

表 1 大补阴丸对 CJ-S₁₃₁致敏小鼠 T、B 淋巴细胞活性及血清中抗 ds-DNA、ss-DNA 抗体水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Dabuyin Pill on T, B lymphocytes activities and ds-DNA, ss-DNA antibody levels

in serum of CJ-S₁₃₁ sensitized mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	T 细胞活性 (A ₅₇₀)	B 细胞活性 (A ₅₇₀)	ds-DNA 抗体 (A ₄₉₀)	ss-DNA 抗体 (A ₄₉₀)
正常	0.601±0.807	0.611±0.109	0.183±0.035	0.196±0.036
模型	0.804±0.079**	0.768±0.055**	0.368±0.058**	0.357±0.062**
地塞米松	0.526±0.070*△△	0.509±0.095*△△	0.204±0.053△△	0.217±0.069△△
大补阴丸	0.667±0.091△△	0.657±0.036△△	0.216±0.025*△△	0.231±0.040△△

与正常组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: △△ $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal group; △△ $P<0.01$ vs model group

自身免疫性疾病严重危害人类健康,如糖尿病、甲亢、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肝炎等,目前尚无满意的治疗药物,因此研究和开发低毒高效控制自身免疫性疾病的新药是国际发展趋势。大补阴丸是中医滋补肾阴的经典名方,临床上发现用其治疗某些自身免疫疾病疗效肯定,但目前相关实验研究较少,在肝炎的治疗研究中也未见相关报道。

本实验结果表明,大补阴丸可明显减轻 CJ-S₁₃₁致敏小鼠肝脏自身免疫性炎症反应,而且可降低血清中抗 ds-DNA、ss-DNA 抗体水平。表明大补阴丸对 CJ-S₁₃₁所致自身免疫反应有改善作用。此外,大补阴丸对 CJ-S₁₃₁致敏小鼠异常亢进的脾细胞增殖反应具有明显的调节作用,提示大补阴丸对 CJ-S₁₃₁致敏小鼠自身免疫性病理变化的改善作用与其纠正整体免疫功能失调有关。而且和地塞米松组相比也有其特点,其 T、B 淋巴细胞活性接近正常水平($P>0.05$),而地塞米松组 T、B 淋巴细胞活性降至正常以下($P<0.05$)。提示中药大补阴丸的免疫抑

制作用较缓和。

本实验初步揭示了大补阴丸对自身免疫疾病的免疫调节作用,由于只设了一个成人常用剂量组,所以可在此基础上加设大、小两个剂量,以便摸索出一个最佳剂量。并且可以继续追踪分离具有改善 CJ-S₁₃₁致敏小鼠免疫功能状态的大补阴丸中的活性组分,并以肝炎小鼠为模型进行进一步研究,从而为大补阴丸治疗肝炎等自身免疫性疾病打下基础。

References:

- [1] Su X. The experience of theraping SLE by Shen Peian professor [J]. *J New Chin Med* (新中医), 1998, 30(8): 10-11.
- [2] Liu X L, Chen K, Shi H, et al. Effects of Dabuyin Pill on blood glucose level and immune function in experimental diabetic mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2000, 17(3): 185-187.
- [3] Sun B, Ma B L, Xie Y L. An animal model of autoimmunity induced by formaldehyde treated CJ-S₁₃₁ and freunds complete adjuvant [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1991, 11(5): 257-260.
- [4] Tan Y Y, You L F, Xu Y J. Effect of Dabuyin Pill on immune function in normal mice [J]. *Chin J Exp Clin Immunol* (中国实验临床免疫学杂志), 1999, 11(2): 21-24.

