

当归多糖组分 AP-3 诱生小鼠脾细胞 IL-2 和 IFN- γ 的作用

杨铁虹, 贾敏, 梅其炳*

(第四军医大学药理学教研室, 陕西西安 710032)

摘要: 目的 研究当归多糖组分 AP-3 对细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的诱生作用, 以探讨其免疫调节的特点。方法 流式细胞术测定培养的脾细胞中 CD4⁺ 细胞比例; 酶联免疫法测定培养上清液中 IL-2 和 IFN- γ 的浓度; RT-PCR 法测定 IL-2 和 IFN- γ mRNA 的转录水平。结果 AP-3 在 0.6 ~ 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 能显著提高培养脾细胞 CD4⁺ 细胞的百分率; 在 2 ~ 6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AP-3 时间、剂量依赖性增加培养的细胞上清液中 IL-2 的浓度和细胞内 IL-2 mRNA 的转录水平, 而对于 IFN- γ 和 IFN- γ mRNA, 则先升高后降低, 并呈现剂量依赖性。结论 当归多糖能够促进 IL-2 和 IFN- γ 的分泌, 激活 Th1 细胞, 从而发挥免疫调节作用。

关键词: 当归多糖; IL-2; IFN- γ ; Th 细胞

中图分类号: R282.71; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)01 - 0054 - 04

Effect of *Angelica sinensis* polysaccharide fraction AP-3 on IL-2 and IFN- γ induction

YANG Tie-hong, JIA Min, MEI Qi-bing*

(Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effects of *Angelica sinensis* polysaccharide fraction AP-3 on IL-2 and IFN- γ induction and its further immunomodulatory feature. **Methods** The percentage of CD4⁺ lymphocyte was detected by flow cytometric method, the production of IL-2 and IFN- γ in cell culture supernatant were determined by ELISA, mRNA expressions of IL-2 and IFN- γ cytokines were detected by RT-PCR. **Results** At the range of 0.6 - 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AP-3 significantly enhanced the percentage of CD4⁺ lymphocytes in total splenocytes. At the range of 2 - 6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the treatment of AP-3 augmented both productions of IL-2 in cell culture supernatant and cell IL-2 mRNA transcription level in a time and dose dependent manner. While in the case of IFN- γ , AP-3 stimulated at early time after exposure but down-regulated thereafter. **Conclusion** *Angelica sinensis* polysaccharide could regulate the immune response through upregulating IL-2, IFN- γ expression and activating Th1 cell.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; IL-2; IFN- γ ; Th cell

当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, AP) 具有抗补体、增强造血功能、促进脾细胞增殖、免疫调节、肝损伤保护和促进溃疡愈合的作用^[1-6]。但所用多糖多为粗多糖, 对 T 细胞及免疫功能影响的研究还不够深入。作者从新鲜岷县当归中分离纯化获得了几个不同相对分子质量的当归多糖组分^[7], 其中组分 AP-3 活性最高, 其平均相对分子质量为

50 kD。药理学研究表明, 当归多糖具有抗肿瘤和调节免疫功能的作用^[8,9]。本文研究当归多糖对细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的诱生作用, 以进一步探讨当归多糖免疫调节的特点。

材料和方法

动物 BALB/c 小鼠, 雌雄兼用, 体重 18 ~ 20 g, 由第四军医大学实验动物中心提供。

主要试剂及仪器 当归多糖组分 AP-3, 为纯白色冻干粉, 纯度 97%, 由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、

收稿日期: 2005-04-15.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 29 - 83374552,

E-mail: qbmei@fmmu.edu.cn

葡萄糖、半乳糖组成,其摩尔比为 1.00: 4.54: 2.98: 11.09: 7.45;制备方法:水煮醇沉法从当归中提取粗多糖,粗多糖经 Sephacry S-400 凝胶过滤色谱,收集主要组分经透析、冷冻干燥即得 AP-3。RPMI-1640, 购自 Gibco 公司;小牛血清,购自 Hyclone 公司; Murine IL-2 ELISA Kit, Murine IFN- γ ELISA Kit, 为法国 Diaclone 公司产品; Trizol, 为美国 Invitrogen 公司产品; 氯仿 (AR)、异丙醇 (AR)、无水乙醇 (AR), 天津化学试剂有限公司; DEPC, 博士德生物公司; mRNA selective PCR Ver1.1, 购自 TaKaRa Biotech 公司; 引物由上海生工生物公司合成 (表 1)。

