

# 人参对老年大鼠淋巴细胞功能的影响

何宏文, 谢 瑶, 周丽华, 袁群芳, 姚志彬

(中山大学中山医学院解剖教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究人参对老年机体淋巴细胞功能的影响。【方法】30 只老年鼠(18 个月)分为老年对照组(ACG)、高浓度人参组(HGG)、低浓度人参组(LGG), 大鼠灌服人参水煎液, 3 周后, 用放射配基结合分析法测定各组大鼠脾细胞和血液淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量, 同时用各组大鼠脾细胞分别加入刀豆球蛋白 A (ConA)、异丙肾上腺素(ISO)、普萘洛尔诱导淋巴细胞增殖, 用四唑盐比色法(MTT)比较各组淋巴细胞增殖 A 值变化。【结果】ACG、HGG、LGG 脾细胞  $\beta$ -AR 密度分别为(3378  $\pm$  117)、(4940  $\pm$  261)、(3572  $\pm$  122), 与 ACG 比较, HGG 明显增多( $P < 0.01$ ); 淋巴细胞增殖的 MTT A 值分别为(0.217  $\pm$  0.027)、(0.547  $\pm$  0.043)、(0.253  $\pm$  0.037), HGG 明显增多( $P < 0.01$ )。在 HGG 淋巴细胞增殖中, 加入 ISO 的淋巴细胞增殖 MTTOD 值明显少于未加 ISO 或加入 ISO 和普萘洛尔( $P < 0.01$ )。【结论】人参可提高老年机体淋巴细胞功能, 这种调节淋巴细胞功能的作用可被 ISO 的抑制。

**关键词:** 人参; 淋巴细胞;  $\beta$  肾上腺受体; 衰老

中图分类号: R749.1

文献标示码: A

文章编号: 1672-3554(2003)05-0425-04

## Effect of Ginseng on the Function of Lymphocytes in Aged Rats

HE Hong-wen, XIE Yao, ZHOU Li-hua, YUAN Qun-fang, YAO Zhi-bin

(Department of Anatomy, Zhong Shan Medical College, SUN Yat-sen University Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the effect of Ginseng on the function of lymphocytes in aged rats. 【Methods】Thirty aged rats(18 months) were divided into aged control group(ACG), high dose Ginseng group(HGG), low dose Ginseng group(LGG). The rats were fed with Ginseng for 21 days. Then,  $\beta$ -AR densities of splenocytes were analyzed by radioligand binding assay of receptor. Lymphocytes proliferation (A values) induced by Concanavalin(ConA), isoprenaline (ISO), propranolol respectively were analyzed by MTT method. 【Results】 $\beta$ -AR densities of ACG, HGG, LGG in splenocytes were 3378  $\pm$  117, 4940  $\pm$  261, 3572  $\pm$  122 respectively. Compared with ACG, HGG was found significantly increase in the  $\beta$ -AR densities ( $P < 0.01$ ). Splenocyte proliferation MTTOD values induced by ConA were 0.217  $\pm$  0.027, 0.547  $\pm$  0.043, 0.253  $\pm$  0.037 respectively in ACG, HGG and LGG groups the value in HGG was found significantly increase ( $P < 0.01$ ). Compared with splenocyte proliferation cultured without ISO or with ISO and propranolol, MTT A of splenocyte proliferation cultured with ISO was decreased in the HGG group ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】Ginseng can increase the function of lymphocytes in aged rats. The effect of Ginseng on the regulation of lymphocyte function can be inhibited by ISO.

**Key words:** ginseng; lymphocytes;  $\beta$ -adrenergic receptor; aging

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(5)425 ~ 428]

人参可调节机体的免疫功能, 提高老年机体淋巴细胞功能及其它抗衰老作用<sup>[1, 2]</sup>, 刘洁的研究发

现人参调节衰老时心肺等组织的  $\beta$  肾上腺素受体 ( $\beta$ -Adrenergic receptors,  $\beta$ -AR) 数量<sup>[3]</sup>, 那么人参是

收稿日期: 2001-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070952)

作者简介: 何宏文(1962-), 男, 广东南雄人, 博士, 副教授, 硕士生导师.

