

三七总皂苷对 TNF、NO 含量的影响及其机制研究

第三军医大学药理教研室(重庆 400038)

李晓辉*

李淑慧

摘 要 采用 sc 角叉菜胶(Car)25 mg/kg 复制大鼠背部气囊滑膜炎模型。白细胞计数、蛋白含量分别用试管稀释法和 Lowry 法测定。酶联免疫吸附分析法、Rivanol 法和 Fura-2 荧光分析法分别用于测定灌洗液中 TNF、NO 含量以及中性粒细胞胞内游离钙($\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$)水平的变化。结果显示:三七总皂苷(PnS)60、120、240 mg/kg 3 个剂量组均能一定程度地降低灌洗液中白细胞数、蛋白含量、TNF 及 NO 含量;与此同时,抑制 $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平的升高,其抑制率分别为:9.2%、34.3%及 39.2%。提示 PnS 具有良好抗炎活性,其机制与抑制灌洗液中炎性细胞因子 TNF 及 NO 水平的升高有密切关系,而抑制 $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平的升高则是 PnS 抑制炎性细胞因子含量升高的重要分子机制之一。

关键词 三七总皂苷 炎症 TNF NO 游离钙

三七总皂苷(total saponins of *Panax notoginseng*, PnS)是三七根的主要活性成分,具有良好的抗炎活性^[1],但其抗炎机制尚不清楚。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一重要的炎性细胞因子,多种炎症疾病均伴有 TNF 含量的升高^[2]。一氧化氮(NO)是新近发现的另一重要致炎分子^[3]。鉴于 PnS 与人参皂苷组成成分具有类似性^[4],而人参皂苷具有调节细胞因子生成的作用^[5],故我们以角叉菜胶(Car)诱导的大鼠气囊滑膜炎为模型,在研究 PnS 抗炎作用的同时探讨了 PnS 对灌洗液中 TNF 及 NO 含量的影响。因细胞内游离钙的变化介导 NO 的致伤作用^[6], Ca^{2+} 参予 TNF 的释放^[7]。为此,进一步探讨了 PnS 对 $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平的影响。

1 材料和方法

1.1 动物:健康雄性 Wistar 大鼠,体重(185 ± 34) g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:PnS 为中国科学院昆明植

物研究所提供(粉剂,含量 99%);地塞米松(Dex)为卫生部药品检定所提供;角叉菜胶(Car)为辽宁药物研究所产品;rivanol:美国 Sigma 产品;肿瘤坏死因子(TNF)试剂盒:军事医学科学院基础所提供;Fura-2 及 Fura-2 AM:中国科学院上海药物研究所提供;其它试剂为国产分析纯级。

1.3 动物处理:随机将大鼠分为 6 组(每组 8 只):正常组、Car 致炎组(对照组)、Car + PnS 60、120、240 mg/kg 组及 Car + Dex 1 mg/kg 组。于 Car 致炎前 30 min 及致炎后 6 h 分别 ip PnS 和 Dex,对照组给予等容量溶媒。Car 致炎后 12 h 活杀大鼠,用无钙镁 Hank's 液(HBSS)灌洗,收集灌洗液进行有关指标测定。

1.4 大鼠气囊滑膜炎模型复制:参照文献方法进行^[8]。气囊内注射 Car 25 mg/kg(正常组给予等容量溶媒)诱导炎症,致炎后 2 h 活杀大鼠,背部气囊内注入 4 mL HBSS 灌洗,收集灌洗液并置于已硅化试管中。取少许灌洗液行白细胞计数及分类计数,其余部分立

* Address: Department of Pharmacology, The Third Military Medical University, Chongqing

李晓辉 医学博士,药理学教授,第三军医大学药理教研室主任。近年主要从事抗炎免疫药理研究工作,现为全国抗炎免疫药理学会副主任委员兼秘书长、中国药理学会理事。首届中法国际药理学青年施维雅优秀工作者奖获得者,曾获省部级(军队)二等奖 1 项、三等奖 3 项。

即离心(4℃,1 800×g,10 min)收集上清液-70℃贮存备用。将沉淀白细胞用 HBSS 液洗涤 2 次(4℃,1 800×g,5 min),typan blue 检查白细胞活力,结果细胞活力大于 97%,Neu 占约 95%,用 HBSS 调整成一定浓度的细胞悬液后备用。

