

2.1 复方丹参对 IPC 大鼠心脏组织 PKC 蛋白表达的影响: PKC 在对照组中主要存在于胞浆,但经过 IPC 和用药后,在胞膜和胞核也可见,这说明上述两种情况激活了 PKC,发生转位,再灌和假性预处理组较对照组表达增强,但无显著差异,早期 IPC 组和晚期 IPC 组表达均高于假性预处理组,以早期 IPC 组明显 ($P < 0.01$);经复方丹参预处理后,PKC 的表达均高于相应组,以 DIPC 组为优,显著高于 IPC 组 ($P < 0.01$)。上述结果提示复方丹参可激活 PKC,促进 PKC 蛋白表达,见表 1

表 1 各组缺血预适应大鼠的 PKC 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects on PKC protein expression

of ischemic preconditioning rats ($\bar{x} \pm s$)

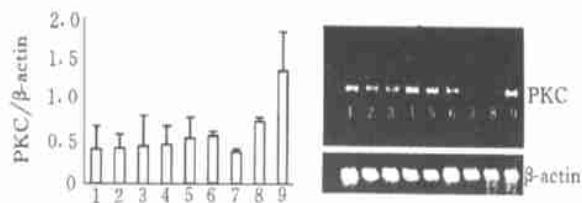
组 别	动物 只	评分值
对照	6	0.88± 0.21
IR	7	1.79± 0.86
SIPC	7	2.43± 1.00
IPC	7	3.36± 1.17 *
DIPC	7	5.20± 1.30 * △△
DIP	7	2.7± 1.31
SIPC /swop	7	1.25± 0.63
IPC /swop	6	1.83± 1.48
DIPC /swop	7	2.7± 1.12

与 IR, SIPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 IPC 组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs IR, SIPC groups; △△ $P < 0.01$ vs IPC group

2.2 复方丹参对 IPC 大鼠心脏组织 PKC mRNA 表达的影响: 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,经分析发现,PKC mRNA 在正常心肌组织中也表达,再灌和假性预处理组与对照组没有明显差异,早期 IPC 组和晚期 IPC 组表达均高于假性预处理组,晚期 IPC 组表现更加明显,复方丹参预处理后,可明显促进早、晚期 IPC 及再灌组 PKC mRNA 的表达

3 讨论



1-对照组 2缺血再灌组 3假性缺血预处理组 4缺血预处理组 5药物预处理+缺血预处理组 6药物预处理组 7晚期假性缺血预处理组 8晚期缺血预处理组 9晚期药物预处理+缺血预处理组

1-control 2-IR 3-SIPC 4-IPC 5-DIPC 6-DIP
7-SIPC/SWOP 8-IPC/SWOP 9-DIPC/SWOP

图 1 各组缺血预适应大鼠的 PKC mRNA 表达

Fig. 1 Effect on PKC mRNA expression of ischemic preconditioning rats

IPC 的保护主要是由 PKC 的激活、蛋白质的磷酸化及其保护蛋白的积累。当短暂缺血和药物刺激后 PKC 迅速转位,使多种保护蛋白发生磷酸化,这是长时间缺血保护的基础。

本实验观察到,IPC 和用药后 PKC 有转位的现象,IPC 组 PKC mRNA 和蛋白表达明显增强,另外还发现不论是再灌前给予复方丹参,还是早、晚期 IPC 前给予复方丹参,均可明显促进 PKC mRNA 和蛋白的表达水平。说明复方丹参对心脏缺血的保护可能是通过激活 PKC 途径而起作用。但 PKC 激活后能使哪些蛋白质发生磷酸化,并参与了心肌细胞的保护作用,以及复方丹参激活了 PKC 的何种亚型是今后值得研究的问题

References

- [1] Nishizuka Y. Protein kinase C, protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses [J]. *FASEB J*, 1995, 9(5): 484-494.

