·博士之窗·

白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性

单保恩[1△]　张金艳[1]　杜肖娜[1]　李巧霞[1]　山下优毅[2]　吉田安宏[2]　杉浦勉[2]

内容提要　**目的**：研究白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性。**方法**：用^{3}H介入法分析了白花蛇舌草提取物(Oldenlandia diffusa extract，ODE)对小鼠脾细胞的增殖活性；用^{51}Cr游离实验测定了小鼠和人杀伤细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤活性，用ELISA法和生物法研究了B细胞抗体的产生以及单核细胞的细胞因子产生，并用^{3}H介入法分析了单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能；用层析法、蛋白酶消化法和糖分解处理(即$NaIO_4$处理)分析了白花蛇舌草的化学成分。**结果**：ODE对小鼠脾细胞的增殖活性有很强的促进作用；ODE增强小鼠和人杀伤细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤活性，增强B细胞抗体的产生以及单核细胞的细胞因子产生，并增强单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能。白花蛇舌草的化学成分为90道尔顿的糖蛋白。**结论**：ODE对小鼠和人有免疫调节作用，并通过刺激机体的免疫系统杀伤或吞噬肿瘤细胞，这些活性可应用于临床调节免疫功能和治疗肿瘤等疾病。

关键词　白花蛇舌草　T细胞　B细胞　单核细胞　抗肿瘤活性　糖蛋白

Immunomodulatory Activity and Anti-Tumor Activity of Oldenlandia Diffusa in vitro SHAN Bao-en，ZHANG Jin-yan，DU Xiao-na，et al *The Research Center 4th Hospital，Hebei Medical University，Shijiazhuang (050011)*

Objective：To study the effect of Oldenlandia diffusa (OD) on lymphocytes and tumor cells in vitro. **Methods**：Effects of OD extract (ODE) on proliferation of spleen cells of mice and the phagocytosis of monocytes to tumor cells using ^{3}H incorporation were analysed，and effect on specific activity of natural killer (NK) cells to human and mice's tumor cells was determined using free ^{51}Cr experiments，effects on B cells' antibody production and cytokine of monocyte production were investigated by ELISA and biological method，the chemical composition of OD was analyzed by chromatography，protease digestion and sugar decomposition ($NaIO_4$) test. **Results**：ODE could vigorously promote the proliferative activity of spleen cells in mice，specific lethal activity of human and mice's NK cell to tumor cells，B cells' antibody production，monocytes' cytokine production and its phagocytosis to remove the tumor cells. By means of chromatography，protease E digestion and $NaIO_4$ treatment，the result of chemical compostion analysis showed that the component of OD was 90 kDa glycoprotein. **Conclusion**：ODE has immuno-modulating activity and anti-tumor activity in vitro through stimulating the immune system to kill or engulf tumor cells，which could be used clinically for immune function modulation and to treat tumor and other diseases.

Key words　Oldenlandia diffusa，Tcell，B cell，monocyte，anti-tumor activity，glycoprotein

白花蛇舌草为茜草科一年生草本植物，主要功效为清热解毒和利尿[1]。有报道动物实验结果表明白花蛇舌草有抗肿瘤作用，故也用于消化道肿瘤的治疗；也有报道白花蛇舌草有免疫学活性[2]，但其免疫调节机制和抗肿瘤作用机制尚未明了。本研究应用小鼠脾细胞和人淋巴细胞研究白花蛇舌草提取物(ODE)对小鼠和人的免调节机制和抗肿瘤机制。

材料和方法

1　实验动物和材料　实验中应用的BALB/c和C3H/HeJ小鼠均购自Seiwa实验动物中心(Yoshitomi，Ohita，Japan)。雌雄兼用，6～8周龄。白花蛇舌

1. 河北医科大学第四医院科研中心(石家庄 050011)；2. 日本产业医科大学免疫学教研室

△博士

万方数据

草的提取：1g 白花蛇舌草浸泡于 100ml 蒸馏水中，过夜后用微火煮沸 60min，待凉后用滤纸过滤，并用一次性针头滤器（Nippon Millipore Ltd. Tokyo，Japan）抽滤后放冰箱备用。