1.5 灌洗液中蛋白含量的测定:按 Lowry 法进行^[9]。

1.6 灌洗液中 TNF 含量测定:采用酶联免疫吸附分析法进行^[10]。

1.7 灌洗液中 NO 测定:参照文献方法^[11],略加改进。(1)样品处理:取样品 0.25 mL,加入 40 mol/L 过氯酸 0.1 mL,混匀后离心(3 000×g,30 min),弃沉淀,-70℃贮存待测。(2)测定:取样品或不同浓度的亚硝酸钠标准液加蒸馏水至 2 mL,加入 0.1% rivanol 200 μL、12 mol/L 盐酸 800 μL,于波长 520 nm 处测定光密度值。根据标准曲线计算样本 NO 含量,以 mg/L 表示。

1.8 Neu-[Ca²⁺]_i 测定^[12]:取细胞悬液(1×10⁶/L),用含有 0.2%牛血清白蛋白的 HEPES-Krebs Rins 缓冲液(HKR)(含:NaCl 116、KCl 5.4、MgCl₂ 1.0、HEPES 20、葡萄糖 10 mmol/L;pH7.4)洗涤 1 次,加入用 DMSO 配制的 Fura-2 AM 贮存液(2 mmol/L)使其终浓度为 4 μmol/L,37℃孵育 40 min,使 Fura-2 AM 负载到细胞内。用 HKR 洗涤 2 次,测定荧光强度。测定条件:以 500 nm 波长为发射波,激发光光栅和发射光光栅均固定为 10 nm,扫描激发光谱,若最大荧光峰在 345 nm,即说明负载成功。固定激发发射光波长于 345 nm,测定无 Ca²⁺ 及 1

mmol/L Ca²⁺ 时的荧光强度,继之加入 Triton-X-100(终浓度为 0.09%)破细胞膜测定最大荧光强度(F_{max}),再加入 9 mmol/L EDTA 络合全部钙,以测定最小荧光强度(F_{min}),依下列公式计算[Ca²⁺]_i 浓度。

[Ca²⁺]_i=Kd(F-F_{min})/(F_{max}-F)

Kd 为 Fura-2 与 Ca²⁺ 的解离常数,37℃ 时为 224 nmol/L。

1.9 统计分析:各组数据采用方差分析和相关显著性检验。结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 对灌洗液中白细胞计数及蛋白含量的影响:由表 1 可见,Car 致炎后,灌洗液中白细胞计数及蛋白含量均显著高于正常组(P<0.01),PnS 在所用剂量范围内能明显降低白细胞数及蛋白含量,且呈剂量依赖性。

表 1 对灌洗液中白细胞计数及蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	白细胞 (1×10 ⁹ /L)	蛋白 (g/L)
正常组	—	8	2.95±0.54	0.59±0.20
Car 致炎组	—	8	47.87±15.34△△	7.46±1.26△△
Car+PnS	60	8	30.29±9.49△△*	7.41±1.55△△
Car+PnS	120	8	21.16±7.15△△**	5.70±1.47△△*
Car+PnS	240	8	16.99±6.18△△**	4.41±1.35△△**
Car+Dex	1	8	16.85±6.99△△**	5.39±1.20△△**

与正常组比较:△△P<0.01

与致炎组比较:*P<0.05 **P<0.01

2.2 对 Car 致炎大鼠灌洗液中 TNF 含量的影响:由表 2 可见,Car 致炎后,大鼠气囊灌洗液中 TNF 含量明显升高(P<0.01),PnS 在所用剂量范围内能一定程度地抑制 TNF 含量的升高,且呈剂量依赖性。Dex 具有类似作用。但各药物不能使 TNF 含量恢

表 2 对灌洗液中 TNF 及 NO 含量和 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	TNF (g/L)	NO (mg/L)	Neu-[Ca ²⁺] _i (nmol/L)
正常组	—	8	1.22±0.36	1.09±0.20	216±48
Car 致炎组	—	8	6.47±2.06△△	4.70±1.02△△	485±126△△
Car+PnS	60	8	5.66±2.21△△	4.89±1.32△△	441±131△△
Car+PnS	120	8	4.34±1.66△△*	3.48±0.59△△*	324±115△*
Car+PnS	240	8	3.08±0.74△△**	2.11±0.59△△**	294±86△△**
Car+Dex	1	8	2.97±0.73△△**	2.22±0.35△△**	480±106△△