Table 1 The sequence of primer

Sample	5' Specific primer	3' Specific primer
IL-2	5'-CTTGCCCAAGCAGGCCA CAG-3'	5'-GAGCCTTATGTGTGTGA AGC-3'
IFN- γ	5'-AGCGGCTGACTGAACTC AGATTGTAG-3'	5'-GTCACAGTTTTCAGCTG TATAGGG-3'
β -Actin	5'-TGGAAATCCTGTGGCATC CATGAAAC-3'	5'-TAAAACGCAGCTCAGTA ACAGTCCG-3'

凝胶成像仪, Alpha Innotech Corporation; DYY-III 2 型电泳仪, 北京六一仪器厂; DG-3022A 酶联免疫检测仪, 华东电子管厂。

AP-3 对 CD4⁺ T 细胞增殖的影响 按实验室常规制备小鼠单个脾细胞悬液, 调整细胞数为 $1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 加入 24 孔培养板, 分别加入 RPMI 1640 培养液或不同浓度的 AP-3。设对照组: 细胞悬液 500 μL + 培养液 500 μL ; 加药组: 细胞悬液 500 μL + 培养液 400 μL + 药物 100 μL , 使 AP-3 终浓度为 $0.2 \sim 2 \mu mol \cdot L^{-1}$ 。37 $^{\circ}C$, 95% O₂, 5% CO₂ 条件下培养 72 h, 收集细胞, 用流式细胞仪检测各组 CD4⁺ 细胞百分率。

AP-3 对 IL-2 和 IFN- γ 的影响 常规制备 BALB/c 小鼠脾细胞悬液, 台盼蓝染色计数, 活细胞大于 95%, 调整细胞数为 $1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 加入 AP-3 使终浓度为 $0.6 \sim 6 \mu mol \cdot L^{-1}$, 以 RPMI-1640 为对照组, 37 $^{\circ}C$, 5% CO₂ 培养箱中培养至所需时间, 收集上清液, 按照试剂盒说明测定 IL-2 和 IFN- γ 的浓度, 收集细胞提取总 RNA, RT-PCR 法测定 IL-2 和 IFN- γ mRNA 的表达水平。

总 RNA 的提取 按说明用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 将 RNA 溶于适量 DEPC 处理过的纯水, 紫外可见分光光度计对 RNA 样品进行定量和纯度检验, -80 $^{\circ}C$ 保存备用。

一步法 RT-PCR 反应体系总体积为 50 μL , 内含 0.1 U $\cdot \mu L^{-1}$ AMV RTase, 5 mmol $\cdot L^{-1}$ MgCl₂, dNTP analog, 0.8 U $\cdot \mu L^{-1}$ RNase Inhibitor, 0.1 U $\cdot \mu L^{-1}$ Taq 酶, 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 3' 及 5' 引物, RNA 样品 100 ng。逆转录反应: 50 $^{\circ}C$, 30 min; 然后 85 $^{\circ}C$, 7 min 灭活逆转录酶。PCR 反应循环参数设置为: 变性温度 85 $^{\circ}C$, 1 min; 退火温度 55 $^{\circ}C$, 1 min; 延伸温度 72 $^{\circ}C$, 2 min。共 35 个循环。72 $^{\circ}C$ 保温 7 min; 4 $^{\circ}C$ 保存。

PCR 产物的定量 取 RT-PCR 产物 5 μL , 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 β -actin 为内标同时扩增并电泳。凝胶成像仪记录图像并对胶上每一条带进行吸收度扫描定量, 结果用各组的吸收度与 β -actin 的吸收度之比表示。RT-PCR 实验重复 3 次。