2 脾细胞及人周围血淋巴细胞的分离和增殖反应分析 脾细胞 将小鼠折颈处死后，采用无菌操作法取脾脏，并制成细胞悬液。人周围血淋巴细胞 肝素抗凝血用淋巴细胞分离液分离单个核细胞（即淋巴细胞）。脾细胞和淋巴细胞（2×10^5）与 10μg/ml 刀豆素 A（Con A，EY Labratories，San Moteo，CA，USA.），10μg/ml 脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS，Sigma Chemical Co.）或不同稀释倍数的 ODE 在含有 10% 胎牛血清（FCS）的 RPMI 1640 培养基中，于 96 孔培养板（No. 3072，Falcon Plastics，Oxuard，CA. USA.），在 5% CO_2，37℃ 条件下（培养条件下同）培养 3 天。在培养结束前 15h 各培养孔加入 0.5μCi（微居里）的^{3}H-胸腺嘧啶（^{3}H-TdR，特异性活性为 6.0 Ci/mmol，Amersham Plc，Buckinghamshire，UK.）。用细胞收集器（上海跃进医疗器械厂）将细胞收集[3]。细胞内结合于 DNA 的放射线的量用多功能液体闪烁仪（LS6500，Beckman contter，USA.）测定。结果用结合于小鼠脾细胞和淋巴细胞^{3}H-TdR 的平均每分钟计数（cpm）和标准差（s）来表示。

3 杀伤性 T 细胞（CTL）的细胞毒活性测定 小鼠脾细胞或人淋巴细胞（2×10^6）与 Mitomycin C 处理过的成人 T 细胞白血病细胞株 MT-2（10^5）在 ODE（空白加 PBS）作用下，37℃ 培养 3 天，以诱导对 MT-2 有特异性的杀伤细胞。其杀伤活性用放射性铬酸钠（^{51}Cr）游离实验测定[4]：将用（^{51}Cr）标记的 MT-2（10^4）细胞分别与 6.25×10^4，12.5×10^4，25×10^4 激活的杀伤性 T 细胞在 0.2ml 培养液中培养 5h，将培养板离心收集每孔之上清液，测定上清液中的放射线活性（cpm）。特异性杀伤百分率计算公式为｛（试验孔 cpm − 对照孔 cpm）/（最大释放 cpm − 对照孔 cpm）｝×100%。最大释放值为^{51}Cr 标记的 MT-2 细胞与 1% Nonidet P-40 培养后所得的上清液 cpm，对照孔值为^{51}Cr 标记的 MT-2 细胞与未经激活的淋巴细胞培养后所得的上清液 cpm。

4 肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细线胞介素-6（IL-6）以及白细胞介素-1（IL-1）的产生和分析 小鼠脾细胞或人淋巴细胞于培养瓶中培养 2h 后，弃去非贴壁细胞，用刮刀收集贴壁细胞并将其（5×10^5）与 10μg/ml LPS 或 ODE 在 37℃ 培养 24h 后，培养上清液中的 TNF-α 含量采用对 TNF-α 敏感的纤维母细胞株（L929），用生物法测定[5]。IL-6 和 IL-1 含量用 ELISA 法测定。

5 B 细胞抗体的产生和分析 小鼠脾细胞或人淋巴细胞（5×10^5）与 10μg/ml LPS 或 ODE 在 37℃ 培养 7 天，收集上清液。上清液中的免疫球蛋白 G（IgG）含量用 ELISA 法测定[6]。

6 单核细胞吞噬功能分析 小鼠或人单核细胞（5×10^4）与 ODE（空白加 PBS）在 37℃ 培养 24h 后，加入肿瘤细胞（对小鼠加入，试验 1：EL4，试验 2：Yac-1，对人加入 X5563 细胞），37℃ 继续培养 48h，培养结束前 15h 各培养孔加入^{3}H-TdR，收集细胞并计数由细胞吸收的^{3}H-TdR 量[7]。结果用抑制百分率和标准差来表示。对肿瘤细胞抑制率的公式为｛1 −（肿瘤细胞 cpm + 单核细胞 cpm − 单独单核细胞 cpm）/单独肿瘤细胞 cpm｝×100%。

