

- for off – pump left ventricular reconstruction following left ventricular aneurysm[J]. Heart Surg Forum, 2006, 9(5): E786 – 791
- 8 Saab G, Dekemp RA, Ukkonen H, *et al.* Gated fluorine 18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography: determination of global and regional left ventricular function and myocardial tissue characterization [J]. J Nucl Cardiol. 2003, 10(3): 297 – 303
- 9 Hongxing W, Congna T, Thomas H, *et al.* The impacts of severe perfusion defects, akinetic/dyskinetic segments, and viable myocardium on the accuracy of volumes and LVEF measured by gated 99mTc – MIBI SPECT and gated ¹⁸F – FDG PET in patients with left ventricular aneurysm: cardiac magnetic resonance imaging as the reference [J]. Journal of Nuclear Cardiology, 2014, 21(6): 1230 – 1244
- 10 Noboru T, Kazuhiro K, Ikuo Y, *et al.* Experimental pig model of old myocardial infarction with long survival leading to chronic left ventricular dysfunction and remodeling as evaluated by PET[J]. J Nucl Med, 2012, 52(5): 761 – 768
- 11 王建飞. 实验动物饲养管理和使用指南[M]. 8版, 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 31 – 129
- 12 Tuzun E, Oliveira E, Narin C, *et al.* Correlation of ischemic area and coronary flow with ameroid size in a porcine model [J]. J Surg Res, 2010, 164(1): 38 – 42
- 13 Herrmann JL. Do ameroid constrictors reliably occlude porcine coronary arteries? [J]. J Surg Res, 2010, 161(1): 36 – 37
- 14 Ghesani M, Depuey EG, Rozanski, *et al.* Role of ¹⁸F – FDG positron emission tomography (PET) in the assessment of myocardial viability [J]. Echocardiography, 2005, 22(2): 165 – 177
- (收稿日期: 2015 – 01 – 12)
(修回日期: 2015 – 01 – 23)

人参皂甙 Rd 对结核感染后中性粒细胞的保护作用

王雯菁 冯国栋 赵 青 朱 旗 张 敏 刘 扬 史 明 赵 钢

摘 要 **目的** 研究人参皂甙 Rd (ginsenoside Rd) 对健康成年人外周血、结核感染模型的中性粒细胞 (PMN) 凋亡率的影响。**方法** 提取健康成年人外周血中 PMN, 分为 3 组: ①组: PMN 与人参皂甙 Rd 共培养; ②组: PMN 与人型结核分枝杆菌减毒株 (H37Ra) 和人参皂甙 Rd 共培养; ③组: PMN 与人体皮下注射用卡介苗 (BCG) 和人参皂甙 Rd 共培养。各组对照组分别加入等体积的丙二醇。3 组 PMN 分别培养 24、48h, 采用流式细胞术检测 PMN 凋亡率。**结果** 各组培养 24h 后, 人参皂甙 Rd 浓度为 100 μmol/L 时 PMN 凋亡率较对照组明显降低 ($P < 0.05$); 培养 48h 后, ①组与 ③组 PMN 于人参皂甙 Rd 浓度为 100 μmol/L 时凋亡率较对照组显著降低 ($P < 0.05$); 与 ②组比较差异无统计学意义。**结论** 高浓度的人参皂甙 Rd 能够抑制正常中性粒细胞和结核感染模型中性粒细胞的凋亡, 提高细胞存活率, 延长细胞存活时间。

关键词 人参皂甙 Rd 中性粒细胞 结核 凋亡

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.009

Ginsenoside Rd Protects the Infected with Mtb of Neutrophils. Wang Wenjing, Feng Guodong, Zhao Qing, *et al.* Department of Neurology, Xijing Hospital, The Forth Military Medical University, Shaanxi 710032, China

