大黄素和大黄多糖对小鼠脾淋巴细胞内

游离钙浓度的影响[△]

天津医学院药理教研室(300070) 靳珠华* 林秀珍 马德禄

摘要 应用最新一代钙离子荧光指示剂Fura-2/AM测定小鼠脾淋巴细胞内游离钙浓度,探讨大黄有效成分蒽醌类中大黄素和大黄多糖对脾淋巴细胞内游离钙的影响。实验表明:大黄素(终浓度18.5 μ mol/L)对淋巴细胞外钙内流有明显促进作用($P<0.01$);大黄多糖则有抑制内钙释放和外钙内流作用($P<0.01$),且抑制程度与剂量相关。本文为大黄双向调节作用提供理论依据。

关键词 Fura-2/AM 大黄素 大黄多糖 淋巴细胞 Ca^{2+}

大黄有多种有效成分,主要有蒽醌类、多糖、鞣质等。这些成分除有各自独特的药理作用外,彼此之间尚有许多相互协同和拮抗的药理作用^[1],其作用机理尚处研究中。

钙离子对细胞有极其重要的生理作用,如肌肉收缩、细胞分泌、细胞增殖等。细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的高低直接影响着细胞功能^[2]。本实验应用Fura-2/AM就蒽醌类中大黄素和大黄多糖对小鼠淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响进行研究,探讨大黄素和多糖对机体免疫功能的作用,为大黄的双向调节作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: Fura-2/AM: 中国医学科学院药物研究所提供。用二甲基亚砷(DMSO)配成1mmol/L后,分装为20 μ l/只于-20 $^{\circ}$ C存贮备用。

大黄素: Sigma公司出品。 大黄多糖: 天津药物研究院植化室提供。

PRMI 1640培养液: 天津医学院内科基础教研室配制。

其它试剂均市售分析纯。

1.2 动物: 昆明种小鼠雌雄不限,体重20 $\pm$ 2.2g,购自天津药物研究院动物室。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞悬液的制备: 将小鼠断脊髓处死,取出脾脏放入含适量冷Hank's液的小平皿内,将脾脏中间剪断,再用弯针头切赶脾细胞至Hank's液中。用吸管反复轻轻吹吸以冲散细胞,经200目过筛后,将细胞悬液离心(500r/min $\times$ 5)弃去上清液,沉淀用Hank's液反复洗涤2次。

1.3.2 Fura-2/AM负载: 将离心沉淀的淋巴细胞用PRMI 1640培养液制成1 $\sim$ 2 $\times$ 10⁻⁷/ml细胞悬液,加入Fura-2/AM(终浓度5 μ mol/ml)和牛血清蛋白(1mg/ml),置三角瓶内于超级恒温(37 $^{\circ}$ C)水浴中回旋振荡,温孵30min后离心(500r/min $\times$ 5),沉淀用Hank's液洗涤2次,将脾淋巴细胞悬浮在2ml Hank's液中待用。

1.3.3 荧光测定: 测定时或加药后均用吸管吹吸细胞悬液数次,以使细胞分布均匀。加药后除大黄素需平衡10min外,其它均至少平衡30s。本实验采用日本岛津RF-510型荧光分光光度计(附岛津TB-85恒温水浴)。发射波长为490nm,通过快速转换激发波长(4 $\sim$ 6s)记录350/380nm的荧光比率,用公式^[3]计算出细胞内游离钙水平。

* Address: Jin Zhuhua, Department of Pharmacology, Tianjin Medical College, Tianjin

[△]国家自然科学基金资助课题

1.4 统计分析: 各组数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 组间差异采用t检验。

2 结果

2.1 $CaCl_2$ 、KCl对脾淋巴细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响: 在脾细胞悬液内预先加入1mmol/L EGTA螯合细胞外钙, 以排除细胞外微量钙的影响, 此时测得静息状态淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 63.38 ± 14.96 nmol/L ($n=8$)。依次向细胞悬液内加入 $CaCl_2$ (2mmol/L), KCl (120mmol/L), 分别测得细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均较静息时有显著增加 ($P < 0.01$), 此为对照组值; $CaCl_2$ 和KCl相比无统计学意义 (表1)。

