文章编号:1000-5404(2005)03-0203-03

论著

三七皂甙对烫伤小鼠白细胞介导的防御系统功能的调理作用

罗中华,刘旭盛,彭代智,刘 敬,周 新,黄跃生 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究三七皂甙对烫伤小鼠白细胞介导的防御系统功能的作用。**方法** 采用昆明种小鼠 60 只,随机分为正常对照组、单烫组和治疗组。观测腹腔中性粒细胞(PMN)吞噬杀菌功能、产生超氧阴离子能力、NO 的产生分泌情况和淋巴细胞(LC)增殖反应。**结果** 单烫组小鼠 PMN 吞噬功能和超氧阴离子的产生能力显著低于正常组,三七皂甙对其均有显著的提高作用($P<0.05$)。单烫组 PMN 产生 NO 的量显著高于正常组小鼠($P<0.05$),三七皂甙对 PMN 产生 NO 的量有显著的降低作用。单烫组小鼠 LC 增殖功能显著低于正常组,三七皂甙治疗组小鼠 LC 增殖功能明显提高($P<0.05$)。**结论** 严重烫伤后 PMN 介导的防御系统功能紊乱,三七皂甙对紊乱的白细胞介导的防御系统功能有显著的调理作用。

关键词: 烫伤;白细胞;三七皂甙
中图法分类号: R282.71; R392.12; R644.02 **文献标识码**: A

Modulating effect of *panax pseudoginseng* wall saponins on the defensive function induced by leukocytes in scalded mice

LUO Zhong-hua, LIU Xu-sheng, PENG Dai-zhi, LIU Jing, ZHOU Xin, HUANG Yue-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the roles of *panax pseudoginseng* wall saponins on the defensive function induced by leukocytes in scalded mice. **Methods** Sixty Kunming mice were employed in the study and were randomly divided into normal control (N), simple scalding (S), and treatment (T) groups. The effects of *panax pseudoginseng* wall saponins were investigated by determining the bactericidal function, the production of superoxide anion, and the secretion of nitric oxide of intraperitoneal polymorphonuclear leucocytes (PMNs) and the proliferation reaction of lymphocytes. **Results** The production of superoxide anion and the phagocytic function of PMNs from the mice in S group were much lower than those in N group, while those in T group were much higher ($P<0.05$). The nitric oxide (NO) production from PMNs in S group was much higher than that in N group ($P<0.05$), but that in T group decreased significantly ($P<0.05$). In addition, the proliferation potential of lymphocytes in S group was evidently lower than that in N group, and that in T group increased markedly ($P<0.05$). **Conclusion** There is severe post-burn derangement in the defensive function induced by leukocytes, which could be well modulated by panax pseudoginseng wall saponins.

Key words: burn; leukocyte; panax pseudoginseng wall saponins

烧伤后机体抵御外界感染的能力降低,易于发生多种病原体的反复感染及多器官功能损害,其原因之一与中性粒细胞(neutrophils, PMN)介导的非特异性和淋巴细胞(lymphocyte, LC)介导的特异性防御功能低下有关[1,2]。中性粒细胞产生的多种生物活性物质在消灭病原体和清除异物等过程中占有很重要的地位。因此,调理烧伤后中性粒细胞介导的非特异性与淋巴细胞介导的特异性防御功能,对预防烧伤感染和多器官功能损害等并发症的发生发展均有重要意义。本研究用三七皂甙调理烫伤小鼠腹腔 PMN 吞噬杀菌功能、超氧阴离子与一氧化氮(nitric oxide, NO)的产生能力及 LC 的增殖反应,以了解三七皂甙对伤鼠白细胞介导的防御系统功能的作用。

作者简介:罗中华(1958-),男,四川省兴文县人,副主任技师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文 26 篇。电话:(023)68754148-8022
通讯作者:刘旭盛,电话:(023)68754148-8022
收稿日期:2004-09-16;修回日期:2004-11-20

1 材料与方法

1.1 动物模型

取体质量20~22 g昆明种小鼠60只(购于第三军医大学实验动物中心)。剪去背部的毛,将背部固定在一特制的,有恒定面积暴露于高压蒸汽喷口处的支架上,致伤区至喷口距离3.5 cm,蒸汽压力1.034×10^5 Pa,致伤12 s,伤后立即于腹腔补给等渗盐水3 ml。分笼饲养,自由进食,该模型烫伤面积18 %,经病理切片证实为Ⅲ度。

