

人参多糖对X射线照射小鼠 免疫功能的影响

田生礼 赵勇 李健超 张晓光

(白求恩医科大学, 长春)

摘要 观察了人参多糖对X射线照射小鼠免疫功能的影响。结果表明, 人参多糖组小鼠受一定剂量X射线照射后, 脾脏有核细胞数、脾脏淋巴细胞对ConA诱导的增殖反应和ConA诱导脾细胞产生白细胞介素2(IL-2)的能力在不同程度上明显高于对照组。发现在照射后第3d这种现象仍然存在。同时发现, 人参多糖组小鼠脾脏NK细胞的活性也明显高于对照组。

关键词 人参多糖, 脾淋巴细胞增殖反应, 白细胞介素2, NK细胞活性

辐射对机体免疫功能的影响是放射肿瘤学和辐射免疫学研究的重要课题之一。人参多糖(Polysaccharides of Ginseng, PSG)具有抑制肿瘤和调节免疫功能的作用^[1]。本实验通过照射前给小鼠腹腔注射人参多糖, 观察了它对受照射小鼠脾脏有核细胞计数、脾脏淋巴细胞对ConA、LPS诱导的增殖反应能力、ConA诱导脾细胞产生IL-2的能力及NK细胞活性的影响。

材料与 方法

1. 实验动物

采用本校实验动物部提供的纯系BALB/C小鼠, 雄性, 体重18—22g, 随机分为PSG组和对照组。

2. 给药方法

照射前连续4d, 每日两次腹腔注射PSG, 每次200mg/kg体重。对照组在相同条件下给予等体积无菌生理盐水。第5d两组小鼠同时接受X射线照射。

3. 照射条件

利用Phillips深部X射线治疗机全身照射, 电压200kV, 电流10mA, 滤过板0.5mmCu和1.0mmAl。球靶距离50cm, 剂量率0.29Gy/min。

4. 脾细胞对ConA和LPS反应性的测定

小鼠断头处死后, 无菌取脾, 用磨压法制备细胞悬液, 调节细胞浓度为 5×10^6 /ml, ConA浓度为10 μ g/ml, LPS浓度为40 μ g/ml, 于96孔平底培养板上每孔各加入100 μ l的细胞悬液和丝裂原。每份样品设自身对照, 不加丝裂原, 只加入各100 μ l细胞悬液和培养液。三复孔培养, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养72h。终止培养前6h每孔加入 1.85×10^4 Bq/20 μ l/³H-TdR。多头细胞收集器收集细胞于49型滤纸上, 用Tri-Carb 464 CD型自动液闪仪测量³H-TdR掺入量, 结果以cpm值表示。

5. 脾细胞IL-2的诱生及活性测定^[2,3]

(1) IL-2诱生 24孔平底培养板, 每孔加入1.0ml浓度为 5×10^6 /ml脾细胞悬液和50 μ l

浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ 。ConA, 37°C $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 28—30 h, 其上清液中含有 IL-2。取上清液测定或 -20°C 冻存, 即为待测样品。

(2) IL-2 活性测定 CTLL-2 细胞株是 IL-2 依赖细胞, CTLL-2 细胞的生长状态依赖培养基中的 IL-2 的浓度。以传代培养的 IL-2 依赖株 CTLL-2 细胞为效应细胞, 用培养液洗 3 次, 于 96 孔平底培养板上每孔加入 $1 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ 细胞、 $50 \mu\text{l}$ 待测上清液和 $100 \mu\text{l}$ 培养液。对照孔只加入 $1 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ 细胞和 $150 \mu\text{l}$ 培养液, 不加待测上清液, 三复孔培养。置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h。终止培养前 4 h 每孔加入 $1.85 \times 10^4 \text{Bq}/20 \mu\text{l}$ $^3\text{H-TdR}$ 。多头细胞收集器收集细胞, 液闪测量 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量。结果以 $\text{cpm}/1 \times 10^4 \text{CTLL-2}$ 细胞表示。

6. NK 细胞活性测定

按文献[4]略加改进, 靶细胞取换液培养 24 h 的 YAC-1 细胞, 调节浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 $7.4 \times 10^5 \text{Bq}/20 \mu\text{l}$ $^3\text{H-TdR}$ 。置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 4 h, 取出, 用培养液洗 3 次后调节浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 备用。效应细胞取自小鼠脾细胞, 调节浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。于 96 孔平底培养板上每孔加入各 $100 \mu\text{l}$ 的效应细胞和靶细胞。单加靶细胞孔加入 $100 \mu\text{l}$ 培养液, 三复孔培养、置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 16—18 h 后, 多头细胞收集器收集细胞, 液闪测滤片的 cpm 值, 按公式计算 NK 细胞活性。

$$^3\text{H-TdR} \text{ 释放率} = \frac{\text{单加靶细胞的 cpm 值} - (\text{效} + \text{靶}) \text{细胞孔的 cpm 值}}{\text{单加靶细胞孔的 cpm 值}} \times 100\%$$

