

小鼠的生存时间 10~15 d,而对发病时间无影响^[10]。本实验结果显示羟基积雪草苷虽不能延迟小鼠发病但能延长小鼠生存期 10 d 左右,这已是一个很好的苗头,且积雪草在我国长江以南地区广泛生长,药源丰富,因此有必要进一步研究并将其开发为治疗 ALS 和其他神经元变性疾病的药物。

References:

[1] Yoshihara T, Ishigaki S. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurochem*, 2002, 80(1): 158-167.
 [2] Mhatre M, Floyd R A, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets [J]. *J Alzheimers Dis*, 2004, 6(2): 147-157.
 [3] Qin L P, Zhuang W G, Zheng H C. Progress in the study on centella asiatica [J]. *World Phytomed* (国外医药:植物药分册), 1997, 12(4): 154-157.

[4] Ming Z J, Sun M. Study on anti-inflammation effect of asiaticoside [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2002, 9(1): 62.
 [5] Inhee M J, Ji-Eun S, Sung H Y. Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(3): 417-425.
 [6] Chen B W, Ji B A, Zhang X Z, et al. Protection of tinctured extract of centella asiatica on gastric mucosa and its possible mechanism [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 1999, 19(4): 246-248.
 [7] Azzouz M, Ralph G S, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS mode [J]. *Nature*, 2004, 429: 413-417.
 [8] Rowland L P. *Merritt's Textbook of Neurology* [M]. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995.
 [9] Brown R H Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice [J]. *Cell*, 1995, 80: 687-692.
 [10] Gurney M E, Cutting F B, Zhai P, et al. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 1996, 39: 147-157.

芫花根总黄酮含药血清对小鼠细胞免疫功能的影响

高晓雯, 郑维发*, 彭烨城

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 建立小鼠血清中芫花根总黄酮(TFRD)各成分的 HPLC 测定方法,探讨 TFRD 含药血清对正常小鼠细胞免疫功能的影响。方法 HPLC 法测定小鼠单次 ig 给药后不同时间点血药浓度;MTT 法检测多次 ig 给药后含药血清对正常小鼠脾淋巴细胞增殖、NK 与 LAK 细胞杀伤活性和腹腔巨噬细胞的吞噬功能等细胞免疫功能的影响。结果 单次 ig TFRD 后血药浓度在 20~30 min 达到高峰,TFRD 含药血清能促进脾淋巴细胞增殖,增加 NK 和 LAK 细胞杀伤活性,增强腹腔巨噬细胞的吞噬能力。结论 TFRD 含药血清能增强正常小鼠细胞免疫功能。
关键词:芫花根总黄酮;血清药理学;细胞免疫
 中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2006)05-0721-05

Effect of serum containing total flavonoids from roots of *Daphne genkwa* on cell immunity in mice

GAO Xiao-wen, ZHENG Wei-fa, PENG Ye-cheng

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Objective To establish HPLC method for assaying total flavonoids from the roots of *Daphne genkwa* (TFRD) in serum of mice and to elucidate the effect of mice serum containing TFRD on cell immunity in mice. **Methods** TFRD Concentration in serum was determined from the mice received single ig TFRD at certain time intervals using HPLC method. The effects of TFRD serum on lymphocyte proliferation, killing activities of NK and LAK cell, and phagocytic activity of macrophage were detected by MTT method. **Results** TFRD in serum reached its highest concentration in 20—30 min after ig administration. TFRD-containing serum significantly improved the proliferation of lymphocyte, enhanced the killing activities of NK and LAK cells, and enforced the phagocytic activity of macrophage. **Conclusion** TFRD-containing serum is an effective agents for enhancing cell immunity in mice.

收稿日期:2005-10-24

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(03049);江苏省高校自然科学研究计划重点项目(02KJA360002)

作者简介:高晓雯(1977—),女,江苏徐州人,徐州师范大学天然产物化学及药理学硕士研究生。E-mail: gxw2003@126.com

* 通讯作者 郑维发 Tel: (0516) 83403179 E-mail: yyzw@xzn. edu. cn

Key words: total flavonoids from the roots of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. (TFRD); serum pharmacology; cell immunity

芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 为瑞香科植物,广泛分布于我国长江流域各省和黄河流域的部分地区。芫花根在民间曾被用来治疗多种癌肿,疗效显著。芫花根还可以治疗腹水、急性乳腺炎等。化学成分研究表明,芫花根主要含有黄酮、香豆素和萜类化合物。其中黄酮类化合物除了芫花素、芫根苷等少数单黄酮外,主要含有毛瑞香素系列双黄酮,种类多且含量高,为芫花根的主要成分之一^[1]。前期实验^[2]证明,芫花根总黄酮(TFRD)对小鼠细胞免疫功能有调节作用。为了更好地探讨 TFRD 对细胞免疫功能调节的作用机制,使反应体系更接近于动物体内环境,本实验采用血清药理学方法,对正常小鼠的脾淋巴细胞增殖、NK 和 LAK 细胞的杀伤活性以及腹腔巨噬细胞的吞噬功能等指标进行检测,从而进一步阐明 TFRD 的药理作用与免疫调节作用机制。

1 材料

1.1 实验动物与细胞株:ICR 小鼠,8~12 周龄,体重 18~22 g,雌雄各半,徐州医学院实验动物中心提供(动物合格证号:苏动字 200402)。实验小鼠饲养在(25±2)℃、明暗各 12 h 的饲养室中,自由饮水和取食。K562 细胞由中国科学院上海细胞研究所提供。

1.2 药品与试剂:甲醇(色谱纯)由 Fisher 公司提供;RPMI-1640 培养液、DMEM 培养液由美国 Gibco 公司提供;胎牛血清由美国 Hyclone 公司提供;刀豆蛋白 A (ConA)、脂多糖(LPS)、巯基乙醇酸钠、中性红、二甲亚砜(DMSO)、MTT 均由美国 Sigma 公司提供;淋巴分离液 TBD 由中国医学科学院生物工程研究所提供;白细胞介素-2(IL-2)沈阳三生制药股份有限公司提供;自制三蒸水;肿瘤坏死因子-α(TNF-α)试剂盒由法国 Diaclone 公司提供。

1.3 TFRD 及各单体的制备:按文献所述的方法^[2]从芫花根醇提物中制备总黄酮;按文献所述的方法^[3]从总黄酮中分离制备毛瑞香素 B、G、H,芫花素、芫根苷以及芫花醇 A,波谱学方法鉴定结构。

1.4 色谱条件:Waters 600E HPLC 色谱仪,以甲醇-水(pH 5.0)作为流动相,按下列梯度进行洗脱:0~10 min,25:75;11~20 min,33:67;21~58 min,41:59;59~79 min,55:45;80~100 min,85:15。检测波长 275 nm。色谱柱:Inertsil,

250 mm×4.6 mm;柱温 30℃。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制:精密称取对照品芫花苷、芫花醇 A、毛瑞香素 H、毛瑞香素 G、毛瑞香素 B 和芫花素(均为本实验室从芫花根中分离制备,质量分数均>99%),质量分别为 0.144 6、0.348 7、0.911 2、1.466 2、2.762 5、0.123 7 mg。分别置于 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准对照品溶液备用。

2.2 供试品溶液的配制:精密称取 TFRD 6.25 mg,置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液备用。

2.3 单次给药血清样品的处理及测定:小鼠 70 只,随机分为 7 组,每组 10 只。正常组,ig 生理盐水;其余 6 组小鼠 ig TFRD 乳液 200 mg/kg。给药后分别于 10、20、30、40、50 和 60 min 从心脏取血,分离血清。取血清 1.0 mL 置 10 mL 离心管中,加 5 mL 异丙醇-氯仿(1:5)的混合溶液,旋涡混匀,4 000 r/min 离心 5 min。吸取氯仿层于 10 mL 离心管中,40℃水浴下氮气吹干,加 0.20 mL 流动相甲醇,旋涡振荡 1 min 并超声 1 min 溶解,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液进样 20 μL。按上述色谱条件进行检测。

2.4 多次给药血清的制备:小鼠随机分为两组,正常组与给药组。分别 ig 生理盐水和 TFRD 乳液 200 mg/kg,每日 2 次,ig 7 次,最后 ig 给药后 0.5 h 无菌心脏取血,分离血清,供以下实验用。

2.5 脾淋巴细胞增殖实验:按常规方法^[4]制备脾淋巴细胞悬液 2×10⁶/mL,加入 96 孔板中。实验设正常血清组、含药血清组、含药血清+ConA 组和含药血清+LPS 组,血清的添加量分别为 10%、20%、30%、40% 和 50%,每孔终体积为 200 μL,每组设 5 个复孔。放入 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 68 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL,继续培养 4 h。培养结束后,弃上清液,加入 150 μL DM-SO,静置 20 min,用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A)值^[5]。

