

of test compounds in a high-throughput format. Using this assay, more than 4 000 compounds have been tested in the primary screening and ten compounds showed potential anti-SARS inhibition.

References

- [1] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al*. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953-1966.
- [2] Sutherland M W, Leamonth B A. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase [J]. *Free Rad Res*, 1997, 27(3): 283-289.
- [3] Goodwin C J, Holt S J, Downes S, *et al*. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 179(1): 95-103.
- [4] Morrey J D, Smeed D F, Sidwell R W, *et al*. Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55: 107-116.
- [5] Gieni R S, Li Y, HayGlass K T. Comparison of [^3H] thymidine incorporation with MTT- and MTS-based bioassays for human and murine L-2 and L-4 analysis. Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 187(1): 85-93.

山茱萸鞣质活性部位对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响

吕晓东, 杨 胜, 齐春会, 张永祥, 茹祥斌, 周文霞, 吴 禾, 赵毅民*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘 要: 目的 研究山茱萸免疫抑制活性部位(鞣质活性部位, F-1C)对佐剂性关节炎(AA)大鼠免疫功能的影响。方法 运用淋巴细胞增殖反应、流式细胞技术和酶联免疫吸附试验(ELISA)观察 F-1C 体内和体外对 AA 大鼠免疫功能的影响, 并与环孢素 A (CsA) 和雷公藤多苷片(TW)进行比较。结果 ig 给予 F-1C (30 mg/kg) 对 AA 大鼠原发性足肿胀具有明显的治疗作用, 该作用较 TW 强, 较 CsA 弱; F-1C 对 AA 大鼠低下的脾细胞增殖反应具有改善作用; 对亢进的胸腺细胞增殖反应具有抑制作用。F-1C 体外对 AA 大鼠低下的脾细胞产生 IgG 水平具有明显的促进作用, 并能抑制亢进的胸腺细胞增殖反应。结论 F-1C 能够治疗 AA 大鼠原发足肿胀, 该作用可能与纠正 AA 大鼠的异常的免疫反应有关。

关键词: 山茱萸; 免疫抑制; 佐剂性关节炎; F-1C

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-1023-04

Effect of tannin from *Cornus officinalis* on immune function of adjuvant arthritis rats

LU Xiao-dong, YANG Sheng, QI Chun-hui, ZHANG Yong-xiang, RU Xiang-bin,

ZHOU Wen-xia, WU He, ZHAO Yin-min

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: **Object** To study the therapeutic effect and the possible mechanism of F-1C, a tannin fraction with immunosuppressive effect isolated from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., in the treatment of adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** AA rat model was reproduced to observe the effect on immune function both *in vivo* and *in vitro* and compare with Cyclosporine (CsA) and Tripterygium wilfordii (TW). The effect of F-1C on joint swelling and the immune responses of AA rats were evaluated by lymphocytotoxic reaction, flow cytometry, and ELISA. **Results** F-1C by ig administration to AA rats decreased the primary joint swelling of AA rats, stronger than TW and weaker than CsA, promoted the decreased splenocyte proliferation induced by Con A, and inhibited the augmented thymocyte proliferation induced by Con A in AA rats. The evaluation *in vitro* showed the F-1C inhibited the augmented thymocyte proliferation from AA rats and promoted the deficient IgG produced by splenocyte from AA rats. **Conclusion** F-1C has therapeutic effect on AA rats and the modulating immune function is one possible underlying mechanism.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; immunosuppressive; adjuvant arthritis (AA); F-1C

收稿日期: 2003-12-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目资助 (G1999054401)