结 果

1. PSG 对 X 射线照射小鼠脾脏有核细胞计数的影响

不同剂量 X 射线照射后 24 h, 小鼠脾脏有核细胞数的变化表明(见图 1), 在低剂量照射时, PSG 组小鼠脾脏有核细胞数明显高于对照组($P < 0.05$)。当剂量大于 3.0 Gy 时, PSG 组和对照组的差异较小。

Tab 1. Time course of the changes of splenocyte in 2.0 Gy X-irradiated mice

Day	Splenocytes ($\times 10^7/\text{spleen}$)	
	PSG	Control
1	$4.86 \pm 0.41^*$	3.49 ± 0.29
3	$7.75 \pm 0.64^*$	5.59 ± 0.47
7	8.18 ± 0.69	8.70 ± 0.74

compared with control, $*P < 0.05$, $\bar{X} \pm \text{SE}$
Normal, 11.83 ± 0.53 $N = 5$

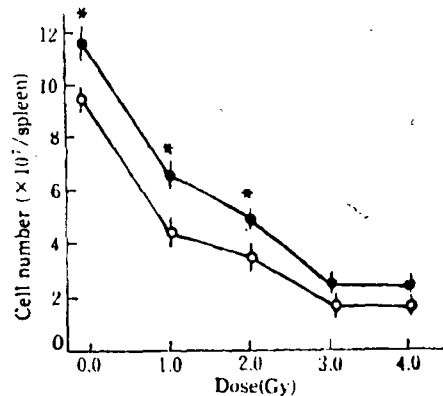


Fig 1. Effect of PSG on nucleated cell number of the spleen in irradiated mice
PSG ($\bullet$), Control ($\circ$)
Compared with control, $*P < 0.05$
 $\bar{X} \pm \text{SE}$, $N = 5$

2.0 Gy X 射线照射后, 脾脏有核细胞计数在不同时间的变化规律表明(见表 1), 在照射后第 3 d, PSG 组小鼠脾脏有核细胞数仍高于对照组。第 7 d 两组的有核细胞数有所回升, 两组之间的脾脏有核细胞数无明显差异。

2. PSG 对 X 射线照射小鼠脾细胞 ConA、LPS 诱导增殖反应的影响

由表 2 可见, 不同剂量照射后 24 h, 脾细胞对 ConA、LPS 诱导增殖反应的能力随照射剂量

的增加而逐渐下降。在低剂量照射时, PSG 组小鼠脾细胞对 ConA 诱导的增殖反应能力明显高于对照组。而在高剂量时, PSG 组脾细胞对 ConA 诱导的增殖反应能力仍然高于对照组, 但无统计学差异。

对于 LPS 诱导的增殖反应能力也随着照射剂量的增加而逐渐下降。PSG 组小鼠脾细胞对 LPS 诱导的增殖反应能力虽然也高于对照组的趋势, 但两组没有明显统计学差异。

Tab 2. Changes in proliferative reaction of splenocytes to ConA and LPS after different doses

Dose (Gy)	cpm/ 5×10^5 cells			
	ConA		LPS	
	PSG	Control	PSG	Control
0	93024.0 $\pm$ 5295	80491.2 $\pm$ 12240	27293.6 $\pm$ 5514	23894.9 $\pm$ 4346
1	58223.4 $\pm$ 6080*	34274.0 $\pm$ 9038	22300.4 $\pm$ 2824	18577.6 $\pm$ 3998
2	53529.5 $\pm$ 4149*	40178.9 $\pm$ 5050	14773.3 $\pm$ 2453	12891.8 $\pm$ 2635
3	31132.3 $\pm$ 3391*	22092.8 $\pm$ 2588	6048.8 $\pm$ 1605	6463.8 $\pm$ 2713
4	11926.4 $\pm$ 2676	8596.8 $\pm$ 3196	697.4 $\pm$ 292	509.8 $\pm$ 320

Compared with control, * $P < 0.05$, $X \pm SE$, $N = 5$

2.0 Gy X 射线照射后, 脾细胞对 ConA、LPS 诱导增殖反应的能力在照后不同时间的变化(见表 3)。PSG 组小鼠脾细胞对 ConA 诱导的增殖反应能力在照后第 1 和第 3 d 均明显高于对照组。而第 7 d 的虽然也高于对照组, 但没有显著差异。LPS 诱导增殖反应的能力在照后不同时间, PSG 组与对照组相比有高于对照组的趋势, 但无显著差异。

