

貳单体 I 的抗氧化损伤作用.

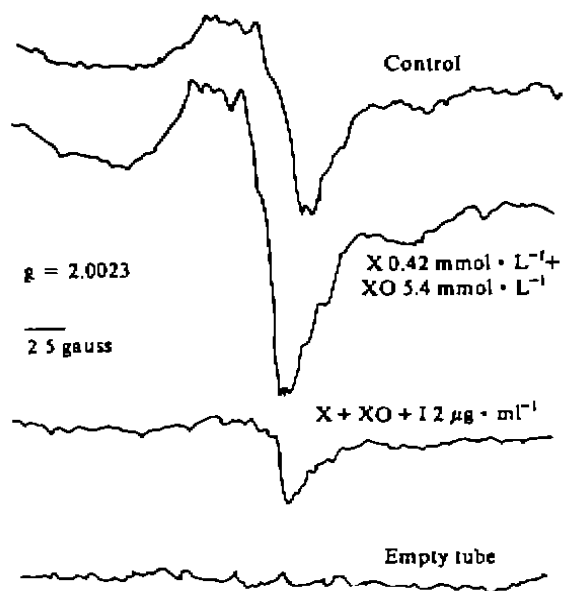


Fig 4. Electron spin resonance spectra of cultured myocardiocytes. 1st curve: Control. 2nd curve: Adding X and XO into culture medium. 3rd curve: Adding I with X-XO. $g = g$ factor. Magnetic field 2.5 Gs.

REFERENCES

- 1 Yu LP, Cheng ZQ, Jiang MT. Influence of soyasaponins on the synthesis of DNA by carcinoma cells. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1990; 16 Suppl 1 : 86.
- 2 Gao GG, Li Zy, Chen YG, Liu YX. The effect of soyasaponin on hyperlipidemia rabbits induced by Adeps Suillus and on the endurance to anoxia in mice under normal pressure. *Bull Chin Mater Med* 1984; 9 : 184-5.
- 3 Zhan H, Shen JM, Jiang GR. Proceedings of antiooxidative action of Chinese traditional drugs. *China J Chin Mater Med* 1990; 15 : 630-3.
- 4 Tanu T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S, Kitagawa I. Histochemistry. V. Soyasaponin in soybeans (*Glycine max* Merrill, seeds). *Chem Pharm Bull* 1985; 33 : 3829-33.
- 5 Zhang WJ, Zhong GG, Zhou AH, Jiang Y, An ZY, Ma XY. Influence of soyasaponins on the spontaneous contractility and action potential. *J Norman Bethune Univ Med Sci* 1992; 18 : 518-20.
- 6 Schanne OF. Factors involved in the loss of spontaneous contractile and electrical activity in clusters of cultured cardiac cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1972; 50 : 523-32.
- 7 Schwarz W, Passow H. Ca^{2+} -activated K^{+} channels in erythrocytes and excitable cells. *Annu Rev Physiol* 1983; 45 : 359-74.
- 8 Thompson JA. The oxygen free radical system; a fundamental mechanism in the production of myocardium necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986; 28 : 449-62.

273-276

苜蓿多糖 免疫佐剂

苜蓿多糖的免疫增强效应

赵武迷, 张玉琴, 任丽娟¹, 张岚¹, 杨健¹

(中日友好临床医学研究所免疫学研究室, ¹ 药物药理学研究室, 北京 100029, 中国)

R967

273-276

Immunopotentiating effects of polysaccharides isolated from *Medicago sativa* L

ZHAO Wu-Shu, ZHANG Yu-Qin, REN Li-Juan¹, ZHANG Lan¹, YANG Jian¹

(Department of Immunology, ¹ Department of Materia Medica and Pharmacology, China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China)

