

脑颗粒神经元死亡是典型的细胞凋亡。而且该模型具有以下特点及优点: (1)小脑颗粒细胞是哺乳动物脑中数量最丰富的细胞之一。(2)小脑颗粒细胞培养方法成熟,易于获得,易于培养。细胞纯度可达95%左右。虽然小脑不是MPTP毒性的最初靶标,但MPTP也作用于小脑^[10]。由于MPTP需从国外购买,价格昂贵,而且用MPTP所制作的动物模型用药量大,成功率仅达30%左右,这对于开展抗PD的药物研究带来困难。细胞凋亡是PD发病机制中必不可少的环节,就有可能通过阻止细胞凋亡,以达到延缓PD的发病进程和改善病情之目的。我们建立的该细胞模型具有简单可靠的特点,为从中草药及合成化合物中筛选抗PD剂提供了新方法、新途径。

参考文献:

- [1] Kopin I J, Markey S P. MPTP toxicity implications for research in Parkinson's Disease[J]. *Ann Rev Neurosci*, 1988, 11: 81-96.
- [2] Stern G. Parkinson's Disease: The apoptosis hypothesis[J].

- Adv Neurol*, 1996, 69: 101-107.
- [3] Levi G, Aloisi F, Ciotti M T, *et al.* Autoradiographic localization and depolarization induced release of acidic amino acids in differentiation cerebellar granule cell cultures[J]. *Brain Res*, 1984, 290: 77-86.
- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 第二版. 北京: 北京出版社, 1997.
- [5] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [6] Moffitt P. Amethyl green-pironin technique for demonstrating cell death in the murine tumour S₁₈₀[J]. *Cell Biol*, 1994, 18: 677-681.
- [7] Santosh R, D Mello, Gall C, *et al.* Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: Inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP[J]. *Proc Natl Acad USA*, 1993, 90: 10989-10993.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [9] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. *J Immunol Methods*, 1991, 139: 271-279.
- [10] Marini A M, Schwartz J P, Kopin I J. The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in-cultured cerebellar granule cells[J]. *J Neurosci*, 1989, 9: 3665-3671.

大黄素对大鼠腹腔巨噬细胞产生的 TNF α 、IL-1、IL-6及细胞 [Ca²⁺]_i 的影响

张 骏,翁福海,李会强,姚 智

(天津医科大学药学院,天津 300203)

摘要:目的 研究中药大黄有效成分大黄素对不同状态下的巨噬细胞分泌 TNF α 、IL-1、IL-6和 [Ca²⁺]_i 的影响。方法 利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的大鼠腹腔巨噬细胞作为过度炎症反应的体外模型,用生物学方法和荧光分光光度法测定巨噬细胞合成分泌的 TNF α 、IL-1、IL-6和 [Ca²⁺]_i。结果 大黄素对 TNF α 的分泌和 [Ca²⁺]_i 有双向调节作用。结论 大黄素可能具有免疫双向调节功能。

关键词: TNF α ; IL-1; IL-6; [Ca²⁺]_i; 大黄素

中图分类号: R286.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2001)08-0718-04

Effect of emodin on secretion of TNF α , IL-1, IL-6, and level of intracellular Ca²⁺ by rat peritoneal macrophage

ZHANG Jun, WENG Fu-hai, LI Hui-qiang, YAO Zhi

(College of Pharmacy, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300203, China)

Abstract Object To study the effect of emodin, the active principle in rhubarb on the secretion of TNF α , IL-1, IL-6, and [Ca²⁺]_i by rat peritoneal macrophage under different conditions. **Methods** Hypernomic inflammation models of isolated rat peritoneal macrophage were prepared by lipopolysaccharide excitation and the levels of [Ca²⁺]_i and the proinflammatory cytokines TNF α , IL-1 and IL-6 secreted determined by fluorescence spectrophotometry and bioassay. **Results** Emodin showed a dual regulatory effect on the secretion of proinflammatory cytokines and [Ca²⁺]_i. **Conclusion** It seemed that emodin has a biphasic immunoregulatory effect.