否对老年机体淋巴细胞的  $\beta$ -AR 也有调节作用及  $\beta$ -AR 改变是否会影响淋巴细胞功能的研究未见报道。我们在 2001 年 7 月 ~ 2002 年 9 月用老年大鼠灌服人参水煎液测定淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量和脾细胞的刀豆球蛋白 A (Concanavolin, ConA) 诱导淋巴细胞增殖的影响, 同时加入  $\beta$ -AR 激动剂和阻断剂, 观察服用人参对老年大鼠淋巴细胞功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

实验动物选用一级 SD 大鼠, 雌雄兼有, 18 ~ 20 个月龄, 动物笼养, 昼夜交替环境(由中山大学实验动物中心提供)。大鼠分为老年对照组、高浓度人参组、低浓度人参组, 每组 10 只大鼠。

### 1.2 人参水煎液制备及给药方法

选用吉林生晒参分别第 1 次用 8 倍水分煎 2 h, 第 2 次 6 倍水分煎 1.5 h, 二次分煎液体合并浓缩至每毫升含生药 40 g/L 的液体, 高浓度人参组灌服人参水煎液 3 mL, 低浓度人参组灌服稀释人参水煎液 5 倍后的液体 3 mL, 老年对照组灌服蒸馏水 3 mL, 每天 1 次, 时间为早上 8 ~ 9 时, 连续 3 周。

### 1.3 动物取材

动物最后 1 次灌服中药 8 h 后用拔眼球方式直接取血(不麻醉), 立即放入含肝素的试管, 混匀, 然后拉颈处死, 立即开腹取出脾脏备用。

### 1.4 脾细胞、血液淋巴细胞 $\beta$ 受体结合量的测定

常规制备脾细胞和淋巴细胞悬液并作细胞计数及测定细胞的存活率(用台盼蓝染色)。用细胞悬液 100  $\mu$ L 分别加入  $^3$ H-DHA(浓度分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5 nmol/L)以消旋普奈洛尔为非标记配基(浓度分别为 0.4、1、2、3、4、5、7  $\mu$ mol/L)做饱和曲线, 并以 Tris-HCl 缓冲液补至 250  $\mu$ L, 各管置冰浴中反应 10 min 后迅速经玻璃纤维滤膜滤过, 并以 10 mL Tris-HCl 缓冲液连续洗涤, 滤膜, 在 80 $^{\circ}$ C 经 30 min 烘干后, 置于含有 5 g/L 2,5-二苯基噁唑(PPO)的甲苯中, 以 XH-6010  $\gamma$  测显仪测其放射量, 从总结合中减去非特异性结合即为特异性结合。将数据经 Scatchard 公式进行处理, 并作图, 求出其最大结合容量 ( $B_{max}$ ), 即  $\beta$ -AR 含量 [公式为  $B/F = B_{max}/kd + (-1/kd) B$ ,  $B$  为结合

配基的浓度,  $F$  为游离配基的浓度,  $B_{max}$  为最大结合含量, 以  $B/F$  对  $B$  作图可得一直线。其斜率为  $-1/kd$ ]<sup>[4]</sup>。蛋白测定用 Lowry 法。

### 1.5 ConA 诱导脾细胞增殖培养实验方法以及药物对它的影响

在无菌操作下取大鼠脾脏分离脾细胞, 用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液稀释备用。各组老年大鼠脾细胞分别移入不同的 96 孔培养板内, 然后分别加入不同浓度 ConA(5 mg/L)、异丙肾上腺素(Isoprenaline, ISO, 浓度 2 nmol/L)、或 ConA、ISO、普奈洛尔(浓度 2  $\mu$ mol/L)。加入含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液至 100 mL, 细胞数为  $2 \times 10^6$ , 放入 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5%  $CO_2$  培养箱培养 3 d。

培养 3 d 后每孔加入 50  $\mu$ g MTT, 反应 4 h, 形成紫色结晶, 吸出孔内液体, 加入 100 mL(0.8 mol/L)盐酸异丙醇溶液, 用八通道可调移液器反复吹打至结晶完全溶解, 在酶标仪上(波长 570 nm)测定吸光度( $A$ )值。

### 1.6 数据统计处理

用 ANOVA 软件包 Student-Newman-keals 方法对各组数据进行统计学处理, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 人参对老年大鼠脾细胞和血液淋巴细胞 $\beta$ -AR 含量的影响

3 组大鼠脾细胞和血液淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量变化如表 1。从表 1 结果显示, 高浓度人参组脾细胞和血液淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量均显著高于老年对照组 ( $P < 0.01$ ), 低浓度人参组脾细胞和血液淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量与老年对照组间差别不明显 ( $P > 0.05$ )。