山楂叶抽提物对人脐静脉内皮细胞中过氧化氢的清除作用

兰文军,郑筱祥*

(浙江大学 生物医学工程与仪器科学学院,浙江 杭州 310027)

H₂O₂可引发细胞膜中的不饱和脂肪酸脂质发生过氧化反应、破坏细胞膜;还能诱发细胞凋亡(apoptosis),促使 DNA 链断裂,从而损伤细胞,参与多种病理机制。Chatterjee 等^[1]报道,山楂的叶和花的总抽提物 WS1442 有抗氧化作用。本实验研究了富含黄酮的山楂叶抽提物对人脐静脉内皮细胞(human umbilicus vein endothelial cell, HUVEC)

中 H₂O₂的清除作用,以探讨此抽提物抗氧化作用。

1 材料

流式细胞仪 (FACSort, BD, 美国);微板读取仪 (Microplate reader 550, Bio-Rad, 美国);紫外分光光度计 (GeneQuantPro, Amersham Pharmacia, 英国);PI 染料 (Caltag, 美国);H₂O₂试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒购自南京

收稿日期:2004-06-07

作者简介:兰文军(1971—),男,江苏泰州人,博士研究生,研究方向为肿瘤和心血管药物(中药)的体外筛选与评价。

Tel: (0571) 87932962 E-mail:lanwenjun0522@hotmail.com

* 通讯作者

建成生物工程公司;山楂叶抽提物(含 80% 总黄酮),由浙江省药品鉴定所提供;胰酶购自 Difco 公司(美国);RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司(美国);24 孔培养板为 Nunc 公司产品(丹麦)。

2 方法

2.1 HUVEC 的收集^[2]:健康产妇的脐带来自浙江大学医学院附属妇幼保健院。清洗脐带,0.25% 胰酶消化内皮细胞,温育 15 min 后,PBS 液清洗;将胰酶消化液和 PBS 清洗液 1 300 r/min 离心 10 min,收集细胞;细胞在 24 孔培养板(含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基)中培养至融合状态备用。

2.2 HUVEC 的处理:细胞培养在 24 孔培养板中,除正常组细胞外,其余各实验组加 H₂O₂于细胞培养上清液中(终浓度为 20 mmol/L)并孵育细胞 0.5 h;移去上清液,清洗细胞,重新加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基(完全培养基);山楂叶抽提物大、中、小剂量组分别加入终质量浓度为 20、10、1 μg/mL 山楂叶抽提物。培育 8 h,进行流式细胞术检测(每组 3 复管)、GSH-Px 和 H₂O₂检测(每组 6 复管)。

2.3 H₂O₂ 定量检测:收集 1×10⁶ HUVEC,加入 200 μL 0.5% Triton X-100,摇匀,作用 2 min;2 500 r/min 离心 10 min 后,取上清液 200 μL;按试剂盒说明书,制备空白管、标准管和测定管,微板读取仪于 405 nm 处测定吸光度(A)值。样本中 H₂O₂含量按下式计算。

$$H_2O_2 = (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times \text{标准品浓度} \times \text{测定样本体积}$$

2.4 GSH-Px 活性检测

2.4.1 酶促反应 A 值测定:收集 1×10⁶ HUVEC,加入 200 μL 0.5% Triton X-100,摇匀,作用 2 min;2 500 r/min 离心 10 min 后,取上清 200 μL;按试剂盒说明书,制备非酶管、样本管、标准管和空白管,用微板读取仪于 415 nm 处测定 A 值。

2.4.2 细胞总蛋白定量^[3]:收集 1×10⁶ HUVEC,加入 200 μL 0.5% Triton X-100,摇匀,作用 2 min;加入 Laemmli 样品缓冲液(20% SDS、10% 甘油、60 mmol/L Tris, pH 6.8) 1 mL;样品置 70 ℃ 加热 10 min,2 500 r/min 离心 10 min 后,取上清液;紫外分光光度法测定蛋白含量。

总蛋白 = 1.55 A₂₈₀ - 0.76 A₂₆₀

2.4.3 样本中 GSH-Px 活力:计算公式如下。

$$\text{GSH-Px 活力单位} = (A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{标准管浓度} / (\text{反应时间} \times \text{蛋白含量})$$

