

三七皂苷对小鼠脾细胞抗瘤活性影响

宾 利* 简志瀚

(病理生理学教研室)

提 要 用 ^{51}Cr 释放试验研究三七皂苷诱导的小鼠脾细胞的抗瘤活性,发现在有ConA/PHA同时存在时,诱导的细胞具有较强的抗瘤作用。进一步的实验表明,三七皂苷对脾细胞的增殖没有刺激作用,但能改变脾细胞内cAMP的含量。

关键词 三七皂苷 植物凝集素 刀豆素A 脾细胞 肿瘤 环核苷酸

三七[Panax notoginseng(Burk)F.H.Chen],又名田七,人参三七,具有止血、散瘀、消肿及定痛的作用。近年来还发现其具有补益气血的作用^[1],但其对免疫功能的影响报道较少^[2],对抗瘤的作用未见报道。作者就三七皂苷(PNS)诱导的小鼠脾细胞的抗瘤作用和其可能机理进行了探讨。

材 料 和 方 法

动物和瘤株 DBA/2小鼠10~16周龄。P815细胞株来源于DBA/2小鼠肥大细胞瘤。

脾细胞悬液制备 将小鼠脾脏无菌取出,加少许Hank's液,捣碎、研匀,尼龙滤血网过滤,1000rpm离心10分钟,取沉淀加入蒸馏水,10秒钟后加入10倍Hank's液,1000rpm离心10分钟,Hank's液洗1次,用培养液调成所需浓度。

细胞诱导 将20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刀豆素A(ConA)、3%植物凝集素(PHA)、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PNS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 三七皂苷Rg₁/Rb₁、或ConA/PHA与PNS、Rg₁或Rb₁的混合液,分别与 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 小鼠脾细胞共同培养72小时得效应细胞。

^{51}Cr 释放试验 P815细胞株 $1 \sim 2 \times 10^6$,体积约0.5ml,加入国产 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 100 μCi 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时,每15分钟振荡1次,Hank's液洗4次,调至 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 备用。将上述诱导的效应细胞0.1ml及标记的靶细胞0.1ml加入96

孔培养板,效应细胞与靶细胞之比为20:1。最大释放组加入10% TritonX-100 0.1ml,18小时后,取上清0.1ml测cpm。按以下公式计算细胞毒性%。

细胞毒性% =

$$\frac{\text{实验组上清cpm} - \text{自然释放组上清cpm}}{\text{最大释放组上清cpm} - \text{自然释放组上清cpm}} \times 100\%$$

脾细胞增殖反应 小鼠脾细胞 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 0.1ml加入96孔培养板,分别加入ConA20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,PHA3%,PNS150 $\mu\text{g}/\text{ml}$,或ConA/PHA与PNS的混合液0.1ml,置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养72小时,收获前10小时,加入 ^3H -TdR1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$ 。纸片闪烁液测cpm。计算刺激指数(SI)。

$$\text{SI} = \frac{\text{实验组cpm}}{\text{对照组cpm}}$$

cAMP含量测定 诱导后的效应细胞置于4 $^{\circ}\text{C}$,用预冷生理盐水洗3次,调成适当浓度,置-40 $^{\circ}\text{C}$ 半小时,然后煮沸5分钟,3500rpm离心10分钟,取上清用蛋白竞争结合法,按中国原子能研究所提供的药盒说明书测cAMP量。

实 验 结 果

三七皂苷诱导的脾细胞的抗瘤活性

1. 三七皂苷诱导的小鼠DBA/2小鼠脾细胞的抗瘤活性 单纯DNS不能提高DBA/2小鼠脾细胞的杀伤活性,其对P815细胞的细胞毒性%为 3.65 ± 3.72 ,与对照 4.73 ± 6.97 相比,统

