

## 人参三醇皂甙促进人白细胞介素-1 基因表达

田志刚<sup>1</sup>, 杨贵贞 (白求恩医科大学免疫学教研室, 长春 130021, 中国)

R 965.2

**Promoting effect of panaxatriol ginsenoside on gene expression of human interleukin-1**TIAN Zhi-Gang<sup>1</sup>, YANG Gui-Zhen (*Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*)

**ABSTRACT** Effect of panaxatriol ginsenoside (PG) on interleukin-1 (IL-1) gene expression was studied by using wheat germ extract (cell-free translation system) and IL-1 bioassay. The results showed that IL-1 production increased by 40% ( $487-682 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) at maximum during cell culture (0-84 h) after PG ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) was added to phytohemagglutinin (PHA,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) stimulated lymph node cells. Meanwhile, IL-1 mRNA from PHA combined with PG stimulated lymph node cells translated 39.5% more IL-1 than that of PHA-stimulated cells at maximum ( $2500-3489 \text{ U} / \text{mg RNA}$ ).

**KEY WORDS** interleukin-1; genetic translation; lymph nodes; cultured cells; ginseng; saponins; messenger RNA; phytohemagglutinins

**摘要** 采用 mRNA 体外转译反应和生物活性检测, 观察到人参三醇皂甙(PG,  $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )明显促进植物血凝素(PHA,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )活化人淋巴结细胞分泌 IL-1, 最大促进效应为 40%。PHA ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) + PG ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )协同刺激的人淋巴结细胞获取的胞浆 RNA, 在麦胚无细胞体系中可转译出高于单纯 PHA 组 39.5% 的 IL-1, 证明 PG 促进了 IL-1 基因的表达。

**关键词** 白细胞介素-1; 遗传转译; 淋巴结; 细胞培养; 人参; 皂甙; 信息 RNA; 植物血凝素

白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 是一种重要的细胞因子, 对免疫应答起重要调控作用<sup>(1)</sup>。人参皂

甙为人参的主要药用成分, 对造血、免疫、神经内分泌等系统具有调节作用。国内杨贵贞自 1980 年以来系列地观察了人参皂甙的免疫调整作用<sup>(2-4)</sup>, 并开展了 IL-1 研究<sup>(5)</sup>, 我们的前期试验证明人参三醇皂甙 (panaxatriol Ginsenoside, PG) 具较强促细胞因子诱生的效应<sup>(6)</sup>, 本文观察 PG 对人淋巴结细胞 IL-1 促诱生效应以及基因调节机制。

**MATERIALS AND METHODS**

**材料** PG 由白求恩医科大学化学教研室提取和徐景达教授惠赠, 经 HPLC 和薄层扫描法测定, 纯度为 90%, 含 R<sub>g1</sub>, R<sub>g2</sub>, R<sub>f</sub>, R<sub>e</sub> 和 R<sub>h</sub> 等 5 种单体皂甙, 应用不含酚红的 Hanks 液配制, 58.8 kPa 压力 20 min 后贮存, 用前经培养液稀释至所需浓度, 植物血凝素 (PHA) 为上海医学化验所产品, 细菌脂多糖 (LPS) 自行制备, 从 E coli 细菌壁中抽提, 酚抽取后再经 Sephadex G 50 分子筛层析。制品为白色冻干粉, 蛋白和 RNA 含量均低于 1%。GTP  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Hepes  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磷酸肌酸  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磷酸肌酸激酶  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 亚精胺  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 二硫苏糖醇  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 20 种 L 型氨基酸各  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每  $200 \mu\text{l}$  体外转译体系中加入  $100 \mu\text{g}$  RNA,  $30^\circ\text{C}$  水浴作用 2 h 后离心取上清, 上清中含有转译反应产生的 IL-1, 经冷 RPMI 1640 透析平衡后用于检测 IL-1 含量。

**IL-1 生物活性检测** 采用 L929 细胞增殖反应<sup>(5)</sup>, 含 IL-1 上清液在 96 孔细胞培养板上进行倍比稀释, 共作 8 个稀释度 (1:2-256), 然后加入 L929 细胞 ( $2 \times 10^4 / 200 \mu\text{l}$  孔), 三复孔培养, 培养 60 h 后加入 [<sup>3</sup>H] 脱氧尿嘧啶核苷 ([<sup>3</sup>H]TdR,  $37 \text{ GBq} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 上海原子核研究所), 作用 12 h 后加 0.25% 胰酶消化 1-5 min, 多头细胞收集器收集细胞, 液体闪烁记数仪测定 cpm 值, 以 rHIL-1 标准品定出所检测标本的生物活性单位。本实验中所用鼠成纤维母细胞 (L929) 为本

Received 1991-07-22

Accepted 1992-08-18

<sup>1</sup> Now in *Department of Immunology, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji-nan 250001, China.*

