

dependent expression of HERG1 and HERG1 B isoforms in tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2947-2955.

- [14] HOFMANN G, BERNABEI P A, CROCIANI O, *et al.* HERG K⁺ channels activation during 1 integrin mediated adhesion to fibronectin induces an up regulation of vb3 integrin in the preosteoclastic cell line FLG 29. 1 [J]. *J*

Biol Chem, 2001, 276: 4923-4931.

- [15] BEETON C, PENNINGTON M W, WULFF H, *et al.* Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1. 3 channels for therapy of autoimmune diseases[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67: 1369-1381.

雷公藤内酯醇对内毒素激活

小鼠腹腔巨噬细胞分泌促炎递质 NO 和 IL-6 的影响*

杨帆¹, 白祥军¹, 刘开俊¹, 杨业金², 曾叶²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院创伤外科; 2. 生化与分子生物学系, 武汉 430030)

[摘要] 目的 观察雷公藤内酯醇(TP)对内毒素(LPS)激活小鼠腹腔巨噬细胞(MΦ)分泌促炎递质一氧化氮(NO)和白细胞介素-6(IL-6)的影响。方法 分离纯化 MΦ, 用 LPS 激活, 与不同浓度 TP 进行培养, 以 Griess 试剂检测培养上清液中的 NO 含量; 以 ELISA 法检测培养上清液中的 IL-6 的浓度。结果 TP 在浓度 0.01 ~ 10.00 μg · mL⁻¹ 范围内, 时间 4 ~ 24 h 范围内, 对 MΦ 产生 NO 具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈剂量和时间依赖关系; TP 在浓度 0.001 ~ 10.000 μg · mL⁻¹ 范围内, 时间 12 h, 对 MΦ 产生 IL-6 具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系。结论 TP 可以抑制被 LPS 激活的 MΦ 活性, 具有高效低毒的抗炎作用。

[关键词] 雷公藤内酯醇; 内毒素; 巨噬细胞; 一氧化氮; 白细胞介素-6

[中图分类号] R286; R392. 114

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)01-0009-04

Effect of Triptolide on Secretion of Inflammatory Cellular Factor NO and IL-6 in Mice Peritoneal Macrophage Activated by Lipopolysaccharide

YANG Fan¹, BAI Xiang-jun¹, LIU Kai-jun¹, YANG Ye-jin², ZENG Ye² (1. *Department of Traumatic Surgery Affiliated with Tongji Hospital*, 2. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*)

ABSTRACT Objective To study the effect of triptolide(TP) on NO and IL-6 of peritoneal elicited macrophage(MΦ) activated by lipopolysaccharide(LPS) in mice. **Methods** The peritoneal elicited macrophage were separated, purified and activated by LPS in mice, then cultured in vitro with a series concentration of TP. The activity of NO and level of IL-6 in cellular supernatants were determined by Griess reagent and ELISA, respectively. **Results** The activity of NO in MΦ was significantly inhibited ($P < 0.01$) by TP(0.01 - 10.00 μg · mL⁻¹) during 4 - 24 h in a time and dosage dependent manner; The level of IL-6 was obviously decreased ($P < 0.01$) by TP(0.001 - 10.000 μg · mL⁻¹) in 12 h in a dose-dependent way. **Conclusion** TP could inhibit the NO activity and IL-6 level in macrophage activated by LPS, and it has strong anti-inflammatory effects with low toxicity.

KEY WORDS Triptolide; Lipopolysaccharide; Macrophage; Nitrogen monoxidum; Interleukin-6

雷公藤作为中药在治疗自身免疫性疾病、肾病综合征、癌症等方面疗效显著^[1], 但同时亦有大量研究表明其有效剂量和中毒剂量相接近, 且毒性作用较大^[2], 所以雷公藤的广泛应用一直受到限制。雷公藤由生物碱、二萜类和三萜类等多种化学成分组成, 研究表明各种成分均具有不同程度的抗炎、抗肿瘤和免疫抑制等活性。因此, 如何在不影响雷公藤疗效的基础上, 寻找毒性作用最小的有效成分, 成为近年来的研究热点。而雷公藤内酯醇(triptolide, TP)是从雷公藤中

新近分离出的一种二萜内酯类单体化合物, 笔者在本实验中以体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞(MΦ)为细胞模型, 观察 TP 对 MΦ 分泌一氧化氮(NO)和白细胞介素-6(IL-6)的量效和时效影响, 以及不同浓度 TP 的毒性作用, 为证明 TP 具有较强抗炎作用, 同时毒性作用较小以及今后进一步纯化雷公藤有效成分提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 PRMI-1640 培养基(Gibco 公司), 小牛血