* 硕士,现在广东省老年医学研究所

计学上差异无显著性, $P > 0.05$ 。但 ConA + PNS 与 PHA + PNS 组分别为 23.57 ± 13.66 与 28.17 ± 23.66 , 与对照组、ConA 及 PHA 组相比有明显增高, 且差异在统计学上有显著性, $P < 0.05$ (表 1)。

2. 三七皂苷 Rg_1 、 Rb_1 诱导的 DBA/2 小鼠脾细胞的抗瘤活性 PNS 单体 Rg_1 和 Rb_1 本身诱导的 DBA/2 小鼠脾细胞, 对 P815 细胞不具有更高的杀伤活性, 其细胞毒性%分别为 10.87 ± 6.25 及 7.93 ± 3.35 , 与正常对照 8.08 ± 4.88 相比, 差异无显著性。但 Rg_1 与 PHA 合用后可提高至 22.73 ± 11.66 与对照组、PHA 组及与 Rg_1 组相比, 在统计学上差异有显著性, $P < 0.05$ 。 Rb_1 与 ConA 合用后, 也能提高杀伤

活性至 17.95 ± 10.73 , 与对照组和 Rb_1 组相比升高具有统计学意义, $P < 0.05$ (表 2)。

因此, 在有植物血凝素 ConA 或 PHA 存在时, PNS 及其单体 Rg_1 、 Rb_1 能提高小鼠脾细胞的溶瘤作用。

三七皂苷对小鼠脾细胞增殖的影响 结果表明: PNS 本身不具有刺激小鼠脾细胞增殖的能力, 也不增加 ConA 和 PHA 对小鼠脾细胞的增殖作用。PNS 对 DBA/2 小鼠脾细胞的 SI 为 0.97 ± 0.22 , 与对照比 $P > 0.05$, 即差异不具有显著性。ConA + PNS 与 PHA + PNS 刺激的 SI 分别为 3.98 ± 1.83 , 2.25 ± 1.48 , 与 ConA 或 PHA 组相比, $P > 0.05$, 即差异不具有显著性 (表 3)。

表 1 三七皂苷等诱导的 DBA/2 小鼠细胞的抗瘤活性

对 P815 细胞的细胞毒性 (%)						
	对照	ConA	PHA	PNS	ConA + PNS*	PHA + PNS**
$\bar{x}$	4.73	12.58	12.52	3.65	23.57	28.17
SD	6.97	13.29	13.34	3.72	13.66	23.66

* ConA + PNS 组与对照组、ConA 组、PNS 组比较, $P < 0.05$

** PHA + PNS 组与对照组、PHA 组、PNS 组比较, $P < 0.05$

n = 6

表 2 三七皂苷 Rg_1 、 Rb_1 等诱导的 DBA/2 小鼠脾细胞的抗瘤活性

对 P815 细胞的细胞毒性 (%)									
	对照	ConA	PHA	Rg_1	Rb_1	ConA + Rg_1	PHA + Rg_1 *	ConA + Rb_1 **	PHA + Rb_1
$\bar{x}$	8.08	10.48	12.03	10.87	7.93	7.70	22.73	17.95	10.38
SD	4.88	7.99	8.74	6.25	3.35	9.58	11.66	10.73	7.28

* PHA + Rg_1 组与对照组、 Rg_1 组、PHA 组比较, $P < 0.05$

** ConA + Rb_1 组与对照组、 Rb_1 组比较, $P < 0.05$

n = 6

三七皂苷对小鼠脾细胞内 cAMP 含量的影响 在加入 PNS、ConA + PNS 或 PHA + PNS 30 分钟后, 脾细胞内 cAMP 升高, 其 cAMP 含量 (PM/ 5×10^6 细胞) 分别为 3.98 ± 2.79 , 5.32 ± 3.78 , 3.90 ± 1.27 , 与对照 1.42 ± 0.34

相比, 差异有显著性, $P < 0.05$ 。加入 PNS 后 1 小时, 脾细胞内 cAMP 仍继续升高, cAMP 含量为 5.72 ± 5.17 , 与对照 3.51 ± 3.38 相比, $P > 0.05$, 即差异无显著性, 与 ConA + PNS 或 PHA + PNS 组比, $P < 0.05$, 差异有显著