统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据经 SPSS 统计软件进行方差分析。

结果

1 AP-3 对 CD4⁺ T 细胞增殖的影响

AP-3 在 $0.6 \sim 2 \mu mol \cdot L^{-1}$ 显著升高培养的脾细胞中 CD4⁺ 细胞的比例, EC₅₀ 为 $0.72 \mu mol \cdot L^{-1}$ (表 2)。

Table 2 Effect of AP-3 on ratio of CD4⁺ T cells in mouse splenocytes *in vitro*

Group	Concentration / $\mu mol \cdot L^{-1}$	Ratio of CD4 ⁺ T cells / %
Control	0	38 \pm 7
AP-3	0.2	46 \pm 7
	0.6	54 \pm 5*
	2	61 \pm 2**

Spleen cells were treated with AP-3 for 72 h, flow cytometric assay was carried out by using CD4 monoclonal antibody conjugated with FITC. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

2 AP-3 对小鼠脾细胞上清液中 IL-2 浓度的影响

AP-3 能够时间、浓度依赖性地增加细胞上清液中 IL-2 的浓度。与对照组相应时间点相比, 2 和 6 $\mu mol \cdot L^{-1}$ AP-3 组从 24 h 起即有显著性差异, 0.6 $\mu mol \cdot L^{-1}$ AP-3 组至 72 h 时与对照组有显著性差异 (图 1)。

3 AP-3 对小鼠脾细胞上清液中 IFN- γ 浓度的影响

$0.6 \mu mol \cdot L^{-1}$ AP-3 对细胞上清液中 IFN- γ 浓度无明显影响, 各时间点与对照组均无显著性差异; AP-3 在 $2 \sim 6 \mu mol \cdot L^{-1}$, 细胞上清液中 IFN- γ 含量在 12 h 显著升高; 随着作用时间的延长, 含量逐渐

降低,但与相应对照组比,仍有显著性差异(图2)。

4 AP-3对小鼠脾细胞 IL-2和 IFN- γ 的 mRNA表达的影响

如图3所示,内标 β -actin的 mRNA表达恒定,不随时间延长产生明显变化,AP-3对其也没有明显

影响;对照组细胞因子 IL-2和 IFN- γ 的 mRNA表达随时间变化不明显;AP-3组 IL-2的 mRNA表达呈时间依赖性增加,斑点亮度明显增高,而 IFN- γ 的 mRNA在 12 h就有较高表达,斑点亮度明显增高,然后随时间延长逐渐下降,但仍较对照组亮。

对 PCR产物定量的结果表明,在 48和 72 h时 AP-3对 IL-2 mRNA表达的增加与对照组比有显著差异;而对 IFN- γ mRNA的表达,在 12,24和 72 h均高于对照组,二者有显著性差异(表3)。

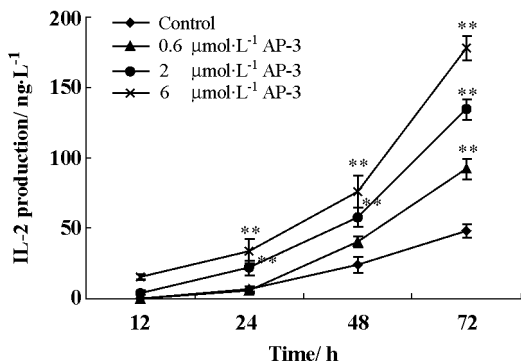


Figure 1 Effect of AP-3 on the production of IL-2 in the culture medium of mouse spleen cells. After incubation up to 72 h, the levels of IL-2 in the supernatant of culture medium were evaluated by ELISA. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control

