

血-再灌注时高能磷酸物质生成严重不足,心肌组织 ATP 水平较正常时降低了 60%, TAN 水平仅达到正常组的 48%, Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Mg^{2+} -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶活力均不同程度下降,而 PL 各剂量组心肌组织 ATP、TAN 水平和能量负荷值 (EC) 均显著高于模型组,此结果提示 PL 可能通过减慢能量物质的分解,改善心肌有氧代谢而发挥抗心肌缺血-再灌注心律失常的作用。

References:

- [1] Du G H, Qiu Y, Zhang J T. Protective effect of salvianolic acid A on ischemia-reperfusion induced injury in isolated rat heart [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(10): 731-735.
- [2] Cheng S Y, Zhao D H, Guo S, et al. Protective effect of 1-cinnamyl-4-(2, 3, 4-trimethoxybenzyl)-tetrahydropyrazine hydrochloride on arrhythmia induced by ischemia-reperfusion in rat [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1996, 10(1): 42-44.
- [3] Lei X L, Zhang R P, Dong X F, et al. Protective effect of Yunnan folk medicine *Rhododryum roseum* on experimental myocardial ischemia of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(12): 1103-1106.
- [4] Kou Y L, He C Y, Liu Z M, et al. Application of high-performance liquid chromatography (HPLC) in the determination of ATP, ADP, and AMP in cardiac muscle [J]. *West China Med J* (华西医学), 2000, 15(3): 295-296.
- [5] Hu B, Sun S G, Mei G W, et al. Protective effects on *Ginkgo biloba* extract on rats during cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2002, 115(9): 1316-1320.
- [6] Lu F, Lin P Y, Zhang N, et al. Optimization of HPLC conditions in determining the adenosine phosphate in cardiac muscle [J]. *J Pharm Pract* (药物实践杂志), 2001, 19(6): 350-351.
- [7] Zhang Y, Wang M Z, Huang Q F, et al. The effect of Baoxin Pills on arrhythmia induced by ischemia and reperfusion in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, 6(18): 290-292.
- [8] Huang C Y, Xie S R, Yang J X, et al. Anti-arrhythmic effect of water extract liquid of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *J. Dalian Med Univ* (大连医科大学学报), 2003, 25(1): 13-15.
- [9] Wan F S, Zhao X M, Liu B, et al. Protective effect of liqustrazin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学杂志), 1998, 3(3): 184-186.

雷公藤甲素对健康人外周血单个核细胞分泌 TNF- α 的抑制作用与 TNF- α 基因多态性的关系

涂胜豪, 陈红波, 盛冬云, 胡永红, 刘沛霖

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 中西医结合科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨雷公藤甲素对外周血单个核细胞 (PBMC) 分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的抑制作用与 TNF- α 基因多态性之间的关系。方法 采用等位基因特异引物 PCR 法对健康人 TNF- α 基因启动子区-308 位点基因多态性进行检测, ELISA 法检测 TNF- α 的量。结果 TNF- α -308 非 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 经脂多糖 (LPS) 刺激后 TNF- α 的分泌量明显较 TNF- α -308 G/G 纯合子基因型的志愿者高; 雷公藤甲素能够抑制 TNF- α -308 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 分泌 TNF- α , 而对 TNF- α -308 非 G/G 纯合子基因型健康志愿者 PBMC 分泌 TNF- α 没有明显的抑制作用。结论 雷公藤甲素抑制外周血单个核细胞分泌 TNF- α 的量与 TNF- α 基因多态性有关。

关键词: 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 基因多态性; 雷公藤甲素; 外周血单个核细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0568-04

Relationship between inhibition of triptolide on TNF- α production from peripheral blood mononuclear cells in healthy humans and TNF- α gene polymorphism

TU Sheng-hao, CHEN Hong-bo, SHENG Dong-yun, HU Yong-hong, LIU Pei-lin

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital Affiliated Tongji Medical College, China-Central University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Key words: tumor necrosis factor- α (TNF- α); gene polymorphism; triptolide; peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

