LPS 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 与正常 BALB/c 小鼠, BALB/c 和 NC 裸鼠淋巴细胞共同培养 5 d, 收集上清液作 1:2 稀释后, 检测 CSF 活性。结果表明 PAP-I, LPS 和 Con A 可促进除 NC 裸鼠以外的其它两品系小鼠淋巴细胞产生 CSF (表 4)。

Tab 4 Effect of PAP-I on the production of colony stimulating factor (CSF) from splenic lymphocytes of normal BALB/c, nude BALB/c and NC mice *in vitro* (n=3, $\bar{x}\pm s$)

PAP-I ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	CSF activity (cpm)		
	Normal BALB/c	Nude BALB/c	NC
0	1783±185	1347±102	1457±17
30	2071±274	1618±26*	1545±122
100	2267±104**	1624±73*	1479±168
300	2560±218*	1878±66**	NT
Con A (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	4875±221**	23617±439**	1489±37
LPS (12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	4500±220**	1895±221*	1197±66**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control, NT; not tested.

PAP-I 对小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 的影响

PAP-I, 50~500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 单独或与 Con A 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 一起和小鼠脾淋巴细胞共同培养 1, 2, 3 d, 收集上清液测定 IL-2 活性, 结果 (表 5) 表明 PAP-I 可呈剂量依赖促进小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2, 并于培养 d 2 达峰。PAP-I 还可显著促进 Con A 诱导小鼠脾细胞产生 IL-2 (表 5)。

Tab 5 Effect of PAP-I on the production of interleukin-2 from murine splenic lymphocytes *in vitro*. The concentration of concanavalin A (Con A) was $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($n=3, \bar{x} \pm s$)

PAP-I ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Interleukin-2 ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$)					
	d 1		d 2		d 3	
	0	+Con A	0	+Con A	0	+Con A
0	0.3±0.4	9.4±1.6	1.0±0.6	3.2±0.3	0.5±0.1	0.6±0.1
50	0.1±0.0	12.3±0.4*	2.3±0.6	3.8±0.7	1.5±0.4*	1.3±0.1**
150	0.2±0.3	13.1±0.1*	3.1±0.4**	5.1±0.4**	2.6±0.5**	1.7±0.1**
500	0.9±0.7	14.5±0.1**	3.7±0.7**	7.0±0.7**	3.5±1.1**	1.5±0.4*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

PAP-I, ip 对小鼠脾淋巴细胞增殖及产生 IL-2 的影响

BALB/c 小鼠 1 次 ip PAP-I, $0 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 7 d 后取脾制备脾淋巴细胞, 并于体外检测 Con A $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 诱导此淋巴细胞转化及 IL-2 产生量。结果(表 6)表明 PAP-I ip 能显著促进 Con A 及 LPS 诱导的淋巴细胞增殖及 IL-2 产生。其最佳剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

Tab 6 Augmentation of IL-2 production and splenic lymphocytes proliferation by administration of ip PAP-I. The concentration Con A and LPS was $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively ($n=4, \bar{x} \pm s$)

PAP-I ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation			IL-2 activity ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$)
	(cpm)			
	RPMI-1640	Con A	LPS	
0	1439±312	19175±3188	1555±212	12.1±2.4
5	1538±248	33313±8494*	1296±277	NT
10	5403±941**	28925±3301**	3871±659**	27.0±6.4*
20	6770±2683**	48239±6484**	7442±1105**	60.9±2.2**
50	10485±730**	32304±5161**	4589±731**	55.7±8.7**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, NT: not tested.

PAP-I 对小鼠腹腔 M Φ 产生 CSF 及集落促进因子的影响

PAP-I $30 \sim 300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 与 M Φ 共同培养 1, 2, 3 d, 收集上清液作 1:2 稀释后检测 CSF 活性, 结果(表 7)表明 PAP-I 与 M Φ 共同培养 1 d, 能显著促进 M Φ 分泌 CSF, 随培养时间延长, 促 M Φ 分泌 CSF 能力下降。收集 PAP-I 和 M Φ 培养 d 2 的上清液作 1:16 稀释后和浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 RMGM-CSF 共同刺激骨髓细胞增殖, 结果显示 PAP-I 可刺激 M Φ 分泌一种促进 RMGM-CSF 诱导骨髓细胞增殖的细胞因子。

Tab 7 Effect of PAP-I on the production of CSF and colony enhancing factor from murine peritoneal macrophage (MΦ) *in vitro* (n=3, $\bar{x} \pm s$)

PAP-I ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	CSF activity (cpm)			Colony enhancing factor activity(cpm)
	1 d	2 d	3 d	2 d
0	1855 ± 213	1718 ± 275	1758 ± 445	1595 ± 550
30	2348 ± 130**	1538 ± 103	1618 ± 200	3029 ± 436**
100	2605 ± 405**	2220 ± 15*	1868 ± 65	3674 ± 617**
300	2349 ± 248	1753 ± 125	1568 ± 433	1826 ± 572