消红散对实验性肾小球肾炎小鼠红细胞免疫功能作用机制的研究

张 翠,刘 琳*

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要: 目的 研究具有益气健脾摄血功效的消红散对肾小球肾炎 (GN) 小鼠红细胞免疫功能的影响。方法 复制免疫性 GN 小鼠模型,检测小鼠血中 C3b 受体花环率及免疫复合物 (CIC) 红细胞免疫黏附促进因子 (RFER)、红细胞免疫黏附抑制因子 (RFIR) 的变化。结果 消红散能增加 GN 小鼠的红细胞免疫功能,使 C3b 受体的数目增加,促使红细胞清除免疫复合物,减少 CIC 在肾小球基底膜沉积,缓解炎症或 CIC 介导的病理过程,且能使 RFER 活性升高,RFIR 活性下降。结论 消红散对红细胞免疫功能具有双向调节作用。

* 收稿日期: 2003-01-10

基金项目: 黑龙江省教育厅基金项目 (9551130)

作者简介: 张 翠 (1958-),女,副教授,博士,主要从事方剂的配伍规律及中药复方治疗肾病的研究。Tel (0451) 84838207

关键词: 肾小球肾炎; 红细胞免疫功能; 消红散

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)10-0935-04

Study on effect of Xiaohong Herbal Powder on red blood cell immune function in glomerulonephritis mice

ZHANG Cui, LIU Lin

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China)

Key words glomerulonephritis; red cell immune function; Xiaohong Herbal Powder

肾小球肾炎(GN)是肾小球疾病中最常见的一种,是慢性肾功能衰竭的最主要原因。多发于儿童及青壮年,以3~8岁儿童为最多,两岁以下极少见。男女发病率之比为1.5~2.5:1^[1]。GN的治疗至今无重大突破,因为它是一个复杂的免疫病理过程,不但各型GN之间表现不同,即使同型肾炎的不同发展阶段在临床表现、肾功能状态及病理变化也不相同,故治疗较为棘手。现代医学认为肾炎的发生发展与免疫平衡失调有关^[2],而红细胞免疫功能在免疫调节中占有很重要的地位,本实验研究消红散对实验性GN小鼠红细胞C3b,红细胞免疫复合物(CIC),红细胞免疫促进因子(RFER),红细胞免疫抑制因子(RFIR)的作用。

1 材料

1.1 动物:昆明种健康小鼠60只,雌性,体重(20±2)g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供;健康豚鼠3只,雌性,体重(400±50)g,黑龙江哈尔滨市药品检验所提供。

1.2 药品和试剂:淋巴细胞分离液,上海试剂二厂;酵母菌,湖北安琪酵母股份有限公司;肝素钠,常州生物化学制药厂;50%戊二醛,哈尔滨化学化工试剂厂;Hank's液,自配;瑞氏染液,南京建成生物工程研究所;小牛血清,哈尔滨万太生物科技公司提供;雷公藤多苷片,湖南株洲市制药二厂。

1.3 用药处方:消红散(黄芪、党参、当归、三七、白术、茜草、甘草等)。

1.4 实验仪器:电热恒温水浴锅,北京长安科学仪器厂;水平高速离心机,北京医用离心机厂;可调微量移液器,上海求精玻璃仪器厂;低温冰箱,日本。

2 方法

2.1 实验分组:选用体重为(20±2)g的昆明种小鼠60只,雌性,将小鼠放入代谢笼内,收集12h尿液,经醋酸加热法测定尿液正常,随机分成6组,每组10只,即消红散高、中、低剂量组(79.2, 39.6, 19.8g/kg),雷公藤多苷对照组(18.75g/kg阳性组),模型组,正常组。

2.2 GN小鼠模型制备:参见文献^[3]并作部分改进。采用昆明种小鼠,雌性,(20±2)g,无菌条件下给小鼠ip小牛血清,每只1mL,每天1次,连续5d。分别在注射前1d和注射后将小鼠放入代谢笼内,收集12h尿液,醋酸加热法检测尿蛋白,以尿蛋白阳性为模型形成指标。第3天尿蛋白检查即为+++,第5天尿蛋白检查为++~+++;动物状况不佳,活动减少,脱毛,并有水肿等症状。模型组小鼠给药前摘眼球采血,进行红细胞C3b(RBC-C3b)受体花环、免疫复合物花环(RBC-ICRR)、血清中RFIR和RFER活性的测定。第6天开始各组小鼠分别ig给予消红散复方煎剂高、中、低剂量,雷公藤多苷片溶液,模型组及正常组ig生理盐水,给药体积均为每只0.5mL,每天1次,连续15d。