2.6 NK 细胞杀伤活性实验:无菌制备效应细胞脾淋巴细胞 2×10⁶/mL,靶细胞 K562 浓度为 2×10⁵/mL,分别以每孔 50 μL 加入 96 孔板。实验孔分别加入不同量的含药血清或正常血清,效应细胞与靶

细胞对照孔分别加入相同体积的正常血清,每组设 5 个复孔,血清添加量为 10%、20%、30%、40% 和 50%,最终每孔加入 RPMI-1640 培养基补足 200 μ L。放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱中培养 4 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μ L,继续培养 4 h,弃去上清液。每孔加入 150 μ L DMSO,静置 20 min,用酶标仪在 570 nm 处测 A 值,计算杀伤率^[6]。

$$\text{杀伤率} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{对照}}} \right) \times 100\%$$

2.7 LAK 细胞杀伤活性实验:LAK 细胞的诱导^[4]:无菌制备小鼠脾淋巴细胞悬液,调细胞浓度为 5×10^6 /mL,移入培养瓶中,加入 IL-2 使其终浓度为 1 000 U/mL,将培养瓶置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养 3 d,更换含 IL-2 为 1 000 U/mL 的培养基,培养 3 d 即孵化成 LAK 细胞。实验前用 RPMI-1640 培养基调细胞浓度为 2×10^6 /mL。LAK 细胞活性检测同 NK 细胞杀伤活性测定方法。同法计算杀伤率。

2.8 腹腔巨噬细胞吞噬功能实验:采用中性红吞噬试验。按文献方法^[7]制备腹腔巨噬细胞,调细胞浓度为 1×10^6 /mL,每孔 100 μ L,再加入 10%、20%、30%、40% 和 50% 的含药血清或正常血清,用完全培养基 DMEM 补足 200 μ L,每组设 5 个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养 24 h。每孔加入 0.075% 无菌中性红生理盐水溶液 50 μ L 后,继续培养 30 min,离心后弃去上清液,PBS 洗 3 遍,每孔加细胞裂解液(醋酸-乙醇,1:1) 200 μ L,用酶标仪测定 540 nm 处 A 值。

2.9 统计学处理:实验数据均采用 SPSS13.0 软件进行 t 检验,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对照品标准曲线的制备:准确吸取对照品溶液 4、8、12、16 和 20 μ L 分别进样,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,以各自对照品进样质量 X (μ g) 对色谱峰面积 Y (mV/min) 进行回归计算,线性回归方程见表 1。

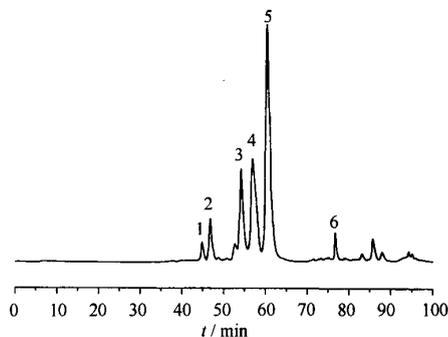
表 1 TFRD 中各对照品的标准曲线方程

Table 1 Standard equation of quantitative analysis data of reference substances in TFRD

对照品	线性方程	r	线性范围/ μ g
芫花苷	$Y = 1.68 \times 10^6 X - 2.96 \times 10^3$	0.999 62	0.023 1~0.092 4
芫花醇 A	$Y = 2.53 \times 10^6 X - 6.28 \times 10^3$	0.996 91	0.055 8~0.279 0
毛瑞香素 H	$Y = 2.82 \times 10^6 X - 5.16 \times 10^4$	0.995 98	0.145 8~0.729 0
毛瑞香素 G	$Y = 2.01 \times 10^6 X - 2.58 \times 10^5$	0.999 75	0.234 6~1.162 2
毛瑞香素 B	$Y = 2.39 \times 10^6 X - 1.96 \times 10^5$	0.999 64	0.427 9~2.139 5
芫花素	$Y = 2.03 \times 10^6 X - 2.22 \times 10^4$	0.999 18	0.019 8~0.096 5

3.2 TFRD 中各单体的测定:精确吸取供试品溶

液 12 μ L 进样测定(图 1),采用峰面积外标法定量,由色谱图相应的峰面积,分别代入各自的回归方程,求出供试样品中各单体的进样质量,再计算出 TFRD 中芫花苷、芫花醇 A、毛瑞香素 H、毛瑞香素 G、毛瑞香素 B 和芫花素的质量分数(表 2)。



