

- 3 Crystal G, *et al*, Am J Physiol, 1996, 270: H1568
4 Fishbein M C, *et al*, Am J Pathol, 1978, 90: 57
5 王智慧, 等. 上海医药, 1996, 8: 21
6 储敏, 等. 中成药, 1996, 18: 30

- 7 罗海明, 等. 中国中西医结合杂志, 1996, 16: 323
8 王裕生主编. 中药药理与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1258

(1998-09-09 收稿)

Effects of Heart-protecting Musk Pill on the Expression of Myocardial Endothelial Nitric Oxide Synthase and Left Ventricular Function after Myocardial Infarction in Rats

Luo Xinping, Zeng Zhiyu, Shi Haiming, *et al*. (Department of Cardiology, Huashan Hospital, Shanghai University of Medical Sciences, Shanghai 200040)

Abstract Effects of heart protecting musk pill (HMP), a traditional medical preparation for the treatment of myocardial infarction, on the expression of myocardial endothelial NO synthase (eNOS) and left ventricular function of acute myocardial infarction (AMI) rat model were studied. AMI rat models were prepared by coronary artery ligation and randomized into 4 groups: Two groups of AMI-2 and AMI-6 were kept as controls, and the other two, were treated with HMP 33 mg/d by intubation for 2 weeks (HMP-2) or 6 weeks (HMP-6). Cardiac functions (LVESP, LVEDP, dp/dt_{max} , dp/dt_{min}) were measured at the end of 2nd and sixth week of treatment with left ventricular catheter insertion. The level of myocardial eNOS were measured by immunohistochemical staining and image analysis. Results showed that the 2 HMP treated groups resulted in an increase of expression of myocardial eNOS ($P < 0.05$) and an improved systolic, and diastolic functions of left ventricular at the end of 2nd and sixth week of treatment as compared with the control ($P < 0.05$). It may be concluded that HMP can increase the level of myocardial eNOS and improve cardiac functions after myocardial infarction at the same time.

Key words heart-protecting musk pill (HMP) endothelial ntric oxide synthaes (eNOS)

当归醇沉物对体外小鼠脾、胸腺淋巴细胞增殖的影响[△]

湖北医科大学药理教研室(武汉 430071) 夏雪雁* 彭仁琇

摘 要 体外试验中, 采用 MTT 比色法测定当归醇沉物对小鼠脾及胸腺淋巴细胞增殖功能的影响。结果显示, 0.16~2.50 mg/mL 范围内的当归醇沉物能单独或协同 ConA/LPS 发挥促进小鼠脾脏及胸腺 T、B 淋巴细胞增殖的作用。当归醇沉物尚可对抗氢化泼尼松(HP)对 ConA 诱导的脾脏及胸腺 T 淋巴细胞的增殖反应的抑制作用。

关键词 当归醇沉物 淋巴细胞增殖 MTT 比色法 氢化泼尼松

当归 *Angelica sinensis* Diels 是我国传统中药, 除具有补血和血、调经止痛、扶正固本及活血化瘀等功效外, 近年来研究已显示, 当归及其提取物的多种组分均有免疫活性^[1,2]。而在制备当归注射液的过程中, 其醇沉物为废弃

部分。为更全面认识当归的作用, 我们选用当归醇沉物, 通过体外试验观察其对小鼠脾脏及胸腺淋巴细胞增殖反应的影响。同时观察它对氢化泼尼松(HP)所致小鼠脾脏及胸腺淋巴细胞增殖反应抑制状态的调节作用。

* Address: Xia Xueyan, Department of Pharmacology, Hubei University of Medical Sciences, Wuhan

夏雪雁 1994 年毕业于湖北医科大学临床医学专业, 获医学学士学位。1994~1997 年攻读湖北医科大学生化药理专业硕士, 并获得硕士学位。1997 年参加第六届全国生化药理学术讨论会青年优秀论文评选并获得三等奖。1997 年至今任湖北医科大学药理教研室助教。

[△]湖北省教委资助项目; 本文获第六届全国生化药理学术讨论会青年优秀论文三等奖

1 材料

1.1 药品与试剂:当归醇沉物(ESA)由湖北医科大学附属第二医院制药厂提供。加入5倍量蒸馏水加热提取,浓缩后加入无水乙醇使醇终浓度为60%,静置取沉淀加水溶解,再加入无水乙醇使醇终浓度为80%,收获沉淀物,低温60℃干燥。所得深棕色粉末,用生理盐水溶解,2.986 kg、20 min 高压灭菌。氢化泼尼松(HP),湖北制药厂。MTT、刀豆蛋白A(ConA)、细菌脂多糖(LPS)均为Sigma产品。RPMI 1640为Gibco产品。