ABSTRACT *In vitro* experiments showed that 250-500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of the polysaccharides isolated from *Medicago sativa* L (MSP) increased mouse lymphocyte uptake of [³H]thymidine (TdR) induced by PHA-p (0.15%), Con A (5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), LPS (20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), and PWM (2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) at maximum by 5.13 ± 0.81, 0.75 ± 0.08, 4.52 ± 0.36, and 0.86 ± 0.24 folds, respectively. After MSP ip for 5 d, the average count of mouse splenic lymphocytes in 125 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ group increased from 1.4 ± 0.4 ($\times 10^7$)/mouse to 3.6

Received 1989-12-09

Accepted 1992-10-20

±0.5 (×10⁷)/mouse; in 250 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ dose group increased to 13.5 ± 0.3 (×10⁷). MSP 125 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ or 250 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ ip for 5 d partially or completely antagonized the effect of cyclophosphamide (200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 1 d) on lymphocyte decrease, the average number of lymphocytes/mouse recovered from 1.04 ± 0.23 (×10⁷) to 2.1 ± 0.4 (×10⁷) and 2.9 ± 0.6 (×10⁷), respectively. In addition, the lymphocyte reactivity to Con A in MSP ip 125 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 5 d group enhanced by 60%, in 250 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 5 d group by 156%. The abilities of PWM-induced antibody production were elevated 51% and 78%, respectively.

KEY WORDS *Medicago sativa*; polysaccharides; immunologic adjuvants

摘要 苜蓿多糖(MSP)体外增强 PHA, Con A, LPS 和 PWM 诱导的淋巴细胞增殖反应. MSP 125 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 和 250 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ ip 5 d 后, 脾淋巴指数和淋巴细胞数显著提高. 后者由 1.4 ± 0.4 (×10⁷) 分别增加到 3.6 ± 0.5 (×10⁷) 和 13.5 ± 0.3 (×10⁷). 上述二剂量组小鼠淋巴细胞对 Con A (5 μg · ml⁻¹) 反应分别提高 60% 和 156%; 对 PWM (1 μg · ml⁻¹) 诱导的抗体产生分别提高 51% 和 78%. ip MSP 还可部分拮抗环磷酰胺降低淋巴细胞作用.

关键词 苜蓿; 多糖; 免疫佐剂

多糖是一类被活跃研究的生物反应调节剂, 迄今报道有免疫活性的多糖为数不少, 用于临床的不过香菇、溶链菌、云芝、茯苓和猪苓等多糖, 究其应用不多的原因, 不外临床效果不佳和毒性. 后者是细菌微生物多糖受限的主要原因; 而植物多糖多无毒性而受到重视. 紫苜蓿为豆科植物, 有清热解毒、治黄疸、尿路结石和夜盲症等功效. 近年来发现紫苜蓿皂甙用于治疗高胆固醇有效⁽¹⁾. 苜蓿多糖是从紫苜蓿中提取的植物多糖, 有关研究尚未见报道. 本实验研究该多糖对免疫细胞及其功能的影响, 为临床应用提供实验依据.

MATERIALS AND METHODS

苜蓿多糖 紫苜蓿 (*Medicago sativa* L) 采自河北省任丘县, 自其根提取多糖. 经茚三酮法检查, 苜蓿多

糖(MSP)不含蛋白质. 以半乳糖醛酸为标准, 测得多糖含量 99.7%. 该多糖 FeCl₃ 反应阴性, 碘试验呈棕色, 爱尔辛兰试验呈兰色, 说明其不含鞣质和淀粉, 为酸性多糖. 三氯醋酸水解, 薄层层析检查, 含葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和另一种未知单糖, 含量之比未测. 超滤法检查 MSP 分子量在 2-6 万.

小鼠分组 C₅₇BL/6 小鼠, ♂, 6 wk, 体重 20 ± 1 g, 购自中国预防医学科学院流行病学研究所动物中心. BALB/c 小鼠, ♀, 6 wk, 体重 20 ± 1 g, 本所动物室供给.

将小鼠随机分组, I 组 ip 生理盐水, II, III, IV 组分别 ip MSP 125, 250, 500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 5 d. 解剖、摘脾称重, 制备分离淋巴细胞并检测其免疫活性.