表 3

ConA、pHA、三七皂苷对脾细胞刺激指数的影响

	刺 激 指 数					
	对照	ConA	PHA	PNS	ConA + PNS	PHA + PNS
$\bar{x}$	1	4.84*	2.55*	0.97	3.98*	2.25*
SD	0	2.00	1.18	0.22	1.83	1.48

*与对照组比较, $P < 0.05$ $n = 9$

性。而 ConA + PNS 或 PHA + PNS 作用组脾细胞内 cAMP 含量开始下降, 分别为 2.76 ± 2.90 , 2.77 ± 2.72 (表 4)。

表 4 三七皂苷对小鼠脾细胞内 cAMP 含量的影响

	cAMP 含量 (PM/5 × 10 ⁶ 细胞)	
	30分钟	1小时
对 照	1.42 ± 0.34	3.51 ± 3.38
PNS	$3.98 \pm 2.79^*$	$5.72 \pm 5.17^{**}$
ConA + PNS	$5.32 \pm 3.78^*$	2.76 ± 2.90
PHA + PNS	$3.90 \pm 1.27^*$	2.77 ± 2.73

* 与对照组比较, $P < 0.05$ ** 与 ConA + PNS 组, PHA + PNS 组比较 $P < 0.05$ 30分钟组 $n = 6$, 1小时组 $n = 12$

讨 论

实验结果提示, 三七皂甙在与 ConA 或 PHA 同时存在时, 能增强小鼠脾细胞的抗瘤活性。由于三七的化学成分与人参相似^[3], 而人参抗瘤的主要成分有人参皂甙 Rb₁、Rb₂、Rc、Rc、Rg₁及 Rh₁^[4], 为此我们进一步用三七皂甙 Rg₁、Rb₁诱导小鼠脾细胞进行实验, 结果发现, Rg₁ 与 Rb₁ 具有不同作用, Rg₁ 在 PHA 存在时, 而 Rb₁ 在 ConA 存在时, 诱导的脾细胞的抗瘤作用强。我们称上述具有较强杀伤瘤细胞活性的细胞为三七诱导的细胞毒性细胞 (notoginseng-induce cytotoxicity cells 简称NICC)。

杨贵贞等^[5,6]报道, 人参皂苷能增强正常小鼠的 T 细胞功能、NK 细胞活性及网状内皮系统的吞噬功能, 促进 E 花环的形成, 提高低剂量抗原的抗体水平及特异性抗原抗体的效

价, 因此人参皂苷具有激活多种免疫细胞的功能。我们实验中所用小鼠脾细胞, 其主要为淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞, 实验中表现出的具有杀伤活性的 NICC 属于哪一细胞群, 或是不同细胞的共同作用, 或诱导出的细胞是一新的杀伤细胞, 有待进一步证明。

PNS对小鼠脾细胞的作用尚未有报道, 我们通过对 PNS 影响脾细胞增殖反应和细胞内 cAMP 含量的研究, 对 PNS 作用机理进行了初步研究。结果表明 PNS 本身不刺激小鼠脾细胞增殖, 也不增加 ConA 或 PHA引起的脾细胞的增殖。在有ConA 或 PHA 存在时, 能增加单个细胞的活性。因此我们推测, PNS可能是增加激活的免疫细胞的杀伤能力, 从而提高细胞的抗瘤活性, 而不通过刺激免疫细胞, 引起杀伤细胞数量的增多。Rg₁ 与 Rb₁ 需与不同的植物血凝素合用, 可能与它们作用于细胞的机理有关。