2.3 指标的测定

2.3.1 新鲜豚鼠血清的制备:将健康豚鼠心脏取血,放入试管内,离心,得上层血清^[4,5]。

2.3.2 红细胞悬液的制备:各组小鼠给药15d后摘眼球取血0.2mL放于含0.1%肝素钠0.1mL的小试管中抗凝,加等量生理盐水稀释,然后将其缓慢加入含等量淋巴细胞分离液的试管中水平离心,2000r/min,10min,取沉淀的红细胞,经生理盐水洗涤离心3次,2500r/min,5min,然后用细胞记数板记数。用生理盐水配成浓度为 1.25×10^7 /mL的鼠红细胞悬液。

2.3.3 酵母菌悬液的制备:取干酵母菌0.4g加入生理盐水50μL,隔水煮沸30min,然后用32层纱布滤过,除去小凝块,使其在低倍镜下呈单个细胞分散状态,生理盐水洗涤离心2次,3000r/min,5min,配成 $\times 10^3$ /mL的酵母菌悬液。

2.3.4 补体致敏酵母菌悬液的制备:取配好的 $\times 10^3$ /mL的酵母菌悬液,加等量新鲜豚鼠血清,混匀37℃水浴15min,然后用生理盐水混匀,洗涤离心1次,3000r/min,5min。最后用生理盐水使其体积复原,即成 $\times 10^8$ /mL的补体致敏酵母菌悬液(该液现用现配)。

2.4 RBC-C3b受体花环实验:取 1支小试管,先加待测红细胞悬液 $50\mu\text{L}$ ($1.25\times 10^7/\text{mL}$),然后加补体致敏酵母菌悬液 $50\mu\text{L}$,摇匀, 37°C 水浴 30 min,取出后轻轻摇匀,加生理盐水 $100\mu\text{L}$,再加 0.25% 戊二醛 $50\mu\text{L}$,再摇匀,取 $50\mu\text{L}$ 水平涂片。吹干后,用姬姆萨-瑞氏染液染色 1 min,再加少许的瑞氏缓冲液 (pH 6.4) 染 10 min,用自来水冲洗。最后在高倍显微镜下计数 200 个红细胞中的酵母菌的花环数 (以结上两个或两个以上的红细胞为花环),并换算成百分率,作为 RBC-C3b 受体活性的指标

2.5 红细胞免疫复合物 (CIC) 花环实验:取 1支小试管,先加待测红细胞悬液 $50\mu\text{L}$ ($1.25\times 10^7/\text{mL}$),然后加补体致敏酵母菌悬液 $50\mu\text{L}$,摇匀, 37°C 水浴 30 min,取出后轻轻摇匀,涂片、固定、染色、计数。换算同 RBC-C3b 受体花环实验,其百分率作为红细胞膜上吸附免疫复合物量的指标

2.6 血清中 RFIR测定:每组各取 2支小试管,分别加入新鲜待测小鼠血清 $75\mu\text{L}$,然后将第 1管置 58°C 水浴, 30 min,第 2管置室温。每管各加 $1.25\times 10^7/\text{mL}$ 正常鼠的红细胞悬液 $50\mu\text{L}$,置 37°C 水浴 30 min,加 $1\times 10^8/\text{mL}$ 的补体致敏酵母菌悬液 $50\mu\text{L}$,轻轻摇匀。再放 37°C 水浴 30 min,然后加生理盐水 $200\mu\text{L}$,加 0.25% 戊二醛 $50\mu\text{L}$ 混匀。从各管中取出约 1/3 的细胞悬液水平涂片,吹干后,用瑞氏染液染色。高倍镜下观察红细胞呈红色,酵母菌呈蓝色,1个红细胞结合上 3个或 3个以上酵母菌为 1个花环,每管记数 200个红细胞,算出花环率。按下面公式求出抑制率,用抑制率代表血清中 RFIR 活性。

$$\text{RFIR} = (58^\circ\text{C} \text{ 灭活血清组花环率} - \text{室温血清组花环率}) / 58^\circ\text{C} \text{ 灭活血清组花环率} \times 100\%$$

2.7 血清中 RFER测定:每管各取 2支小试管,第 1管加待测新鲜小鼠血清 $75\mu\text{L}$,第 2管加生理盐水 $75\mu\text{L}$,然后第 1管置 58°C 水浴 30 min,第 2管