1.2 药物

三七皂甙购于云南植物药厂,批号:980528。将三七皂甙用生理盐水配制成5 mg/ml,经抽滤除菌后备用。

1.3 实验分组及给药方法

取昆明种小鼠60只按编号随机分为正常对照组、单烫组和治疗组。

正常对照组($n=12$)小鼠不烫伤,以生理盐水代替药物于腹腔注射。单烫组小鼠($n=12$)烫伤后以生理盐水代替药液于腹腔注射。治疗组根据三七皂甙剂量的不同分为大剂量组,中剂量组和小剂量组,每个剂量组12只小鼠。在小鼠烫伤后12 h开始于腹腔注射给药,大剂量组每只小鼠注射100 mg,中剂量组50 mg,小剂量组25 mg,每间隔12 h注射1次,共给药12次。实验进行到168 h活杀小鼠进行实验。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 PMN吞噬功能[3] 小鼠活杀前6 h于腹腔注射0.2%肝糖元2 ml。腋下放血活杀小鼠,用不含钙、镁离子的磷酸盐缓冲液洗出腹腔内白细胞。用磷酸盐缓冲液洗1次,悬浮于含钙、镁离子及葡萄糖的磷酸盐缓冲液中,与调理素化的乳胶颗粒(0.8 μm)在37 ℃水浴中孵育15 min,利用梯度离心去除剩余的乳胶颗粒,涂片后于光镜下计数300个细胞内的含乳胶颗粒的PMN数和不含乳胶颗粒的PMN数,计算出PMN的吞噬百分率,结果以百分率表示。

1.4.2 PMN超氧阴离子的测定[4] 活杀小鼠,以冷的RPMI1640液冲洗腹腔,取腹腔细胞以淋巴细胞分离液去除淋巴细胞和单核细胞,以不含钙、镁的磷酸盐缓冲液1 000 r/min洗1次,调细胞浓度为1×10^6/ml,取100 μl加入96孔细胞培养板,再加入0.2%(W/V)氯化硝基四唑蓝(NBT)100 μl及佛波酸豆蔻酯(PMA)10 μl,置37 ℃孵箱1 h,离心去除上清,用二甲亚砜(DMSO)150μl溶解蓝色颗粒后,用酶标仪(Bio-Rad 450)测定570 nm处的吸收峰,结果以$D(570)$值表示。以上试剂均为Sigma公司产品。

1.4.3 PMN产生NO能力的测定 参照文献[5]方法进行。

1.4.4 LC增殖功能的检测 无菌操作取小鼠脾脏,研碎后经200目钢丝网和100目尼龙网过滤获得LC,以RPMI1640液1 000 r/min洗1次,调细胞浓度为5×10^6/ml,加入96孔细胞培养板,0.1 ml/孔。加入终浓度5 μg/ml刀豆素A(ConA)。置37 ℃ CO_2培养72 h,在培养结束前16 h加入H^3-TdR,3.7×10^4 Bq/孔。培养终止时用多头细胞收集器,将细胞收于玻璃纤维滤纸上,80 ℃烤干,将滤纸片分别加于液体闪烁瓶,加闪烁液5 ml/瓶,于Beckman-LS6000TA型闪烁计数器(效率为70%)进行计数,每个样品作3复孔,以Bq均值表示结果。

1.5 统计学处理

结果用$\bar{x}\pm s$表示,并用四川大学(华西医科大学)PEMS程序统计软件进行单因素方差分析,以t检验比较各组间差异显著性。

2 结果

2.1 三七皂甙对烫伤小鼠PMN吞噬功能产生分泌超氧阴离子和NO的影响

见表1。

表1 三七皂甙对烫伤小鼠PMN吞噬功能产生分泌超氧阴离子和NO的影响($n=12$)

Tab 1 Effects of *panax pseudoginseng* wall saponins on phagocytosis, superoxide anion and NO secretion of PMNs in scalded mice ($n=12$)

Group	Phagocytosis (%, $\bar{x}\pm s$)	Superoxide anion (%, $\bar{x}\pm s$)	NO (nmol/10^6 PMN)
Control	68.0±8.2*	100	14.70±1.65*
Scald	38.0±3.6	53.8±6.8	65.80±6.35
100 mg	73.0±6.8*	97.4±15.5*	20.76±1.70*
50 mg	66.0±7.2*	89.7±11.6*	25.70±1.85*
25 mg	58.0±6.5*	83.3±10.5*	27.65±2.60*

*: $P<0.05$, *vs* scald group

2.2 三七皂甙对烫伤小鼠LT增殖功能的影响

见表2。

表2 三七皂甙对烫伤小鼠LC增殖功能的影响($n=12$)

Tab 2 Effects of *panax pseudoginseng* wall saponins on LC proliferation in scalded mice ($n=12$)

Group	LC proliferation(Bq)
Control	1568±235*
Scald	628±162
100 mg	1637±237*
50 mg	1434±216*
25 mg	1247±214*

*: $P<0.05$, *vs* scald group

3 讨论

烧伤后机体多功能受损的同时,机体特异性和非特异性免疫功能也受损紊乱,若能寻找到一种或多种药物进行调理,对防治烧伤感染和多器官功能受损,均能起到较好的作用。中医中药是祖国的医学宝藏,有许多中草药具有调理机体特异性和非特异性免疫功能的作用,有待我们去挖掘。故本研究在过去实验的基础上,观察了中药三七皂甙对烫伤小鼠PMN介导的非