表 1 人参对老年大鼠脾细胞和血液淋巴细胞  $\beta$  受体含量影响

Groups	n	Splenocyte	Lymphocytes
Aged control	10	3 378 $\pm$ 117	3 730 $\pm$ 178
High dose ginseng	10	4 940 $\pm$ 261 <sup>1)</sup>	5 747 $\pm$ 197 <sup>1)</sup>
Low dose ginseng	10	3 572 $\pm$ 122	3 927 $\pm$ 188

Compared with aged control group 1)  $P < 0.01$

## 2.2 人参对 ConA 诱导老年大鼠脾细胞中的 T 淋巴细胞增殖的影响(A 值)

灌服人参老年大鼠脾细胞 ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖培养及 ISO 抑制培养 MTT A 值如表 2。

表 2 人参对老年大鼠脾细胞 ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖(A 值)的影响  
Table 2 Effect of ginseng on splenocyte ConA induce T lymphocytes proliferation (A values)

Groups	ConA	ConA + ISO	ConA + ISO + Propranolol
Aged control	0.217 ± 0.027	0.192 ± 0.021	0.225 ± 0.025
High dose ginseng	0.547 ± 0.043 <sup>1)</sup>	0.324 ± 0.031 <sup>1),2)</sup>	0.529 ± 0.047 <sup>1)</sup>
Low dose ginseng	0.253 ± 0.037	0.223 ± 0.028	0.261 ± 0.033

Compared with aged control group 1)  $P < 0.01$ ; Compared with same group without ISO 2)  $P < 0.01$

结果显示灌服高浓度人参组老年大鼠 A 值变化明显大于老年对照组和低浓度人参组 ( $P < 0.01$ )。高浓度人参组中加了 ISO 的 A 值明显小于未加 ISO 的 A 值 ( $P < 0.01$ )。同时加入普萘洛尔和 ISO 的 A 值与未加 ISO 的 A 值相近 ( $P > 0.05$ )。老年对照组和低浓度人参组加入 ISO 及普萘洛尔后 A 值变化均不明显 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

根据以往的研究显示:刺激淋巴细胞  $\beta$ -AR 激活细胞内腺苷酸环化酶,使其 cAMP 浓度增加,进而影响淋巴细胞的功能。cAMP 浓度提高可抑制 LPS 刺激的外周血单核细胞 IL-1 产生,持续提高细胞内 cAMP,可促进其 IL-1 基因表达,能抑制 NK 细胞的增殖及细胞毒作用,可抑制 T 细胞增殖及 IL-1 的产生,总之, $\beta$ -AR 兴奋被认为可抑制淋巴细胞的功能<sup>[5-7]</sup>,本实验结果显示人参可明显提高脾细胞和血液淋巴细胞的  $\beta$ -AR 含量,因此人参上调体内淋巴细胞  $\beta$ -AR 可能会由于血液中的儿茶酚胺的作用使淋巴细胞功能受到抑制。

衰老时机体的淋巴细胞功能退变是造成机体衰老时免疫机能减退的重要机制。衰老时,具有应答能力的细胞数减少,或淋巴细胞本身的增殖能力及应答能力低下是引起淋巴细胞功能低下的最常见表现。用细胞刺激因子(如 PHA、ConA、LPA)刺激活化淋巴细胞增殖可用来评价机体细胞免疫及体液免疫功能。衰老时淋巴细胞增殖能力下降对细胞刺激因子应答能力亦下降,用细胞刺激因子刺激淋巴细胞增殖的测定,也可作为评价衰老机体免疫功能的指标<sup>[8,9]</sup>。本结果显示,服人参老年大鼠 ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖明显提高,说明服人参后老年大鼠的淋巴细胞对 ConA 刺激增殖能力明显

提高。因此可以认为人参可提高老年大鼠淋巴细胞功能。

如前所述,服人参老年大鼠淋巴细胞的增殖能力明显提高,淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量明显增多,那么人参在体内对淋巴细胞的功能到底有什么影响,本研究发现,加入异丙肾上腺素服人参老年大鼠淋巴细胞增殖能力明显下降,且该作用能被普萘洛尔拮抗,说明异丙肾上腺素的这种抑制作用是通过兴奋  $\beta$ -AR 完成的,所以本研究认为服人参后老年大鼠淋巴细胞对 ConA 诱导增殖能力提高的同时,由于淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量也增高,其对异丙肾上腺素抑制淋巴细胞增殖能力的敏感性也提高,老年对照组淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量处于一个低的水平,显现其对异丙肾上腺素敏感性低下,加入异丙肾上腺素后,淋巴细胞增殖能力也下降较少。虽然服人参后在老年机体血液中含有儿茶酚胺的情况下淋巴细胞功能到底会出现什么影响仍有待进一步研究。然而就人参提高老年大鼠淋巴细胞增殖能力作用而言,人参提高淋巴细胞  $\beta$ -AR 含量是人参的副效应,本研究认为如果要用人参提高老年机体淋巴细胞的功能,应配伍能抑制  $\beta$ -AR 的药物效果会更好。