Tab 3. Time course of proliferative reaction of splenocytes to ConA and LPS in 2.0 Gy X-irradiated mice

Time (day)	cpm/ 5×10^5 cells			
	ConA		LPS	
	PSG	Control	PSG	Control
1	71372.6 $\pm$ 5532(5)*	53571.8 $\pm$ 6733(5)	1772.8 $\pm$ 658(5)	1547.0 $\pm$ 316(5)
3	57617.6 $\pm$ 8973(5)*	30957.4 $\pm$ 4527(5)	1505.3 $\pm$ 423(4)	1483.0 $\pm$ 468(4)
7	63800.3 $\pm$ 5782(4)	60275.4 $\pm$ 6546(4)	1728.3 $\pm$ 730(4)	1494.5 $\pm$ 624(4)

Compared with control, * $P < 0.05$, $X \pm SE$, Numbers in parentheses are animal number. Normal counts for ConA: 101048.2 $\pm$ 9248(5), Normal counts for LPS: 2898.6 $\pm$ 914(5)

3. PSG 对 X 射线照射小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响

不同剂量照射后 24 h, ConA 诱导脾细胞产生 IL-2 的能力随照射剂量加大而逐渐下降。由表 4 可见, ConA 诱导 PSG 组小鼠脾细胞产生 IL-2 的能力明显高于对照组。

2.0 Gy X 射线照射后, ConA 诱导脾细胞产生 IL-2 的时间动态变化表明, 脾细胞产生 IL-2 的能力在照后第 3 d 降至最低, 以后开始回升, 第 7 d 达到正常水平。ConA 诱导 PSG 组小鼠脾细胞产生 IL-2 的能力在照后第 1 和第 3 d 均显著高于对照组, 第 7 d 两组结果无统计学差异(见表 5)。

Tab 4. Changes in IL-2 production by splenocytes in X-irradiated mice

Dose (Gy)	cpm/ 1×10^4 CTLL-2 cells (25% supernatant)	
	PSG	Control
0	54101 $\pm$ 3018	49422 $\pm$ 2567
1	32668 $\pm$ 1803**	13208 $\pm$ 1351
2	30273 $\pm$ 2025*	22342 $\pm$ 3325
4	27776 $\pm$ 3962**	5711 $\pm$ 962

Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
 $X \pm SE$, $N = 5$

Tab 5. Time course of IL-2 production by splenocytes in 2 Gy X-irradiated mice

Time (day)	cpm/ 1×10^4 CTLL-2 cells (25% supernatant)	
	PSG	Control
1	36968 $\pm$ 2473*	27283 $\pm$ 4060
3	37387 $\pm$ 6558*	21112 $\pm$ 3883
7	49529 $\pm$ 5300	40387 $\pm$ 730

Compared with control, * $P < 0.05$, $X \pm SE$,
 $N = 5$. Normal counts: 40474 $\pm$ 5046

4. PSG对X射线照射小鼠脾脏NK细胞活性的影响

小鼠受不同剂量1.0和4.0 Gy X射线照射后24 h, NK细胞活性并无明显下降。PSG组小鼠脾脏NK细胞活性均高于对照组($P < 0.05$)。

讨 论

目前的研究表明, 人参提取物可增强空斑形成细胞(PFC)反应, 增强小鼠NK细胞活性及干扰素(IFN)的诱生^[5]。Gupta等用人外周血淋巴细胞研究进一步证明了人参提取物不仅有诱生IFN的作用, 还能增强NK细胞及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的活性^[6]。

本实验观察了PSG对X射线照射小鼠免疫功能的影响。结果表明, 不同剂量照射后24 h, PSG组小鼠的脾脏有核细胞计数、脾细胞对丝裂原ConA的反应能力和ConA诱导脾细胞产生IL-2的能力均高于对照组, 尤其在照射剂量小于3.0 Gy时。而LPS诱导的增殖反应能力未见明显高于对照组。而文献[1]报道表明, PSG能改善荷瘤小鼠的免疫功能, 尤其以特异玫瑰花形成细胞(SRFC)和PFC更为明显, 能增加抗体分泌量。而本实验结果并未见到PSG对B细胞的明显促进作用。造成这种情况可能有以下原因: (1) 从不同人参中提取出的多糖其成份可能不同, 因此其作用不同。(2) PSG可能对T细胞的作用明显而对B细胞的作用不明显。有资料表明^[7], PSG能显著恢复T淋巴细胞的功能。(3) 可能与采用的实验方法有关。本实验表明, PSG对脾脏有核细胞数和T细胞的作用在一定剂量范围内能表现出来, 而当大剂量照射后, 可能由于细胞的大量死亡, PSG对T细胞的作用表现不出来。但有人认为产生IL-2的细胞具有辐射抗性^[8]。从表3的结果看到, ConA诱导PSG组小鼠脾细胞产生IL-2的能力均明显高于对照组。IL-2是T淋巴细胞经丝裂原刺激分泌的生物活性物质。因此可以认为PSG具有协同ConA刺激T细胞分泌IL-2的作用。文献[9,10]报道, 人参花总皂甙及当归多糖能促进IL-2的产生。本实验结果还表明, 小鼠受照后第1、3 d, PSG组的脾脏有核细胞数、脾细胞对ConA诱导的增殖反应能力