置室温。每管加入配好的 $1.25\times 10^7/\text{mL}$ 正常鼠红细胞悬液 $50\mu\text{L}$,摇匀,放 37°C 水浴 30 min。取出后,各加 $1\times 10^8/\text{mL}$ 补体致敏酵母菌悬液 $50\mu\text{L}$,摇匀,再放 37°C 水浴 30 min。然后各加 $200\mu\text{L}$ 生理盐水混匀,再加 0.25% 戊二醛 $50\mu\text{L}$,混匀。从各管中取出 1/3 细胞悬液水平涂片,吹干,用瑞氏染液染色。高倍镜下观察,每管涂片记数 200个红细胞,1个红细胞结合上 2个或 2个以上酵母菌为 1个花环,算出各管花环率。按下面公式计算出促进率,用促进率代表血清中 RFER 活性。

$$\text{RFER} = (58^\circ\text{C} \text{ 灭活血清组花环率} - \text{生理盐水组花环率}) / \text{生理盐水组花环率} \times 100\%$$

2.8 数据处理:结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据均采用两样本均数 t 检验,对疗前、疗后指标的变化给予配对资料 t 检验。

3 结果

3.1 对实验性 GN 小鼠 RBC-C3b 受体、RBC-ICRR、RFIR 及 RFER 的影响:见表 1。从表 1 可知,消红散可以使 GN 小鼠 RBC-C3b 受体活性显著提高, RBC-ICRR 明显降低,随着剂量的增加,药物的作用也增加。消红散还可以使 RFIR 显著下降,而使 RFER 显著上升,并接近于正常组,结果提示,疗后小鼠接近正常,与阳性对照组相比,消红散低剂量效果较优。

3.2 模型组小鼠给药前后各项指标测定结果比较:见表 2。模型组小鼠各项指标给药前后测定结果差异无显著性,说明 GN 小鼠没有自愈的可能。

4 讨论

红细胞是血液中最多种的一种血细胞,除担负着运送氧和二氧化碳、维持机体组织器官正常新陈代谢的功能外,还具有多种重要的免疫功能,红细胞的免疫功能主要是通过其膜上的 C3b 受体 (CRI,也可称黏附分子) 的介导来实现的, CRI 是分子键内部存有二硫键的单链糖蛋白,是红细胞黏附的关键

表 1 消红散对 GN 小鼠 RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER 和 RFIR 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Xiaohong Herbal Powder on RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER and RFIR of glomerulonephritis mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	RBC-C3b/%	RBC-ICRR/%	RFIR/%	RFER/%
正常	-	15.96 $\pm$ 3.74	13.84 $\pm$ 2.95	28.42 $\pm$ 10.80*	47.29 $\pm$ 29.22
模型	-	6.00 $\pm$ 2.46	22.97 $\pm$ 3.94	48.14 $\pm$ 8.11	29.57 $\pm$ 9.92
阳性对照	18.75	8.25 $\pm$ 3.20	14.88 $\pm$ 3.88*	23.14 $\pm$ 9.33*	43.41 $\pm$ 10.77
消红散	79.20	7.47 $\pm$ 1.59	20.91 $\pm$ 3.94 $\triangle\triangle$	25.29 $\pm$ 18.34*	38.57 $\pm$ 7.53
	39.60	12.78 $\pm$ 3.94* $\triangle\triangle$	18.66 $\pm$ 3.45* $\triangle\triangle$	24.00 $\pm$ 12.15	36.43 $\pm$ 12.40 $\triangle$
	19.80	13.97 $\pm$ 4.10* $\triangle\triangle$	20.91 $\pm$ 3.94 $\triangle\triangle$	27.86 $\pm$ 11.30* $\triangle$	58.57 $\pm$ 10.95* $\triangle\triangle$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs positive control group

表 2 模型组小鼠 RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER和 RFIR 给药前后测定结果比较 ($\bar{x}\pm s$, $n= 10$)

Table 2 Comparison of RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER and RFIR of model group mice by pre- and post-administration ($\bar{x}\pm s$, $n= 10$)

模型组	RBC-C3b/%	RBC-ICRR/%	RFIR/%	RFER/%
疗前	6.28± 2.64	22.54± 4.53	45.14± 11.88	34.7± 10.99
疗后	6.00± 2.46	22.97± 3.94	48.14± 8.11	29.57± 9.22