7 有效成分的提取 将 2ml ODE 加样于 Sephocryl S-200 层析柱（2.0×15cm），用 PBS 平衡流速至 10ml/h。每管收集 2ml 层析液。各管中的蛋白质含量用紫外分光光度计测定 280nm 吸光度值 糖含量用酚 − 硫酸法测定，结果用 492nm 吸光度值表示[5]。各成分的增殖活性由^{3}H 介入法测定小鼠脾细胞的增殖反应，结果用^{3}H-TdR 吸入量（cpm）值表示。各成分的分子量由标准分子量物质测定（Blue Dextran Wt：2 000 000，Sigma；牛血清白蛋白，Wt：66 000，Sigma；Carbonic anhydrase，Wt：29 000，Sigma. 各种蛋白质 2mg 溶于 1.3ml PBS 后上样），根据标准分子量物质析出的管数与吸光度（OD）值绘制标准曲线，从曲线上查取各成分分子量。

8 蛋白酶 E 和 $NaIO_4$ 处理 蛋白酶 E 处理：1mg ODE 或从层析柱分离的有效成分加入 0.4g Pronase E（Sigma）在 4ml 含有 50mmol/L $CaCl_2$ 的 0.1mol/L Tris-HCl（pH8.0）缓冲液中于 37℃ 培养 36h 后，再加入 0.2mg Pronase E 继续培养 36h，然后将反应混合物于 100℃ 加热 10min 以灭活 Pronase E，最后用 PBS 透析后备用。$NaIO_4$ 处理：1mg ODE 或从层析柱分离的有效成分与 100μl 0.1mol/L $NaIO_4$ 于 37℃ 培养 4h 后，加入 Ethyleneglycol（Sigma）[8]，然后将反应液用 PBS 透析后备用。

9 统计学处理 数据用平均值 ± 标准差表示。计量资料用 t 检验，两组数据计算相关系数的显著性检验。

结 果

1 ODE 对小鼠脾细胞增殖的作用 见图 1。

万方数据

ODE 显著地刺激了小鼠脾细胞的增殖并有浓度依存

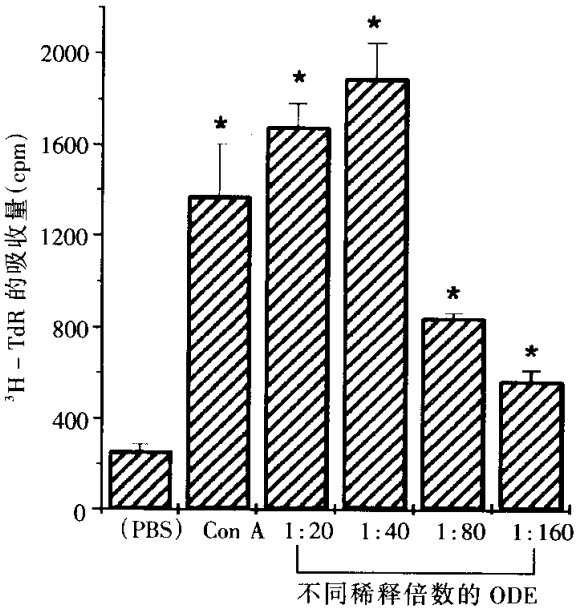

图 1　PBS 对 BALB/c 小鼠脾细胞增殖的作用

注：与 PBS 处理比较，* $P<0.01$

性($P<0.01$)。因 1∶40 倍稀释的 ODE 作用最强，所以在以后的实验中均采用 1∶40 倍稀释的 ODE。

2　ODE 增强杀伤性 T 细胞(CTL)的细胞毒活性　见表 1，3。ODE 显著地增强了小鼠 T 细胞对 alo-antigen 特异性细胞毒活性($P<0.01$)。也显著地增强了人 CTL 的细胞毒活性($P<0.01$)。

表 1　ODE 对小鼠 CTL 特异性杀伤作用的影响　($\bar{x}\pm s$)

