Chin J Integ Trad West Med 1987; **7** : 736—7.

4 Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N Engl J Med* 1974; **291** : 1207—11.

5 Da WM, Liu Y, Wei SN. Studies on sensitivity of human GM-CFU and L-CFU to hyperthermic killing *in vitro*. *Leuk Res* 1989; **13** : 217—20.

6 Ball ED. *In vitro* purging of bone marrow for autologous marrow transplantation in acute myelogenous leukemia using myeloid-specific monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant* 1988; **3** : 387—92.

7 Xu CX, Lin L, Huang YY, Liu HY, Wang XR, Wang YX, *et al*. Purge of malignant cells from bone marrow by hematoporphyrin derivatives and light exposure *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 1990; **11** : 72—5.

8 Lu ZH, Yang YC, Shen SY, Chu JX. Study on the killing effect of psoralen plus ultraviolet irradiation on L615 mice leukemic cells. *Chin J Hematol* 1991; **12** : 637—9.

BIBLID : ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1993 Nov; **14** Suppl : S30—S33

商陆多糖 I 对小鼠脾细胞体外产生集落刺激因子的影响[1]

王洪斌, 郑钦岳, 陈海生[2] (第二军医大学药学院药理教研室, [2]植化教研室, 上海200433, 中国)

Effect of *Phytolacca acinosa* polysaccharides I on production of colony-stimulating factors of mouse splenocytes *in vitro*

WANG Hong-Bin, ZHENG Qin-Yue, CHEN Hai-Sheng[2]

(*Department of Pharmacology*, [2]*Department of Phytochemistry*, *College of Pharmacy*, *Second Military Medical University*, *Shanghai 200433*, *China*)

ABSTRACT *Phytolacca acinose* polysaccharides I (PAP-I), M_r=10 000, activated mouse splenocytes to produce colony-stimulating factors (CSF) *in vitro*. The level of CSF was tested by [^{3}H]TdR uptaken by bone marrow cells and rmGM-CSF was used as standard. PAP-I (10—500 μg·ml^{-1}) increased CSF production of the splenocytes treated with or without concanavalin A. When the concentration of PAP-I was 100 μg·ml^{-1}, the level of CSF was about equivalent to that of rmGM-CSF 11.8±1.8 ng·ml^{-1}. After a 3-d incubation of PAP-I with the splenocytes, CSF was assayed. The longer the incubation, the higher were the CSF concentrations. The CSF type in supernants of splenocytes induced by PAP-I was determined by IL-3 McAb, GM-CSF McAb, and M-CSF PcAb. The type of CSF was found to be interleukin-3.

KEY WORDS *Phytolacca acinosa*; polysaccharides; concanavalin A; colony-stimulating factors; interleukin-3; spleen

摘要 以 rmGM-CSF 作标准品, [^{3}H]TdR 骨髓细胞参入法定量检测 PAP-I 刺激小鼠脾细胞产生 CSF, 表明 PAP-I 10—500 μg·ml^{-1}显著促进脾细胞和 Con A 诱导的脾细胞产生 CSF. PAP-I 100 μg·ml^{-1}可刺激产生相当于 rmGM-CSF 11.8±1.8 ng·ml^{-1}的 CSF. PAP-I 与脾细胞培养前48 h 无 CSF 检出, 随着培养时间延长, CSF 含量越来越高. 经 CSF 的特异性抗体吸收实验证明 PAP-I 刺激产生的 CSF 为 IL-3.

关键词 商陆; 多糖; 刀豆球蛋白 A; 集落刺激因子; 白细胞介素3; 脾

Received 1991-07-01 Accepted 1993-01-10

[1] Project supported by the Science Foundation of the General Logistics Department of the PLA, № 26-071-176.