收稿日期: 2005-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (90209049)

作者简介: 涂胜豪 (1965-), 男, 湖北武汉人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合治疗风湿病研究。

Tel: (027) 83663379 E-mail: shtu@tjh.tjmu.edu.cn

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是具有广泛生物活性的重要细胞因子,在类风湿性关节炎的发病过程中起到重要作用。TNF- α 基因组中多个位点存在基因多态性,如-308、-208、+498 等^[1],其中以-308 位点的基因多态性可能与类风湿性关节炎的易感性、药物治疗和预后情况之间的关系较密切^[2~5]。雷公藤内酯 (triptolide, TP; 又称雷公藤甲素、雷公藤内酯醇) 是雷公藤的主要活性成分之一,具有较强的抗炎和免疫抑制作用。雷公藤在临床上广泛用来治疗类风湿性关节炎,但其临床疗效存在一定的个体差异性。本研究 TP 抑制外周血单个核细胞 (PBMC) 分泌 TNF- α 与 TNF- α 基因多态性之间的关系,以探讨 TNF- α 基因多态性与雷公藤治疗类风湿性关节炎疗效差异性之间是否存在关联。

1 材料与方法

1.1 对象:与本院体检中心协作,随机选取 41 名汉族健康成年人,年龄 21~50 岁,平均 33 岁;男性 24 名,女性 17 名,均无自身免疫性疾病病史和相关疾病家族史。每名志愿者抽取肘静脉血 8 mL,其中 2 mL 用来提取 DNA 和进行基因型检测,6 mL 用来进行细胞培养。

1.2 试剂:全血基因组 DNA 提取试剂盒 (Gentra systems); RPMI-1640 培养基 (Hyclone);脂多糖 (LPS, Sigma); 人 TNF- α ELISA 试剂盒 (PIERCE);PCR 引物由上海生物工程有限公司合成;雷公藤甲素 (TP) 由福建医学科学研究所提供,质量分数 98.5% 以上,以二甲基亚砜 (Sigma) 助溶,磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释,配制成 240 ng/mL 的贮存液。

1.3 基因多态性的检测

1.3.1 TNF- α -308 位点基因多态性检测:利用等位基因特异引物 PCR (AS-PCR) 方法来检测 TNF- α -308 位点的基因多态性,参照 Warzocha 和林经安等^[6,7]报道的引物序列,委托上海生物工程有限公司合成,序列为 F1: 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3'; R1: 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3'; R2: 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3' 和 R3: 5'-GAGTCTCCGGGTCAGAA-TGA-3', R3 为内对照引物负链, F1 和 R1/R3 组成检测 TNF1-内对照引物对, F1 和 R2/R3 组成检测 TNF2-内对照引物对。

1.3.2 PCR 反应体系及条件:在 50 μ L 的反应体系中,含有 10 $\times$ 缓冲液 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs、5 U Taq 聚合酶、110

pmol/L TNF1-内对照引物对或 TNF2-内对照引物对分别为 5、2.5、2.5 μ L, DNA 模板 1~2 μ g, 置于循环仪中, PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C、10 min 后, 按 95 $^{\circ}$ C、90 s, 60 $^{\circ}$ C、150 s, 72 $^{\circ}$ C、60 s, 反复循环 34 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 结束 PCR 反应。

1.3.3 结果分析:取 PCR 产物 6 μ L, 在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 每管样本 PCR 产物均出现 531 bp 的内参照条带, 以出现 184 bp 的反应管来判断为 TNF1 或 TNF2 纯合基因型, 或者是 TNF1/2 杂合型。

1.4 PBMC 的分离与培养:取健康人静脉血, 未经处理, 直接在超净工作台用 Ficoll 淋巴细胞分离液无菌分离 PBMC, 重悬于 RPMI-1640 培养液 (含 10% 小牛血清) 中, 制成细胞悬液, 并调整细胞终浓度为 1×10^6 /mL。将细胞悬液加到 96 孔培养板中, 每孔 150 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱预培养 24 h 后, 进行加药干预培养。设置 LPS 对照组、TP+LPS 组, LPS、TP 的终质量浓度分别为 4.5 ng/mL 和 1 μ g/mL (预试验表明此为最佳剂量), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱继续培养 48 h 后, 离心, 收集培养基上清液, 保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱待检。

