



凉膈散药物血清对脂多糖诱导体外培养巨噬细胞核转录因子- κ B的影响

凉膈散出自宋·《太平惠民和剂局方》，为中医治疗温病常用的清热解毒名方。我们先前对凉膈散进行研究发现该方有降低内毒素温病模型动物血浆肿瘤坏死因子(TNF- α)水平、减轻组织病理损害、改善微循环、降低死亡率等作用，随后的研究发现其抑制内毒素损伤小鼠的肺组织TNF- α 及白细胞介素-6(IL-6)的升高并能有效抑制脂多糖(LPS)诱导的小鼠肺组织核转录因子- κ B(NF- κ B)的活化[1][2][3][4][5]。本研究在以往研究的基础上，应用既可定性又可定量、定位的免疫荧光与激光扫描共聚焦显微镜联用，进一步研究其对NF- κ B活化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

LPS(Sigma公司出品)；兔抗小鼠p65多克隆抗体(Santa Cruz公司出品)；Alex Flour-594驴抗兔抗体(二抗, Molecular Probes公司出品)；TLCK(N-Tosyl-Lys Chloromethyl Ketone, Hydrochloride, Calbiochem公司产品)；激光扫描共聚焦显微镜；昆明种小鼠(雄性, 6周龄)、SD大鼠(雌雄各半, 体质量200~250 g)均购自南方医科大学实验动物中心。

1.2 凉膈散药物血清制备

1.2.1 煎液制备 凉膈散处方：大黄12 g，青海产蓼科植物大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)的干燥根；芒硝12 g，广西产硫酸盐类矿物芒硝族芒硝(NATRII SULFAS)经加工精制而成的结晶体；连翘24 g，安徽产木犀科植物连翘(*Forsythia suspense* Vahl)的干燥成熟果实；栀子6 g，湖南产茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实；黄芩6 g，安徽产唇型科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi.)的干燥根；薄荷6 g，广西产唇型科植物薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)的干燥茎叶；生甘草12 g，内蒙古产豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的干燥根茎。以上处方剂量为成人(70 kg)一日用量。由南方医科大学南方医院中药房提供，南方医科大学中医系中药鉴定室鉴定，均为符合2000版《中国药典》规定并加工炮制合格的饮片。具体煎煮方法如下：加水将饮片浸泡30 min，先煮连翘、黄芩、栀子、甘草，沸腾10 min后加入大黄及薄荷再煎煮10 min，二煎沸腾后继续煎煮20 min，合并煎液，4层无菌纱布过滤，芒硝最后纳入药液中充分溶解，最后浓缩成含生药3 g/ml，置4 °C冰箱保存备用。

1.2.2 药物血清制备[6][7] SD大鼠随机分为空白血清组和凉膈散药物血清组，每组10只，每组均雌雄各半。为达到在体外反应体系中与体内相当的血药浓度，以相当于等效剂量10倍量灌胃，即按2.3 ml/100 g体质量灌药，1次/d，连续给药7 d，于末次给药(灌药前禁食不禁水12 h)90 min后，20%乌拉坦腹腔麻醉，腹主动脉无菌采血，以3 000 r/min离心10 min，无菌分离血清后，0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌，-80 °C冰箱保存备用。空白血清的制备：以同等量蒸馏水灌胃，余同前。

1.3 腹腔巨噬细胞的采集、培养和处理

用颈椎脱位法处死小鼠，常规消毒。用RPMI1640液冲洗小鼠腹腔，收集冲洗液，以1 500 r/min离心5

min。弃上清，加入含10%小牛血清的RPMI1640培养液并混匀，调整细胞浓度为 0.1×10^6 /ml备用。实验共设10个组：即阴性对照组，正常对照组，LPS刺激组，抑制剂TLCK组，药物血清高、中、低剂量组，空白血清高、中、低剂量组。每组作4个培养皿，将该巨噬细胞悬液加入3.5 cm培养皿中央孔中(用前先在中央孔中加FN 100 μ l处理2 h)，100 μ l/孔，置CO₂培养箱中，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养2 h后，弃上清及非贴壁细胞(贴壁细胞为巨噬细胞)。重新加入含10%小牛血清的RPMI1640培育12 h后细胞功能恢复，这时加入反应体系培育2 h。各组反应体系的设立：药物血清高、中、低组为1 ml RPMI1640培养液中分别含药物血清200、100、50 μ l；空白血清高、中、低组为1 ml RPMI1640培养液中分别含空白血清200、100、50 μ l；阴性对照组、正常对照组及LPS刺激组及抑制剂TLCK组为1 ml RPMI1640培养液含10%小牛血清，其中抑制剂TLCK组另添加TLCK (10 μ g/ml)。各组细胞(阴性对照组、正常对照组加入等量的无菌PBS)加LPS (LPS终浓度均为10 μ g/ml)刺激1 h后，终止反应，进行免疫荧光染色。