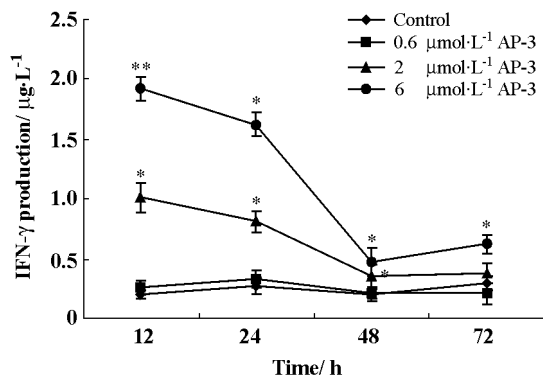


Figure 2 Effect of AP-3 on the production of IFN- γ in the culture medium of mouse spleen cells. After incubation up to 72 h, the level of IFN- γ in the supernatant of culture medium was evaluated by ELISA. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

Table 3 mRNA expression of IL-2 and IFN- γ in mouse spleen cells induced by AP-3

Time /h	Density ratio of IL-2 / β -actin (%)		Density ratio of IFN- γ / β -actin (%)	
	Control	AP-3	Control	AP-3
0	34 \pm 4	31 \pm 6	46 \pm 3	51 \pm 9
12	44 \pm 7	48 \pm 8	47 \pm 9	76 \pm 5**
24	43 \pm 6	50 \pm 3	48 \pm 4	81 \pm 8**
48	39 \pm 9	77 \pm 5**	42 \pm 11	47 \pm 16
72	36 \pm 7	108 \pm 11**	38 \pm 7	58 \pm 10*

The mouse spleen cells were treated with AP-3 at 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ up to 72 h. Then RT-PCR was performed and products were electrophoresized. The band density was analyzed by image analysis system. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

讨论

本研究结果表明,当归多糖能增加脾细胞中 CD4⁺ T细胞的比例,说明当归多糖能够激活 CD4⁺ T细胞,即 Th细胞。Th细胞按其分泌细胞因子类型的不同可分为 Th1和 Th2亚型,分别介导细胞免疫和体液免疫,两者之间相互抑制。本研究表明,当归多糖显著促进 Th1型细胞因子 IL-2和 IFN- γ 的分泌。IL-2和 IFN- γ 在调节机体免疫功能,抗肿瘤方面有非常重要的作用,同时也是调节 Th细胞亚型 Th1和 Th2细胞功能的关键因素之一。IL-2和 IFN- γ 的分泌可以促进 Th1细胞自身的增殖与分化,

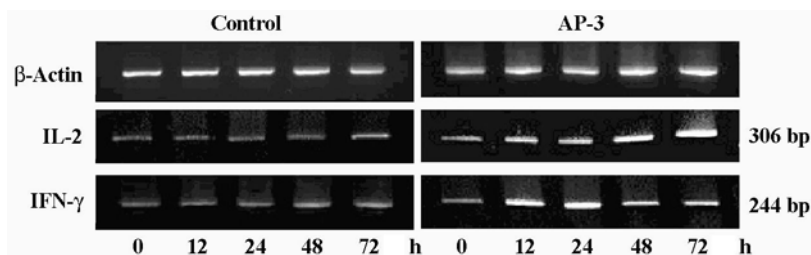


Figure 3 mRNA expression of IL-2, IFN- γ and β -actin in spleen cells induced by AP-3 at 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. After incubation up to 72 h, total RNA was isolated and the level of mRNA expression of IL-2 and IFN- γ was evaluated by RT-PCR