清(武汉大风生物公司),脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma), 噻唑蓝(MTT, Duchefa), 二甲基砒(DMSO, Ameresco), L-谷氨酰胺(上海政翔化学试剂研究所), 雷公藤内酯醇单体(由福建中医院研究所提供, 纯度>99%, 以少量 DMSO 溶解后, 用 0.9% 氯化钠溶液配制成所需浓度, 以 0.22 μm 微孔滤膜除菌待用), Griess 试剂(以纯化水配制 0.1% N-1-萘乙二胺盐, 以 5% 磷酸配制 1% 磺胺嘧啶, 临用前两者等量混合), IL-6 检测试剂盒(深圳晶美生物公司), 其他试剂均用 0.9% 氯化钠溶液配成所需浓度, 0.22 μm 微孔滤膜除菌待用。

1.2 细胞模型 清洁级昆明种小鼠, 8~12 周龄, 体重 22~25 g, 雄雌兼用, 由同济医学院实验动物学部提供。L929 细胞株, 由同济医学院生化与分子生物学系提供。细胞按常规培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱内, 培养液为含 10% 灭活小牛血清、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液。

1.3 巨噬细胞的分离、纯化和培养^[3] 于小鼠腹腔内注射 4 mL PBS, 轻揉其腹部使液体充分流动, 5 min 后处死小鼠, 75% 乙醇消毒其腹部, 收集腹腔液于无菌离心管, 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心机半径 9 cm) 离心 10 min 收集细胞, 用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液悬浮细胞, 调整细胞浓度为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 置于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 4 h, 弃上清, PBS 洗去未粘附细胞, 即为所需巨噬细胞(M Φ)。

每孔加入终浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 以激活 M Φ , 同时加入不同剂量的 TP 使其终浓度分别达到 0.001, 0.010, 0.100, 1.000, 10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每个浓度 6 个复孔, 并以 0.9% 氯化钠溶液作为空白对照(含同等量 DMSO)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 和 12 h 后, 取培养上清液测定 NO 含量及 IL-6 活性。同时加入终浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TP, 细胞培养 1, 4, 12, 24 h 后测定

[收稿日期] 2009-01-13

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目(基金编号: 30070899)

[作者简介] 杨帆(1981-), 男, 湖北武汉人, 在读医学博士, 主要从事创伤外科临床和科研工作。电话: 027-83663813, E-mail: yf_tjh@163.com。

[通讯作者] 白祥军(1963-), 男, 湖北北京山人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 医学博士, 主要从事创伤外科临床和科研工作。电话: 027-83663669, E-mail: baixiangjun@hotmail.com。

NO 含量。

1.4 NO 产生量检测^[4] 采用 Griess 试剂比色法进行检测。取 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚硝酸钠等倍稀释后加入等体积的 Griess 试剂混合, 室温 10 min 后, 于酶标检测仪下读取 570 nm 波长处的吸光度(A 值), 每个样本设 6 个复孔, 取其平均值, 绘制亚硝酸钠浓度-吸光度标准曲线, 并作相关分析, 求出回归方程为: $C = 1\ 035.05A - 10.34$, $r = 0.999\ 0$ ($P < 0.01$)。

取不同处理组的培养上清液 100 μL , 加入等体积的 Griess 试剂混合, 室温 10 min 于酶标检测仪下读取吸光度(A 值), 根据回归方程求出相应的浓度。

1.5 IL-6 浓度的检测^[5] 以 ELISA 法检测, 采用深圳晶美公司检测试剂盒, 严格按照试剂盒说明操作, 将标准品倍比稀释为 6 个浓度: 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。检测相应 A 值(A_{490})绘制标准曲线。检测样品(细胞培养上清液)A 值(A_{490}), 根据标准曲线得出样品 IL-6 浓度。首先将培养的 M Φ 在不同浓度 TP 下培养 12 h, 然后收集上清于不同的试管内待测。从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条, 将不同稀释度的待测上清及 IL-6 标准品加至已包被抗鼠 IL-6 单抗的 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μg , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min; 洗板 4 次, 除空白孔外, 每孔加入生物素化抗体工作液 100 μg , 用封板胶纸封住反应孔, 孵箱温育 60 min; 吸弃孔内液体, 洗涤 4 次, 扣干; 除空白孔外, 每孔加入 100 μg , 避光, 孵箱温育 10~25 min, 每孔加入终止液 100 μg ; 混匀后于酶标仪上读取 490 nm 波长处的吸光度(A 值)。

1.6 锥虫蓝染色法检测培养细胞成活率 制备单个细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 9 滴细胞悬液加 1 滴 0.4% 锥虫蓝溶液混匀, 在 3 min 内分别计数活细胞数和死细胞数。根据下式计算细胞活力: 细胞成活率(%) = [活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数)] $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法 采用 Qstat 统计软件进行两组间配对 t 检验, 实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 TP 有效剂量对小鼠腹腔激活 M Φ 分泌 NO 和 IL-6 的影响 TP 从 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 开始, 对 M Φ 产生 NO 具有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 且随浓度提高而抑制作用增强; TP 从 0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 开始, 对 M Φ 产生 IL-6 具有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 且随浓度提高, 抑制作用增强(表 1)。