Abstract Objective To study the influence of Ginsenoside Rd on the apoptosis rate of healthy adults' peripheral blood and the PMN in TB infection model. **Methods** As for the methods, the PMN of healthy adults peripheral blood were taken and divided into three groups. The first group was the co – cultivation of PMN and Ginsenoside Rd. The second group was the co – cultivation of PMN, mycobacterium tuberculosis attenuated strain (H37Ra) and Ginsenoside Rd. The third group was the co – cultivation of PMN, human subcutaneous injection bacillus Calmette Guerin (BCG) and Ginsenoside Rd. All control groups were added the same volume of propylene glycol. The PMN in each group were respectively cultivated for 24h and 48h. Flow cytometry was adopted to detect the apoptosis rate of PMN. **Results** After being cultivated for 24h, when the concentration of Ginsenoside Rd was 100 μmol/L, the apoptosis rate PMN was significantly lower than the control group ($P < 0.05$). After being cultivated for 48h, when the concentration of Ginsenoside Rd was 100 μmol/L, the apoptosis rate of PMN in the first group and the third group significantly reduced ($P < 0.05$). There was no significant difference in the second group. **Conclusion** Ginsenoside Rd in high concentration can inhibit the apoptosis of normal and PMN in TB infection model, improve survival rate of cells and extend the survival time of cells.

Key words Ginsenoside Rd; Neutrophils; Tuberculosis; Apoptosis

肺结核(Mtb)是由吸入含分枝杆菌的飞沫引起的,仍是全球最主要的健康问题之一。中性粒细胞作为机体固有免疫的主要免疫细胞,具有移除死亡的宿主细胞和保护机体免受病原体入侵的功能^[1]。在机体感染结合杆菌后,中性粒细胞早期大量募集至结核感染部位调解和引导对结核病的免疫反应^[2]。PMN到达感染部位后会很快活化并吞噬Mtb。由于PMN本身是机体主要的免疫效应细胞之一,研究推测PMN可能对于Mtb感染的早期控制有重要作用。PMN能在Mtb感染早期迅速吞噬并杀死Mtb,从而促进Mtb的清除^[3]。

人参在中国自2000年前作为一种补益药被广泛使用,并因为其能对人体神经系统和心血管系统产生各种药理作用而被重视^[4~6]。人参皂甙Rd主要是皂苷代谢后在肠道中吸收利用的主要形式之一,对神经系统、心脑血管以及肾功能具有良好的药理作用。研究表明人参皂苷Rd,作为药用植物人参的生物活性物质,能够减少心肌梗死面积,细胞凋亡,血肌酸激酶,乳酸脱氢酶水平在心肌缺血/再灌注损伤后。在新生大鼠心肌细胞,人参皂甙Rd(10mmol/L)抑制ROS的生成,减少细胞凋亡,稳定线粒体膜电位(MMP)减弱的线粒体细胞色素C易位到胞质,并且人参皂甙Rd能够抑制caspase-9、caspase-3的激活,从而起到对细胞的保护作用^[7]。通过测试其对钙通道的影响,神经递质释放和凋亡相关的酶,发现人参皂苷通过对神经系统的不同的中枢神经细胞具有抗氧化和保护作用,特别是在神经元^[8]。在炎症反应方面,有研究报道,在体外脂多糖激活的N9小胶质细胞人参皂甙Rd可以通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)减少生产肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的产生。人参皂甙Rd能显著抑制角叉菜胶注入后的大鼠后爪肿胀。并且能使炎症因子和炎症介质的水平明显下降。此外,人参皂甙Rd有效地减少核NF- κ B和磷酸化I κ B α 的水平,表明在体内人参皂甙Rd具有显著的抗炎作用,这可能是由于其阻断核NF- κ B信号通路^[9]。但对于人参皂甙Rd对于人体固有免疫系统的作用鲜有报道,本实验用流式细胞术检测人参皂甙Rd对正常PMN和Mtb感染后PMN模型的保护作用进行研究。