与正常组比较:△△P<0.05 △△P<0.01; 与致炎组比较:*P<0.05 **P<0.01

复到正常水平。

2.3 对 Car 致炎大鼠灌洗液中 NO 含量的影响:Car 致炎后大鼠气囊灌洗液中 NO 含量明显升高,PnS 在所用剂量范围内能一定程度地降低灌洗液中 NO 的含量,且呈剂量依赖性。Dex 也具有类似作用(见表 2)。

2.4 对 Car 致炎大鼠 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的影响:Car 致炎后大鼠气囊灌洗液 Neu-[Ca²⁺]_i 水平明显升高($P<0.01$),PnS 60、120、240 mg/kg 能一定程度地抑制 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的升高,其抑制率分别为 9.2%、34.3%、39.2%;Dex 无降低 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的作用(见表 2)。

2.5 相关分析结果:PnS 对灌洗液中 TNF 及 NO 含量变化的影响与其对灌洗液中蛋白含量变化的影响均呈显著正相关($r=0.9319, 0.9109, P$ 均 <0.01);Neu-[Ca²⁺]_i 水平与 TNF、NO 含量的变化也呈显著正相关($r=0.6986, 0.6640, P$ 均 <0.01)。

3 讨论

白细胞游出和蛋白渗出是炎症的两大显著特征。本实验观察到 PnS 在使用剂量范围内能明显降低 Car 致炎大鼠气囊灌洗液中 Neu 数量,降低灌洗液中蛋白含量,表明 PnS 具有抑制 Car 诱导的大鼠气囊滑膜炎的作用。这与其它学者报道 PnS 能显著抑制大鼠 5-HT 足肿胀、巴豆油致耳肿胀的结果^[1]相似。说明 PnS 的确具有良好的抗炎活性。

实验结果显示,Car 致炎后大鼠气囊灌洗液中 TNF 水平明显增加,这与其它学者报道人类系统性炎症反应综合症、类风湿性关节炎时均伴有 TNF 含量增加的结果^[2]相一致。PnS 在所用剂量范围内能明显降低大鼠气囊灌洗液中 TNF 含量,且呈剂量依赖关系。相关分析结果显示,PnS 抑制灌洗液 TNF 含量升高与其抑制灌洗液中蛋白渗出呈显著正相关($P<0.01$)。表明抑制炎症细胞因子 TNF 生成是 PnS 发挥抗炎作用的重

要机制之一。

实验还发现,Car 致炎后大鼠灌洗液中 NO 含量明显升高。这与其它学者报道大鼠关节炎时 NO 含量明显升高的结果^[3]相吻合,提示降低 NO 可能具有抗炎活性。但目前对 PnS 是否影响炎症时 NO 的含量尚未见文献报道,本实验首次观察到 PnS 能一定程度地阻止 Car 致炎大鼠灌洗液中 NO 含量的升高。相关分析结果显示,PnS 抑制 NO 含量的升高与其抑制蛋白渗出呈显著正相关($r=0.9101, P<0.01$);表明 PnS 抑制 NO 合成可能是其发挥抗炎作用的又一重要机制。

实验进一步观察到,Car 致炎后 Neu-[Ca²⁺]_i 水平明显升高,PnS 3 个剂量组呈剂量依赖性地阻止 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的升高,Dex 无影响。相关分析结果显示,PnS 对 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的影响与其对 TNF 及 NO 含量的影响成显著正相关(P 均 <0.01),表明 PnS 抗炎机制与 Dex 不同,抑制 Neu-[Ca²⁺]_i 水平的升高是其抑制炎症细胞因子 TNF 及 NO 含量升高的重要分子机制之一。