脾细胞的处理	刺激细胞及其靶细胞	对靶细胞的特异性杀伤率(%) 反应细胞与靶细胞的比率		
		25∶1	12.5∶1	6.25∶1
PBS	X5563	1.6±0.1	2.3±0.1	2.1±0.2
ODE	X5563	26.1±1.2*	18.6±1.3*	10.8±0.8*

注：与 PBS 处理比较，* $P<0.01$；$n=12$；下表同

3　ODE 刺激 B 细胞抗体产生　见表 2，3。ODE 和 LPS 较显著地刺激了小鼠 B 细胞抗体的产生($P<0.01$)。该结果表明 ODE 不但刺激 B 细胞增殖，也能增强其功能即抗体产生。ODE 也较显著地刺激人 B 细胞抗体的产生($P<0.01$)。

4　ODE 刺激单核细胞产生细胞因子　见表 2，3。ODE 不但显著刺激小鼠单核细胞产生 TNF-α 和 IL-6 的产生($P<0.01$)，也对人单核细胞产生 TNF-α 和 IL-1 的产生有较强的作用($P<0.01$)。

5　ODE 增强单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能　见表 4。ODE 对小鼠和人单核细胞的增殖无抑制作用($P>0.05$)，对单独肿瘤细胞也无明显抑制作用($P>0.05$)，当加入单核细胞后对肿瘤细胞显示了较强的抑制作用($P<0.01$)。这说明 ODE 是通过刺激机体的免疫系统来抑制肿瘤生长的。

6　ODE 的有效成分是糖蛋白　最后我们提取了白花蛇舌草的有效成分，通过 Sephocryl S-200 层析柱分离并用标准分子量测定表明白花蛇舌草有效成分的分子量约为 90 道尔顿，从层析分离曲线上看，对小鼠脾细胞有增殖活性的峰由蛋白质和糖重叠，该峰的成分其活性对蛋白酶消化和 $NaIO_4$ 处理都敏感，证明该成分为糖蛋白物质(图 2)。

表 2　ODE 对小鼠 B 细胞 IgG 及单核细胞 TNF-α、IL-6 产生的影响　($\bar{x}\pm s$)

小鼠脾细胞培养与处理	IgG (μg/L)	TNF-α (U/ml)	IL-6 (μg/L)
PBS	30.4±19.0	0.24±0.1	<0.1
LPS	74.2±2.3*	63.1±7.1*	44.0±5.5*
ODE	68.6±1.2*	51.5±4.3*	6.0±0.2*

表 3　ODE 对人 CTL 活性、B 细胞 IgG 以及单核细胞 TNF-α 和 IL-1 产生的影响　($\bar{x}\pm s$)

淋巴细胞培养与处理	CTL (%)	IgG (μg/L)	TNF-α (U/ml)	IL-1 (μg/L)
PBS	2.3±0.1	30.7±19.0	24.7±3.3	18.6±0.5
LPS	—	74.0±2.4*	75.6±5.5*	520.3±14.5*
ODE	18.7±1.3*	74.5±2.3*	120.2±5.7*	220.8±0.5*

表 4　ODE 对小鼠和人单核细胞吞噬功能的影响　($\bar{x}\pm s$)

反应细胞的处理		^{3}H-TdR 吸收量(cpm) 单核细胞+肿瘤细胞	单独单核细胞	单独肿瘤细胞	抑制率 (%)
小鼠单核细胞					
试验 1	PBS	2154.2±179.1	139.9±99.9	2525.0±32.5	20.3±2.4
	ODE	1325.9±34.3	166.7±17.6	2479.5±46.9	53.2±0.4*
试验 2	PBS	1108.5±33.1	269.4±15.7	1898.4±321.1	23.6±0.1
	ODE	772.7±10.2	220.9±30.2	955.9±124.5	42.2±0.5*
人单核细胞					
	PBS	40574.7±3955.6	124.6±54.9	48481.6±683.9	16.5±5.7
	ODE	26891.8±451.2	101.6±29.6	10480.3±1829.2	33.8±0.2*