材料与方法

1. 材料:外周血中性粒细胞来自健康成年志愿者,年龄25~55岁。percoll分离液购自中国GE Healthcare公司。红细胞裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司。胎牛血清

(FBS)购自杭州四季青生物工程材料研究所。改良型RPMI-1640培养基购于HyClone公司人參皂甙Rd,丙二醇,由广东泰禾生物制药有限公司提供。BCG由中国上海生物制品研究有限责任公司提供。人型结核分枝杆菌减毒株H37Ra,购于美国sigma公司。FITC和DMSO购自Merk公司;膜磷脂结合蛋白V和碘化丙啶(annexin V/PI)细胞凋亡双染试剂盒购于美国BD公司,流式细胞仪,美国BD公司产品。

2. PMN的提纯:抽取健康成年志愿者(年龄25~55岁)外周血至肝素抗凝管。用8.5%NaCl溶液与percoll原液按1:9的体积比配制成100%percoll溶液,再与0.85%NaCl溶液按体积比配制70%与60%percoll溶液,依次将3ml70%percoll,3ml60%percoll,5ml白膜层加入15ml离心管中,500×g离心25min。血液分为6层,依次为血浆、单个核细胞层、60%percoll、中性粒细胞层、70%percoll、红细胞层。转移中性粒细胞至离心管中,加入1×PBS离心、洗涤后加入2ml红细胞裂解液,置于4℃,15min裂解残余红细胞。将PMN悬浮于含10%热灭活的胎牛血清、100U/ml青霉素、RPMI-1640的培养液中。用台盼蓝排斥反应法评估了100个中性粒细胞,细胞存活率>95%。瑞氏染色鉴定PMN纯度>96%。

3. 实验分组:为证明Ginsenoside Rd对正常PMN及BCG、H37Ra感染模型的PMN存活、凋亡的影响,将提取的PMN分为3组:①正常PMN组;②H37Ra预处理PMN组;③BCG预处理PMN组。分别观察不同浓度的人参皂甙Rd对PMN存活、凋亡的作用。

4. PMN的培养:将细胞浓度调至 1×10^6 /ml。人参皂甙Rd用丙二醇稀释,终浓度调至1~100 μ mol/L,①组加入人参皂甙Rd放入37℃,5%CO₂培养箱中孵育24h或48h。②、③组预先加入BCG或H37Ra,37℃,5%CO₂孵育30min,再加入人参皂甙Rd,放入37℃,5%CO₂培养箱中孵育24h或48h。

5. PMN凋亡率检测:吸取PMN悬液放入1.5mlPE管,PMN细胞数为 1×10^6 /管;离心、洗涤后加入结合缓冲液100 μ l,再加入FITC-annexin V 5 μ l和PI 5 μ l,室温避光放置15min;加入结合缓冲液400 μ l,流式细胞术检测PMN的凋亡率,FITC阳性细胞记作凋亡细胞。每个样本计数细胞10000个PMN。

6. 统计学方法:实验数据均采用SPSS 18.0软件进行统计分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人参皂甙Rd作用下PMN凋亡率检测:在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧,而在细胞凋亡早期,细胞膜中的PS由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V与PS有高度亲和力,Annexin V进行FITC标记,可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。PI是一种核酸染料,对凋亡中晚期的细胞和坏死细胞,PI能够透

过细胞膜而使细胞核染红。现将 FITC 阳性的细胞记作凋亡细胞。人参皂甙 Rd 与 PMN 共培养 24h 后,流式细胞仪检测 Annexin V 细胞,人参皂甙 Rd 浓度为 50 μ mol/L 时 PMN 凋亡率为 (15.63 $\pm$ 3.49)%,人参皂甙 Rd 浓度为 100 μ mol/L 时 PMN 凋亡率为 (5.83