1.4 免疫荧光化学染色

去除培养液，1 \times PBS缓冲液洗2次；4%多聚甲醛固定10 min，1 \times PBS缓冲液洗1次、再经0.2%TritonX-100 PBS液洗2次，每次都是5 min(下同)；0.1%硼氢化钠浸泡5 min，0.2% TritonX-100 PBS液洗3次；加1:100兔抗小鼠p65抗体60 μ l(抗体稀释液为含3%小牛血清白蛋白的PBS)培育90 min(阴性对照组不加一抗，加等量抗体稀释液)，0.2% TritonX-100 PBS液洗3次；加1:500荧光标记驴抗兔二抗(Alex Flour 594驴抗兔抗体)培育45 min，0.2% TritonX-100 PBS液洗2次；加1:200 DAPI Rodamine染色8 min，0.2% TritonX-100 PBS液洗2次，保留第2次冲洗的部分0.2% TritonX-100 PBS液，盖上盖玻片，立即开始观察。

1.5 观察方法

将染色后的培养皿倒置于LSCM显微镜下进行观察，选择参数如下：LaserPower为15 mW；ScanningStrength为40%；ScanningSpeed为400 MHz；双重荧光标记波长为594/504(DAPI Rodamine)，选数值孔径为1.4的100倍油镜观察，图像存为1 024 \times 1 024像素。图像经Leica QN软件处理，转化为数据即为荧光强度值(代表p65的表达量)。

1.6 统计学处理

数据经SPSS10.0软件处理，采用One-way ANOVA及Tamhane方法检验。

2 结果

2.1 免疫荧光染色图像观察

从LSCM上采集的图像(图1)可以看出未经LPS刺激的细胞p65主要表达于胞质中，核内仅见少量表达(正常对照组)；经LPS刺激1 h后，核内表达呈明显增强(LPS刺激组)。抑制剂组及药物血清高、中、低剂量组核内表达均增强，但较LPS刺激组弱；空白血清高、中、低组核内表达增强也较明显；阴性对照组仅见模糊细胞影，染色不明显。