2.2 大黄素对淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响: 大黄素(终浓度18.5 μ mol/L)使淋巴细胞在依次加入与对照组相同剂量 $CaCl_2$ 和KCl时, 细胞内游离钙水平明显高于对照组 ($P < 0.01$) (表1)。

表1 大黄素对小鼠淋巴细胞内游离钙浓度的影响 ($\bar{x} \pm SD$, $n=8$)

组别	淋巴细胞内游离钙浓度(nmol/L)				
	静息状态 (1mmol/L EGTA)	H ₂ O	大黄素 (18.5 μ mol/L)	CaCl ₂ (2mmol/L)	KCl (120mmol/L)
对照组	63.38 ± 14.96	77.29 ± 13.68	—	139.12 ± 21.46***	128.76 ± 17.57***
给药组	67.67 ± 13.72	—	80.85 ± 39.37	211.01 ± 41.39*** $\Delta\Delta\Delta$	213.65 ± 37.28*** $\Delta\Delta\Delta$

与静息状态比较 * $P > 0.05$ *** $P < 0.01$, 与对照组比较 $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ (下同)

2.3 不同剂量大黄多糖对淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 影响: 大黄多糖(终浓度分别为0.1, 0.2, 0.3mg/ml)均使淋巴细胞在加入 $CaCl_2$ 和KCl时, 游离钙水平较对照组有显著降低 ($P < 0.01$), 且抑制程度与多糖剂量相关 (表2)。

表2 大黄多糖对小鼠脾淋巴细胞内游离钙浓度的影响 ($\bar{x} \pm SD$, $n=8$)

组别	淋巴细胞内游离钙浓度(nmol/L)				
	静息状态 (1mmol/L EGTA)	H ₂ O	大黄多糖	CaCl ₂ (2mmol/L)	KCl (120mmol/L)
对照组	60.35 ± 11.26	67.96 ± 20.91	—	145.30 ± 19.07***	137.54 ± 14.32***
给药组	64.21 ± 14.24	—	(0.1mg/ml) 55.90 ± 11.41	104.66 ± 22.62*** $\Delta\Delta\Delta$	100.17 ± 21.45*** $\Delta\Delta\Delta$
给药组	63.73 ± 18.66	—	(0.2mg/ml) 39.30 ± 19.69	79.55 ± 29.06 $\Delta\Delta\Delta$	75.91 ± 23.81 $\Delta\Delta\Delta$
给药组	62.10 ± 17.37	—	(0.3mg/ml) 23.24 ± 17.81***	51.96 ± 26.11 $\Delta\Delta\Delta$	51.24 ± 25.75 $\Delta\Delta\Delta$

3 讨论

大黄对机体的调节作用是一个复杂的问题, 其作用因机体状况及药量多寡而异^[4]。本实验观察大黄的不同有效成分大黄素和多糖对同一组织细胞——脾淋巴细胞的作用完全不同。结果显示: 大黄素对静息状态(1mmol/L EGTA存在)脾淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 影响不明显, 而在加入 $CaCl_2$ 和KCl后, 胞内游离钙水平均比对照组有明显增加 ($P < 0.01$), 表明大黄素对淋巴细胞内钙释放影响不大, 而对外钙内流有促进作用。大黄多糖小剂量(0.1mg/ml)对静息期淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显作用, 增加剂量(0.2, 0.3mg/ml)可使胞内游离钙随剂量增加而下降 ($P > 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示大剂量多糖可能有抑制内钙释放作用。当分别依次加入 $CaCl_2$ 和KCl后, 细胞内游离钙浓度较对照组均有显著降低, 表明多糖还具有抑制外钙内流作用, 且抑制效应与剂量相关。