作者简介: 吕晓东(1966—), 男, 山东人, 医学硕士, 现为解放军 305 医院药剂科主任, 副主任药师, 主要从事中药复方研究。

Tel: (010) 83086947 E-mail: lxd3052002@yahoo.com.cn

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一类严重危害人类健康的多发性自身免疫性疾病, 目前临床尚无理想的治疗方法。佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠模型是研究 RA 及评价防治药物的常用动物模型之一, 其病理表现与 RA 有一定的相似之处, 如病变关节肿胀、细胞免疫功能异常等^[1]。本研究室发现, 六味地黄汤对 AA 大鼠继发性关节肿胀具有抑制作用, 同时对 AA 大鼠紊乱的细胞免疫反应和体液免疫反应具有调节平衡或恢复作用^[2]。为了研究六味地黄汤免疫调节作用的物质基础, 本研究室通过药理学与植物化学紧密结合的方法, 在活性评价的导向下对六味地黄汤组方的君药之一山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的免疫抑制活性成分进行了追踪分离, 最终获得了以鞣质成分为主的主要活性部位 F-1C。初步免疫药理学研究表明, F-1C 对正常小鼠免疫反应应具有明显的抑制作用^[3]。本实验以 AA 大鼠为模型, 进一步观察 F-1C 对 AA 大鼠免疫功能的影响, 并与目前常用的免疫抑制剂环孢素 A (Cyclosporin A, CsA) 和雷公藤多苷片 (TW) 进行比较。

1 材料

1.1 动物: Wistar 大鼠, 二级, 雌性, 体重 160~200 g, 购自本院动物中心。

1.2 药物: 山茱萸, 所用样品为炙萸肉, F-1C (含鞣质 60%) 制备参见文献^[3]。CsA 购自瑞士山德士制药厂, 批号 19990801; TW 购自上海医科大学红旗制药厂, 批号 990101。

1.3 试剂: 伴刀豆蛋白 A (Con A)、美洲商陆 (PWM)、噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司; 卡介苗购自中国药品生物制品检定所; RPMI-1640 培养粉购自 Gibco 公司; 新生小牛血清 (NCS) 购自本院放射医学研究所; ³H-胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-TdR) 购自中国原子能研究所同位素研究室; 补体, 新鲜豚鼠血清, -80℃ 保存; 十二烷基磺酸钠 (SDS), 分析纯, 购自上海新华化工厂。纯化及辣根过氧化物酶标记兔抗大鼠抗体、兔抗大鼠 IgG 抗体, 购自邦定生物医学公司。

1.4 仪器: 二氧化碳培养箱, 本池理化株式会社; 液体闪烁计数器, LKB 公司; Hitachi 20PR—5 型低温常速离心机, 日本日立公司; 高速离心机, 本院仪器厂; MCC/340 型酶标仪, 美国 FLOW 公司。

2 方法

2.1 AA 大鼠模型的移植建立: 动物随机分为 5 组, 每组 10 只, 除正常对照组外, 其余 4 组按文献

方法^[4]制备 AA 模型: 羊毛脂-石蜡油 (1:2) 加热, 混匀, 高压灭菌后加入卡介苗 (10 mg/mL), 配制成弗氏完全佐剂 (CFA), 大鼠右足垫皮内注射, 每只 0.05 mL。原发病变表现为致炎侧的关节肿胀, 继发病变一般于致炎 12~14 d 后出现, 表现为非致炎侧及双前肢的关节肿胀。3 个给药组于造模后第 2 天分别 ig F-1C (30 mg/kg, 经实验证明此剂量为最佳剂量)、ig TW (20 mg/kg) 和 ip CsA (5 mg/kg), 连续 2 周。正常对照组和模型对照组分别 ig 等量生理盐水。造模后 14 d 取材进行实验。

2.2 淋巴细胞增殖实验 (³H-TdR 掺入法)

2.2.1 体内实验: 参见文献方法^[5]。分别取 2.1 项各实验组动物的脾脏及胸腺组织, 制备脾细胞和胸腺细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^6 /mL, 取 0.1 mL 细胞悬液与等体积 RPMI-1640 液或 Con A (终质量浓度为 2.5 μg/mL) 加到 96 孔培养板内, 5% CO₂ 37℃ 培养箱培养 54 h, 每孔加入 7.4×10^3 Bq ³H-TdR, 继续培养至 72 h 后用多头细胞收集仪收集细胞于玻璃纤维滤膜上, 将滤膜于 80℃ 烘干后用液体闪烁计数器测 ³H-TdR 掺入值 (cpm)。

2.2.2 体外实验: 使用模型组的脾细胞或胸腺细胞悬液 (正常对照组除外), 取 0.05 mL 细胞悬液与等体积 Con A (终质量浓度为 2.5 μg/mL) 加到 96 孔培养板内, 同时分别加入不同质量浓度的 F-1C (10、25、50、100 μg/mL)。³H-TdR 掺入值 (cpm) 检测方法同 2.2.1 项。