同时抑制 Th2 细胞的增殖。这一结果说明,当归多糖能够促进 Th1 细胞的增殖与分化,进而对 Th1 细胞介导的细胞免疫功能起促进作用。在促进 Th1 细胞功能的同时,当归多糖有可能对 Th2 细胞及其介导的体液免疫功能有一定的抑制作用。这可能是当归多糖在整体动物实验中表现出来的抑制体液免疫功能的机制之一,同时当归多糖还表现出了较好的促进小鼠非特异性免疫功能的作用^[9]。此外,IL-2 和 IFN- γ 是细胞因子网络中重要的调节因子,在抑制肿瘤细胞生长及免疫调节方面发挥着重要的作用。当归多糖能够促进 IL-2 和 IFN- γ 的分泌,提示当归多糖可以通过细胞因子调节机体的免疫功能,这也是当归多糖抗肿瘤的途径之一^[8]。另据报道,当归多糖还可激活小鼠腹腔巨噬细胞和 大鼠 Kuffe r 细胞,促进 NO 和 TNF- α 等效应分子的释放,从而发挥间接的抗肿瘤免疫作用^[10,11]。此外,在时效关系上,IFN- γ 对当归多糖响应迅速,而 IL-2 对当归多糖响应较慢,由此可以推测,分泌 IFN- γ 的 NK 细胞可能被当归多糖首先激活,是当归多糖的主要靶细胞。而分泌 IL-2 的 T 细胞随后被激活,这可能是当归多糖的直接作用,也可能是通过其他细胞因子发挥的间接作用,其确切机制还有待进一步研究。

韩国学者从朝鲜当归 (*Angelica gigas* Nakai) 中也提取了多糖成分,研究表明其免疫刺激功能与临床上广泛使用的香菇多糖和云芝多糖不同,它可特异性活化巨噬细胞,而不直接影响 B 细胞和 T 细胞。其作用于脾细胞后可使 IL-6 和 IFN- γ 表达量迅速增加,而 IL-2 的增加要稍晚一些,预示其首先作用于非特异性免疫细胞如巨噬细胞和 NK 细胞,随后影响辅助 T 细胞,同时对 B 细胞也具有潜在的活化作用,能增加抗体的产生,从而增加机体的免疫功能^[12]。本研究中使用多糖源于甘肃岷县产中国当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels], 其主要活性成分可能与韩国学者使用的当归有一定的差别,而造成生物活性上的差异。

References

- [1] Ye YN, So HL, Liu ES, et al. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing [J]. Life Sci, 2003, 72: 925 - 932.
- [2] Ye YN, Liu ES, Li Y, et al. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from *Angelica sinensis* on hepatic injury [J]. Life Sci, 2001, 69: 637 - 646.
- [3] Yamada H, Komiyama K, Kiyohara H, et al. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from the roots of *Angelica acutiloba* [J]. Planta Med, 1990, 56: 182 - 186.
- [4] Shang JJ, Wang Y, Wang SC, et al. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharides on lymphocyte proliferation and induction of IFN- γ [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2002, 37: 497 - 499.
- [5] Zheng M, Wang YP. Study on biological mechanism of *Angelica* polysaccharide regulation on human early multipotential progenitor cell [J]. Chin J Anat (解剖学杂志), 2002, 25: 105 - 109.
- [6] Hatano R, Takano F, Fushiya S, et al. Water-soluble extracts from *Angelica acutiloba* Kitagawa enhance hematopoiesis by activating immature erythroid cells in mice with 5-fluorouracil-induced anemia [J]. Exp Hematol, 2004, 32: 918 - 924.
- [7] Shang P, Yang TH, Jia M, et al. Purification and analysis of polysaccharides of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报), 2001, 22: 1311 - 1314.
- [8] Shang P, Qian AR, Yang TH, et al. Experimental study of anti-tumor effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1963 - 1967.
- [9] Yang TH, Jia M, Mei QB. Immunoregulation effect of *Angelica* polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* [J]. Chin Pharm Bull (中国药理学通报), 2003, 19: 448 - 451.
- [10] Yang XB, Mei QB, Zhou SY, et al. The role of *Angelica* polysaccharides in inducing effector molecule release by peritoneal macrophages [J]. Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志), 2004, 20: 747 - 749.
- [11] Wang J, Xia XY, Peng RX, et al. Activation of the immunologic function of rat Kupffer cells by the polysaccharides of *Angelica sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2004, 39: 168 - 171.
- [12] Han SB, Kim YH, Lee CW, et al. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai [J]. Immunopharmacology, 1998, 40: 39 - 48.
- [1] Ye YN, So HL, Liu ES, et al. Effect of polysaccharides