多糖的辐射防护作用可能与其促进造血过程、激活网状内皮系统、增强吞噬细胞活性、刺激淋巴组织、增强机体免疫功能有关[1]. 集落刺激因子(colony-stimulating factors, CSF)是一类促进造血祖细胞增殖、分化、成熟及存活的糖蛋白, 在造血功能调控中占有重要地位[2]. 商陆多糖-I (PAP-I) 是从中国

商陆科植物商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb)的药用块根水提液分离出来的一种酸性杂多糖，经醋酸纤维薄膜电泳和凝胶层析证实为均一组份，内含半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖成份，其分子比为1:0.18:0.32:0.16，分子质量为10 kDa. PAP-I 可显著增强 MΦ 的杀瘤活性，促进 IL-1产生并作为启动剂促进TNF 的产生[3]. 为了解其作用机制，本文探讨 PAP-I 对小鼠脾细胞诱生 CSF 的影响.

MATERIALS AND METHODS

PAP-I 临用前用培养基溶解，过滤除菌后备用. 刀豆球蛋白 A (concanavalin A，Con A) 为 Sigma 产品. [^{3}H]TdR 为中科院上海原子核研究所产品，放射性活度为 118.4 TBq·mol^{-1}. 重组鼠 GM-CSF (rmGM-CSF) 由 Dr R L Pristidge (New Zealand) 惠赠，鼠 IL-3，GM-CSF 的单克隆抗体由 Dr G Steven (USA) 惠赠，鼠 M-CSF 多克隆抗体由 Dr E R Stanley (USA) 惠赠. 培养液为 RPMI-1640 (Sigma)，每升补充 2-巯基乙醇 0.1 mmol，青霉素 500 IU，链霉素 25 mg，$NaHCO_3$ 2 g.

骨髓细胞的制备 3—5只 BALB c 小鼠，♀♂不拘，20±*s* 1.2 g，8—12 wk，本校动物房提供，无菌操作取其股骨，用培养液冲出全部骨髓，过4号针头成单细胞悬液，计数后备用.

脾细胞的制备 小鼠来源同上，无菌取脾脏，挤压通过不锈钢筛网，离心 (500×*g*，10 min) 弃上清，加入 0.83% NH_4Cl 缓冲液 3 ml，溶解红细胞，洗涤2次，trypan blue 计数后备用.

CSF 的诱生 在 24 孔细胞培养板中每孔加入脾细胞 5×10^6·ml^{-1}和药物 (PAP-I 或 Con A) 各 1 ml，牛血清最终浓度为 10%，培养 1—7 d，取上清液测定或冻存.

CSF 活性测定及含量计算 本实验采用同位素参入法检测 CSF[4]，以 rmGM-CSF 作为标准品，用生物测定法，以每个稀释度 dpm 值计算出曲线下面积 (AUC)[5]，比较标准品及样品的 AUC，以一定浓度 rmGM-CSF 表示药物诱生的 CSF 含量，此表示法优于用某一稀释度 dpm 值来表示 CSF 活性，因为此法可避免每次实验检测条件(细胞浓度、同位素来源等)变化而造成 dpm 值相差较大.

数据处理 定量指标以 $\bar{x}\pm s$ 表示，均数差异的显著性用 *t* 检验法测定.

RESULTS

PAP-I 体外对脾细胞产生 CSF 的影响

PAP-I (10—1000 μg·ml^{-1})和小鼠脾细胞共同培养3 d，发现 PAP-I 可显著促进脾细胞产生 CSF，PAP-I 100 μg·ml^{-1}可刺激产生相当于 rmGM-CSF 11.8±1.8 ng·ml^{-1}的 CSF (Tab 1). Con A 0，1，2.5，5，10，50 μg·ml^{-1}刺激小鼠脾细胞产生 CSF 含量分别相当于 rmGM-CSF 7.7，9.9，11.5，13.3，12.1 和 7.3 ng·ml^{-1}，说明 Con A 刺激 CSF 产生的最佳刺激浓度为5 μg·ml^{-1}. 选择 Con A 1，2.5，5 μg·ml^{-1}和 PAP-I 共同培养3 d，发现 PAP-I 可显著促进 Con A 1，2.5 μg·ml^{-1}诱导的脾细胞产生 CSF，而 Con A 浓度为5 μg·ml^{-1}时，加 PAP-I 与单独 Con A 之间无显著性差异(Tab 1).