环磷酰胺(cyclophosphamide, Cyc, 上海十二制药厂)处理的小鼠在分组前 im Cyc 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 1 d 或 × 2 d, 次日分组, 按上述 II 和 III 组 ip MSP.

淋巴细胞制备 小鼠脾脏制成单细胞悬液, 经 Ficoll 密度梯度离心, 收集界面层淋巴细胞, 洗净后计数并悬浮于含 5% FCS 的 RPMI-1640 培养液中备用.

对外源凝集素反应的促进作用⁽²⁾ 用 [³H]TdR 参入法测定. 淋巴细胞浓度 2 × 10⁶ · ml⁻¹; MSP 行倍比稀释, 浓度从 30 到 500 μg · ml⁻¹. 在 96 孔培养板上, 每个多糖浓度和对照各占 3 个孔. 外源凝集素固定在最适浓度: PHA-p (Difco) 0.15%, Con A (Sigma) 5 μg · ml⁻¹, LPS (北京生物制品所) 20 μg · ml⁻¹ 和 PWM (Sigma) 2 μg · ml⁻¹. 在 37°C 5% CO₂ 条件下刺激 48 h, 最后 6 h 每孔加 [³H]TdR 18.5 kBq, 测定各孔参入的 dpm.

MSP 体内增强免疫功能的效应 小鼠分组用生理盐水或多糖处理后, 按上述方法检查各组小鼠脾淋巴细胞对外源凝集素的反应能力. 与体外法不同的是培养细胞时不加 MSP.

MSP 对机体产生抗体能力的影响^(3,4) ip 生理盐水或 MSP 的小鼠, 分组制备胸脾淋巴细胞, 悬浮于含 2% FCS RPMI-1640 的培养液中, 细胞浓度 5 × 10⁶ · ml⁻¹, 加 PWM 1 μg · ml⁻¹, 在 37°C 5% CO₂ 条件下培养 6 d, 收集上清液测定淋巴细胞分泌的 IgG.

IgG 的测定 双抗体夹心 ELISA 法测定. 羊抗小鼠 IgG 抗血清 1:32, 购自军事医学科学院流行病学研究所, 包被浓度 1:1500. 底物 OPD. 羊抗小鼠 IgG 抗体结合物 HRP (Sigma) 使用浓度 1:3000, 在 MTP-

32 (Corona Electric Co, Japan)酶标仪上测定, λ (测量)=495 nm, λ (参照)=630 nm.

RESULTS

MSP 提高小鼠的脾指数并使脾淋巴细胞增多 连续 ip MSP 5 d, 无论是正常小鼠, 还是 Cyc 处理过的小鼠, 与对照组相比, 均有显著变化. 正常对照小鼠 ($n=5$) 脾占体重的 $0.42 \pm 0.06\%$; $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 组小鼠 ($n=5$) 为 $0.95 \pm 0.10\%$; ip MSP $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 组 ($n=5$) 为 $1.18 \pm 0.08\%$. 与对照组相比, 二实验组均 $P < 0.01$. 对照组的脾淋巴细胞为 $1.4 \pm 0.5 (\times 10^7)$; 二实验组的分别为 $3.6 \pm 0.5 (\times 10^7)$ 和 $13.5 \pm 3.0 (\times 10^7)$. 与对照组相比 P 值分别 < 0.05 和 < 0.01 .

Cyc im $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 2 \text{ d}$, MSP 仍可使淋巴细胞数量部分或全部恢复. 各组均 12 只小鼠, 实验结果显示, 未经 Cyc 处理的空白对照组, 小鼠脾淋巴细胞为 $2.9 \pm 0.6 (\times 10^7)$; Cyc 处理过不给多糖的对照组为 $1.04 \pm 0.23 (\times 10^7)$, Cyc 处理使脾淋巴细胞明显减少, 二组相比 $P < 0.01$. Cyc 处理后给 MSP, Cyc + $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组的脾淋巴细胞数为 $2.1 \pm 0.4 (\times 10^7)$, Cyc + $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组为 $2.9 \pm 0.6 (\times 10^7)$, 与空白对照组几乎没有差异; 比 Cyc 对照组显著增高, P 值分别 < 0.05 和 < 0.01 .