葎草止泻作用的实验研究

开封医专药理教研室(475001) 包翠屏 许启泰 雷玉河 杜钢军

葎草(别名五爪龙,拉拉藤等,开封地区称之为涩拉秧)为桑科植物,主要药理成分为葎草酮,有抑菌、抗病毒作用,临床上主要用于结核病,气管炎等病的治疗。当地民间用其治疗牲畜腹泻和水煎剂泡脚治疗小儿腹泻,疗效甚佳,目前临床未见报道,因此,我们根据腹泻的发病机理作了动物实验。

1 对小鼠腹泻的影响

取健康昆明种小鼠禁食12h,药物组20只灌胃葎草煎剂2g/kg,阳性对照组20只灌胃易蒙停2mg/kg,空白对照组20只灌胃生理盐水20ml/kg,1h后各种组小鼠均灌胃蓖麻油20ml/kg,观察给蓖麻油后8h内各组小鼠拉稀便只数和点数分别为:空白对照组拉稀便14只,点数($\bar{x} \pm SD$) 8.08 ± 3.26 ,阳性对照组拉稀便4只,点数 3.40 ± 0.21 ,药物组拉稀便7只,点数 4.30 ± 0.24 ,经统计学处理,药物组与空白对照组比较 $P < 0.05$,差异显著,与阳性对照组比较差异不明显。

2 对小鼠小肠炭末推进率的影响

取健康小鼠禁食12h,药物组12只小鼠灌胃葎草煎剂2g/kg,空白对照组12只灌胃生理盐水20ml/kg,阳性对照组12只灌胃阿托品5mg/kg,30min后各组小鼠均灌胃5%炭末混悬液20ml/kg,25min后处死小鼠,测量炭末在肠管内移动距离,计算各组小鼠的肠推进率($\bar{x} \pm SD$)分别为:空白对照组 71.08 ± 8.60 ,阳性对照组 4.17 ± 7.82 ,药物组 61.71 ± 10.88 。经统计学处理药物组与空白对照组比较 $P < 0.05$,差异显著。

3 对小鼠胃残留率的影响

取健康小鼠30只,随机平分3组,禁食12h,药物组灌胃葎草煎剂2g/kg,阳性对照组灌胃阿托品5mg/kg,空白对照组灌胃生理盐水20ml/kg,给

药后1h,每只小鼠均灌甲基橙溶液0.2ml,20min后取胃剪开,蒸馏水洗胃,分离上清液,用72型光电分光光度计比色,记录各组小鼠胃液中甲基橙的吸收度,计算各组小鼠胃残留率分别为($\bar{x} \pm SD$):空白对照组 46.71 ± 6.23 ,阳性对照组 63.7 ± 71.82 ,药物组 67.8 ± 11.2 ,经统计学处理,药物组与空白组比 $P < 0.05$,差异显著。

4 对家兔离体肠平滑肌的影响

常规法制备家兔离体十二指肠数段,洗净放入50ml 37°C恒温台氏液浴槽中,用LNS-2A型二道生理记录仪描记肠管活动情况。观察加入100%葎草煎剂0.1ml和1:100000乙酰胆碱0.1ml后肠管活动情况(加各药前用台氏液冲洗肠管4次),结果表明葎草对离体肠有明显的抑制作用,并能对抗乙酰胆碱引起的离体肠自发活动亢进的作用,而且作用优于阿托品。

5 对家兔致热模型的影响

体重2.0~2.5kg健康家兔36只,均分3组,各组家兔均在背部皮下注射0.2%2,4-二硝基酚溶液30mg/kg,1h后药物组灌胃葎草煎剂2g/kg,空白对照组灌胃生理盐水10ml/kg,阳性对照组灌胃复方氨基比林0.08g/kg,30min测体温1次,连续测3h,各组平均体温为:空白组 40.53 ± 0.15 ,阳性对照组 39.71 ± 0.05 ,药物组 40.71 ± 0.15 。由结果看出葎草对家兔用2,4-二硝基酚所致的发热,降温作用不明显,查原因发现葎草酮有二硝基酚样作用,与致热源有协同作用,故此无效。