2.3 脾细胞培养上清液中 IgG 水平的检测

2.3.1 体内实验: 使用 2.2.1 项制备的各组脾细胞悬液, 细胞浓度为 5×10^6 /mL, 另配制 0.08 mg/mL 的 PWM, 各取 0.5 mL 加入 48 孔培养板中, 5% CO₂ 37℃ 条件下培养 5 d, 离心取上清液备用。用纯化兔抗大鼠 IgG 抗体包被聚苯乙烯板, 依次加入 0.05 mL 脾细胞培养上清液、0.1 mL 酶标抗体, 反应后加入底物, 在酶联免疫检测仪上于 450 nm 处测每孔吸光度 (A) 值。

2.3.2 体外实验: 使用模型组的脾细胞悬液 (正常对照组除外), 取 0.5 mL 加入 48 孔培养板中, 同时分别加入不同质量浓度的 F-1C (10、25、50、100 μg/mL), 5% CO₂ 37℃ 条件下培养 5 d, 离心取上清液备用。IgG 检测方法同 2.3.1 项。

2.4 统计学处理: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性检验采用 ANOVA 检验。

3 结果

3.1 F-1C 体内对 AA 大鼠免疫功能的影响

3.1.1 F-1C 对 AA 大鼠足肿胀的治疗作用: AA 大鼠致敏后, 原发侧 (右后足) 及继发侧足肿胀 (左后足) 均非常明显。F-1C 对原发侧足肿胀具有明显的治疗作用, 对继发侧足肿胀有减轻趋势, 但无统计学意义, CsA 对双侧足肿胀均有明显的治疗作用, TW 对两者的治疗作用均不明显, 见表 1。

表 1 F-1C 对 AA 大鼠足肿胀的治疗作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Therapeutic effect of F-1C on joint swelling of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	继发侧(左足)		原发侧(右足)	
		体积/mL	抑制率/%	体积/mL	抑制率/%
正常	-	1.01 ± 0.24	-	1.02 ± 0.27	-
模型	-	1.68 ± 0.33 ^{**}	-	3.01 ± 0.53 ^{**}	-
F-1C	30	1.42 ± 0.24	15.5	2.40 ± 0.25 ^{##}	20.3
TW	20	1.62 ± 0.37	3.6	2.62 ± 0.32	13.0
CsA	5	1.11 ± 0.35 ^{##}	33.9	2.28 ± 0.30 ^{##}	24.3

与正常组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs normal group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.1.2 F-1C 对 AA 大鼠脾细胞增殖反应的影响:

AA 大鼠脾细胞自发增殖反应及 Con A 诱导的脾细胞增殖反应较正常对照组明显降低, F-1C 对 AA 大鼠低下的脾细胞增殖反应具有明显的改善作用, CsA 对 AA 大鼠脾细胞增殖反应的作用与 F-1C 相似, TW 对 AA 大鼠 Con A 诱导的脾细胞增殖反应无明显影响, 但使自发增殖反应进一步降低, 见表 2。

表 2 F-1C 对 AA 大鼠脾细胞增殖反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of F-1C on splenocyte proliferation of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	³ H-TdR 掺入值 (cpm)	
		Con A (-)	Con A (+)
正常	-	2 133 ± 173	3 665 ± 635
模型	-	1 391 ± 218 ^{**}	2 045 ± 307 ^{**}
F-1C	30	1 748 ± 139 ^{##}	6 003 ± 483 ^{##}
TW	20	899 ± 159 ^{##}	2 114 ± 616
CsA	5	1 644 ± 74 ^{##}	2 837 ± 606 ^{##}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs normal group

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.1.3 F-1C 对 AA 大鼠胸腺细胞增殖反应的影响: 结果表明, AA 大鼠胸腺细胞自发增殖反应及 Con A 诱导的胸腺细胞增殖反应较正常对照组明显增强, F-1C 对其具有明显的抑制作用, CsA 和 TW 使其亢进的胸腺细胞增殖反应进一步增强, 见表 3。