收稿日期: 2001-12-11

作者简介: 张 骏(1966-),男,浙江人,讲师。1988年毕业于天津第二医学院获理学学士学位,2000年毕业于天津医科大学获医学硕士学位。现在天津医科大学药学院工作,主要从事药理学及药物分析工作。Tel: (022) 23328724

Key words TNF; IL-1; IL-6; $[Ca^{2+}]$; emodin

目前认为炎症和免疫反应具有不可分割的相关性。病原激活巨噬细胞等炎性细胞,使后者分泌介导炎症的细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6等以及其它炎性介质,形成炎症。过度的炎症反应常常一经启动便失去控制,形成瀑布效应,最终导致自身破坏性的结果——全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[1,2]。 Ca^{2+} 除了作为细胞内许多关键酶和功能蛋白的辅基之外,还是重要的胞内信使。细胞 $[Ca^{2+}]$ 变化在生物信号传递、调节细胞因子和炎性介质的基因表达中有重要作用。大黄素(emodin, EMD)是大黄的有效成分之一,它具有显著的抗菌、抗癌、解痉、利尿作用^[3]。目前对其抗炎作用的研究多见于器官组织水平,本研究从EMD对大鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, PM Φ)释放炎性细胞因子(TNF、IL-1、IL-6)和对细胞 $[Ca^{2+}]$ 的影响这个角度,分析了各指标水平的变化以及它们之间的相互关系,在细胞分子水平上探讨中药清热解毒和活血化瘀在炎症控制与治疗方面的机制。

1 实验材料

1.1 动物: Wistar大鼠,体重250~280g,雌雄兼用,军事医学科学院动物室提供。

1.2 试剂: 大黄素(纯度: 90%以上)由天津药物研究院植化室提供; RPMI1640(Sigma公司)、脂多糖(LPS, Sigma公司)、IL-1、IL-6标准品、We-Hil64.13细胞、B9细胞(天津医科大学医学检验系主任姚智教授惠赠); Fura-2/AM(中国医学科学院药物所)。

1.3 仪器: CO₂孵育箱(美国Napco公司);超净台(天津净化仪器厂);Bio-Rad-550酶标仪(美国);倒置相差显微镜(日本Olympus);Vortex涡旋振荡器(上海精科实业有限公司);荧光分光光度计(BF-510,日本岛津)。

2 实验方法

2.1 EMD液: 精称EMD适量,先用少量0.01 mol/L NaOH溶解,然后用生理盐水稀释到 $\times 10^{-4}$ mol/L (pH=7.5),无菌过滤,室温密闭保存。

2.2 LPS液: 取LPS适量,用无血清RPMI1640溶解,浓度200 μ g/mL,无菌过滤,分装,1毫升/皮, -20 $^{\circ}$ C冻存。

2.3 Fura-2/AM液: 1mg,用1mL DMSO溶解,

分装20微升/皮,密封, -20 $^{\circ}$ C冻存。

2.4 实验分组

2.4.1 LPS处理组分为: ①正常对照组(PM Φ), ②LPS模型组(LPS+ PM Φ), ③EMD大剂量组(EMD+ LPS+ PM Φ), ④EMD中剂量组(EMD+ LPS+ PM Φ), ⑤EMD小剂量组(EMD+ LPS+ PM Φ), ⑥地塞米松组(地塞米松+ LPS+ PM Φ)。①~⑥组LPS终浓度为20 μ g/mL, ③~⑤组EMD终浓度分别为 8×10^{-5} , 1.5×10^{-5} , 8×10^{-6} mol/L, ⑥组地塞米松为0.5 μ g/mL。

2.4.2 未经LPS处理组: ③~⑥不加LPS,其余同“2.4.1”。

2.5 大鼠腹腔巨噬细胞分泌的TNF、IL-1、IL-6的测定^[4]: 在无菌条件下制备大鼠腹腔巨噬细胞悬液($\times 10^6$ cfu/mL, 细胞活力大于95%)。根据实验分组,加入一定量LPS、EMD、地塞米松磷酸钠,每组做3个复孔,继续培养48h,取培养上清液待测。TNF的测定采用对其敏感的对数生长期的We-Hil64.13细胞,MTT液(0.5mg/mL)显色,计算细胞毒效应。IL-6的测定采用B9细胞MTT显色法。IL-1的测定采用小鼠胸腺细胞MTT显色法。