1.5 TNF- α 水平检测:利用 ELISA 试剂盒来检测上清液中 TNF- α , 按照说明书操作, 酶标测试仪在 450 nm 处测吸光度 (A) 值。

1.6 统计学处理:数据利用 SPSS11.0 统计软件处理进行 *t* 检验。

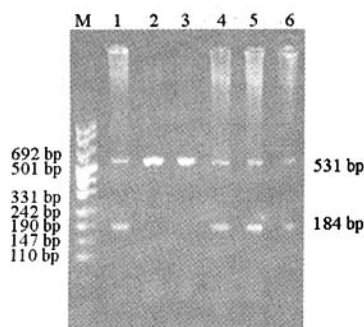
2 实验结果

2.1 TNF- α -308 基因多态性检测结果:在 41 例健康志愿者中, TNF- α -308 位点 G/G、G/A、A/A 3 种基因型例数分别为 34、6、1 例。PCR 产物电泳结果见图 1。

2.2 TNF- α 基因多态性的影响:由于 G/A 和 A/A 基因型均可使 TNF- α 基因表达增加, 且 A/A 基因在人群中出现的频率低, 故将 G/A 基因型和 A/A 基因型合并分析, 结果见表 1。

3 讨论

类风湿性关节炎是一种与多种遗传因素相关联的自身免疫性疾病, 其发病过程涉及多种炎性细胞因子, TNF- α 则是其中重要细胞因子之一。TNF- α 主要由单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞分泌, 具有广泛的诱导炎症和免疫调节功能。编码 TNF- α 位于染色体 6p21.3, 在 MHC-III 类基因区内, 与 MHC 基因紧密连锁^[1]。在 TNF- α 5' 端基因调节区多个位点存在基因多态性, 而在这些位点中, 以 -308 位点基因多态性与类风湿性关节炎的发病、治疗及预后有



M-pUC MixDNA 标准分子量 1、2-TNF1 纯合基因型
3、4-TNF2 纯合基因型 5、6-TNF1/2 杂合基因型
M-pUC MixDNA standard molecular weight 1、2-homogenic
TNF1 3、4-homogenic TNF2 5、6-heterogenic TNF1/2

图 1 正常淋巴细胞 TNF- α -308 位点的不同基因型电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of different TNF- α -308 gene type in normal lymphocyte

表 1 TP 对 PBMC 分泌 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of TP on TNF- α produced by PBMC ($\bar{x} \pm s$)

组 别	TNF- α /(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	
	A $^{-}$ (G/G) (34 例)	A $^{+}$ (G/A, A/A) (7 例)
LPS	306.24 $\pm$ 150.59	583.92 $\pm$ 216.38 [#]
LPS+TP	242.11 $\pm$ 135.78 [*]	509.54 $\pm$ 194.99 [#]

与 LPS 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 A $^{-}$ 型比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs LPS group; [#] $P < 0.05$ vs A $^{-}$ type

较密切的关系^[2~5]。

随着遗传药理学和药物基因组学的不断深入研究,人们发现药物的疗效和不良反应存在个体差异的潜在原因,除了与疾病的轻重,个体情况(年龄,营养,肝肾功能),伴发疾病等有关联外,个体基因差异也是其中重要的原因之一。这种基因上的多态性可能导致药物代谢酶、药物转运体、药物受体或药物靶标产生多态性,而这些多态性的存在可能是导致药物治疗中个体间存在疗效和不良反应差异的重要原因^[8,9]。