三七皂苷对小鼠脾细胞内 cAMP 含量的影响表现为加药后半小时内细胞内 cAMP 含量就较对照为高, 以后继续上升, 1小时时更高; 而与 ConA 或 PHA 合用后, 加药半小时时细胞内 cAMP 含量较对照高, 以后下降, 到1小时已低于对照, 其变化类似 PHA 或 ConA 引起的淋巴细胞内 cAMP 变化^[7,8], 但下降更迅速且快, PHA在6小时以后才降到对照以下, 而 PNS 与 PHA 合用后1小时就降到对照以下。cAMP 的短暂升高, 可增加淋巴细胞对抗原反应的细胞数, 可激活细胞内的许多蛋白激酶, 引起细胞代谢的改变^[9]。而 cAMP 降低可增加细胞毒细胞的溶细胞作用^[10]。因此推测, PNS 对小鼠脾细胞功能起

影响, 可能通过细胞内 cAMP 含量的变化, 从而达到与PHA 或 ConA 的协同作用, 提高细胞的杀伤能力。

参 考 文 献

- [1] 马逢昇. 对三七性能功效中一些问题的探讨. 云南中医学院学报 1985; 8(4):25.
- [2] 郝朝庆. 三七总皂苷能提高小鼠免疫功能. 中成药研究 1986; (8):31.
- [3] 匡海学. 人参三七药化、药理的研究进展. 国外医学中医中药分册 1982; (6):1.
- [4] 李向高. 人参抗肿瘤作用. 中成药研究 1982; (11):1.
- [5] 杨贵贞, 等. 人参皂苷对体内外免疫调整作用的初步研究. 白求恩医科大学学报 1983; (3):1.
- [6] 于永利. 吉林人参总皂苷对NK-IFN-IL₂调节网的作用及其抑瘤效应. 中国免疫学杂志 1987; 3(1):41.
- [7] Strom T B, et al. The role of cyclic nucleotids in lymphocyte activation and function In: Schwartz R S. Progress in clinical immunology. Vol 3. New York: Grune and Stratton. 1977:115~153.
- [8] Smith J W, et al. Cyclic adenosine 3', 8'-monophosphate in human lymphocytes alterations after PHA stimulation. J Clin Invest 1971; 50(2):432.
- [9] Kook A T, et al. The control exerted by thymic hormone on cellular cAMP levels and immune reactivity of spleen cells in the MLC assay. J Immunol 1975 115(1):8.
- [10] Strom T B, et al. Modulation of cytotoxic T lymphocyte by cAMP. In: Braun W, et al. Cyclic AMP, cell growth and the immune response. New York: Springer-Verlag Berlin 1974:209.

EFFECT OF PANAX NOTOGINSENG SAPONINS ON MURINE SPLENOCYTES AGAINST TUMOR

Bin Li Jian Zhihan

(Department of Pathophysiology)

In these studies notoginseng-induced cytotoxicity cells (NICC) were generated in vitro culture of murine splenocytes in Panax notoginseng saponins (PNS) or Rg₁ or Rb₁ and ConA or PHA. NICC were compared with the three other in vitro cytotoxicity reactions using P815 cell targets in a 18-hours chromium-51-release assay: lymphokine-activated killer cells (LAK cells), PHA-activated killer cells (PAK cells), and ConA-activated killer cells (CAK cells). The rate of target cell damage due to NICC was significantly more than due to LAK cells, PAK cells, or CAK cells. PNS did not effect on the transformation and PHA-induced or ConA-induced transformation of splenocytes. These suggest that PNS could increase the cytotoxicity of activated splenocytes and have no activating effect in vitro.

The effect of PNS or the combinations of PHA or ConA and PNS on cAMP levels were investigated in murine splenocytes. The responsiveness of splenocyte cAMP to PNS and the combination were increased after adding them 30 minutes. But one hour later PNS stimulating cAMP was still significantly increase, whereas the combinations stimulating splenocyte cAMP began to decrease. This results indicate that PNS influences the regulation of splenocyte cAMP and that this effect may be responsible for PNS increasing cytotoxicity of splenocytes.

Key words Panax notoginseng saponins PHA ConA Splenocyte Neoplasm cAMP