2.6 大鼠腹腔巨噬细胞 $[Ca^{2+}]$ 测定方法^[5]: 制备大鼠腹腔巨噬细胞悬液($\times 10^7$ cfu/mL, 细胞活力大于95%)。根据实验分组,分别加入一定量LPS、EMD、地塞米松磷酸钠液等,用负载Fura-2法测定 $[Ca^{2+}]$ 。

2.7 数据处理及统计: 采用中环电脑Penta III, SPSS 8.0软件进行数据处理线性回归。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,比较各组间的差异。加药时做3个复孔,细胞因子测定时做2个复孔。

3 实验结果

3.1 EMD对大鼠腹腔巨噬细胞合成分泌TNF、IL-1、IL-6的影响: 当大鼠腹腔巨噬细胞被LPS激活后,进入完全激活阶段,大量分泌TNF、IL-1、IL-6与正常对照组相比,上述细胞因子的分泌量显著增加($P < 0.01$);向模型中加入EMD后,与LPS模型组相比,TNF、IL-1、IL-6的分泌量显著减少($P < 0.01$),并表现出良好的剂量依赖关系,见表1。

正常对照组可见TNF、IL-1、IL-6少量的分泌,向其中加入不同剂量的EMD后,发现TNF的分泌量呈剂量依赖性增加,其中大剂量EMD组的分泌量与正常对照组相比,有显著性增加($P <$

0.01),但增加程度明显低于 LPS刺激组;而 EMD 塞米松阳性对照组对不同状态下的巨噬细胞分泌对正常对照组的 IL-1 IL-6的分泌无明显作用,地 TNF α 表现出抑制作用,见表 2

表 1 EMD对 LPS刺激的大鼠腹腔巨噬细胞分泌细胞因子的影响 (n= 8)

组别	TN F α 细胞毒效应 (%)	IL-1(U/mL)	IL-6(pg /mL)
PM Φ	5.8 \pm 1.83	16.94 \pm 2.64	19.22 \pm 2.69
LPS	91.39 \pm 3.16 Δ	60.68 \pm 11.75 $\Delta\Delta$	152.88 \pm 11.69 $\Delta\Delta$
EMD(6 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	15.5 \pm 1.27 Δ^*	19.29 \pm 4.60 *	21.03 \pm 2.52 *
EMD(1.5 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	31.35 \pm 6.24 Δ^*	24.25 \pm 6.53 Δ^*	68.1 \pm 16.07 Δ^*
EMD(6 \times 10 $^{-6}$ mol/L)	88.07 \pm 2.31 Δ^*	39.05 \pm 5.01 Δ^*	115.47 \pm 9.75 Δ^*
地塞米松 (0.5 μ g /mL)	10.39 \pm 1.56 Δ^*	16.70 \pm 2.35 *	17.34 \pm 1.40 *

与 PM Φ 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 LPS组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

表 2 EMD对未经 LPS刺激的大鼠腹腔巨噬细胞分泌细胞因子的影响 (n= 6)

组别	TN F α 细胞毒效应 (%)	IL-1(U/mL)	IL-6(pg /mL)
PM Φ	6.28 \pm 2.11	14.6 \pm 2.12	48.05 \pm 10.34
EMD(6 \times 10 $^{-6}$ mol/L)	8.15 \pm 1.70	13.89 \pm 2.64	49.50 \pm 6.07
EMD(1.5 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	9.4 \pm 1.93	14.94 \pm 2.59	49.95 \pm 6.08
EMD(6 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	17.57 \pm 1.76 Δ	14.45 \pm 3.22	58.12 \pm 5.09
地塞米松 (0.5 μ g /mL)	3.73 \pm 1.11	14.52 \pm 2.97	48.60 \pm 8.52

与 PM Φ 组比较: $\Delta P < 0.01$; 与地塞米松组比较: $^* P < 0.01$

3.2 EMD对大鼠腹腔巨噬细胞 [Ca $^{2+}$]_i的影响: 实验结果显示,与正常对照组相比, LPS模型组巨噬细胞 [Ca $^{2+}$]_i显著增加 ($P < 0.01$);加入不同剂量 EMD组,与模型组相比可见到的 [Ca $^{2+}$]_i显著下降 ($P < 0.01$),呈剂量依赖性关系,见表 3