特异性免疫功能和LC介导的特异性免疫功能的作用。实验结果显示，烫伤小鼠PMN吞噬功能显著低于正常对照小鼠，只有正常小鼠的55.9%[以正常组的(68.0±8.2)%为100%计算]，说明烫伤小鼠PMN吞噬功能低下。经用三七皂甙治疗后的小鼠PMN吞噬功能有显著的提高，其中大剂量组从(38.0±3.6)%提高到(73.0±6.8)%，中剂量组从(38.0±3.6)%提高到(66.0±7.2)%，小剂量组从(38.0±3.6)%提高到(58.0±6.5)%，提示中药三七皂甙对烧伤后受损PMN吞噬功能的治疗有很好的疗效。小鼠烫伤后PMN产生超氧阴离子的能力只有正常的(53.8±6.8)%，显著低于正常组的小鼠，该结果显示小鼠烫伤后PMN产生分泌超氧阴离子的杀菌功能低下，经用三七皂甙治疗组均有显著的提高烫伤小鼠PMN产生分泌超氧阴离子的杀菌能力。烫伤小鼠PMN产生分泌NO的能力为(65.80±6.35)nmol/10^6 PMN，而正常小鼠仅为(14.70±1.65) nmol/10^6 PMN，说明伤鼠PMN过度活化和过度产生NO，用三七皂甙治疗后的各组PMN产生分泌NO的能力均明显降低，表明三七皂甙对伤鼠PMN过度活化后和过度产生分泌NO均有显著的意义($P<0.05$)。烫伤小鼠LC增殖功能只有正常小鼠的40%，显著低于正常小鼠，表明烫伤小鼠LC介导的免疫功能低下，用三七皂甙治疗后的各组LC增殖功能均恢复到正常或接近正常水平，提示中药三七皂甙具有提高LC介导的免疫功能的作用。另外，将三七皂甙各剂量间作用进行比较，从数据上看大剂量的作用似乎要强一些，但经统计学处理，无统计学意义。

中性粒细胞(neutrophils, PMN)在机体的自身防御系统中发挥作重要的地位，PMN在吞噬病原性微生物或有害异物时可产生大量的超氧阴离子，以杀死和清除病原体或有害异物。当PMN超氧阴离子产生分泌减少或不足时，会造成机体非特异性防御功能的下降；但超氧阴离子产生分泌过度升高，则可造成正常组织细胞的损害。烧伤后易于发生感染和多器官功能损害，与烧伤后非特异性防御功能受损紊乱密切相关。其表现为PMN介导的非特异性免疫防御系统功能低下，有报道[6]证实，烧伤后机体PMN的趋化作用、吞噬功能、产生超氧阴离子杀菌功能等均明显降低。NO是由NO合成酶(NOS)催化L-精氨酸产生，是细胞衍生的一种具有活跃生物化学性质的非蛋白质非多肽的无机小分子物质，参与了机体多种生理及病理过程，影响着多种疾病的发生发展[7]，由于PMN及NO本身的特点，致使PMN产生的NO与机体非特异性免疫防御系统功能联系更为密切，并认为它是一种免疫调节分子[8]，它在细胞免疫、吞噬细胞的杀菌、杀伤肿瘤细胞过程中均起着重要的介导作用[9]。烧伤后机体免疫防御系统功能严重受损，PMN和LC功能紊乱。若对紊乱的PMN和LC功能进行调理，紊乱的功能得到重建或恢复，这对临床防治烧伤并发症的发生有较大的利益。

通过实验，我们认为三七皂甙对烫伤小鼠PMN介导的非特异性免疫功能和LC介导的特异性免疫功能均有较好的调理作用，本实验对临床调理烧伤后受损的PMN介导的非特异性免疫功能和LC介导的特异性免疫功能均有较好的指导意义。

参考文献：

[1] Makinodan T, Kay M M. Age influences on the immune system[J]. Adv Immunol, 1980, 29: 287-330.

[2] Antonaci S, Jirillo E, Ventura M T, *et al*. Nonspecific immunity in aging: deficiency of monocyte and polymorphonuclear cell mediated functions [J]. Mech Ageing Dev, 1980, 24(3): 367-375.

[3] Grisham M B, Ware K, Gilleland H E Jr, *et al*. Neutrophil mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats[J]. Gastroenterology, 1992, 103(4): 1260-1266.

[4] 徐叔云，卞如濂，陈　修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1991. 1218-1221.

[5] 罗中华，蔡绍丽，何保斌，等. 三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞产生NO和TNF的作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：664-666.

[6] Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies[J]. Life Sci, 1989, 44(22): 1655-1664.

[7] Palmer R M, Ferrige A G, Monada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor[J]. Nature, 1987, 327(6122): 524-526.

[8] Billiar T R, Curran R D, Harbrecht B G, *et al*. Modulation of nitrogen oxide synthesis *in vivo*: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage[J]. J Leukoc Biol, 1990, 48(6): 565-569.

[9] Moncada S, Higgs E A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance[J]. Eur J Clin Invest, 1991, 21(4): 361-374.

（编辑　陈聪连）