1-芫花苷 2-芫花醇 A 3-毛瑞香素 H
4-毛瑞香素 G 5-毛瑞香素 B 6-芫花素
1-yuankanin 2-genkwanol A 3-daphnodorin H
4-daphnodorin G 5-daphnodorin B 6-genkwanin

图 1 TFRD 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of TFRD

表 2 TFRD 的测定结果

Table 2 Determination of TFRD

样品	峰面积	进样量/ μ g	质量分数/%
芫花苷	99 501	0.060 9	2.03
芫花醇 A	358 035	0.144 0	4.80
毛瑞香素 H	1 203 523	0.445 1	14.64
毛瑞香素 G	1 908 390	0.821 1	27.37
毛瑞香素 B	2 683 504	1.204 6	40.16
芫花素	144 745	0.060 4	2.01

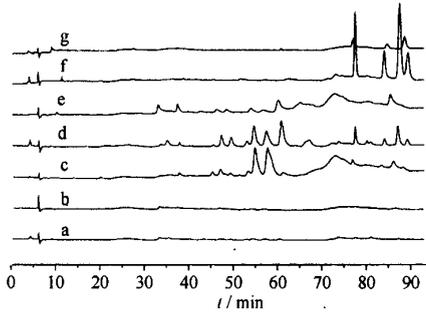
3.3 单次给药血清样品测定的结果

3.3.1 血药浓度与时间的关系:正常小鼠在单次 ig TFRD 乳液 200 mg/kg 后,血药浓度先是逐渐上升,在 20~30 min 达到高峰,然后逐渐下降;当到 60 min 时,血清中几乎没有药物(图 2)。

3.3.2 血清中对照品标准曲线的制备:取正常小鼠空白血清 1 mL,置于 10 mL 具塞离心管中,精密加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 对照品溶液,按 2.3 方法处理血清样品,进样 20 μ L,进行色谱分析。结果以各自对照品进样质量 X (μ g) 对峰面积 Y (mV/min) 进行线性回归,建立线性回归方程见表 3。

3.3.3 血药浓度的测定:根据 20、30、40 min 的血清色谱图中各单体的峰面积,分别代入各自的回归方程,可以计算出各单体在血清中的质量(表 4)。

3.4 TFRD 血清对淋巴细胞增殖的作用:TFRD 血清对正常小鼠的脾淋巴细胞增殖反应有促进作用。与相等添加量的正常血清组相比,20% TFRD



a-0 min b-10 min c-20 min d-30 min
e-40 min f-50 min g-60 min

图 2 单次 ig TFRD 200 mg/kg 后不同时间小鼠血清的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of mice serum in different times after a single ig TFRD at a dose of 200 mg/kg

表 3 单次 ig TFRD 200 mg/kg 血清中对照品标准曲线方程

Table 3 Standard equation of TFRD serum reference substances after a single ig 200 mg/kg

对照品	线性方程	r	线性范围/ μg
芫花苷	$Y=5.67 \times 10^6 X - 1.25 \times 10^4$	0.997 47	0.009 2~0.037 0
芫花醇 A	$Y=1.34 \times 10^7 X - 2.02 \times 10^5$	0.994 78	0.022 3~0.100 4
毛瑞香素 H	$Y=1.52 \times 10^7 X - 7.66 \times 10^5$	0.993 07	0.058 3~0.262 4
毛瑞香素 G	$Y=1.48 \times 10^7 X - 8.28 \times 10^5$	0.999 85	0.094 6~0.425 5
毛瑞香素 B	$Y=1.04 \times 10^7 X - 1.13 \times 10^6$	0.994 30	0.171 1~0.684 6
芫花素	$Y=8.19 \times 10^6 X - 2.24 \times 10^4$	0.993 64	0.007 9~0.035 6

表 4 20, 30, 40 min TFRD 血清的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Determination of TFRD serum in 20, 30, and 40 min ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	血清中样品的量/ μg		
	20 min	30 min	40 min
芫花苷	—	0.010 1 \pm 0.000 8	—
芫花醇 A	—	0.017 6 \pm 0.004 3	—
毛瑞香素 H	0.054 2 \pm 0.002 1	0.053 1 \pm 0.001 2	—
毛瑞香素 G	0.068 4 \pm 0.002 8	0.061 7 \pm 0.000 3	—
毛瑞香素 B	—	0.121 9 \pm 0.000 9	0.115 9 \pm 0.003 1
芫花素	—	0.008 2 \pm 0.001 9	—