表 3 EMD对经 LPS刺激的大鼠腹腔巨噬细胞 [Ca $^{2+}$]_i的影响

组别	例数	[Ca $^{2+}$] _i (nmol/L)
PM Φ	8	84.40 \pm 12.05
LPS模型	8	159.4 \pm 22.89 Δ
EMD(6 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	8	96.66 \pm 13.96
EMD(1.5 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	8	108.89 \pm 10.40 Δ^*
EMD(6 \times 10 $^{-6}$ mol/L)	8	120.74 \pm 6.28 Δ^*
地塞米松 (0.5 μ g /mL)	8	102.86 \pm 9.24 Δ^*

与 PM Φ 组比较: $\Delta P < 0.01$; 与 LPS组比较: $^* P < 0.01$

向正常对照组中加入 EMD,可升高 [Ca $^{2+}$]_i水平,并呈剂量依赖关系;与正常对照组相比,大、中剂量组的 EMD使 [Ca $^{2+}$]_i显著增加 ($P < 0.01$);地塞米松阳性对照组对不同状态下的巨噬细胞 [Ca $^{2+}$]_i呈抑制作用,见表 4

表 4 EMD对未经 LPS刺激的大鼠腹腔巨噬细胞 [Ca $^{2+}$]_i的影响

组别	例数	[Ca $^{2+}$] _i (nmol/L)
PM Φ	6	88.77 \pm 6.18
EMD(6 \times 10 $^{-6}$ mol/L)	6	85.83 \pm 17.73
EMD(1.5 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	6	110.78 \pm 9.83 Δ
EMD(6 \times 10 $^{-5}$ mol/L)	6	131.35 \pm 5.53 $\Delta\Delta$
地塞米松 (0.5 μ g /mL)	6	78.14 \pm 21.15

与 PM Φ 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与地塞米松组比较: $^* P < 0.05$

4 讨论

在机体对组织损伤和感染的炎症反应中,巨噬细胞分泌的细胞因子以网络化作用方式发挥着整体效应。其中的 TNF α 、IL-1、IL-6更为人们关注,其介导的反应是创伤、感染反应的基本部分,但在炎症免疫反应过程中过量释放,却导致多脏器功能障碍及衰竭。如能阻断细胞因子的过量产生,使细胞因子网络恢复平衡,则能阻止损害性炎症反应的发生和发展。巨噬细胞被内毒素激活后,可广泛参与抗感染、抗肿瘤等非特异性和特异性免疫应答和免疫调节过程。当机体在重度感染时,腹腔巨噬细胞受到大量 LPS刺激,产生大量 TNF α 、IL-1、IL-6,它们相互诱导,相互协同。这些细胞因子的过量存在,进一步激活多形核白细胞 (PMN)和上皮细胞等效应细胞,并释放自由基 (oxygen radicals OR),蛋白酶等,加速花生四烯酸代谢,释放血栓素 (TXA $_2$),前列腺素 (PGs)、白三烯和一氧化氮 (NO)等炎性介质,形成瀑布效应,导致过度炎症反应^[1]。本研究证实,EMD对此有明显的抑制作用,可使上述细胞因子的分泌达到或接近正常水平。当机体处于正常状态时,适当剂量 EMD对 TNF α 分泌尚有一定的促进作用,有利于机体在维护免疫自稳状态下,发挥 TNF α 抗感染的生物活性。由此可见,EMD一方面对过度的炎症反应具有抑制和治疗作用,另一方面对机体的正常免疫防御功能又有促进作用,发挥双向调节作用。

Ca $^{2+}$ 作为第二信使,在细胞活动中占有突出的地位。细胞 [Ca $^{2+}$]_i迅速升高,可激活钙调蛋白激酶;使一系列特异蛋白底物的磷酸化水平增加,其中包括细胞因子的转录因子,如核因子 κ B(nuclear fac-

to rs- κ B, NF- κ B)^[6],使细胞因子的 mRNA水平升高,大量细胞因子生成。本研究发现,大鼠腹腔巨噬细胞被 LPS激活后,细胞 [Ca²⁺]增高 EMD可降低 [Ca²⁺],使之接近或达到正常水平,进而可能抑制与细胞因子有关的基因的表达,减少炎性介质的产生,抑制过度炎症反应。对于未经 LPS刺激的巨噬细胞,EMD却可升高 [Ca²⁺],促进相关的细胞因子的表达,有利于适度发挥抗炎等免疫防御反应。本研究发现,EMD对正常分泌 IL-1和 IL-6几无影响,这可能是机体在自稳状态下的分泌是相互影响、相互制约的网络式的,IL-1和 IL-6的分泌受多种因素的影响。这一现象可能更有利于机体发挥正常的免疫防御功能。