室保存细胞株。基因工程人 IL-1 (recombinant human IL-1, rHIL-1) 由日本大阪大学惠赠。

**人淋巴结细胞制备、激活以及含 IL-1 上清液和含 IL-1 mRNA 的总 RNA 的制备** 将淋巴结剪成碎块, 200 目不锈钢网碾成单细胞悬液, 用 RPMI 1640 (Gibco) 稀释成  $2 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ , 含 10% 新生牛血清, 培养起始时加入 PHA ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 或 PHA ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) + PG ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 并设立单纯 PG ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 组和无刺激组。每 12 h 收集一次, 离心取上清液含有 IL-1, 取细胞沉淀后提取胞浆总 RNA<sup>(7)</sup>。

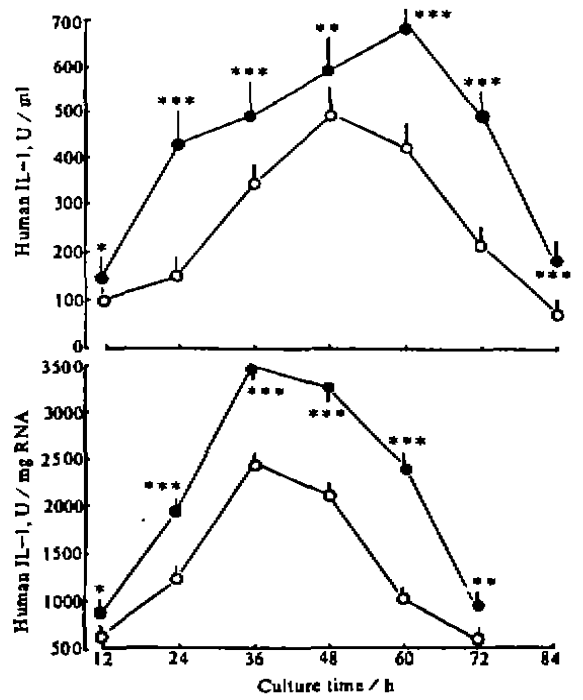
**IL-1 mRNA 体外转译反应** 麦种浸入 4℃ 水中 24 h 泡发后用解剖刀取出麦胚, 与玻璃粉混合后在预冷研钵中碾磨, 将所得糊状物离心 ( $26\ 000 \times g$ , 15 min, 4℃) 取中层透明浅绿色液体, 立即用 Sephadex G 25 除盐, 留取  $A_{260}$  nm 吸收高峰各管作为麦胚抽提物(WGE)。将 WGE 与 RNA 混合后加入下列物质, 终浓度分别为: KAc  $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MgAc<sub>2</sub>  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ATP  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GTP  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Hepes  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磷酸肌酸  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磷酸肌酸激酶  $75 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 亚精胺酸  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DDT  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和各种 L 型氨基酸  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (共 20 种), 30℃ 水浴作用 2 h,  $12\ 000 \times g$  离心 3 min 取上清, 再用冷 RPMI 1640 液 4℃ 透析平衡后作 IL-1 活性测定。

**RESULTS AND DISCUSSION**

**PG 对 PHA 活化淋巴结细胞的 IL-1 促诱生效应**

PHA 刺激后 12 h 可测出细胞培养上清中 IL-1 为  $100 \pm 17 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 48 h IL-1 含量是  $487 \pm 64 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 加入 PHA 的同时加入 PG 后各时相均有 IL-1 分泌增加, 平均增加  $35 \pm 7\%$ , 其中 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 时 IL-1 分泌增加有显著意义(Fig 1)。表明 PG 可协同 PHA 活化人淋巴结细胞而增加 IL-1 的诱生。我们以往曾观察到 PG 协同 PHA 活化淋巴细胞主要增加了细胞内蛋白质合成<sup>(6)</sup>, 提示 PG 可能对 IL-1 基因表达的转译环节有协同效应。

**PG 对人淋巴结细胞 IL-1 基因表达的促进效应** 淋巴细胞受 PHA 刺激后可转录 IL-1 mRNA, 该



**Fig 1. Induction kinetics of IL-1 and IL-1 mRNA of human lymph node cells stimulated by PHA ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ○) or PHA + PG ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ●).  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.01$  vs PHA.**

IL-1 mRNA 在麦胚无细胞转译体系中可指导合成具完整生物活性的 IL-1。由 Fig 1 B 可知 PHA 组 IL-1 mRNA 高峰时相为 36 h, 较 IL-1 高峰提前 12 h, 高峰时相体外转译效率为  $2500 \text{ U} / \text{mg RNA}$ , PG 可以促进 PHA 对淋巴细胞 IL-1 基因表达的诱导作用, 该组 IL-1 mRNA 高峰仍为 36 h, 转译效率为  $3489 \text{ U} / \text{mg RNA}$ , 提示 PG 促进 IL-1 基因表达, 使 IL-1 mRNA 转译活性增加。用体外转译体系检测 IL-1 mRNA 尚不能确切指出 PG 调节 IL-1 基因表达的环节(转录或转译), 有待采用分子杂交技术探讨。

**REFERENCES**

- 1 Onozaki K. Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 1985; 135 : 3962-6.
- 2 Yang GZ, Bao T. The immunoregulatory effect of ginsenoside *in vivo* and *in vitro*. *J Trad Chin Med* 1986; 6 : 191-4.