$\pm$ 1.76)%,与对照组相比 (27.33 $\pm$ 7.34)%,凋亡率明显下降;人参皂甙 Rd 与 PMN 共培养 48h 后,人参皂甙 Rd 浓度为 100 μ mol/L 时 PMN 凋亡率为 (43.70 $\pm$ 10.55)%,明显低于对照组 (70.63 $\pm$ 1.05)%(表 1、图 1)。

表 1 人参皂甙 Rd 作用下 PMN 凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

时间 (h)	对照组	1 μ mol/L	10 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L
24	27.33 $\pm$ 7.34	30.40 $\pm$ 3.76	29.53 $\pm$ 7.12	15.63 $\pm$ 3.49 *	5.83 $\pm$ 1.76 **
48	70.63 $\pm$ 1.05	78.40 $\pm$ 11.05	76.93 $\pm$ 8.65	77.96 $\pm$ 8.10	43.70 $\pm$ 10.55 *

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, ** $P < 0.01$

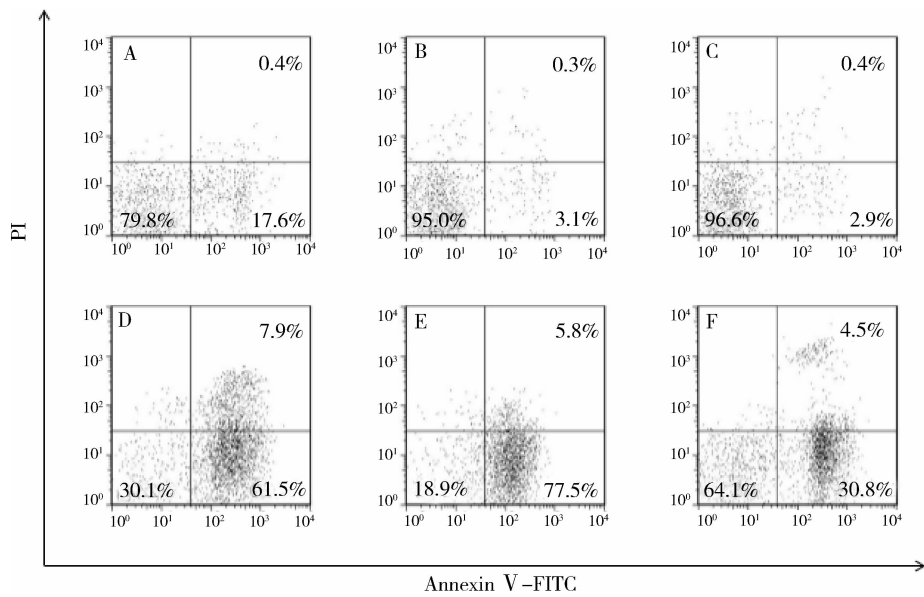


图 1 人参皂甙 Rd 作用下 PMN 凋亡率的比较

A. 丙二醇对照组 24h; B. 人参皂甙 Rd 50 μ mol/L 组 24h; C. 人参皂甙 Rd 100 μ mol/L 组 24h;
D. 丙二醇对照组 48h; E. 人参皂甙 Rd 50 μ mol/L 组 48h; F. 人参皂甙 Rd 100 μ mol/L 组 48h

2. 人参皂甙 Rd 与 BCG 作用下 PMN 凋亡率的检测:将 BCG 加入 PMN 中 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 30min, 再加入人参皂甙 Rd, 结果显示人参皂甙 Rd 浓度为 100 μ mol/L, 24h 后 PMN 的凋亡率为 (19.16 $\pm$

5.25)% 明显低于对照组 (42.20 $\pm$ 6.54)%; 48h 后, PMN 的凋亡率为 (46.30 $\pm$ 10.77)%, 比对照组 (76.30 $\pm$ 10.35)% 明显降低(表 2、图 2)。