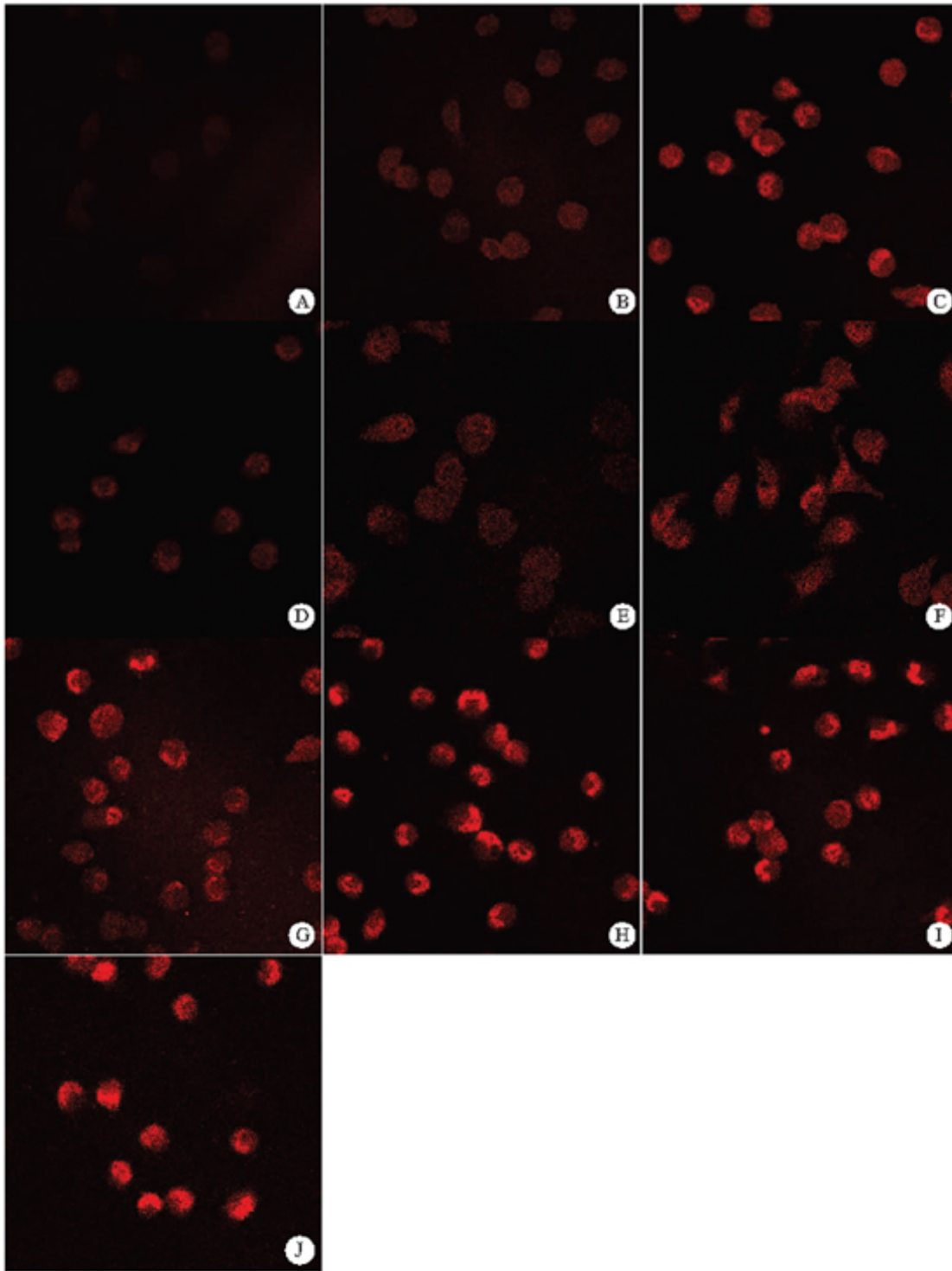


图1 各组巨噬细胞p65表达(免疫荧光法,原放大倍数:×1000)

Fig.1 p65 expression of macrophages in different groups (Immunofluorescence, original magnification: ×1 000)

A: Blank control group; B: Negative control group; C: LPS-stimulated group; D: TLCK group; E: High-dose Liangge San serum group; F: Mid-dose Liangge San serum group; G: Low-dose Liangge San serum group; H: High-dose blank serum group; I: Mid-dose blank serum group; J: Low-dose blank serum group

2.2 细胞免疫荧光染色图像分析

每组从采集的图像视野中随机采集100个细胞(每个培养皿采25个细胞),用 Leica QN软件测定各个细胞核的荧光强度值并经SPSS10.0软件处理(表1)。可以看出LPS刺激后,巨噬细胞核内p65的量明显升高,LPS刺激组与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。而抑制剂TLCK组、不同剂量凉膈散组的p65的量均小于LPS组,以TLCK及高剂量凉膈散组最低,中低剂量组次之,不同剂量血清组之间也有显著性差异($P < 0.01$),呈现

剂量依赖性关系。各组与LPS组比较均有显著性差异($P < 0.01$), 而不同剂量空白血清组与LPS组比较无显著差异($P > 0.05$), 不同剂量空白血清组之间也无显著性差异($P > 0.05$)。显示不同剂量药物血清均有抑制LPS所致的细胞核内p65升高的作用, 而空白血清则无此作用。

表 1 各组细胞核荧光强度值 ($n=100, \bar{x} \pm s$)
Tab.1 Fluorescence intensity in
the nuclei of the macrophages in different groups
 ($n=100, Mean \pm SD$)