1.2 实验动物:Balb/c 雄性小鼠,6~8周龄,体重18~22 g,湖北省医科院动物中心提供。昆明种雄性小鼠,8周龄,体重18~22 g,湖北医科大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 ESA 对小鼠脾/胸腺淋巴细胞增殖的影响:参照文献^[2],小鼠摘眼球放血,断椎处死。无菌取出脾/胸腺,制成淋巴细胞悬液。将此悬液用RPMI 1640完全培养液配成 5×10^6 /mL的淋巴细胞悬液,加入40孔板内,每孔50 μ L,随后每孔加入用RPMI 1640稀释的不同浓度(0.16、0.31、0.63、1.25、2.50 mg/mL)的ESA液50 μ L。另设培养液作空白对照。置37℃、5%CO₂培养箱中培养48 h后,每孔加入5 mg/mL MTT液10 μ L,继续培养4 h,加入10%SDS液(0.01mol/L HCl配制)每孔100 μ L,置37℃恒温箱静置12 h。DG-3022A型酶联比色仪波长570 nm处测OD值,结果见表1。

ESA 0.16~1.25 mg/mL 浓度范围内,可明显增强脾淋巴细胞的增殖,且0.16~0.63 mg/mL 浓度范围内存在量效关系($r=0.9890$),0.31~1.25 mg/mL 范围内与对照组比较均有显著性差异($P<0.01$)。ESA 0.16~0.25 mg/mL 浓度范围内,可明显增强胸腺淋巴细胞增殖,且该浓度范围内存在量效关系($r=0.9920$),0.31~2.50 mg/mL 范围内与对照组比较均有显著性差异($P<0.01$),说明ESA单独作用时对脾脏及胸腺

淋巴细胞增殖均有促进作用。

表 1 ESA 对小鼠脾/胸腺淋巴细胞

增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)			
药品	剂量 (mg/mL)	脾细胞 OD	胸腺细胞 OD
RPMI1640	—	0.170±0	0.137±0.015
ESA	0.16	0.173±0.006	0.170±0.017
	0.31	0.190±0**	0.180±0**
	0.63	0.200±0.010**	0.190±0**
	1.25	0.190±0**	0.197±0.015**
	2.50	0.173±0.012	0.213±0.006**

与 RPMI 1640 组比: ** $P<0.01$

2.2 ESA 协同 LPS 对脾 B 淋巴细胞增殖的影响:取 Balb/c 小鼠,同前法制备含 LPS 50 μ g/mL 的 5×10^6 /mL 的脾细胞悬液,加入40孔板内,每孔50 μ L,每孔加入不同浓度的ESA液,并设置培养液及LPS作对照,其它同2.1,结果见表2。

表 2 ESA 协同 LPS 对小鼠脾 B 淋巴细胞

增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)		
药品	剂量(mg/mL)	脾细胞 OD
RPMI 1640	—	0.433±0.025
LPS 25 μ g/mL	—	0.480±0.010*
LPS 25 μ g/mL+ESA	0.16	0.540±0.026 Δ
	0.31	0.530±0.017 Δ
	0.63	0.603±0.074 Δ
	1.25	0.550±0.030 Δ
	2.50	0.547±0.012 $\Delta\Delta$

与 RPMI 1640 组比: * $P<0.05$

与 LPS 组比: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

可见终浓度25 μ g/mL的LPS能明显诱导脾脏B淋巴细胞的增殖反应,统计学处理有显著性差异($P<0.05$)。ESA 0.16~2.50 mg/mL 浓度范围内,均能协同LPS发挥促B淋巴细胞增殖的作用,其中以ESA 0.63 mg/mL时的作用最为明显,淋巴细胞增殖程度较LPS组升高126%,此后随着ESA浓度的升高,脾B淋巴细胞增殖作用不再增加。

2.3 ESA 协同 ConA 对小鼠脾/胸腺 T 淋巴细胞增殖的影响:将脾/胸腺淋巴细胞制成含ConA 6 μ g/mL 的 5×10^6 /mL 的细胞悬液,加入40孔板内。每孔50 μ L,随后每孔加入不同浓度的ESA液,并设置培养液及ConA作对照,其它同2.1,结果见表3。

可见ConA终浓度为3 μ g/mL能明显诱导脾脏及胸腺T淋巴细胞的活化、增殖,

表 3 ESA 协同 ConA 对小鼠脾/胸腺 T 淋巴细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