表 2 人参皂甙 Rd 与 BCG 作用下 PMN 凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

时间 (h)	对照组	1 μ mol/L	10 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L
24	42.20 $\pm$ 6.54	45.23 $\pm$ 9.25	40.63 $\pm$ 5.83	37.56 $\pm$ 13.02	19.16 $\pm$ 5.25 *
48	76.30 $\pm$ 10.35	71.13 $\pm$ 7.24	65.00 $\pm$ 17.60	71.46 $\pm$ 4.98	46.30 $\pm$ 10.77 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. 人参皂甙 Rd 与 H37Ra 作用下 PMN 凋亡率的检测:将 H37Ra 加入 PMN 中 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育 30min 后加入人参皂甙 Rd, Rd 浓度为 100 μ mol/L,

24h 后 PMN 的凋亡率为 (7.20 $\pm$ 9.37)%, 明显低于对照组 (24.43 $\pm$ 5.70)%, 48h 后各组差异无统计学意义(表 3、图 3)。

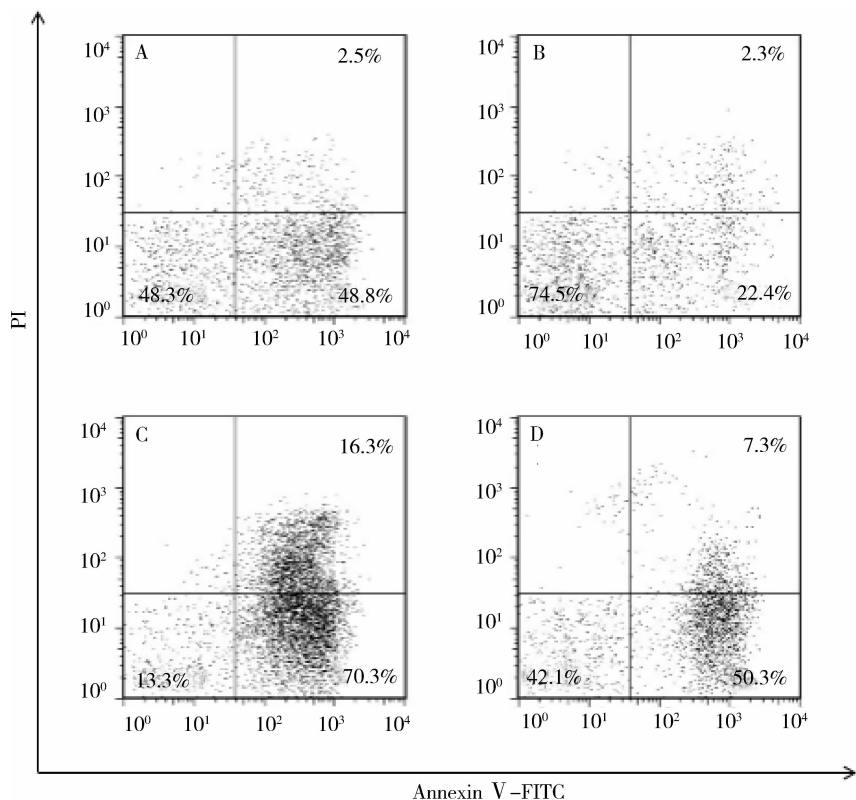


图 2 人参皂甙 Rd 与 BCG 作用下 PMN 凋亡率的比较
A. BCG 预处理、丙二醇对照组 24h; B. BCG 预处理、人参皂苷 Rd 100μmol/L 组 24h;
C. BCG 预处理、丙二醇对照组 48h; D. BCG 预处理、人参皂苷 Rd 100μmol/L 组 48h

表 3 人参皂甙 Rd 与 H37Ra 作用下 PMN 凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \%$)

时间 (h)	对照组	1μmol/L	10μmol/L	50μmol/L	100μmol/L
24	24.43 ± 5.70	21.67 ± 4.27	17.23 ± 1.81	6.63 ± 1.73	7.20 ± 9.37 *
48	55.20 ± 9.50	56.20 ± 13.51	56.40 ± 9.62	53.26 ± 14.38	53.26 ± 14.38