Tab 1. Colony stimulating factors (CSF) production (μg·L^{-1}) in supernants of Con A-induced mouse splenocytes treated with *Phytolacca acinosa* polysaccharides I (PAP-I) for 3 d. CSF was measured by radioactivity of [^{3}H]TdR uptaken by bone marrow cells and rmGM-CSF was used as standard. $n=4$ experiments, each experiment pooled from spleens of 3—4 BALB c mice. $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ *vs* control.

PAP-I/ mg·L^{-1}	Concanavalin A/mg·L^{-1} 0	1	2.5	5
0	7.7±0.6	8.7±1.5	8.8±1.9	17.7±3.9
10	10.2±1.7^b	10.7±0.8^a	13.2±0.5^b	14.5±1.5^a
100	11.8±1.8^c	12.5±2.8^a	13.5±0.7^b	21.9±2.9^a
200	10.2±0.7^c	19.4±4.1^c	12.9±2.1^a	19.1±2.6^a
500	10.9±1.5^c	13.6±1.1^c	13.2±1.4^b	20.2±0.5^a
1000	8.4±2.1^a	6.9±5.5^a	12.2±1.6^a	21.5±2.7^a

PAP-I 体外刺激脾细胞产生 CSF 时效关系

PAP-I 和小鼠脾细胞共同培养不同时间，收

集上清液检测 CSF，发现 PAP-I 和脾细胞培养3 d 上清液中开始出现 CSF，并随着培养时间的延长，CSF 含量逐渐升高(Fig 1). Con A 刺激脾细胞产生的 CSF 含量随着时间延长越来越高，至5 d 达峰，以后逐渐下降，PAP-I 合用 Con A 培养至7 d，其刺激产生的 CSF 含量显著地高于单用 Con A 组(Fig 1).

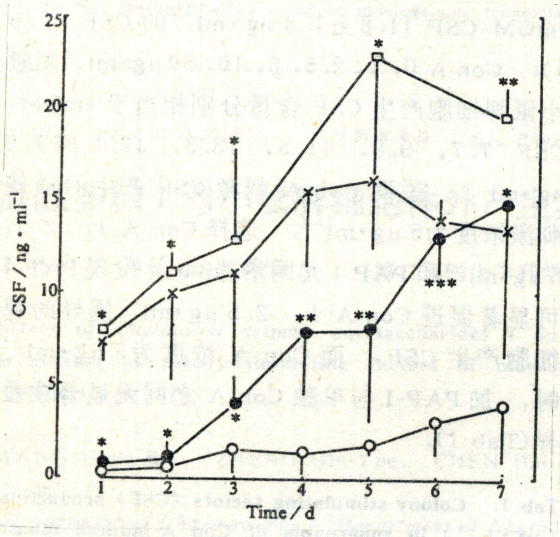

Fig 1. Colony-stimulating factors (CSF) production in supernants of mouse splenocytes treated with saline (○), PAP-I 100 μg·ml^{-1} (●), Con A 5 μg·ml^{-1} (×), PAP-I 100 μg·ml^{-1} + Con A 5 μg·ml^{-1} (□). The assay method of CSF was the same as Tab 1. n = 4 experiments, each experiment pooled from spleens of 3 − 4 BALB c mice, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P > 0.05$, $^{**}P < 0.05$, $^{***}P < 0.01$ *vs* without PAP-I.

PAP-I 刺激脾细胞产生 CSF 的类型 为了观察 PAP-I 诱生脾细胞产生的 CSF 类型，在待测上清液中加入 IL-3，GM-CSF 单克隆抗体和 M-CSF 的多克隆抗体吸收其中的 CSF，并采用 *D*-[^{3}H]galacotose 骨髓细胞膜参入法检测 CSF，发现加入 GM-CSF 单克隆抗体和 M-CSF 多克隆抗体试验孔中的 *D*-[^{3}H]galacotose 参入的 dpm 值与对照孔无显著性差异，而加入 IL-3单克隆抗体的试验孔中的 dpm 值为865 ± 73，对照孔(未加抗体吸收)值为1375 ± 88 ($P < 0.001$)，而与仅有培养基(不含待测上清)的阴性对照孔 dpm 值993 ± 110无显著差异，说明 PAP-I 刺激脾细胞产生的 CSF 类型主要为 interleukin-3.