TNF- α 作为许多药物在体内的作用靶标,其基因多态性很可能会影响到药物的临床功效。几组实验研究发现,TNF- α -308 位点的基因多态性可以导致 TNF- α 转录水平的不同^[10,11],从而导致体内 TNF- α 水平的不同,而这种差异性的存在则可直接影响到药物的临床疗效。Balog A 等给予类风湿关节炎病人(RA)和克罗恩病人(Crohn's disease)抗-TNF 抗体药物 infliximab 治疗,发现 A $^{+}$ (G/A, A/A)的病人对 infliximab 疗效评价明显低于 A $^{-}$ (G/G)病人^[3],这表明 A $^{+}$ (G/A, A/A) RA 患者治疗难度可能较 A $^{-}$ (G/G) RA 患者高,同时提示

TNF- α -308 基因多态性不仅可以作为疾病易感性和预后性的筛选指标,也有助于个性化选择药物治疗。

TP 是从雷公藤中分离得到的二萜内酯化合物,具有强大的抗炎和免疫抑制作用,其主要作用途径之一就是抑制 PBMC 的活化与增殖。研究表明雷公藤多苷可以降低人体血浆内 TNF- α 水平,雷公藤单体 T4 还可以抑制经过 LPS 刺激培养的 PBMC 在体外产生 TNF- α ^[12]。雷公藤在临床用于治疗类风湿关节炎已经多年,其临床疗效在不同个体间存在一定的差异。TNF- α 作为雷公藤在体内的药物作用靶标之一,推测其基因多态性可能是导致雷公藤治疗类风湿性关节炎疗效存在个体差异的重要原因之一。

通过本实验发现,在脂多糖(LPS)的刺激下, A $^{+}$ (G/A, A/A)的健康人 PBMC 分泌 TNF- α 的量明显高于 A $^{-}$ (G/G)健康人,这与 Louis 等的研究结果是一致的^[13]。在给予 LPS 和 TP 联合作用后,发现 A $^{+}$ (G/A, A/A)细胞中 TNF- α 的量与 LPS 单独刺激后分泌的量并没有明显差异,相反的是,在 A $^{-}$ (G/G)细胞中,联合刺激组较单独刺激组分泌的量有明显的降低。这说明 TP 对携带 TNF- α -308 G/G 基因型组 PBMC 有明显的抑制作用,而对 TNF- α -308 非 G/G 基因型组 PBMC 可能没有明显的抑制作用。因此推测雷公藤治疗类风湿性关节炎疗效个体差异与 TNF- α -308 基因多态性之间存在关联。由于 A $^{+}$ (G/A)在人群中分布频率较低,尤其是 A $^{+}$ (A/A),这一结果有待于进一步在较大范围以及 RA 病人中进行研究确证。

另外,本实验选择等位基因特异引物 PCR (AS-PCR)方法来检测 TNF- α -308 位点的基因多态性,该方法主要用于检测已知的基因位点改变。在 TNF- α -308 位点的两种不同基因型的引物链序列 3 末端分别采用 G 和 A,使得 TNF1 中的 G 在 TNF2 正链序列的 3 末端 A 不能退火,同样的 TNF2 中的 A 在 TNF1 正链序列的 3 末端 G 不能退火,这种差别决定了不同基因型在扩增过程的特异性,当两种不同基因型引物 PCR 均阳性时,则判断为杂合型,无需 PCR 后的操作。本实验结果显示:等位基因特异引物 PCR (AS-PCR)方法能有效地检测 TNF- α -308 位点的基因多态性,内对照引物的同时扩增,确保了 PCR 反应的可靠性。本方法较常规 PCR-RFLP 方法简单、节省,而且不受限制性内切酶消化不完全的影响,造成结果的误判。

References:

- [1] Chen H P, Tu S, Hu Y H. Current progress of single nucleotide polymorphism in rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Rheumatol* (中华风湿病学杂志), 2004, 8(3): 171-173.
- [2] Cipriano C, Caruso C, Lio D, et al. The -308 G/A polymorphism of TNF- α influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases [J]. *Int J Immunogenet*, 2005, 32(1): 13-18.
- [3] Balog A, Klausz G, Gal J, et al. Investigation of the prognostic value of TNF- α gene polymorphism among patients treated with infliximab, and the effects of infliximab therapy on TNF- α production and apoptosis [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(5): 274-280.
- [4] Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62: 526-529.
- [5] Ye J H, Chen C J, Tsai W C, et al. Tumour necrosis factor promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28: 1788-1792.
- [6] Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, et al. Genetic polymorphisms in the tumour necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome [J]. *Blood*, 1998, 91: 3574-3581.
- [7] Lin J A, Ye D F, Chen J Q, et al. Polymerase chain reaction analysis for the tumor necrosis factor α 308 (G>A) gene polymorphism relation to ankylosing spondylitis [J]. *Chin J Rheumatol* (中华风湿病学杂志), 2003, 7(7): 420-422.
- [8] Norton R M. Clinical pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R & D [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(4): 180.
- [9] Lou X E, Zhang H, Wu M Z. Pharmacogenomics and individual dosage regimens [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2002, 22(5): 304-305.
- [10] Wilson A G, Symons J A, McDowell T L, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3195-3199.
- [11] Kroeger K M, Carville K S, Abraham L J. The -308 tumor necrosis factor α promoter polymorphism effects transcription [J]. *Mol Immunol*, 1997, 34: 391-399.
- [12] Zeng X J, Zhang N Z. The effects of a single active ingredient (T₁) of *Tripterygium wilfordii* Hook on the production of tumour necrosis factor by the peripheral blood mononuclear cells and synovium cells of rheumatoid arthritis patients [J]. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 1996, 18(2): 138-142.
- [13] Liou E, Franchimont D, Piron A, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influence TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113: 401-406.

硕苞蔷薇漆黄素对高铁引起大鼠心肌损伤的保护作用

冯 星¹, 许东晖², 梅雪婷², 许实波²

(1. 湖南师范大学 医学院, 湖南 长沙 410006; 2. 中山大学 药学院, 广东 广州 510275)

摘 要:目的 研究从硕苞蔷薇叶醇提取物中分离得到的漆黄素对高铁引起的大鼠心肌损伤的保护作用。方法 采用 Langendorff 灌流心脏为实验模型, 研究羟基喹啉铁复合物 (Fe-HQ) 对心肌的损伤作用, 以及漆黄素对心肌损伤的保护作用。结果 漆黄素可以抑制由高铁引起的离体大鼠心脏左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末期压 (LVEDP) 的升高和冠脉流量 (CBF)、心率 (HR) 的下降; 漆黄素使冠脉流出液中乳酸脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶 (CK) 释放量和心肌中的 MDA 水平降低。结论 漆黄素对铁超载引起的大鼠心肌损伤有保护作用。

关键词:硕苞蔷薇; 漆黄素; 铁超载

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0571-04

Protective effect of fisetin from *Rosa bracteata* on myocardial injury induced by high iron

FENG Xing¹, XU Dong-hui², MEI Xue-ting², XU Shi-bo²

(1. Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410006, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Sun Yet-san University, Guangzhou 510275, China)

Key words: *Rosa bracteata* Wendl.; fisetin; iron overloaded

硕苞蔷薇 *Rosa bracteata* Wendl. 为蔷薇科蔷薇属植物。常绿灌木, 广泛分布于华中和华南地区。其根可入药, 具有祛风活血、通经补肾、涩精补精之功效,

民间用于治疗疝气、梦遗滑精、子宫下垂、久泻等。从其叶的醇提物中提取到漆黄素。本实验采用 Langendorff 灌流心脏为实验模型, 研究羟基喹啉铁复合物

收稿日期: 2005-06-18

基金项目: 国家自然科学基金课题 (30170105); 广东省科技计划 (C30402)

作者简介: 冯 星 (1973—), 男, 湖南长沙人, 博士, 长期从事天然产物的药学研究。

Tel: (0731) 8652216 E-mail: fengxing01@hotmail.com