MSP 对外源凝集素反应的促进作用

MSP 体外增强正常小鼠脾淋巴细胞对 PHA, Con A, LPS 和 PWM 诱导的有丝分裂反应, 前三者的结果如 Tab 1 所示.

MSP 增强 PWM 诱导的有丝分裂反应结果如下: 不加多糖的对照为 $20\ 662 \pm 95 \text{ dpm}$, MSP $31 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时 $30\ 662 \pm 30 \text{ dpm}$, MSP $62 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时 $37\ 424 \pm 5149 \text{ dpm}$, 达到高峰, 以后随多糖剂量缓慢下降, 多糖 $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时 $31\ 175 \pm 1142 \text{ dpm}$, 与对照相比 $P < 0.01$.

MSP 对机体免疫功能的刺激作用

ip MSP 后, 小鼠脾淋巴细胞的免疫活性提高, Tab 2 表示增强 PHA 和 Con A 诱导的淋转结

Tab 1. *In vitro* potentiating effect of *Medicago sativa* L polysaccharides (MSP) on lectin-induced lymphoblasts. 2×10^5 BALB/c mouse lymphocytes in 0.2 ml medium were stimulated by PHA-p, Con A or LPS with or without MSP for 42 h and subsequently were incorporated with [^3H]thymidine 18.5 kBq for 6 h. The incorporation was measured via liquid scintillation. $n=4$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control.**

MSP/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	[^3H]Thymidine uptake/dpm		
	PHA-p/ 0.15%	Con A/ $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	LPS/ $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
0	6407 \pm 523	132032 \pm 4448	19802 \pm 3332
31	13763 \pm 3917*	168233 \pm 2938**	78465 \pm 10163***
62	18662 \pm 4252**	159085 \pm 3132***	78558 \pm 12017***
125	26876 \pm 4677**	183177 \pm 2158***	90663 \pm 2630***
250	39278 \pm 5207***	189923 \pm 14523**	109342 \pm 7203***
500	38393 \pm 267**	230390 \pm 9857***	104083 \pm 10503***

果. Cyc 降低机体淋巴细胞对 LPS 的反应, 如果 Cyc 处理后 ip MSP, 可以拮抗 Cyc 的抑制作用, 使 LPS 反应恢复正常, 见 Fig 1.

Tab 2. Effect of ip *Medicago sativa* L polysaccharides (MSP) on mouse lymphocyte transformation induced by PHA and Con A. Mice were randomly divided into 3 groups: ip MSP 0, 125, and $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$, respectively. The lymphoblast was determined as described in Tab 1. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control.**

Lectin	Lymphoblast incorporated [^3H]TdR/dpm		
	Control group	125 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	250 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
Con A/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($n=8$)			
0	4455 \pm 248	4890 \pm 417*	6568 \pm 497**
5	24916 \pm 10890	58153 \pm 8085*	64130 \pm 2025*
10	90645 \pm 11237	145508 \pm 5668***	213248 \pm 4698***
PHA-p/% ($n=6$)			
0	3310 \pm 280	4675 \pm 327***	4282 \pm 907*
0.075	7745 \pm 350	16460 \pm 905***	43863 \pm 5003***
0.150	14405 \pm 1070	21389 \pm 843**	52590 \pm 908***
0.300	21948 \pm 478	23477 \pm 4643*	57768 \pm 3612***