参考文献:

- [1] 毛宝龄. 深入探讨全身炎症反应的失控与调控 [J]. 中华内科杂志, 1997, 36(1): 3-4.
- [2] Demling Rrt, La Londa C, Saldincer D, *et al.* Multiple organ dysfunction in the surgical patient: pathophysiology, prevention and treatment [J]. *Curr Probl Surg*, 1993, 4: 349.
- [3] 祁红. 大黄的抗炎作用 [J]. 中草药, 1999, 30(7): 522-524.
- [4] 李会强, 姚智, 赵瑾莹, 等. IL-2, IL-6及 TNE 的 MTT检测法的建立 [J]. 天津第二医学院学报, 1993, 9(3): 4-6.
- [5] 崔荣芬, 林秀珍. 大黄素对大鼠腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度的影响 [J]. 中草药, 1994, 26(4): 199-200.
- [6] Vanden-Bergh-W, Plainsance-S, Boone-E, *et al.* p38 and extracellular signal-regulated kinase and mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p36 transactivation mediated by tumor necrosis factor [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3285-3290.

蜕皮甾酮对冠状动脉闭塞致大鼠心肌梗死的有益作用及机制

吴旭¹, 晋军², 梁自文³, 石富胜⁴

(1. 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; 2. 第三军医大学附属新桥医院 心内科, 重庆 400039; 3. 第三军医大学附属西南医院 内分泌科, 重庆 400038; 4. 中国人民解放军 322医院 烧伤科, 山西大同 037006)

摘要:目的 探讨植物药有效成分蜕皮甾酮(ecdysterone, EDS)对心肌梗死有益作用,并探讨其机制。方法 采用冠状动脉左前降支结扎致大鼠心肌梗死模型, ip EDS,连续 7 d 测定血清肌酸磷酸激酶(CPK)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性、心肌梗死面积、冠状动脉血流量、毛细血管密度及血管内皮生长因子(VEGF)的表达量。结果 0.5, 5, 50 mg/kg EDS能剂量依赖地影响大鼠血清 CPK、GOT、LDH活性,以 5 mg/kg 剂量的 EDS降低心肌酶谱为最佳。5 mg/kg EDS能明显减少心肌梗死面积,增加冠状动脉血流量、毛细血管密度和 VEGF表达量。结论 EDS能减轻冠状动脉结扎致心肌梗死,机制在于促进 VEGF的表达和毛细血管再生及增加冠状动脉血流量。

关键词: 蜕皮甾酮;心肌梗死;冠状动脉;血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5; R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0721-03

Beneficial effect of ecdysterone on rat myocardial infarction induced by coronary occlusion

WU Xu¹, JIN Jun², LIANG Zi-wen³, SHI Fu-sheng⁴

(1. Institute of Field Surgery, Affiliated DAPING Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated XIN QIAO Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400039, China; 3. Department of Endocrinology, Affiliated Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 4. Department of Burn, No. 322 Hospital, PLA, Datong Shanxi 037006, China)

Abstract Object To explore the beneficial effect of phytoecdysone (EDS) on myocardial infarction and its mechanism of action. **Methods** Rat myocardial infarction model was prepared by ligating the left anterior descending coronary artery, and EDS was injected ip for seven consecutive days. Serum creatine phosphokinase (CPK) glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), lactic dehydrogenase (LDH) activities, infarct size (IS), coronary blood flow, capillary vessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression were determined. **Results** 0.5, 5, and 50 mg/kg of phytoecdysone were able to ef-

收稿日期: 2001-01-05

作者简介: 吴旭(1967-),男,云南绥江县人,第三军医大学大坪医院野战外科研究所副教授,医学硕士,从事内皮细胞相关的心肺脑血管疾病的研究。发表论文 39篇,获国家发明专利 1项。现在第一军医大学南方医院胸外科工作(广东省广州市),邮编: 510515, E-mail wuxu555888@china.com