### 参考文献:

- [1] 刘俊达,王舒,刘红涛,等. 中药皂甙成分对老年人淋巴细胞功能的作用[J]. 中国药学杂志,1994,29(12):717.
- [2] 刘忞,张均田. 人参皂甙 Rg-1 对老年大鼠免疫功能的调节作用[J]. 药学学报,1995,30(1):818.
- [3] 刘洁,赵胜利,姬汴生,等. 人参对衰老大鼠  $\beta$  受体-cAMP 系统的影响及其机理初探[J]. 中药药理学与临床,1995,6(1):22.
- [4] 何宏文,卢汉平,谢瑶,等. 当归芍药散加味方及拆方对老年鼠脑组织和淋巴细胞  $\beta$ -AR 密度的影响[J]. 中山医科大学学报,2002,23(5):325.

- [5] Li Y S, Kouassi E, Revillard J P. Differential regulation of mouse B-cell activation by beta-adrenoceptor stimulation depending on type of mitogens[J]. *Immunology*, 1990, 69(3): 367.
- [6] Kalinichenko V V, Mokyry M B, Graf L H. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression[J]. *J Immunol*, 1999, 163(5): 2492.
- [7] Borger P, Hoekstra Y, Esselink M T. Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of IFN-gamma, IL-3, and GM-CSF mRNA accumulation in activated human T lymphocytes is solely mediated by the beta2-adrenoceptor subtype[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(3): 400.
- [8] Aihara M, Dobashi K, Horie T, *et al.* Effect of beta-agonists on production of cytokines by activated T cells obtained from asthmatic patients and normal subjects[J]. *J Asthma*, 1999, 36(7): 619.
- [9] Hokari R, Miura S, Fujimori H, *et al.* Altered migration of gut-derived T lymphocytes after activation with concanavalin A[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 1): 763.

(编辑 张恩健)

(上接第 424 页 form page 424)

提供了一个高效的、稳定的、长期的目的基因转移手段,使得它最适于作为基因转染的载体。本研究用的逆转录病毒载体来源于 Moloney 小鼠白血病病毒 (MoMLV),是在逆转录病毒载体 N2 基础上构建的新一代载体,按其结构属带有内部启动子的载体,不仅去除了 *gag*、*pol*、*env* 等结构基因,而且将 *gag* 基因的翻译起始密码子 ATG 变成终止子 TAG,将 5' 端 *MoMLV* 基因序列用相应的小鼠肉瘤病毒 *MoMSV* 基因序列所取代,进一步降低了同源重组的概率,使逆转录病毒载体介导的基因转移隐患大大降低,具有较高的安全性<sup>[10]</sup>。

## 参考文献:

- [1] Miyata K, Omori N, Uchino H, *et al.* Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia [J]. *Neuroscience*, 2001, 105(3): 571.
- [2] Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia[J]. *Pain*, 2002, 100(1-2): 171.
- [3] Hirschberg D L, Moalem G, He J, *et al.* Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma [J]. *J Neuroimmunol*, 1998, 89(1~2): 88.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory, 1989. 53~87.
- [5] Sorentino B P, McDonagh K T, Woods D, *et al.* Expression of retroviral vectors containing the human multidrug resistance -1 cDNA in hematopoietic cells of transplanted mice [J]. *Blood*, 1995, 86(2): 491.
- [6] 高文谦,裴雪涛,王立生,等. 逆转录病毒载体介导的人多药耐药基因 (*mdr-1*) 导入小鼠造血细胞的实验研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 1998, 14(2): 113.
- [7] Maisonpierre P C, Le Beau M M, Espinosa R, *et al.* Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localization [J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 558.
- [8] Cheng Y, Gidday J M, Yan Q, *et al.* Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1997, 41(4): 521.
- [9] Kramer R Y, Zhang J, Gehrman R, *et al.* Gene transfer through the blood-nerve barrier: nerve growth factor engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 1162.
- [10] Miller A D, Resman G J. Improved retroviral vectors for genetransfer and expression [J]. *Biotechniques*, 1989, 7(9): 980.

(编辑 张敏瑞)