药品	剂量 (mg/mL)	脾细胞 OD	胸腺细胞 OD
RPMI 1640	—	0.170±0	0.137±0.015
ConA3 $\mu\text{g/mL}$	—	0.187±0.006**	0.163±0.006*
ConA3 $\mu\text{g/mL}$ +ESA	0.16	0.180±0	0.173±0.006
	0.31	0.190±0.010	0.190±0.034
	0.63	0.197±0.015	0.187±0.012△
	1.25	0.203±0.006△	0.203±0.015△
	2.50	0.197±0.006	0.200±0.010△△

与 RPMI 1640 组比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与 ConA 组比: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

统计学处理有显著性差异。ESA 能协同 ConA 发挥促脾脏及胸腺 T 淋巴细胞增殖的作用,其中以 ESA 浓度为 1.25 mg/mL 时作用最为显著。在 0.16~2.50 mg/mL 浓度范围内,对脾脏及胸腺 T 淋巴细胞增殖均存在量效关系($r=0.8452$ 及 $r=0.8912$)。

2.4 ESA 协同 ConA 对抗 HP 对小鼠脾/胸腺 T 淋巴细胞增殖的抑制:将脾/胸腺淋巴细胞制成含 ConA 6 $\mu\text{g/mL}$ 、HP 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液,加入 40 孔板内,每孔 50 μL ,随后每孔加入不同浓度的 ESA 液,并设置 ConA 及 ConA+HP 作对照,其它同 2.1,结果见表 4。

表 4 ESA 协同 ConA 对抗 HP 对小鼠脾/胸腺 T 细胞增殖的抑制($\bar{x} \pm s, n=4$)

药品	剂量 (mg/mL)	脾细胞 OD	胸腺细胞 OD
ConA 3 $\mu\text{g/mL}$	—	0.187±0.006	0.163±0.006
ConA 3 $\mu\text{g/mL}$ + HP0.025 $\mu\text{g/mL}$	—	0.170±0**	0.143±0**
ConA 3 $\mu\text{g/mL}$ + HP0.025 $\mu\text{g/mL}$ + ESA	0.16	0.177±0.006	0.160±0△△
	0.31	0.180±0△△	0.153±0.025
	0.63	0.193±0.006	0.197±0.038
	1.25	0.187±0.011	0.163±0.006△
	2.50	0.200±0.010△△	0.187±0.006△△

与 ConA 组比: ** $P<0.01$

与 ConA+HP 组比: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

HP 终浓度为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 能明显抑制 ConA 诱导的脾脏及胸腺 T 淋巴细胞的增殖($P<0.01$),使淋巴细胞增殖程度下降,分别为 ConA 组的 91%和 88%。ESA 能对抗 HP 的抑制作用在 0.16~2.50 mg/mL 浓度范围

内,ESA 的对抗 HP 对脾淋巴细胞增殖的抑制作用随着浓度的增加而增强。而 ESA 对抗 HP 对胸腺淋巴细胞增殖的抑制作用的浓度-效应现象则不似对脾细胞作用典型,其中 ESA 1.25 mg/mL 时使胸腺淋巴细胞增殖升高 138%。

3 讨论

从当归热水提取物中所得到的当归免疫活性多糖(AIP)为小鼠 B 淋巴细胞的潜在丝裂原,且可使部分细胞群成熟为抗体分泌细胞^[4,5]。本实验所用的系当归水煮醇沉物,体外试验对经特异性 B 淋巴细胞有丝分裂原 LPS 活化及未经活化的小鼠脾细胞均有促进增殖的作用,我们在实验中,曾观察到 ESA 可对抗 HP 对抗绵羊红细胞抗体生成功能的抑制,因此本结果表明当归醇沉物同样具有激活 B 淋巴细胞并使之分化为抗体分泌细胞的作用。

吴梧桐等观察到在 ConA 存在时,当归和其中单体成分阿魏酸均能明显地促进活化的淋巴细胞 DNA 及蛋白质的合成^[2]。本实验结果显示,当归醇沉物对 ConA 活化的小鼠脾及胸腺 T 淋巴细胞也有促进增殖作用,进一步说明当归及其提取物有增强活化的 T 细胞增殖的作用。糖皮质激素为免疫抑制剂,据认为它对胸腺细胞的抑制作用与其诱导免疫细胞的程序性死亡有关^[6,7]。本文所见当归醇沉物对抗 HP 所致 T 淋巴细胞增殖反应的抑制的原因将有待阐明。此外该醇沉物单独对未经活化的小鼠胸腺淋巴细胞有活化和促进增殖的作用,且存在量效关系,这一点尚少见报道。