2.2 TP 作用时间对小鼠腹腔激活 M Φ 分泌 NO 的影响 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TP 作用 4 h 后即对小鼠腹腔 M Φ 分

泌 NO 产生明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 且呈现时间依赖关系 (表 2)。

2.3 TP 作用小鼠腹腔激活 M Φ 成活率 将 M Φ 与 TP (0.001 ~ 10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作用 24 h 后, 锥虫蓝染色检测细胞成活率 $> 95\%$, 表明 TP 在 0.001 ~ 10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内对 M Φ 无细胞毒性作用。

3 讨论

雷公藤的临床应用历史悠久, 疗效显著。但是由于其毒性作用较大, 目前仅限于治疗风湿性关节炎、肾小球肾炎、红斑狼疮、肾病综合征等少数疾病^[6]。如何在不影响疗效的前提下, 寻找并提取出雷公藤高效低毒的有效成分, 扩大其临床适应症, 不断提高雷公藤的安全性和临床应用价值, 是目前雷公藤相关研究的发展方向。

创伤和感染后, 巨噬细胞广泛参与机体的炎症反应, 是机体免疫系统中最为重要作用一类免疫细胞^[7]。当其受创伤、感染、异物、肿瘤等激活后会导致一系列炎症反应^[8], 产生大量的 NO 和 IL-6。而 NO 和 IL-6 是激活巨噬细胞杀灭病原微生物及肿瘤细胞的主要效应分子, 也是重要的炎症递质, 在炎症反应的发生与发展中起着多种作用, 极具有代表性。过度的炎症反应产生“瀑布效应”, 会导致病理反应和组织损伤, 最终使创伤患者继发生全身炎症反应综合征 (SIRS)、脓毒症和多器官功能衰竭 (MOF)^[9], 加重病情。虽然雷公藤具有较强

的抗炎效果, 但是由于其毒性作用, 临床上应用较少, 笔者也暂未见用于创伤患者的相关报道。

笔者在本研究中以激活的小鼠腹腔巨噬细胞 (M Φ) 为模型, 观察不同浓度 TP 对 M Φ 分泌 NO 和 IL-6 的影响, 并研究其毒性剂量。结果表明, TP 在 0.01 ~ 10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 时间 24 h, 对内毒素激活的巨噬细胞分泌 NO 具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 呈现良好的量效关系; 当终浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TP 与 LPS 激活的小鼠腹腔巨噬细胞共同孵育 1, 4, 12, 24 h, TP 作用 4 h 后, 即对小鼠腹腔激活的巨噬细胞分泌 NO 具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 呈现时间依赖关系; TP 在 0.001 ~ 10.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 时间 12 h, 对内毒素激活的巨噬细胞分泌 IL-6 具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 呈现良好的量效关系; 并且在上述剂量范围内, TP 对巨噬细胞均无细胞毒性作用, 锥虫蓝染色检测培养细胞成活率均 $> 95\%$ 。

综上所述, 雷公藤药理作用广泛, 化学成分复杂, 虽然 TP 含量在雷公藤有效成分测定中最少^[10], 但是能够显著抑制 M Φ 分泌 NO 及 IL-6, 起到较强的抗炎作用, 且毒性作用较小, 浓度达到 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时仍具有较高安全性, 在创伤领域拥有的较好临床应用前景。但是 TP 是否为雷公藤最佳的高效低毒提取物? TP 抑制巨噬细胞分泌促炎介质的具体机制如何? TP 在临床实践中的应用剂量范围为何? 这些还需我们在今后

表 1 TP 作用剂量对小鼠腹腔激活 M Φ 分泌 NO 和 IL-6 的影响

Tab. 1 Effect of the dose of TP on NO and IL-6 production by activated M Φ in mice

$\bar{x} \pm s, n = 6$

TP/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO ₂ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO ₂ 抑制率/ %	IL-6/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6抑制率/ %
0.000	209.48 \pm 0.54	-	1 149.81 \pm 1.01	-
0.001	203.01 \pm 0.66	3.39	758.22 \pm 0.98 ^{*1}	37.09
0.010	110.67 \pm 0.73 ^{*1}	47.33	473.61 \pm 0.77 ^{*1}	60.78
0.100	89.60 \pm 0.23 ^{*1}	53.36	322.58 \pm 0.19 ^{*1}	73.30
1.000	78.78 \pm 0.48 ^{*1}	62.51	210.13 \pm 1.43 ^{*1}	82.59
10.000	40.58 \pm 0.55 ^{*1}	80.69	85.81 \pm 1.10 ^{*1}	92.95