- 3 Yang GZ, Yu YL. Effect of ginsenoside on the nature killer cell-interferon-interleukin-2 regulatory network and its tumor inhibiting effect. *J Trad Chin Med* 1988; 8 : 135-7.
- 4 Yu YL, Yang GZ. The effects of ginsenoside on NK activity in vitro. *Chin J Immunol* 1985; 2 : 28-30.
- 5 Li Y, Yang GZ. Production and characterization of McAb

- to murine astrocyte and some biological properties of astrocyte product. *Chin J Immunol* 1987; 4 : 202-6.
- 6 Tian ZG, Yang GZ. Effect of panaxatriol saponin (PTS) on human lymphokine production and its characteristics. *Chin Pharm Bull* 1990; 6 : 37-42.
- 7 Tian ZG, Yang GZ. II-2 mRNA translation in wheat germ extract. *Chin J Immunol* 1989; 5 : 4-7.

161-164

(18)

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1993 Mar; 14 (2) : 161-164

## 用模拟恒速吸收及消除分析苜蓿地尔对豚鼠离体左心房肌的抑制作用

朱 远, 陈丁丁, 苏 玲, 戴德哉 (中国药科大学药理研究室, 南京 210009, 中国)

R972

Assay of negative inotropism of bepridil on isolated guinea pig left atrial myocardium by simulating constant rate of absorption and elimination

ZHU Yuan, CHEN Ding-Ding, SU Ling, DAI De-Zai (Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** The pharmacodynamic characteristic of negative inotropic effect of bepridil on isolated guinea pig cardiac atrium was conducted by gradient perfusion with constant rate of bepridil ranging from 0-20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and inverse, simulating a fixed pharmacokinetic parameters of  $K_a$  and  $K_e$ , respectively. A counter-clockwise hysteresis loop of negative inotropism of bepridil was presented. Fixing  $C_p$ ,  $T$ , and  $E$  by pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) non-parameter model, the hysteresis loop was collapsed in figure plotting  $C_e$  against  $E$ . The estimated  $K_{\infty} = 0.03 \pm 0.023 \text{ h}^{-1}$ , an apparent  $T_{1/2}$  of pharmacological effect was measured, and about 80-fold as long as the pharmacokinetic  $T_{1/2}$ . It was suggested that the long-lasting effect of bepridil was partly due to the slow elimination rate from the effect compartment.

**KEY WORDS** bepridil; heart atrium; myocardial contraction

**摘要** 苜蓿地尔 0-20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 20-0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  梯度灌流豚鼠离体左房, 以模拟固定  $K_a$  及  $K_e$  参数, 研究药效动力学特征。以  $C_p$ - $E$  作图, 苜蓿地尔的负性肌力作用呈逆时针滞后环。将  $C_p$ ,  $T$ ,  $E$  参数经 PK/PD 非参数模型拟合, 以  $C_e$ - $E$  作图, 滞后环消失。测得的药效能观  $T_{1/2}$  比药液下降  $T_{1/2}$  长约 80 倍, 证明其长效与从药效室中缓慢消除有关。

**关键词** 苜蓿地尔; 心房; 心肌收缩

苜蓿地尔 (bepridil, Bep) 为一种新型长效钙拮抗剂<sup>(1,2)</sup>, 本文通过 Bep 对豚鼠离体左心房的梯度灌流实验, 模拟恒速吸收 ( $K_a$ ) 及消除 ( $K_e$ ), 尝试以非参数模型进行观察其药效与药浓的关系。

### MATERIALS AND METHODS

**材料** Bep 为白色粉剂, 由常州第四制药厂提供; DSC-FG-1 浮置隔离多用数字式刺激仪; 台式自动平衡记录仪, 大华仪表厂生产; 53WB UV/VSI 分光光度仪; TB-600 梯度搅拌器; HL-2 恒流泵。

**左心房的梯度灌流** 豚鼠 8 只, ♀♂ 各半, 体重  $324 \pm 47 \text{ g}$ , 离体左心房的制备及实验条件参照文献<sup>(3)</sup>, 标本悬于 2 ml 浴皿中, 以  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  的氧饱和 Locke 液  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  灌流, 以频率 1 Hz, 波宽 5

Received 1991-10-28

Accepted 1992-08-18