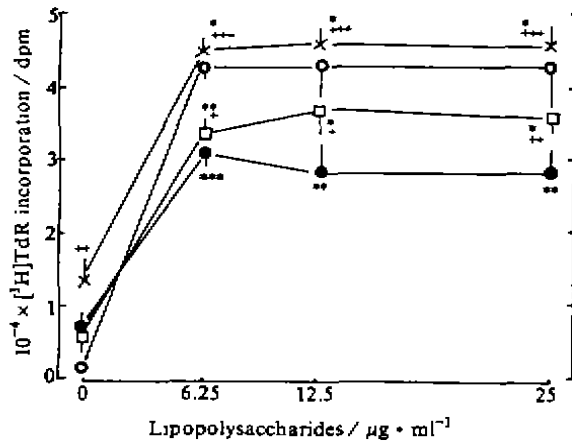


Fig 1. Antagonistic effect of *Medicago sativa* L polysaccharides (MSP) against the inhibition of cyclophosphamide (Cyc) to LPS-stimulated blast. $n=6$. $\bar{x} \pm s$. Normal mice (○), Cyc-treated mice (●). Cyc-treated mice were ip MSP 125 (×) and 250 (□) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs (●) group.

此外, ip MSP 能提高机体淋巴细胞产生抗体的能力. PWM 诱导的 IgG 测定结果: 对照组 ($n=8$) $4250 \pm 414 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$; 125 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 多糖组 ($n=8$) 为 $6430 \pm 598 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$; 250 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 多糖组 ($n=8$) 为 $7580 \pm 812 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 二实验组分别提高 51% 和 78%. 与对照组相比 P 值分别 < 0.05 和 < 0.01 .

DISCUSSION

MSP 刺激小鼠脾指数和脾淋巴细胞增多, 在 5 批实验中, 虽然批间有差异, 但趋势一致. 在体外, MSP 可以相当明显地刺激 PHA、Con A、LPS 和 PWM 诱导的有丝分裂反应, 多糖浓度 $31-62 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 就有统计学意义. ip MSP 提高机体对 PHA 和 Con A 的反应, 多糖剂量以 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 左右为宜; 剂量为 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 时, 小鼠脾指数和脾淋巴细

胞数目, 略低于 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 剂量组, 对 PHA、Con A 等的反应比低剂量组降低, 说明剂量过高过低都不适宜, 这是免疫增强剂的特点.

ip MPS 能部分或全部地恢复 Cyc 处理机体对 LPS 反应能力的降低. 但在 5 批实验中有一批, Cyc 处理后 ip MSP 体重略有减轻, 脾淋巴细胞对 LPS 的反应能力亦没有明显恢复, 原因不明.

淋巴细胞在有丝分裂原作用下, 从静止进入分裂状态, 在 S 期合成 DNA, $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入高峰时间因有丝分裂原而异. PHA 刺激的 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入在 48-72 h 最高, 此期间在显微镜下观察, 发现淋巴细胞体积增大、胞浆增多、核质致密及细胞生长旺盛, 呈母细胞化相. 若小鼠 ip MSP $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$ 或 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 5 \text{ d}$, 在相同的刺激和培养条件下, 尽管在镜下观察仍发现期间淋巴细胞转化明显, 但 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入高峰提前, 参入的 dpm 值 20 h 时高于 48 h, 更高于 72 h 的 dpm 值, 与正常小鼠的实验结果明显不同, 说明 ip MSP 后, 淋巴细胞的 S 期缩短或提前. 这提示 MSP 有缩短细胞周期的作用.

REFERENCES

- Malnow MR, McLaughlin P, Kohler GO, Livingston AL. Prevention of elevated cholesterolemia in monkeys by *Medicago sativa* saponins. *Steroids* 1977; 29: 105-10.
- Stoecker CA, Rickard BM, Abel CA. Effect of T- and B-lymphocyte mitogens on interactions between lymphocytes and macrophages. *Cell Immunol* 1978; 35: 362-77.
- Fauci AS, Whalen G, Burch C. Activation of human B lymphocytes. XVI Cellular requirements interactions, and immunoregulation of pokeweed mitogen-induced total-immunoglobulin producing plaque-forming cells in peripheral blood. *Cell Immunol* 1980; 54: 230-40.
- Lane HC, Volkman DJ, Whalen G, Fauci AS. *In vitro* antigen-induced, antigen-specific antibody production in man: specific and polyclonal components, kinetics, and cellular requirements. *J Exp Med* 1981; 154: 1043-57.