2.5 细胞毒(细胞死亡率)检测:收集 1×10⁶ HUVEC;用 PBS 配 50 μg/mL PI 染料浓缩液,取 PI 浓缩液 100 μL,加入到 1 mL 的细胞液中,放置 5 min。采用流式细胞仪携带的 Cell QuestTM软件进行 FL2 红色荧光通道检测和分析。为了设定分析用 Marker,同时准备未染色的细胞。

2.6 统计分析:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 Student-*t* 检验。

3 结果

山楂叶抽提物对 H₂O₂预处理的 HUVEC 中 H₂O₂含量、GSH-Px 活性及细胞毒作用的影响,结果见表 1。10、20 μg/mL 山楂叶抽提物剂量依赖性降低 H₂O₂预处理的 HUVEC 中的 H₂O₂含量,与模型组比较差异显著(*P* < 0.01);且能以非剂量依赖方式激活 HUVEC 的 GSH-Px 活性,与模型组比较差异显著(*P* < 0.01)。同时,本实验结果显示 10、20 μg/mL 山楂叶抽提物能保护 H₂O₂预处理的 HUVEC,细胞死亡率与模型组比较差异显著(*P* < 0.01)。1 μg/mL 山楂叶抽提物组各项指标与模型组比较差异均无显著性。

表 1 山楂叶抽提物对 H₂O₂诱导的 HUVEC 中 H₂O₂含量、GSH-Px 活性和细胞毒的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of hawthorn leaf extract on H₂O₂ level, GSH-Px activity, and cytotoxicity of HUVEC induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μg · mL ⁻¹)	H ₂ O ₂ /μmol	GSH-Px/(U · g ⁻¹)	死亡率/%
正常	—	6.28 ± 0.85**	87.80 ± 8.61**	4.30 ± 0.52**
模型	—	58.83 ± 4.77	224.91 ± 19.47	34.48 ± 1.05
山楂叶抽提物	1	48.18 ± 5.63	246.51 ± 23.60	33.70 ± 1.14
	10	31.04 ± 2.73**	485.39 ± 52.96**	24.40 ± 1.06**
	20	29.34 ± 2.70**	432.71 ± 41.52**	22.88 ± 1.21**

与模型组比较: ** *P* < 0.01

** *P* < 0.01 vs model group

4 讨论

以往研究表明,山楂的叶和花的总抽提物 WS1442 有抗氧化作用^[1],且植物中所含的黄酮被认为是天然的抗氧化剂^[4]。本实验以 H₂O₂诱导的 HUVEC 为模型,研究了山楂叶抽提物(含 80% 总黄酮)对 HUVEC 中 H₂O₂的清除作用,结果显示,山楂叶抽提物降低了 HUVEC 中的 H₂O₂含量,表明山楂叶抽提物可清除 HUVEC 中的 H₂O₂。

消除 H₂O₂的抗氧化防御体系分为酶系和非酶系,前者主要是 GSH-Px、过氧化氢酶(CAT);后者主要是一些蛋白、还原型谷胱甘肽(GSH)和维生素 E^[5]等。GSH-Px 可将三肽的谷胱甘肽转化为其

氧化形式 ($2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$), 由此能清除 H_2O_2 。本实验观察了山楂叶抽提物对 HUVEC 中 GSH-Px 活性的影响。结果显示, 在 H_2O_2 处理 HUVEC 后, 加入富含黄酮的山楂叶抽提物可以促进 GSH-Px 的活性, 表明山楂叶抽提物可通过调控 GSH-Px 活性, 清除 HUVEC 中的 H_2O_2 。

在本实验结果中, 富含黄酮的山楂叶总抽提物可剂量依赖性地降低 H_2O_2 预处理的 HUVEC 中的 H_2O_2 含量。然而, 此抽提物激活 HUVEC 的 GSH-Px 活性却是以非剂量依赖方式。这些结果提示: 富含黄酮的山楂叶总抽提物可能还通过其他途径降低 HUVEC 中的 H_2O_2 含量。本实验还应用流式细胞术, 研究了山楂叶抽提物对 H_2O_2 所致细胞毒的抑制作用。结果显示, 富含黄酮的山楂叶抽提物可以抑制