3.1.4 F-1C 对 AA 大鼠脾细胞产生 IgG 的影响: AA 大鼠脾细胞产生抗体 IgG 的水平较正常对照组

降低, F-1C 和 CsA 对 IgG 水平无明显影响, TW 则使低下的抗体 IgG 水平进一步下降, 见表 4。

表 3 F-1C 对 AA 大鼠胸腺细胞增殖反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 3 Effect of F-1C on thymocyte proliferation of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量 /(mg · kg ⁻¹)	³ H-TdR 掺入值 (cpm)	
		Con A (-)	Con A (+)
正常	-	1 502 ± 280	32 867 ± 5 339
模型	-	2 088 ± 307 [*]	119 557 ± 14 903 ^{**}
F-1C	30	1 641 ± 147 [#]	88 945 ± 2 487 ^{##}
TW	20	1 656 ± 124	152 484 ± 8 463 ^{##}
CsA	5	5 997 ± 749 ^{##}	183 002 ± 18 536 ^{##}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs normal group

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表 4 F-1C 对 AA 大鼠脾细胞培养上清液中 IgG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 4 Effect of F-1C on IgG in supernatant of splenocyte culture of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	A 值 (570 nm)
正常	-	0.384 ± 0.014
模型	-	0.344 ± 0.022 [*]
F-1C	30	0.325 ± 0.016
TW	20	0.303 ± 0.005 ^{##}
CsA	5	0.373 ± 0.013

与正常组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ vs normal group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.2 F-1C 体外对 AA 大鼠免疫功能的影响

3.2.1 F-1C 体外对 Con A 诱导的 AA 大鼠脾细胞增殖反应的影响: Con A 诱导的 AA 大鼠脾细胞增殖反应较对照组明显降低, F-1C 在终质量浓度 50 μg/mL 时对 Con A 诱导的脾细胞增殖反应具有明显的改善作用, 见表 5。

3.2.2 F-1C 体外对 Con A 诱导的 AA 大鼠胸腺细胞增殖反应的影响: Con A 诱导的 AA 大鼠胸腺细胞的增殖反应较正常对照组明显亢进, F-1C 在 25~100 μg/mL 具有剂量依赖性地抑制作用, 见表 5。

3.2.3 F-1C 体外对 AA 大鼠脾细胞培养上清液中 IgG 水平的影响: AA 大鼠脾细胞产生 IgG 水平较正常对照组明显降低, F-1C 在 50~100 μg/mL 时具有明显的改善作用, 见表 6。

4 讨论

本研究结果表明, AA 大鼠致敏后原发侧足肿胀及继发侧足肿胀均非常明显, Con A 诱导的胸腺细胞增殖反应明显增强, 脾细胞增殖反应及脾细胞产生抗体 IgG 水平低下, 表明此 AA 大鼠模型发生

表 5 F-1C 体外对 Con A 诱导的 AA 大鼠脾细胞及胸腺细胞增殖反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of F-1C in vitro on Con A-induced splenocyte and thymocyte proliferation of AA rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$^3\text{H-TdR}$ 掺入值 (cpm)	
		脾细胞 ($n=3$)	胸腺细胞 ($n=4$)
正常	-	5 221 $\pm$ 643	11 459 $\pm$ 3 705
模型	-	3 153 $\pm$ 363 ^{**}	99 228 $\pm$ 5 081 ^{**}
F-1C	10	3 116 $\pm$ 423	89 408 $\pm$ 6 605
	25	3 717 $\pm$ 407	53 835 $\pm$ 4 382 [#]
	50	6 690 $\pm$ 783 [#]	37 603 $\pm$ 1 625 [#]
	100	4 531 $\pm$ 860	4 583 $\pm$ 583 [#]

与正常组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs normal group; [#] $P < 0.01$ vs model group

表 6 F-1C 体外对 AA 大鼠脾细胞培养上清液中 IgG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 6 Effect of F-1C in vitro on IgG in splenocyte culture of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值 (570 nm)
正常	-	1.235 $\pm$ 0.060
模型	-	1.002 $\pm$ 0.057 ^{**}
F-1C	10	1.034 $\pm$ 0.038
	25	1.002 $\pm$ 0.036
	50	1.224 $\pm$ 0.013 [#]
	100	1.118 $\pm$ 0.072 [#]