参考文献

- 1 张晓丹,等. 中医药信息,1993,(5):28
- 2 Dinarello C A. J Biol Regul Homeost Agents,1997,11(3):91
- 3 李淑慧,等. 四川生理科学杂志,1998,20(1):9
- 4 范盘生,等. 中国药理学与毒理学杂志,1988,2(4):257
- 5 于永利,等. 中国免疫学杂志,1987,3(1):41
- 6 Richter C, *et al.* Biochem Biophys Res Commun,1994,205(2):1143
- 7 Sodhi A, *et al.* Int J Immunopharmacol,1994,16(12):1003
- 8 Mikami T, *et al.* Eur J Pharmacol,1983,95(1):1
- 9 Lowry O H, *et al.* J Biol Chem,1951,193(1):265
- 10 Meager A, *et al.* J Immunol Methods,1989,116(1):1
- 11 罗向东,等. 中华创伤杂志,1994,10(4):185
- 12 关水源,等. 中国药理学通报,1990,6(5):96
- 13 Mourelle M, *et al.* Am J Physiol,1996,270(3 Pt 1):G425

(1998-12-30 收稿)

Li Xiaohui and Li Shuhui (Department of Pharmacology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Rat air-pouch acute inflammatory model was prepared by sc injection of carrageenan (Car, 25 mg/kg). The neutrophil (Neu) count and protein content in exudate were measured by test tube diluting method and Lowry method. Enzyme linked immunosorbent assay and Rivanol assay were applied respectively to investigate effects of saponins of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng (PnS) on tumor necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO) content in the perfusate. Fura-2 fluorescence technique was used to determine the intracellular free calcium concentration in Neutrophils ($\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$). The results showed that PnS 60, 120 and 240 mg/kg ip reduced Neu counts, protein content, TNF and NO contents in a dose-dependent manner; lowered the level of $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$ with inhibitory rates of 9.2%, 34.3%, and 39.2%, respectively. It was concluded that PnS has an obvious antiinflammatory effect and its mechanisms of action are related to the reduction of TNF and NO contents, and inhibition of $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$ level.

Key words saponins of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng TNF NO free calcium anti-inflammation $\text{Neu-}[\text{Ca}^{2+}]_i$

罗布麻叶浸膏对脑内单胺类递质含量 及细胞膜流动性的影响[△]

苏州医学院药理学教研室(215007) 潘建新* 顾振纶 钱曾年 秦正红 许美凤 石琳

摘 要 罗布麻叶浸膏可使脑内 5-HT 及 DA 含量升高,其水溶性成分可使 5-HT、5-HIAA 及 DA 含量升高,而 NE 含量降低,醇溶性成分上述作用更为明显。提示罗布麻叶浸膏可能含有兴奋中枢 5-HT 神经元功能及抑制中枢肾上腺素神经元功能的化学物质,这些化学物质为水溶性及醇溶性。脑神经细胞膜脂质流动性测定结果提示罗布麻叶浸膏水溶性部分可使膜流动性增加。

关键词 罗布麻叶浸膏 单胺类递质 脑神经细胞膜流动性

罗布麻为夹竹桃科植物 *Apocynum venetum* L., 广泛野生于盐碱沙荒地区,其根有强心利尿作用;叶具有降血压,治哮喘^[1]及加强免疫功能等作用。以往我们研究还发现罗布麻叶浸膏有一定程度的镇静,镇痛作用。为此我们进一步测定了罗布麻叶浸膏、水溶性、醇溶性或脂溶性部分对脑内单胺类递质含量以及对神经细胞膜脂质流动性的影响,以探

索其中枢作用机制及其有效成分所在部位。

1 实验材料

1.1 动物:昆明种小鼠,雌雄兼有,体重 18~22 g;Wistar 大鼠,雌雄兼有,体重 150~200 g,均由苏州医学院实验动物中心提供。

1.2 药物:罗布麻叶浸膏,由江苏省东台县罗布麻厂提供,为棕色干浸膏,每克相当原生药 7.7 g,临用时用 0.5%羧甲基纤维素钠

* Address, Pan Jianxing Department of pharmacology, Suzhou medical college, Suzhou

潘建新 男,44 岁,主管药师,1978 年毕业于苏州医学院附一院卫校药剂专业,1989 年毕业于苏州医学院夜大学医学基础专业,获大专学历。主要从事心血管、神经药理及新药临床前药理、药效、毒理等研究工作,共发表论文 5 篇。

[△]江苏省医药总公司资助项目