讨　论

中药可以治疗很多疾病尤其是自身免疫性疾病和肿瘤等，而且以副作用小而著称。然而许多中药的作用机制和有效成分还尚未明了。本研究我们应用小鼠脾细胞和人末梢血淋巴细胞检测了 ODE 对小鼠和人体的免疫调节活性和抗肿瘤活性并提取了其有效成分。ODE 显著地刺激小鼠脾细胞进行增殖，并有较好的量效关系，其最适浓度为 1∶40 倍稀释，高于此浓度对脾细胞的增殖显示了轻微的毒性作用。ODE 不但刺激脾细胞增殖，还增强了其功能如 T 细胞的细胞毒活性和 B 细胞的抗体产生活性；ODE 也增强了人 T 细胞的细胞毒活性和 B 细胞的抗体产生。众所周知，

万方数据

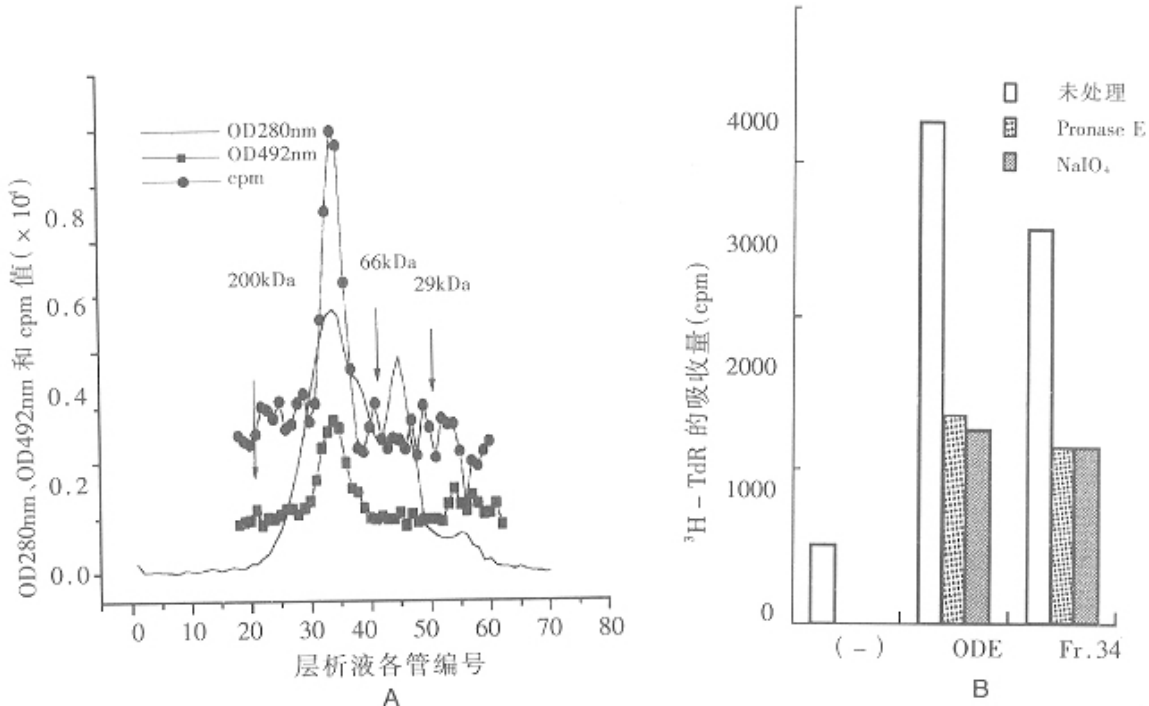

图 2 A:用层析法分离的 ODE 各管中蛋白质、糖含量以及对小鼠脾细胞的增殖反应曲线;B:ODE 和经层析法分离的活性成分(Fr.34)用蛋白酶 E 和 $NaIO_4$ 处理后测定其对小鼠脾细胞增殖活性