部位,每个红细胞上大约有 500个 CRI, Siegel算出循环系统中红细胞的 C3b 受体数为白细胞的 20 倍,即 C3b 受体总数的 95% 分布在红细胞膜上,循环免疫复合物 (CIC) 与红细胞膜相遇的机会比白细胞大 500~ 1 000倍。然而红细胞黏附的强弱不仅与红细胞补体受体的数目有关,而且与血清中存在的红细胞免疫调节物质有关。

消红散低剂量组的小鼠 C3b 受体花环率明显升高, CIC 的花环率明显降低;与模型组相比,差异有显著性 ($P < 0. 01$),这说明消红散低剂量能明显地增强红细胞的黏附作用,促进红细胞的免疫功能,从而减少免疫复合物的形成,抑制肾小球损伤。与模型组相比消红散各剂量组小鼠的 RFER明显提高,而 RFIR显著降低,亦说明消红散可增强红细胞的免疫功能。

方中黄芪对免疫系统具有双向调节作用,能使紊乱的免疫功能恢复。黄芪当归二者配伍有抗氧化

自由基作用,可以减轻肾组织细胞在缺血、缺氧和炎症反应时的损伤^[6]。白术有免疫增强、免疫调节的作用,临床应用白术煎剂可使玫瑰花环形成率明显上升。茯苓多糖有明显的促进免疫功能的作用,是一种免疫促进剂。甘草能够补气和中、调和诸药。三七的根、叶皂苷可提高红细胞黏附免疫复合物能力和红细胞 C3b 受体活性,有利于清除免疫复合物,以维持机体的正常免疫功能。茜草具有活血化瘀功能。实验结果表明,该方具有免疫双向调节作用,其作用是通过调节紊乱的免疫功能而实现的。

References

[1] Beijing Medical College. *Basic and Clinical Immunology* (基础与临床免疫学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1981.

[2] Liu H W, Hou J Y. Development of experiment study of traditional Chinese medicine on chronic nephritis [J]. *J Guiyang Coll Tradit Chin Med* (贵阳中医学院学报), 1989 (2): 54-56.

[3] Su Z Z, He Y Y. Clinical and experimental research of Manshenling treating chronic nephritis [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1993, 13 (5): 269-272.

[4] Guo F. Determination of RFIR of serum [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1987, 7(3): 133.

[5] Guo F. Determination of RFER of serum [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1988, 8(6): 440.

[6] Zhang Y K, Wang H Y. Experiment research of *Astragalus* and *Angelica* treating different pathological nephritis [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 1986, 25(4): 222-224.

金荞麦 Fr抑制瘤和拮抗环磷酰胺毒性的作用

陈洁梅¹, 顾振纶¹, 梁中琴¹, 周文轩², 郭次仪^{2*}
(1. 苏州大学医学院 药理学教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

金荞麦 *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn. 又称野荞麦、苦荞头,为蓼科植物,是民间常用中草药,具有活血化瘀的功效,临床上用于肺癌的治疗,金荞麦还具有清热解毒、抗菌作用^[1]。金荞麦 Fr系从金荞麦根茎中提取的多酚类物质,本实验研究了金荞麦 Fr的体内外抑瘤作用和拮抗环磷酰胺 (CTX) 的骨髓抑制作用。

1 材料与方法

1.1 药品: 金荞麦 Fr由苏州中药研究所植化研究室从购自上海药材公司的云南产金荞麦根茎中提取

所得的有效部位,为棕褐色粉末,主要含多酚类化合物 (含量为 64.25%)。体内实验时,用蒸馏水配制成 1% 和 2% 的溶液。

- 1.2 试剂: CTX,南通制药厂出品,批号 970409
- 1.3 动物: 昆明种小鼠,体重 (20± 2) g,雌雄兼用,每一批实验为同一性别。由苏州大学医学院实验动物中心提供,合格证编号: 苏动 (环) 98008,苏动 (质) 98018
- 1.4 瘤种: 小鼠肉瘤 S₁₈₀,肝癌 H₂₂由中国科学院上海药物研究所提供

* 收稿日期: 2002-11-25
基金项目: 香港保健协会资助项目 (HK 2000918)
作者简介: 陈洁梅 (1969-),女,江苏张家港人,苏州第三人民医院主治医师,硕士,研究方向为药理学。