与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

PMN 作为 Mtb 感染机体后的主要免疫细胞之一,感染后外周血中的 PMN 可在 1 ~ 3h 内迁移至 Mtb 感染的部位,迅速吞噬 Mtb 并发生自身活化,构成人体吞噬和杀伤 Mtb 的第 1 道屏障,在急性感染早期起到重要防御作用,因此 PMN 对抵抗 Mtb 感染的作用尤为重要。

笔者的研究结果显示,对于正常人 PMN 加入不同浓度人参皂甙 Rd 后,PMN 凋亡率在人参皂甙 Rd 浓度为 100μmol/L 时显著降低,证明人参皂甙 Rd 对正常 PMN 具有保护作用。在 H37Ra 感染 PMN 模型组中,24h 后 100μmol/L 的人参皂苷 Rd 可以明显抑制细胞凋亡,48h 后对 PMN 保护作用不明显;而对于 BCG 感染 PMN 模型中,24h、48h 100μmol/L 的人参皂甙 Rd 均可以对 PMN 起到明显保护作用。之前研

究表明,随着 PMN 凋亡率升高,PMN 的吞噬、趋化以及 ROS 生成等功能都不同程度地受损。从而提示 PMN 功能与其凋亡相关^[10]。推测人参皂甙 Rd 可以通过延长 PMN 存活时间、提高 PMN 存活率加强 PMN 抗结核感染的功能。

之前的研究证明了人参皂甙 Rd 对预防缺血性脑损的机制,在星形胶质细胞缺血缺氧的条件下,人参皂甙 Rd 可以增加 PI₃K/Akt 或 ERK1/2 的水平,并且证明了人参皂甙 Rd 可以通过这个途径上调谷氨酸转运体,从而促进谷氨酸清除,保护胶质细胞^[15]。中性粒细胞中存在几种与 PI₃K 和 Akt、ERK、NF-κB,黏附受体,TLR4 相关的信号通路,可以暂时延迟中性粒细胞凋亡,确保中性粒细胞从血液迁移至感染部位^[11-13]。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,PI₃K 使其可以激活。Akt 介导的磷酸化使 caspase-9 失去