葎草在我国大部分地区生长普遍,药源充足,采集方便,有待于继续研究其疗效与作用机制,以便开发利用。

(1993-07-07收稿)

Ca^{2+} 在体内能够促细胞的生物活性并参与补体的激活,体外试验表明钙有增强淋巴细胞转化率的效能^[5]。大黄素和多糖是中药大黄的有效成分,实验证明大黄素有促进淋巴细胞外钙内流作用,此作用与增强淋巴细胞免疫功能有关,而多糖则因抑制淋巴细胞内钙释放和外钙内流,故对淋巴细胞免疫功能有抑制作用,这可能是大黄双向调节作用的理论依据之一。

参 考 文 献

- 1 陈琼华. 冶金医药情报, 1990, 7(3): 88
- 2 金有豫. 中国药学杂志, 1992, 27(1): 38
- 3 Gryniewicz G, et al. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(6): 3440
- 4 张启元. 冶金医药情报, 1990, 7(3): 103
- 5 廖清平. 小儿营养及营养性疾病. 天津: 天津科学技术出版社, 1990, 388

(1994-01-07收稿)

**Effects of Emodin and Rhubarb Polysaccharides
on the Cytoplasmic Free Calcium in the
Spleen Lymphocytes of Mice**

Jin Zhuhua, Lin Xiuzhen, Ma Delu

Effects of emodin and rhubarb polysaccharides on the cytoplasmic free calcium in lymphocyte of mice were studied with the latest generation fluorescent indicator Fura-2. Results showed that emodin at a final concentration of $18.5 \mu \text{mol/L}$ promotes the influx of extracellular Ca^{2+} of lymphocytes. Polysaccharides inhibit the influx of Ca^{2+} and the release of Ca^{2+} from intracellular stores and their effects are dose dependent. Therefore, it suggests that emodin can improve the immune function of spleen lymphocytes, but the polysaccharides can inhibit their function. This may be one of the theoretical evidences of the biphasic regulation effects of rhubarb.

(Original article on page 413)

**Study on Cytotoxicity to Mouse 3CL-8 Cell of Friend Erythrocyte by 50%
Dyers Woad (*Isatis tinctoria*) Injection in Vivo and in Vitro**

Shan Fengping, Ion Gresser

The paper presented here provides evidence of cytotoxicity to mouse 3CL-8 cell of friend erythrocyte by 50% *Isatis tinctoria* injection. In vitro this extract of traditional Chinese medicine exerts a strong cytostatic effect directly on mouse 3 CL-8 cell in tissue culture at a minimum concentration of 1:80 dilution. In vivo, when injected subcutaneously and locally on tumor site, it showed some cytotoxic effect on 3 CL-8, but showed no significant cytotoxic effect intraperitoneally.

(Original article on page 417)

**A Comparison of Pharmacological Activities of Effective
Constituents in Zhishi (*Citrus aurantium*)**

Hu Shengshan, Wang Dayuan, Qiu Pin, et al

Pharmacological activities of the effective constituents: essential oils, flavonoids and alkaloids, in fruit of *Citrus aurantium* L. were compared. Blood pressure was increased markedly by transfusion of the alkaloids. Contractions of isolated intestines were inhibited by flavonoids. Essential oils significantly decreased the rate and frequency of writhing syndrome induced by ip acetic acid and spontaneous locomotor activities in the mice with the exception of exciting at first followed by inhibiting the isolated intestines, which displayed analgesia and ocenral inhibition to a certain extent.

(Original article on page 419)

**Studies on Individual Biomass and
Alkaloid Content of Wild *Coptis* on Mt. Emei**

Zhuang Ping, Huang Mingyuan

The structure and trends of individual organic biomass and alkaloid content of two wild *Coptis* species, *C. omeiensis* and *C. gulinensis*, on Mt. Emei, were studied by testing and analyzing samples collected from several points. The results were compared with two cultivated *C.* species, *C. chinensis* and *C. deltoidea*. The accumulative characters and laws of biomass and effective composition of the two wild species were revealed.

(Original article on page 425)