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

讨 论

本实验证明 PAP-I 在体外能显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖,促进 T、B 淋巴细胞丝裂原 Con A 及 LPS 诱导的淋巴细胞增殖。在双向混合淋巴细胞培养反应模型中,巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞同时参与,B 细胞是刺激细胞,巨噬细胞通过分泌非特异性淋巴细胞活化因子起协助作用,T 细胞为反应细胞⁽⁵⁾。PAP-I 能增强混合淋巴细胞反应,说明 PAP-I 可能通过作用于免疫效应细胞而达到增强混合淋巴细胞反应作用。NC 裸鼠脾细胞为 T 细胞缺乏,T 细胞丝裂原 Con A 非但不能促其脾淋巴细胞增殖,反而呈现一定的抑制作用,其原因还有待进一步研究。PAP-I 可呈剂量依赖促进 NC 裸鼠脾淋巴细胞增殖,说明 PAP-I 为非特异的 T 细胞丝裂原,PAP-I 是否为 B 细胞丝裂原还要做进一步研究。PAP-I 在体外可刺激小鼠脾淋巴细胞产生 IL-2 及 CSF,以往实验亦已证实此 CSF 活性为白细胞介素 3(interleukin-3,IL-3)⁽⁶⁾。IL-2,IL-3 为激活 T_H 细胞分泌的淋巴因子^(7,8)。PAP-I 激活 T 淋巴细胞分泌 IL-2,IL-3 可能与其促进 MΦ 分泌 IL-1 有关⁽³⁾。实验中观察到 PAP-I 及 Con A LPS 均不能刺激 NC 裸鼠脾淋巴细胞产生 CSF,说明小鼠脾淋巴细胞产生 CSF 需 T 细胞参与。PAP-I 诱导的 MΦ 上清液中存在抑制骨髓细胞生长的物质,此物质可能是前列腺素⁽⁹⁾。PAP-I 诱导 MΦ 的上清液可促进 rmGM-CSF 诱导骨髓细胞增殖的细胞因子。大量实验表明 IL-1,IL-6 能促进 CSF 诱导骨髓细胞增殖^(10,11),推测此细胞因子可能为 IL-1 或 IL-6。在以上体外实验基础上,进一步观察了 PAP-I 腹腔给药对脾淋巴细胞增殖及脾淋巴细胞产生 IL-2 的含量,结果证实了 PAP-I,ip 能显著促进脾淋巴细胞增殖及 IL-2 产生。以上结果证实 PAP-I 在体内和体外均能促进小鼠的免疫功能。

致谢 本院植化教研室陈海生副教授提供足量的 PAP-I。

参 考 文 献

- 1 王著禄,等.商陆多糖的分离和纯化.第二军区大学学报 1990;11:56.
- 2 王洪斌,等.商陆多糖 I 对荷 S180 小鼠的抑瘤、增强免疫和造血保护作用.中国药理学与毒理学杂志 1993;7:52.
- 3 张俊平,等.商陆多糖 I 对小鼠腹腔巨噬细胞细胞毒作用及诱生肿瘤坏死因子和白细胞介素 1 的影响.中国药理学报 1990;11:375.
- 4 Hewlett G, et al. A method for the quantitation of interleukin-2 activity. *J Immunol Methods* 1989;117:243.
- 5 雷林生,林志彬.灵芝多糖对混合淋巴细胞培养反应的影响.基础医学与临床 1992;12:59.

- 6 王洪斌,郑钦岳. 商陆多糖 I 体外对小鼠脾细胞产生集落刺激因子的影响. 中国药理学报(待发表).
- 7 张罗修. 白细胞介素 2 的产生. 见:张罗修编. 免疫药理学. 第 1 版. 上海:上海医科大学出版社, 1990: 34.
- 8 Dexter TM. Hemopoietic growth factors. *Br Med Bull* 1989;45: 341.
- 9 Wang SY, et al. The effect of lipopolysaccharides on the production of GM-EA, GM-CSA and PGE₂ by human monocyte-derived lipid-containing macrophage. *Exp Hematol* 1988;16: 349.
- 10 Hoang T, et al. Interleukin-1 enhance growth factor-dependent proliferation of colonogenic cells in acute myeloblast leukemia and of normal human primitive hemopoietic precursors. *J Exp Med* 1988;168: 463.
- 12 Dexter TM. Haemopoietic growth factors. *Br Med Bull* 1989;45: 346.

EFFECTS OF *PHYTOLACCA ACINOSA* POLYSACCHARIDE ON SPLENIC LYMPHOCYTE PROLIFERATION AND CYTOKINE SECRETION FROM SPLENIC LYMPHOCYTE AND MACROPHAGE

HB Wang, QY Zheng, DW Ju and J Fang

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT The effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides I (PAP-I), a polysaccharide extracted from *Phytolacca acinosa* Roxb; on splenic lymphocyte proliferation and cytokines production from splenic lymphocyte and macrophage were studied. Lipopolysaccharides (LPS) and PAP-I were found to significantly augment splenic lymphocyte proliferation of normal BALB/c, nude BALB/c and NC mice *in vitro*, but concanavalin A (Con A) was shown to stimulate only normal BALB/c and nude BALB/c splenic lymphocyte proliferation. Also, PAP-I significantly enhanced Con A or LPS-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte reaction. Significant enhancement of colony stimulating factor (CSF) production was observed from splenic lymphocyte of normal BALB/c and nude BALB/c mice but not from NC mice when treated with PAP-I for 5 d. PAP-I was shown to significantly enhance interleukin-2 (IL-2) production from normal mice splenocyte and Con A stimulated normal mice splenocyte in a concentration-dependent fashion. Supernatant of PAP-treated macrophage (M Φ) were collected and CSF activity was tested. The results confirmed that PAP-I can significantly stimulate M Φ to secret CSF activity on d 1. The supernatant also contained a cytokine which exhibited a synergistic action with recombinant murine granular-macrophage CSF (RMGM-CSF) to stimulate mice bone marrow cell proliferation. PAP-I, 5~50 mg \cdot kg⁻¹, ip can enhanced splenic lymphocyte proliferation and IL-2 production. These findings indicate that PAP-I can augment immunologic function *in vitro* and *in vivo*.

Key words *Phytolacca acinosa*; Polysaccharides; Splenic lymphocyte; Macrophage; Colony stimulating factor; Interleukin-2(IL-2)