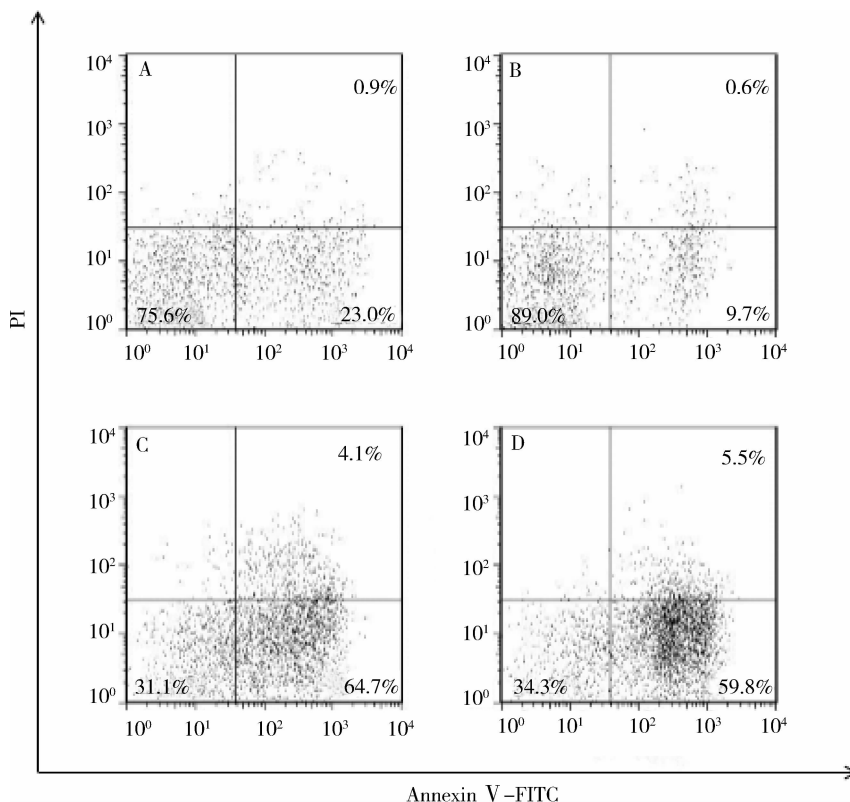


图3 人参皂苷 Rd 与 H37Ra 作用下 PMN 凋亡率的比较

A. BCG 预处理、丙二醇对照组 24h; B. H37Ra 预处理、人参皂苷 Rd 100 μmol/L 组 24h;

C. H37Ra 预处理、丙二醇对照组 48h; D. H37Ra 预处理、人参皂苷 Rd 100 μmol/L 组 48h

活性,防止 Bax 与线粒体结合,从而抑制细胞凋亡。Akt 可以使 GSK3b 失活,防止磷酸化,泛素化和降低 Mcl-1 蛋白酶体水平的促凋亡作用,从而使中性粒细胞寿命的延长^[14]。本实验证明了人参皂甙 Rd 对 PMN 具有保护作用,那么人参皂甙 Rd 对 PMN 的保护作用是通过哪种途径介导实现的?其机制还有待于后续实验来进一步研究。

参考文献

- Robert KA, Jane FA, Elizabeth EG. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection[J]. *Thromb Haemost*, 2014,112(4): 659-665
- Eum SY, Kong JH, Hong MS, *et al*. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB[J]. *Chest*, 2010,137(1):122-128
- Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, *et al*. Neutrophils exert protection in the early tuberculosis granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages[J]. *Cell Host Microbe*, 2012,12(3):301-312
- Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytomedicine - ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations[J]. *Curr Med Chem*, 2009,16(19):2475-2484
- Peng L, Sun S, Xie LH, *et al*. J. T. Ginsenoside Re: pharmacological effects on cardiovascular system[J]. *Cardiovasc Ther*, 2014,26(6): 533-542
- Lu J M, Yao Q, Chen C. Ginseng compounds: An update on their molecular mechanisms and medical applications[J]. *Curr Vasc Phar-*

macol, 2009, 7(3): 293-302

- Yang W, Xu L. Ginsenoside Rd attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via Akt/GSK-3 β signaling and inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway[J]. *PLoS One*, 2013,16(8): e70956
- Ye R, Li N, Han J, *et al*. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. *Neurosci Res*, 2009,64:306-310
- Li W, Yunxin Z, Zhiping W. Inhibitory effect of ginsenoside - Rd on carrageenan-induced inflammation in rats[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2012,90(2): 229-236
- 李英利,陈洋藻,颜光涛. 细胞凋亡对中性粒细胞功能的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2000,16(10):29-30
- Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection[J]. *Immunol Res*, 2009,43(1-3):25-61
- Geering B, Stoeckle C, Conus S, *et al*. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils[J]. *Trends Immunol*, 2013,34(8):398-409
- El Kebir D, Filep JG. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through b2 integrins[J]. *Front Immunol*, 2013,6(4):60
- Rane MJ, Klein JB. Regulation of neutrophil apoptosis by modulation of PKB/Akt activation[J]. *Front Biosci*, 2009,14:2400-2412
- Xiao Z, Ming S, Ruidong Y. Ginsenoside Rd attenuates tau protein phosphorylation via the PI₃K/AKT/GSK-3 β pathway after transient forebrain ischemia[J]. *Neurochemical Res*, 2014,39(7):1363-1373

(收稿日期:2014-12-23)

(修回日期:2015-01-27)