LPS 是广泛应用的 B 细胞有丝分裂剂,LPS 来自于细菌内毒素,也可来自植物。该实验中 ODE 的 B 细胞刺激活性不是来自 LPS 的污染,因为,虽然 C3H/HeJ 小鼠脾细胞对 LPS 呈低反应性,但 ODE 仍能显著刺激其增殖(结果未显示);另外,Polymyxin B 可以抑制 LPS 的反应,但不能抑制 ODE 的活性(结果未显示)。ODE 刺激单核细胞产生细胞因子如 TNF-α,IL-1 和 IL-6 等,并增强单核细胞对肿瘤细胞的吞噬功能。以上这些结果可以说明 ODE 对小鼠和人有免疫调节作用,并通过刺激机体的免疫系统抵抗肿瘤的生长。

有些中药有抗诱变和抗肿瘤活性[9],抗肿瘤活性是与其增强免疫功能有关[10]。本研究着重进行了体外实验研究,但作为预实验我们也发现向患肿瘤小鼠体内投入 ODE 后明显抑制了肿瘤的生长,恢复了被抑制的免疫功能,与对照组相比,寿命明显延长(结果未显示)。这说明 ODE 不仅在体外,在体内也有免疫调节作用和抗肿瘤作用。我们认为在体内 ODE 作用于免疫系统,使 T 细胞、B 细胞和单核细胞发挥协同作用,更加增强了免疫效应。

有报道,一些从高等植物由来的多糖提取物作为生物反应修饰剂有免疫调节活性和抗肿瘤活性[11,12]。我们的结果显示白花蛇舌草的有效成分其分子量约为 90 道尔顿,在其活性峰上有蛋白质和糖质峰重叠,为了进一步证实该有效成分是一种糖蛋白,对该成分分别进行了蛋白酶消化和 $NaIO_4$ 处理,结果该成分对这两种处理均敏感,证明该有效成分是一种糖蛋白。

白花蛇舌草对小鼠和人有免疫调节作用,并通过刺激机体的免疫系统抵抗肿瘤的生长和其他疾病的发生。该结果对更有效地开发白花蛇舌草的药理活性提供有效的数据。

参 考 文 献

1. 崔树德. 中药大全. 哈尔宾:黑龙江科学出版社,1989:302.
2. 吴厚铭,黄胜余,劳霞飞. 白花蛇舌草免疫多糖研究. 有机化学 1992;12(4):43.
3. Shan BE, Zeki K, Sugiura T, et al. Chinese medicinal herb, Acanthopanax gracilistylus, extract induces cell cycle arrest of human tumor cells in vitro. Jpn J Cancer Res. 2000;91:383—389.
4. Shan BE, Yaoshida Y, Sugiura T, et al. Suppressive effect of Chinese medicinal herb, Acanthopanax gracilistylus, extract on human lymphocytes in vitro. Clin Exp. Immunol 1999;118:41—48.
5. Ruff RM, Gifford EG. Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. J. Immunol 1980;12:1671—1677.
6. Shan BE, Yaoshida Y, Kuroda E, et al. Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. Int J. Immunopharmacol 1999;21:59—70.
7. Kurata S, Tsuchiya T, Norimura T, et al. Evidence for cytostatice T cell activity in the effector mechanism against syngeneic TMT mammary tumor cells in mice. J.

Immunol 1983;130:496—500.
8. Oka S, Shigeta S, Ono K, et al. An epitope residing in carbohydrate chains of sea squirt antigen termed Girep. J. Allergy Clin Immunol 1987;80:57—63.
9. Ye J, Ding M, Zhang X, et al. On the role of hydroxyl radical and the effect of tetrandrine on nuclear factor-kappa B activation by phorbol 12-myristate 13-acetate. Ann. Clin. Lab. Sci 2000;30:65—71.
10. Wang JZ, Tsumura H, Shimura K, et al. Antitumor activity of polysaccharide from a Chinese medicinal herb, Acanthopanax giraldii Harms. Cancer Lett 1992;65:79—84.
11. Ohtake N, Suzuki R, Diakuhara H, et al. Modulation of lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine SHo-saoko-to. Int. J. Immunophar-macol 2000;22:419—430.
12. Liu JW, Nagao N, Kageyama K, et al. Miwa, N. Anti-metastatic effect of an autooxidation-resistant and lipophilic ascorbic acid derivation through inhibition of tumor invasion. Anti Cancer Res 2000;20:113—118.

（收稿：2000－06－06　修回：2000－12－05）

万方数据