中药制剂的免疫活性作用常表现出复杂的量效关系,有时只存在一个最适剂量^[8,9]。本实验中可见,当归醇沉物 0.63 mg/mL 时,协同 LPS 对脾 B 淋巴细胞增殖的促进作用亦表现这样的特点。与此同时,当归醇沉物在一定浓度范围内(0.16~2.50 mg/mL),对胸腺淋巴细胞增殖存在量效关系。因此,寻找药物发挥免疫作用的最适剂量,成为研究工

作中的一个关键。

当前从传统中药中提取有效单一成分,已越来越受到人们的关注。然而本文所观察到的是当归水煮醇沉物的免疫活性,它从另一个侧面提示了在反映中药的药理活性中,应全面认识其不同组分的综合作用的结果。

参考文献

- 1 柳钟勋,等. 中国中西医结合杂志,1992,12(6):378
- 2 周金黄,等主编. 中药免疫药理学. 北京:人民军医出版社,1994:365

- 3 周道洪,等. 中国免疫学杂志,1986,2(1):39
- 4 Kumazawa Y, et al. Immunol, 1982, 47:75
- 5 Kumazawa Y, et al. 国外医学-中医中药分册, 1986, 8(3):22
- 6 李宁丽,等. 上海免疫学杂志, 1994, 14(1):59
- 7 时玉舫,等. 上海免疫学杂志, 1997, 17(4):197
- 8 方积年,等. 药学报, 1986, 21(12):944
- 9 胡国俊,等. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2):163

(1998-04-20 收稿)

Effects of Chinese Angelica Tuber (*Angelica sinensis*) Ethanol Sediments on Mice Spleen and Thymus Lymphocytes Proliferation *in vitro*

Xia Xueyan and Peng Renxiu (Department of Pharmacology, Hubei University of Medical Science, Wuhan 430071)

Abstract Sediment (ESA) obtained from the alcoholic precipitate of extract of tuber of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels in the preparation of Angelica injection was considered as a waste product. Its effect on lymphocyte proliferation of mice spleen and thymus was tested *in vitro* by MTT colorimetry. Results showed that at concentrations in the range of 0.16 ~ 2.50 mg/mL. ESA significantly promoted T, B lymphocyte proliferation either alone or with ConA/LPS, and can also antagonize hydroprednisone induced suppression of T lymphocyte proliferation *in vitro*.

Key words ethanol sediments from tuber of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels lymphocyte proliferation MTT colorimetry hydroprednisone

极大螺旋藻胞内多糖对人血癌细胞生长的影响

南京大学医学院 (210093) 刘宇峰* 张成武** 沈海雁*** 李恒 魏海燕

摘要 应用半固体琼脂培养法和 MTT 法研究了极大螺旋藻胞内多糖对人血癌细胞 U937 和 HL-60 的影响。实验结果显示,对体外生长的 U937 细胞有促进生长的作用,而对体外生长的 HL-60 细胞有抑制生长的作用。提示极大螺旋藻胞内多糖对人的血癌细胞的生长有明显的影。

关键词 极大螺旋藻胞内多糖 半固体琼脂培养法 MTT 法 U937 HL-60

多糖不仅是所有生物有机体的重要结构成分,而且也是一种重要的信号或信息分子的受体,参与分子识别、细胞粘着及细胞的防御机制^[1]。近年来,随着糖科学和糖技术的发展,藻类多糖与其它多糖一样,在作为医药产品方面已日益为人们所重视^[2]。钝顶螺旋藻

Spirulina platensis 多糖能够提高机体免疫功能^[3],能够增强小鼠骨髓细胞增殖能力,减轻小鼠骨髓细胞的辐射遗传损伤^[4,5],并能明显抑制体内移植性癌细胞的增殖^[6]。

极大螺旋藻 *Spirulina maxima* 来源于美国 Texas 大学藻种保藏中心,其胞内多糖

* Address: Liu Yufeng, Medical College of Nanjing University, Nanjing

刘宇峰 34 岁,1986 年南京大学生物系本科毕业,1991 年南京大学生物系研究生毕业,获硕士学位。1991 年至今任南京大学医学院讲师。专业研究方向为细胞和分子生物学及肿瘤免疫学。近年来主要从事螺旋藻蛋白及多糖对小鼠免疫功能及人肿瘤细胞生长影响的研究,已在《中国海洋药物》发表论 1 篇(嗜盐隐杆藻胞外多糖对小鼠免疫功能的影响)。

** 南京化工大学生物技术与科学系

*** 南京大学生物科学与技术系