Group	Fluorescent intensity
Negative control	15.90±3.84
Blank control	29.64±6.98
LPS stimulate	112.92±20.20
TLCK	59.25±18.59
High-dose <i>Liangge San</i> serum	59.99±19.14
Mid-dose <i>Liangge San</i> serum	84.20±20.54
Low-dose <i>Liangge San</i> serum	95.85±18.99
High-dose blank serum	121.69±18.70
Mid- dose blank serum	116.45±20.59
Low-dose blank serum	116.22±21.79

$F=455.98, P<0.01$

3 讨论

机体在受到细菌感染时, 细菌产生大量的LPS, LPS是诱导产生炎症介质的有效刺激物。LPS进入体内, 对宿主各系统、器官产生广泛的影响, 诱导机体产生多种炎症介质的瀑布反应, 使机体出现感染和中毒性休克、呼吸窘迫综合症、甚至多器官功能衰竭。LPS的这些作用是通过一系列细胞信号转导途径实现的。NF- κ B信号通路是与机体免疫及炎症反应最为密切相关的信号通路, 该信号通路控制了绝大多数的免疫炎性基因的转录。多种外界刺激因素如致分裂原、细菌LPS、病毒及相关蛋白、紫外线等作用于细胞后通过多种蛋白激酶介导的信号级联反应最终导致NF- κ B分子的活化, 活化后其亚基p50、p65由细胞质进入细胞核内, 与其目的靶基因的启动子或增强子上特定的 κ B系列特异结合, 启动和调控一系列参与炎症反应的炎症因子表达(如促炎细胞因子、黏附分子、环氧化酶等), 从而介导多种炎症性疾病的产生[8][9]。因此要想减轻LPS所造成的损伤, 抑制NF- κ B的活化是非常重要的核心环节。中医解毒理论认为中药解毒的重要途径是通过影响炎症因子的表达实现的[10]。文献报道NF- κ B抑制剂或某些递质(如NO)有抑制NF- κ B的活化或影响其亚基入核进而影响炎症因子表达的作用[11][12]; 凉膈散有抑制炎症因子的表达的作用[1][2]。本研究主要通过血清药理学的方法研究凉膈散药物血清对LPS诱导的小鼠腹腔巨噬细胞核内p65表达的影响, 探讨凉膈散抑制炎症反应、解毒的细胞信号转导机制。

检测组织和细胞中核转录因子激活的方法包括免疫细胞化学、免疫印迹、凝胶迁移率分析法、原位杂交等, 其中免疫荧光法及激光扫描共聚焦显微镜联用不但可以定性, 而且可以定位、定量, 因而近年来被广泛采用。从实验结果可以看出LPS刺激后p65从胞质进入胞核, 与空白组比较胞核的p65量显著升高, 而不同剂量的凉膈散药物血清均有减少胞核p65量的作用, 并呈剂量依赖性关系。因而可以推测凉膈散药物血清有抑制NF- κ B活化或抑制p65从胞质向胞核转移的作用, 进而可以推测凉膈散抑制炎症因子的表达其中重要的途径是通过抑制NF- κ B激活实现的。表明凉膈散减轻LPS对机体损伤作用机理可能是通过抑制组织细胞NF- κ B的活性, 从而抑制各种炎症细胞因子的产生, 起到解毒作用。至于凉膈散是直接抑制NF- κ B活化、入核, 还是通过抑制其上游通路实现的, 还需继续研究。本研究发现高剂量凉膈散药物血清与抑制剂TLCK作用强度相似, 但TLCK作用

途径单一且副作用大,尚不能很好应用于临床,而凉膈散除了抑制NF- κ B作用外,还有许多抑制炎症反应的途径,为多靶点多途径的作用,而且在正确应用的前提下无明显副作用,显示了其独到的优越性。

参考文献:

[1] 余林中, 吴锐, 黄泳, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型解毒作用研究[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(5): 4-6.

Yu LZ, Wu R, Huang Y, et al. The study of Liangge San on the effect of toxin elimination in endotoxic epidemic febrile disease (EFD) model rabbits[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1996, 12(5): 4-6.

[2] 余林中, 吴锐, 沈映君, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型体温、血浆TNF- α 及脑脊液PGE₂、cAMP含量的影响[J]. 中国中医药科技 (Chin J Tradit Chin Med Scitech), 1996, 3(4): 26-7.

[3] 余林中, 雷载权, 沈映君, 等. 凉膈散对小鼠内毒素血瘀模型微循环的影响[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(2): 1-3.