血清对脾淋巴细胞增殖有显著的促进作用 ($P < 0.05$); 在 ConA 的诱导下, 仅有 TFRD 血清添加量为 30% 时有显著的促进作用 ($P < 0.05$), 在 LPS 的诱导下, TFRD 血清添加量为 20%~40% 对淋巴细胞增殖有显著促进作用 ($P < 0.05$), 见表 5。

3.5 TFRD 血清对 NK 和 LAK 细胞杀伤活性的影响: TFRD 血清能显著提高 NK 和 LAK 细胞的杀伤活性。与相等添加量的正常血清组相比, TFRD 血清添加量为 30% 时作用表现最为显著 ($P < 0.01$); 其次是 TFRD 血清添加量为 20% 和 40% ($P < 0.05$), 结果见表 6。

表 5 TFRD 血清对小鼠淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of TFRD serum on lymphocyte proliferation in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	A_{570}				
	10%	20%	30%	40%	50%
正常血清	0.32 \pm 0.02	0.37 \pm 0.05	0.56 \pm 0.02	0.74 \pm 0.01	0.83 \pm 0.03
TFRD 血清	0.32 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02*	0.60 \pm 0.01	0.74 \pm 0.02	0.84 \pm 0.05
TFRD 血清+ConA	0.29 \pm 0.02	0.39 \pm 0.04	0.65 \pm 0.00*	0.74 \pm 0.03	0.69 \pm 0.01
TFRD 血清+LPS	0.35 \pm 0.03	0.43 \pm 0.01*	0.71 \pm 0.06*	0.83 \pm 0.03*	0.85 \pm 0.03

与正常血清组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal serum group

表 6 TFRD 血清对 NK 和 LAK 细胞杀伤活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 Effect of TFRD serum on killing activities of NK and LAK cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	NK 细胞杀伤率/%				
	10%	20%	30%	40%	50%
TFRD 血清	35.32 \pm 2.67	59.84 \pm 0.71*	71.11 \pm 2.67**	62.21 \pm 4.24*	60.87 \pm 2.68
正常血清	27.54 \pm 10.01	28.91 \pm 1.38	30.53 \pm 0.65	30.00 \pm 3.24	36.57 \pm 6.50

组别	LAK 细胞杀伤率/%				
	10%	20%	30%	40%	50%
TFRD 血清	55.32 \pm 0.76*	79.43 \pm 2.90*	84.57 \pm 0.42**	77.67 \pm 1.28*	59.97 \pm 5.64
正常血清	30.70 \pm 1.37	33.44 \pm 0.46	39.19 \pm 0.52	38.57 \pm 3.31	40.34 \pm 9.80

与正常血清组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal serum group

3.6 TFRD 血清对巨噬细胞吞噬功能的影响: TFRD 血清对正常小鼠的腹腔巨噬细胞的吞噬功能有增强作用, 但与相等添加量的正常血清组相比, 只有 TFRD 血清添加量为 30% 时作用有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 7。

表 7 TFRD 血清对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 7 Effect of TFRD serum on phagocytosis of macrophages in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	A_{540}				
	10%	20%	30%	40%	50%
TFRD 血清	0.17 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01*	0.21 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02
正常血清	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	0.18 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01

与正常血清组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal serum group

4 讨论

中药血清药理学是由日本学者在 1984 年提出的, 并由田代真一命名。它是指动物经口服给药一段时间后, 采集动物血液, 分离血清, 用含药物成分的血清代替中药进行体外实验的一种方法^[8]。中药复方成分较复杂, 直接进行体外实验有许多干扰因素, 科学性较差。该方法克服了中药直接进行体外实验的不利因素, 使反应体系更接近于体内环境, 并且客

观地模拟了药物与机体的相互作用过程,可更深入地揭示药物作用机制,使结果具有真实性和科学性。

本实验建立了测定血清中 TFRD 浓度的高效液相色谱方法,该方法准确、科学性强。根据不同时间的 HPLC 指纹图谱测定血药浓度,为在血清药理学方法中寻找一个合适的采血时间点提供一个更可行的手段,也为研究药物在体内的吸收、代谢及其作用机制提供了一个可靠的方法。由 TFRD 的药-时关系可知,血清药物浓度在 0~30 min 是逐渐上升的,在 30~60 min 是逐渐下降的,在 60 min 的血清中几乎已经没有药物。因此,确定 ig 后 30 min 为采血最佳时间点。由于中药试剂一般在给药 3 d 后才能观察到效果,并结合血清药理学实验中通常采用的给药方式^[9],在本实验过程中,采取了 1 日 2 次,给药 7 次的给药方案。

