

酸浆苦素 B 对活化多形核中性粒细胞 化学发光及 H_2O_2 产生的影响

北京市中医研究所病理生理室(100010)

李萍* 盛巡 王晓中 张建华

鲍朝辉 何延良 丁瑞

摘 要 通过观察化学发光及检测 H_2O_2 产生,考察锦灯笼的主要成分酸浆苦素 B(physalin B, PhB)对调理酵母多糖激活的多形核中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)的影响。结果显示,不同浓度的 PhB 对活化的 PMN 化学发光呈剂量相关的抑制作用,同时对活化 PMN H_2O_2 的产生也有相同趋势的抑制作用。提示锦灯笼抗炎机理可能是抑制 PMN 氧自由基的产生和释放而发挥作用。

关键词 酸浆苦素 B 多形核中性粒细胞 化学发光 H_2O_2

多形核中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)是机体防御感染的第一道屏障,是炎症过程中的主要杀伤细胞。活化的 PMN 产生呼吸爆炸,形成多种氧自由基,如 O_2^- , $\cdot OH$, H_2O , 及 1O_2 等参与了炎症过程,锦灯笼常用于上呼吸道感染性疾病,有良好的临床疗效,酸浆苦素 B(physalin B, PhB)为其主要成分,因此需观察 PhB 对活化 PMN 化学发光及 H_2O_2 产生的影响,探讨其抗炎作用机理。

1 材料与方法

1.1 PhB:由北京中医医院药化室提供。

1.2 PMN 的制备:选用 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体重 180~250g。腹腔注入高压灭菌液体石蜡 9ml,18h 后用 pH7.2 的 Hank's 液 60ml 冲洗腹腔,洗出液经 1500r 离心 10min,用 pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两次,台盼兰排除染色,存活率 >95%。并用 PBS 调至所需浓度。

1.3 调理酵母多糖:用生理盐水将酵母多糖(zymosan A, Sigma 公司)制成 20mg/ml,沸水煮 30min 后,加自体血清(1:5 稀释)覆

盖,在 37℃ 恒温震荡水浴中孵育 30min,3000r 离心,去上清液,用 PBS 洗两次,用 pH7.2 PBS 调至所需浓度,置 -70℃ 冰箱中保存。

1.4 PMN 化学发光的测定:采用 luminol 发光体系, luminol (3-氨基邻苯二甲酰肼, Merck 公司)先用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成 $1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 4℃ 保存。参考李益新方法^[1]在 Bioorbit-1250 发光仪上测定,设置温度 37℃,将 PMN 调至 $1 \times 10^7/\text{ml}$,分别与 PhB 溶液(100%, 50%, 25%, 0) 5μl 孵育 10min 后,加入调理酵母多糖 0.2ml (2.5mg/ml 终浓度),观察 10min 内的发光曲线的变化。

1.5 PMN 产生 H_2O_2 的测定:参考 Pick 方法^[2]。辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRPO)贮存液:HRPO(上海生化所)用 pH7.0 的磷酸钾缓冲液配成:浓度为 850u/ml。

酚红贮存液:酚红 10g/ml 溶于双蒸水中,浓度为 0.028mol/L。

PRS 缓冲液:组成为工作液(mmol/L):

• Address: Li Ping, Laboratory of Pathology and Physiology, Beijing Municipal Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing

NaCl 140, 磷酸钾缓冲液 10, 葡萄糖 5.5) 9.8ml, HRPO 贮存液 0.1ml, 酚红贮存液 0.1ml。

H₂O₂ 标准品经 KMnO₄ 滴定法检测。

PMN 产生 H₂O₂ 的测定: 将 PMN 用 PRS 调至 2 × 10⁷/ml, 分别加于试管中各 1ml, 同时加 PhB(100%, 50%, 12.5%, 0) 各 5μl, 再加入调理酵母多糖(40mg/ml) 20μl, 在 37℃ 恒温水浴中孵育 30min, 然后 3000r 离心, 取上清, 加 1mol/L NaOH 10μl 终止反应, 在 721 分光光度计上测定, λ=610nm。

1.6 不同浓度的调理酵母多糖对 PMN 产生 H₂O₂ 的影响: PMN 用 PRS 缓冲液调至 2 × 10⁷/ml, 每管各 1ml, 分别加调理的酵母糖(10, 20, 30, 40, 50mg/ml) 20μl, 在 37℃ 水浴中孵育 30min, 离心取上清, 加 1mol/L NaOH 10μl 终止反应, 在 721 分光光度计上测定, λ=610nm。

2 结果

2.1 PhB 对活化 PMN 化学发光的影响: 以 PhB 原液为 100%, 依次观察 50%, 25% 及不加 PhB(0) 对调理酵母多糖(20mg/ml) 活化 PMN 化学发光的影响, 实验重复 3 次, 结果趋势相同, 直线回归分析, r = 0.983, P < 0.05, 各组曲线见图 1。