Yu LZ, Lei ZQ, Shen YJ, et al. The effect of Liangge San on the microcirculation of blood stagnation model mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1996, 12(2): 1-3.

[4] 余林中, 黄泳, 吴锐, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型的化瘀作用研究[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(1): 7-9.

Yu LZ, Huang Y, Wu R, et al. The study of Liangge San on the effect of removing blood stagnation in endotoxic epidemic febrile disease (EFD) model rabbits[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1998, 14(1): 7-9.

[5] 林慧, 余林中, 秦清和. 凉膈散对内毒素肺损伤小鼠肺组织核因子- κ B活化的影响[J]. 四川中医 (J Sichuan TCM), 2004, 22(7): 16-8.

[6] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理 (New Drugs Chin Mater Med Clin Pharmacol), 1999, 10(2): 95-7.

[7] 王淑杰, 张秀英, 卢立波. 中药血清药理学研究方法及其应用[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(3): 35-7.

[8] 邢飞跃, 赵克森, 姜勇. NF- κ B的信号通路与阻断策略[J]. 中国病理生理杂志 (Chin J Pathol), 2003, 19(6): 849-55.

[9] 姜勇, 金丽娟. 休克的细胞和分子基础[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 143-4.

[10] 余林中, 郑有顺. 中医解毒法研究思路[J]. 中药药理与临床 (Pharmacol Clin Chin Mater Med), 1998, 14(5): 39-41.

[11] Clancy RM, Gomez PF, Abramson SB. Nitric oxide sustains nuclear factor kappa B activation in cytokine-stimulated chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(7): 552-8.

[12] Zhou JY, Tang FD, Mao GG, et al. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF- κ B in THP-1 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(4): 480-4.

参考文献:

[1] 余林中, 吴锐, 黄泳, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型解毒作用研究[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(5): 4-6.

Yu LZ, Wu R, Huang Y, et al. The study of Liangge San on the effect of toxin elimination in endotoxic epidemic febrile disease (EFD) model rabbits[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1996, 12(5): 4-6.

[2] 余林中, 吴锐, 沈映君, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型体温、血浆TNF- α 及脑脊液PGE₂、cAMP含量的影响[J]. 中国中医药科技 (Chin J Tradit Chin Med Scitech), 1996, 3(4): 26-7.

[3] 余林中, 雷载权, 沈映君, 等. 凉膈散对小鼠内毒素血瘀模型微循环的影响[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(2): 1-3.

Yu LZ, Lei ZQ, Shen YJ, et al. The effect of Liangge San on the microcirculation of blood stagnation model mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1996, 12(2): 1-3.

[4] 余林中, 黄泳, 吴锐, 等. 凉膈散对家兔内毒素温病模型的化瘀作用研究[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(1): 7-9.

Yu LZ, Huang Y, Wu R, et al. The study of Liangge San on the effect of removing blood stagnation in endotoxic epidemic febrile disease (EFD) model rabbits[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1998, 14(1): 7-9.

[5] 林慧, 余林中, 秦清和. 凉膈散对内毒素肺损伤小鼠肺组织核因子-KB活化的影响[J]. 四川中医 (J Sichuan TCM), 2004, 22(7): 16-8.

[6] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理 (New Drugs Chin Mater Med Clin Pharmacol), 1999, 10(2): 95-7.

[7] 王淑杰, 张秀英, 卢立波. 中药血清药理学研究方法及其应用[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(3): 35-7.

[8] 邢飞跃, 赵克森, 姜勇. NF-KB的信号通路与阻断策略[J]. 中国病理生理杂志 (Chin J Pathol), 2003, 19(6): 849-55.

[9] 姜勇, 金丽娟. 休克的细胞和分子基础[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 143-4.

[10] 余林中, 郑有顺. 中医解毒法研究思路[J]. 中药药理与临床 (Pharmacol Clin Chin Mater Med), 1998, 14(5): 39-41.

[11] Clancy RM, Gomez PF, Abramson SB. Nitric oxide sustains nuclear factor kappa B activation in cytokine-stimulated chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(7): 552-8.

[12] Zhou JY, Tang FD, Mao GG, et al. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(4): 480-4.

[回结果列表](#)