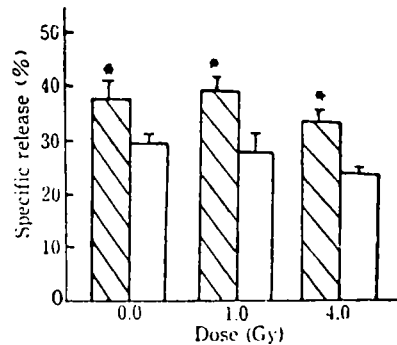


Fig 2. Effect of PSG on NK cell activity in irradiated mice.

PSG(▨), Control(□).

Compared with control, * $P < 0.05$,
 $X \pm SE$, $N = 5$

和 ConA 诱导脾细胞产生 IL-2 的能力均明显高于对照组,而受照后第 7 d,两组无明显差别。这可能与 PSG 在机体内的作用和代谢时间有一定的关系,还可能与机体在不同水平受照有关。在受照开始时可能下降程度不同,但其后由于机体的自然恢复可能使两组相差不明显。

NK 细胞是一种辐射抗性细胞^[11]。本实验表明,不同剂量照射后 24 h, NK 细胞的活性没有明显变化,但是 PSG 组的 NK 细胞活性均明显高于对照组。这可能是 PSG 的直接作用,也可能是由于 PSG 促进了 IL-2 的产生,IL-2 又促进了 NK 细胞的活性。杨贵贞等证明人参能促进 NKC—IFN—IL-2 调节网的作用^[6]。已知 IL-2 和 IFN 是机体内 NK 细胞和其它杀伤细胞活性增强的因子, NK 细胞和其它杀伤细胞的膜上有 IL-2 和 IFN 的受体^[12]。IL-2 诱导原始 NK 细胞的增殖分化和前体 NK 细胞分化成熟表现活性,激活 NK 细胞及增强其裂解靶细胞的能力。本实验表明, PSG 组的 ConA 诱导脾细胞产生 IL-2 的能力以及 NK 细胞的活性均明显高于对照组,这些可能与 PSG 的抗肿瘤作用有着重要的内在联系。

参 考 文 献

- 1 钱伯初,臧星星.中国药理学报,1987,8(3):277
- 2 Gillis S, Ferk M M et al.. J. Immunol., 1978, 120: 2027
- 3 Gearing A J H, Johnstone A P et al.. J. Immunol. Methods., 1985, 83:1
- 4 冯作化,陈兆聪.中国免疫学杂志,1988,4(2):73
- 5 Singh V K, Agarwal S S et al., Planta Med., 1984, 50(6): 462
- 6 Gupta S, Agarwal S S et al., Clin. Res., 1980, 28:504
- 7 胡明继,杨连顺.中草药,1985,16(4):27
- 8 Manori I, Kushelevsky A et al., J. Natl. Cancer Inst., 1985, 74:1215
- 9 于永利,杨贵贞.中国免疫学杂志,1987,3(1):41
- 10 Weng X C, Zhang P et al.. Immunol. Invest., 1987, 16(2):79
- 11 范晓慧,刘树铮.白求恩医科大学学报,1989,15(6):551
- 12 Braakman E, Tunen A V, Meager A et al., Cellul Immunol., 1986, 99:476

(稿件收到日期:1991年5月13日)

EFFECT OF POLYSACCHARIDES OF GINSENG(PSG) ON IMMUNOLOGICAL FUNCTION IN X-IRRADIATED MICE

Tian Shengli Zhao Yong Li Jianchao Zhang Xiaoguang

(Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun)

ABSTRACT The effect of PSG injection before X-irradiation on immunological functions was studied. The results showed that the counts of nucleated cell of the spleen, the ConA-induced proliferative reaction of splenocytes and the IL-2 production by splenocytes in irradiated mice in PSG group were higher than those in irradiated mice in control group at a certain dose range of X-rays. This effect still existed in the 3rd day after irradiation with 2.0 Gy X-rays. It was also showed that NK cell activity in PSG group was higher than that in control group. It might be related to the effect of antitumor of PSG.

KEYWORDS Polysaccharides of Ginseng. Proliferative reaction of lymphocyte of spleen. IL-2. NK cell activity