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$

Compared with control group, ^{*1} $P < 0.01$

表 2 TP 作用时间对小鼠腹腔激活 M Φ 分泌 NO 的影响

Tab. 2 Effect of the duration of TP time on NO production by activated M Φ in mice

$\bar{x} \pm s, n = 6$

组别	TP/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1 h	4 h	12 h	24 h
实验组	10	10.02 \pm 0.82	25.00 \pm 0.45 ^{*1}	49.12 \pm 0.11 ^{*1}	99.91 \pm 0.12 ^{*1}
对照组	10	50.02 \pm 0.23	110.24 \pm 0.77	175.22 \pm 0.56	270.36 \pm 0.33

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$

Compared with control group, ^{*1} $P < 0.01$

的研究中进一步探索。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.01.003

[参考文献]

- [1] 李中华,张振家,孙卫红. 雷公藤的临床应用[J]. 医药导报,2003,6(22):76-77.
- [2] 王爱民,罗功名. 雷公藤的毒性研究[J]. 湖北中医杂志,2008,30(6):60-61.
- [3] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:127-128.
- [4] TORREILLES J. Nitric oxide; one of the more conserved and widespread signaling molecules[J]. *Front Biosci*,2001,6:1161-1172.
- [5] 王兰兰. 临床免疫学和免疫学检验[M]. 北京:人民卫生

出版社,2003:146-155.

- [6] 徐央丽. 雷公藤的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(12):1941-1942.
- [7] 蒯守刚,俞用芳,朱启贯. 巨噬细胞研究进展[J]. 中国实验诊断学,2008,12(2):266-267.
- [8] 刘都户,栗水平,张渭,等. 严重创伤后巨噬细胞在炎症介质释放中的作用及其功能调节[J]. 中国急救医学,2001,21(11):630-632.
- [9] 王正国. 创伤基础研究进展[J]. 中华创伤杂志,2005,21(1):6-10.
- [10] 孟玲菊,高峻峰,宋秀荣. 雷公藤有效成分含量的测定[J]. 天津化工,2008,22(4):48-49.

护心灵对急性心肌梗死犬的保护作用*

李明春¹,李秀忠¹,徐江平²

(1. 解放军第401医院药剂科,青岛266071;2. 南方医科大学药学院,广州510515)

[摘要] 目的 观察护心灵片对麻醉犬冠状动脉前降支结扎所致急性心肌梗死的保护作用。方法 结扎麻醉犬左冠状动脉前降支(LAD)造成急性心肌梗死模型,测定犬心肌缺血程度与缺血范围、心肌梗死面积的变化。结果 护心灵片能增加心肌供氧量,减轻心肌缺血程度和范围,缩小心肌缺血面积。结论 护心灵对急性心肌梗死具有一定的保护作用。

[关键词] 护心灵;心肌梗死,急性

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)01-0012-04

The Protective Effects of *Huxinling* on Experimental Acute Myocardial Infarction in Dogs

LI Ming-chun¹, LI Xiu-zhong¹, XU Jiang-ping² (1. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. Department of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effects of *huxinling* on experimental acute myocardial infarction (AMI) induced by ligation of anterior descending coronary artery in anaesthetized dogs. **Methods** The model of acute myocardial infarction was established by ligating left arterial descending artery in dogs. The severity of myocardial ischemia and infarction area were measured. **Results** It was found that *huxinling* increased the myocardium ventilation, attenuated the degree and scale of myocardial ischemia, and decreased the infarction size of dogs. **Conclusion** Compound *huxinling* possesses the protective effects on acute myocardial infarction.

KEY WORDS *Huxinling*; Myocardial infarction, acute

护心灵片原是由广州奇星药业公司研制的中药复方制剂,可用于治疗缺血性心脏病。该药疗效确切,但其处方(原处方由川芎、毛茛萸等8味药组成)药味较多,并含有地方性药材;为使该药起效迅速、质量可控,

根据传统医药理论结合现代药学知识,进行有效物质部位群药理活性筛选后将原8味药筛选为4味;筛方后该药主要有效成分为三七、川芎等所含有的皂苷、生物碱等。该药前期的药理研究提示,护心灵对垂体后叶素以及冠状动脉结扎所致大鼠心肌缺血模型具有一定的保护作用,且疗效迅速,单次给药后效果较为明显^[1,2]。笔者在本实验中通过结扎麻醉犬冠状动脉前降支,研究其对急性心肌梗死的保护作用,为其深入研究和临床应用提供药理学实验基础。

[收稿日期] 2009-03-26

[基金项目] *广东省社会发展攻关中药现代化重大专项(基金编号:A3010201)

[作者简介] 李明春(1965-),男,山东青岛人,主任药师,硕士,从事免疫与分子药理研究。电话:0532-51870086, E-mail:lmc401@163.com。