与正常组比较: ^{**} $P < 0.01$

与模型组比较: [#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs normal group

[#] $P < 0.05$ [#] $P < 0.01$ vs model group

了关节肿胀等病理变化,并伴有免疫功能异常,与文献报道相符^[6]。给药 2 周后, F-1C 对 AA 大鼠原发侧足肿胀具有明显的治疗作用,对继发侧足肿胀的治疗作用较弱, CsA 对双侧足肿胀均具有明显的治疗作用, TW 对二者的治疗作用均不明显。上述结果表明,在所观察的剂量条件下 F-1C 对 AA 大鼠足肿胀的治疗作用不如 CsA,但优于 TW。

进一步观察口服给予 F-1C 对 AA 大鼠免疫功能的影响,结果发现, F-1C 可使 AA 大鼠低下的脾细胞增殖反应得到恢复,抑制 AA 大鼠亢进的胸腺细胞增殖反应,对 AA 大鼠脾细胞生成 IgG 能力低下无明显影响; TW 不影响 Con A 诱导的 AA 大鼠脾细胞增殖反应,但使 AA 大鼠脾细胞低下的自发

增殖反应进一步降低,使其亢进的胸腺细胞增殖反应进一步升高,并进一步降低 AA 大鼠低下的脾细胞产生 IgG 的水平; CsA 也可部分纠正 AA 大鼠低下的脾细胞增殖反应,但使其亢进的胸腺细胞增殖反应进一步加剧,对 AA 大鼠脾细胞生成 IgG 的水平低下无明显影响。由此提示, F-1C 对 AA 大鼠免疫功能异常具有双向恢复和调节作用,而 CsA 和 TW 则为单向免疫抑制作用。

体外应用 F-1C 结果表明, F-1C 对 AA 大鼠 Con A 诱导的低下的脾细胞增殖反应和亢进的胸腺细胞增殖反应均具有明显的恢复作用,与口服给药观察到的结果一致。当 F-1C 终质量浓度为 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可使 AA 大鼠降低的脾细胞产生 IgG 的水平明显升高。上述结果进一步提示, F-1C 对紊乱的免疫细胞功能具有恢复平衡或调节作用。

AA 大鼠的炎症肿胀与其紊乱的免疫功能密切相关^[7],而本研究观察到 F-1C 对 AA 大鼠的免疫功能具有改善和纠正作用,进而可以减小因炎症反应而造成的肿胀。因此 F-1C 有望开发成免疫抑制剂,用于治疗 RA 等自身免疫性疾病。

References

- [1] Zhang Y X. Pharmacological and chemical study on Liuwei Dihuang Decoction [J]. *Basic Med Sci Clin* (基础医学与临床), 2000, 20(5): 15-19.
- [2] Fang J, Zhang Y X, Ru X B, et al. Effect of Liuwei Dihuang Decoction on the cytokines expression in splenocyte in AA rat [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(2): 128-131.
- [3] Lu X D, Zhang Y X, Ru X B, et al. Activity-guided evaluation and isolation of the immunoinhibitory fractions from *Cornus officinalis* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2002, 18(6): 357-359.
- [4] Ma D L, Li J, Chen M S. Induce of adjuvant arthritis rat and study on abnormality of immune [J]. *Chin J Exp Clin Immunol* (中国实验临床免疫学杂志), 1995, 7(3): 13-16.
- [5] Qin Y K, Yin J Z. *Practical New Immune Technology* (实用免疫学新技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Publishing House, 1994.
- [6] Jin Y, Li J, Ding C H, et al. Therapeutic action of leflunomide on adjuvant arthritis rat and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(1): 62-65.
- [7] Fang J, Zhang Y X, Ru X B, et al. A study of the immunofunction of adjuvant arthritis rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2000, 16(10): 525-528.

多种密度、浓度计

总有一款适合您

我厂专业生产多种型号的溶液密度计、电导率仪和溶液浓度计,可广泛地适用于工业、医药生产过程中,包括酒精、中药提取液在内的多种溶液的密度或浓度的自动在线检测。还有供室内使用的台式密度计(特别推荐)。

上海浦东新区三海智能仪表厂

厂址: 上海张江高科技园区 电话: (021)58377810 网址: www. sanhai. com 3721 网络实名: 密度计、溶液浓度计