Tab 2. CSF types from mouse splenocyte supernants treated with PAP-I. CSF was measured by *D*-[^{3}H] galactose uptaken by membrane of bone marrow cells. n = 3 − 4 BALB c mice in each experiment, $\bar{x} \pm s$. $^{a}P > 0.05$, $^{c}P < 0.01$ *vs* +RPMI-1640.

Supernants of PAP-I	CSF activity/dpm Exp 1	Exp 2	Exp 3
+GM-CSF, McAb	1 283 ± 60^{a}	523 ± 24^{a}	815 ± 43^{a}
+M-CSF, PcAb	1 253 ± 68^{a}	499 ± 37^{a}	833 ± 55^{a}
+IL-3, McAb	865 ± 73^{c}	360 ± 29^{c}	543 ± 49^{c}
+RPMI-1640	1 375 ± 88	540 ± 32	801 ± 35
RPMI-1640 only	993 ± 110^{c}	380 ± 43^{c}	511 ± 60^{c}

DISCUSSION

本文实验结果证明了 PAP-I 能显著促进脾细胞产生 CSF，经 IL-3，GM-CSF 单克隆抗体及 M-CSF 的多克隆抗体吸收实验证实 CSF 类型主要为 IL-3. 已知激活 T 淋巴细胞可产生 L-3[6]，推测 PAP-I 可能通过激活 T 淋巴细胞产生 IL-3，此和 PAP-I 能激活 T 淋巴细胞产生 IL-2的报道一致(中国药理通讯 1989；**6**：22). PAP-I 激活 T 淋巴细胞可能是直接或间接的[7]. 本文实验结果表明 PAP-I 可以显著促进亚适剂量 Con A 刺激小鼠脾细胞产生 CSF，而 Con A 浓度达最适刺激浓度5 μg·ml^{-1}时，PAP-I 合用 Con A 与单独使用 Con A 刺激小鼠脾细胞产生 CSF 能力无显著差异，此结果说明 PAP-I 与 Con A 刺激 CSF 产生的靶细胞可能是一致的. 欲进一步区分 PAP-I 作用的靶细胞类型，还有待将脾细胞

分类纯化以获得单一细胞亚群，继而观察PAP-I对其产生CSF的影响. 已知实验表明IL-3能诱导单核细胞内与TNF合成有关的mRNA生成[8]，PAP-I可促进MΦ分泌IL-1并可作为启动剂促进TNF分泌，说明PAP-I促进T淋巴细胞生成IL-3可能是其启动MΦ分泌TNF的重要机制之一. 本实验结果及以往实验[3]提示PAP-I可能具有辐射防护及造血功能的保护作用[9].

REFERENCES

1 Niskanen EO, Burgaleta C, Cline MJ, Golde DW. Effect of glucan, a macrophage activator, on murine hemopoietic cell proliferation in diffusion chambers in mice.
Cancer Res 1978; **38** : 1406—9.

2 Morstyn G, Burgess AW. Hemopoietic growth factors: a review.
Cancer Res 1988; **48** : 5624—37.

3 Zhang JP, Qian DH, Zheng QY. Effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides I on cytotoxicity of macrophages and its production of tumor necrosis factor and interleukin 1.
Acta Pharmacol Sin 1990; **11** : 375—7.

4 Wang HB, Zheng QY. Comparison of four methods of colony-stimulating factors (CSFs) assay.
Clin J Hematol 1991; **12** : 323—4.

5 Hewlett G, Stünkel KG, Schlumberger HD. A method for the quantitation of interleukin-2 activity.
J Immunol Methods 1989; **177** : 243—6.

6 Yang YC, Ciarletta AB, Temple PA, Chung MP, Kovacic S, Witek-Giannotti JS, *et al*. Human IL-3 (multi-CSF): Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3.
Cell 1986; **47** : 3—10.

7 Grönvik KO, Andersson J. The role of T cell growth stimulating factors in T cell triggering.
Immunol Rev 1980; **51** : 35—59.

8 Cannistra SA, Vellenga E, Groshek P, Rambaldi A, Griffin JD. Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin-3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism.
Blood 1988; **71** : 672—6.

9 Neta R. Role of cytokines in radioprotection.
Pharmacol Ther 1988; **39** : 261—6.