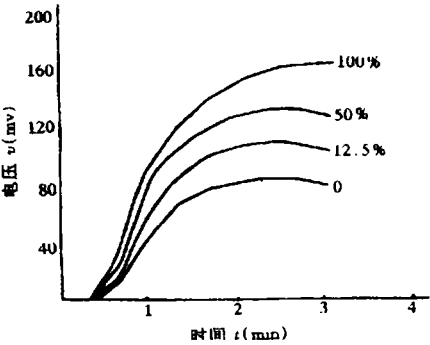


图 1 不同浓度 PhB 对活化 PMN 化学发光的影响

2.2 PhB 对调理酵母多糖激活的 PMN 产生 H₂O₂ 的影响: 以 40mg/ml 调理酵母多糖激活 PMN, PhB 浓度分别为 100%, 50%, 12.5%, 0, 抑制曲线见图 2。

2.3 不同浓度调理酵母多糖对 PMN 产生

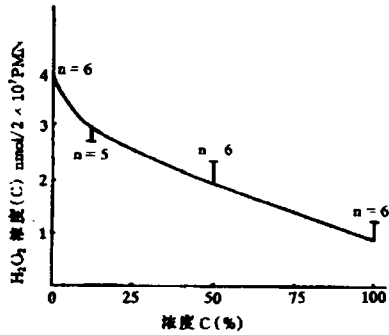


图 2 PhB 对活化 PMN 产生 H₂O₂ 的影响: 分别考察 10, 20, 30, 40, 50mg/ml 调理酵母多糖对 PMN 产生 H₂O₂ 的影响, 结果见图 3, 在 10~40mg/ml 间, 线性关系良好。

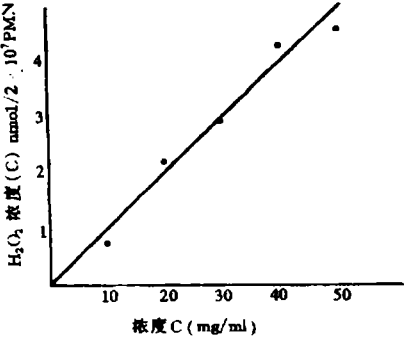


图 3 不同浓度调理酵母多糖对 PMN 产生 H₂O₂ 的影响

3 讨论

PMN 是机体防御感染的第一道屏障, 在炎症过程中, 多种刺激剂可引起 PMN 激活, 产生呼吸爆炸, 形成多种氧自由基, 如 O₂⁻, H₂O₂, ¹O₂ 及 ·OH 等, 其酶反应机制除 NADPH 酶及髓过氧化物酶(MPO)外, 还涉及脂氧合酶和环氧合酶对氧化产物花生四烯酸进行氧化^[3]。活性氧从激发态以光量子辐射形式返回到稳态, 这一过程伴随着化学发光现象^[4]。活性氧的产生, 可促进白细胞趋化, 游走, 导致溶酶体破裂, 血管通透性增高。因此抗炎药物机理中抑制 PMN 的激活也是十分重要的^[5]。

PhB 是锦灯笼的主要成分, 常用于上呼吸道感染性疾病。细菌学检查 PhB 对大肠杆

菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌无明显抑制作用,因此需对其抗炎机理进行深入探讨。

本实验用调理酵母多糖激活 PMN,PhB 不仅能抑制活化 PMN 的化学发光,而且减少 H₂O₂ 的产生,并有剂量依赖性关系。因此推测 PhB 的抗炎作用可能是抑制了 PMN 活化时氧自由基的产生,其作用环节仍需进一步探讨。

参 考 文 献

1 李益新,等. 上海免疫学杂志,1985,5(1):25
2 Pick E,et al. J Lmmu Meth,1980(3):161
3 Badwey J A,et al. J Biochem,1981,256:12640
4 Allen R C,et al. Biochem Biophys Res Commun,1972,47:679
5 Weissmman G,et al. Drugs,1987,33(Suppl):28

(1995-03-06 收稿)

Effect of Physalin B on Chemiluminescence and H₂O₂ Production of Activated Polymorphonuclear Leukocyte

Li Ping,Sheng Xun,Wang Xiaozhong,et al

Effect of opsonized zymosan on polymorphonuclear leukocyte (PMN)were studied by chemiluminescence (CL)and hydrogen peroxide (H₂O₂)assays. Results showed that different concentrations of Physalin B(PhB) presented a dose-dependent inhibitive effect on CL and H₂O₂ production of activated PMN. It suggested that the anti-inflammatory action of PhB may be related to the inhibition of production and release of oxygen free radical by PMN.

伸筋草注射液的制备及其对大鼠实验性矽肺的疗效[△]

铁道部第二工程局职业病防治院(成都 610101) 贺立中* 黄泽华 王惠茹

摘 要 将伸筋草提取液分别用超滤法和水醇法制成注射液,分组对染尘大鼠腹腔注射给药 5 周,解剖后测定各组大鼠肺的鲜重、干重、胶原含量和病理分级等指标,结果表明,用超滤法制备的注射液预防性治疗给药对大鼠实验性矽肺有较好疗效,而用水醇法制备的注射液疗效不佳。还对伸筋草的抗矽有效成分进行了探讨。

关键词 伸筋草注射液 矽肺 超滤

伸筋草为石松科植物石松(*Lycopodium japonicum* Thunb.)和垂穗石松 *Palhinhaea cernua* (L.)A. Franco et Vasc. 等的干燥全草^(1,2)。我们在药筛工作中发现伸筋草的酸水提取液腹腔注射对大鼠实验性矽肺有较好疗效,为了能逐步应用于临床,采用不同的制剂方法,将其制成注射液并进行了预防性治疗

给药的动物疗效实验。

1 注射液的制备

制剂所用的伸筋草购自本地医药公司,经鉴定为垂穗石松,并经成都市药品检验所检验所证。将药材先后用 10 倍量和 8 倍量的 0.1%HCl 浸泡过夜,倾出浸泡液,过滤后浓缩至约 200%(即含生药 2g/ml),冰箱中放置

* Address: He Lizhong,Occupational Diseases Prevention and Treatment Centre,the Second Engineering Bureau of the Ministry of Railways,Chengdu

△现在铁道部第二工程局中心医院药剂科