本实验从刺激小鼠脾淋巴细胞增殖、提高 NK 与 LAK 细胞杀伤活性以及增强巨噬细胞吞噬功能等方面对 TFRD 含药血清的活性进行了评价和分析,结果证实了 TFRD 含药血清对小鼠的细胞免疫功能如淋巴细胞增殖、巨噬细胞吞噬活性有一定的促进作用,对 NK 以及 LAK 细胞的杀伤活性表现出十分显著的促进作用。说明 TFRD 通过提高 NK 和 LAK 细胞的杀伤活力实现对小鼠细胞免疫功能的提升。

References:

- [1] Zheng W F, Chen C F, Shi F. HPLC Fingerprint of the roots of *Daphne genkwa* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2005, 21(1): 4-8.
- [2] Zheng W F, Wang L, Shi F. Modulatory effects on cell immunity of mice by total flavonoids from *Radix Daphne Genkwa* [J]. *Pham J Chin PLA* (解放军药学报), 2004, 20(4): 241-245.
- [3] Zheng W F, Shi F. Three biflavonoids from ethanol extract of the roots of *Daphne genkwa* [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2005, 40(5): 438-442.
- [4] Ba D N. *Contemporary Immunological Technology and Application* (当代免疫学技术与应用) [M]. Beijing, Beijing Medical University and China United Medical University United Press, 1998.
- [5] Hu T, Geng P L. Effects of Fufang Pianji and Danweiyao on the chemical therapy-induced impairment of cytokines and NK cell activity [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2003, 19(9): 616-617.
- [6] Ogawa K, Nakada K, Yamashita S. Beneficial effects of the vegetable juice Aojiru on cellular immunity in Japanese young women [J]. *Nutr Res*, 2004, 24: 613-620.
- [7] Zhang S, Wang Q, Li W F, et al. Enhanced antitumor immunity by murine cytokine activated T lymphocytes after co-cultured with bone marrow derived dendritic cells pulsed with whole tumor lysates [J]. *Leukemia Res*, 2004, 28(10): 1085-1088.
- [8] Zhang Q H, Chen K J. The evaluation of application of serum pharmacology on Chinese materia medica and compound prescription [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1996, 16(3): 131.
- [9] Li Y K, Wu J Y. The current scheme of blood drawing on serum pharmacological experiment [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(6): 569-570.

关木通肾毒性的代谢组学研究

赵剑宇¹, 颜贤忠^{1*}, 彭双清²

(1. 军事医学科学院 国家生物医学分析中心, 北京 100850; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所
国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850)

摘要:目的 研究经关木通染毒后大鼠尿液的代谢表型改变及其与组织病理和尿液、血浆生化指标的相关性,探讨代谢组学在中药毒理学研究中的应用。方法 关木通分 4 个剂量组:36、32、28、24 g/kg, Wistar 大鼠连续 ig 给药 6 d, 12 h 后收集尿样,测定¹H-NMR 谱,并进行血浆生化指标和肾脏组织病理学检查。结果 染毒后,大鼠肾脏出现不同程度的炎症坏死,尿样中氧化三甲胺、柠檬酸、牛磺酸、肌酐、甜菜碱等代谢物均有不同程度的下降,而醋酸、丙氨酸则显著上升。主成分分析表明,给药组与对照组的代谢谱有明显差异,能够被区分开,而造成组间差异的主要影响因素是醋酸和氧化三甲胺的变化。不同剂量条件下,各组动物的代谢谱也各不相同,与肾脏病理和血浆生化改变相一致。结论 关木通能够对肾脏造成损害,且大鼠尿液的代谢物谱与关木通毒性作用强度密切相关,代谢组学分析方法在毒理学研究中有广泛的应用前景。

关键词:关木通; 肾毒性; 代谢组学; 核磁共振; 模式识别

中图分类号:R285.53

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0725-06

收稿日期:2005-02-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371705); 国家高新技术研究发展计划项目(2002AA2Z342D)

作者简介:赵剑宇(1974—),男,湖南人,在读硕士研究生,主要从事中药毒性的代谢组学研究。

* 通讯作者 颜贤忠 Tel: (010) 66930305 E-mail: yanxz@nic.bmi.ac.cn