H_2O_2 所致 HUVEC 的损伤, 提示此抽提物可通过清除 HUVEC 中过量 H_2O_2 而引起细胞保护作用。

References:

- [1] Chatterjee S S, Koch E, Jaggy H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* investigations on the cardio-protective effects of oligomeric procyanidins in a *Crataegus* extract from leaves and flowers [J]. *Arzneimittel-Forsch*, 1997, 47: 821-825.
- [2] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745.
- [3] Harlaw E, Lane D. *Using Antibody: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1999.
- [4] Diana A. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage [J]. *Mutat Res*, 1996, 350: 103-108.
- [5] Hitomi S, Yoichi T, Mitsuko S, *et al.* Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2000, 68: 353-359.

八味锡类散不同途径给药治疗大鼠溃疡性结肠炎的药效对比研究

刘端勇^{1,2}, 赵海梅², 赵 宁³, 赵林华³, 贾红伟³, 肖 诚³, 吕 诚³, 赵红艳³, 何颖辉², 辛增平², 吕爱平^{1,3*}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006;

3. 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

八味锡类散具有清热解暑、消肿止痛之功。常用于内有蕴热、外感时邪引起的瘟疫白喉、咽喉肿痛及溃疡性结肠炎 (UC) 等的治疗, 用于治疗 UC 时常用的方法是 *po* 和灌肠, 但究其两种不同途径给药治疗 UC 的疗效和作用机制对比分析鲜见报道, 本实验即从此角度出发, 对二者进行对比实验研究。

1 材料与方法

1.1 动物及分组: 新西兰家兔 8 只 (中国药品生物制品检定所实验动物中心)。清洁级健康 SD 大鼠 72 只 (北京大学医学部实验动物科学部), 雌雄各半, 体重 (160 ± 10) g, 随机分成正常组、灌胃模型组 (模型 I 组)、灌肠模型组 (模型 II 组)、八味锡类散灌胃治疗组 (治疗 I 组)、八味锡类散灌肠治疗组 (治疗 II 组)、柳氮磺吡啶组 (阳性对照组), 每组 12 只, 常规饲养 3 d 后使用。

1.2 主要药物及试剂: 八味锡类散每支 1 g (北京同仁堂股份有限公司, 批号 4100008); 柳氮磺吡啶, 每片 0.25 g (上海三维制药有限公司, 批号

200403C09); 盐酸氯胺酮注射液 (上海第一生化药业有限公司, 批号 951020); CD4、CD8 单克隆抗体 (BD Biosciences 公司产品); CD4、CD8 免疫组化试剂盒 (SANTA 公司产品); 完全弗氏佐剂 (Sigma 公司产品); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司产品)。

1.3 仪器: Leica 图像分析仪和 Qwin100 图像分析处理系统 (德国 Leica 公司); EPICS (XL) 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司); SABA 全自动生化仪 (意大利 SABA 公司)。

1.4 造模方法: 按文献方法进行^[1]。抗原乳化液的制备: 取家兔分离结肠黏膜, 加适量生理盐水置组织捣碎机中捣碎, 于 -20°C 下保存 24 h 后, 溶冻, 再以 4 000 r/min 离心 30 min, 取其上清液即抗原原液并测得其蛋白质质量浓度 (14.5 g/L)。取抗原原液与等量完全弗氏佐剂混匀为 10 mg/mL 溶液, 然后用注射器反复抽吸、充分乳化, 制成抗原乳化液。大鼠致敏与处理方法: 除正常组外, 其他各组大鼠均予

收稿日期: 2004-05-11

基金项目: 江西省企业创新基金 (2003-239)

作者简介: 刘端勇, 男, 江西中医学院国家工程研究中心 2002 级方剂专业硕士研究生。

* 通讯作者 Fax: (010) 64013896 Tel: (010) 64067611 E-mail: lap@jzjt.com