

株、腺病毒Ⅲ型的致细胞病变有抑制作用,对疱疹病毒Ⅰ有一定延迟作用。

### 3 讨论

小鼠流感病毒性肺炎是用流感病毒小鼠适应株所致的出血性肺炎模型,是最常用的病毒致整体动物感染模型。小鼠感染病毒后引起肺炎导致肺组织内炎症细胞渗出增多,形成肝样实变,使全部肺质量增加,肺质量增加和肺炎的严重程度相关。该模型用于观察药物对流感病毒所致肺炎的预防和治疗作用。本实验于感染流感病毒 96 h 解剖称取肺质量,计算肺指数及其抑制率,结果射干高、低剂量组肺指数明显低于模型组,高剂量组肺指数抑制率明显高于低剂量组,并强于病毒唑。表明射干对小鼠流感病毒所致肺炎有抑制发生发展,使其炎症减轻作用。

细胞培养抗病毒试验常用抑制病毒致细胞病变

(CPE)法,是因为许多病毒可使感染细胞产生明显的病变,在光学显微镜下可见到细胞变圆,折光增加,空泡形成,细胞融合和细胞溶解。这些变化很容易与药物毒性所造成的细胞损害相区别,所以 CPE 法是最常用于研究药物的抗病毒试验的方法。射干对流感病毒 FM 株、腺病毒Ⅲ型致细胞病变有抑制作用,对疱疹病毒Ⅰ有一定延迟作用。可见,射干在体内、体外均有较好的抗病毒作用,在防治病毒性疾病方面具有广泛的开发前景。

### References

- [1] Ministry of Public Health of the People's Republic of China. *The Guide of Traditional Chinese Drug Research* (中药新药研究指南) [S]. 1995.
- [2] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.

## 培补肝肾中药对 MPP<sup>+</sup> 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

陈建宗<sup>1</sup>, 田季雨<sup>2</sup>, 陈晓莉<sup>1</sup>, 杨浩<sup>2\*</sup>

(1. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学神经科学研究所, 陕西 西安 710033)

培补肝肾中药由肉苁蓉、枸杞子、何首乌组成, 临床实验证明其治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 有一定疗效<sup>[1,2]</sup>。本实验采用 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP<sup>+</sup>) 建立 PC12 细胞凋亡模型, 观察培补肝肾中药对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响。

### 1 材料与方法

1.1 细胞培养: PC12 细胞 (购自日本生命科学基金会) 常规培养在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液 (Sigma 公司) 中, 细胞培养瓶及培养皿 (内置盖玻片) 使用前均用 0.2 mg/mL 鼠尾胶原覆壁。培养细胞置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 (Heraeus HERAcell, 德国) 中, 3 d 换 1 次液, 待单层培养细胞将要融合时, 用 0.125% 胰蛋白酶消化, 传代培养。当传代细胞进入对数生长期时即可加药。

1.2 中药冻干粉及含中药兔血清制备: 中药冻干粉制备参照文献<sup>[3]</sup>, 将中药肉苁蓉、枸杞子、何首乌 (购于西安市中药饮片厂, 由本院药剂科苏世银主管药师鉴定), 按 1: 2: 2 质量比, 取 1 kg 置不锈钢锅

内, 加水 5 000 mL, 煎煮 1 h, 得滤液 3 000 mL, 再加水煎煮 1 h, 得滤液 1 000 mL, 合并滤液 (4 000 mL) 常温常压下浓缩至 800 mL, 静置 10 min, Whatman I 号滤纸滤过, 得滤液 700 mL。将滤液放入冻结干燥机 (FD-5N 型, 东京理化器械株式会社) 进行冻结干燥, 制成冻干粉, -20℃ 冰箱保存。每克冻干粉相当于中药生药 5.67 g, 用时以蒸馏水稀释。将新西兰大耳白兔 (雄性, 体重 2.5~3 kg, 由第四军医大学实验动物中心提供) 随机分 5 组。A 组每天 ig 中药冻干粉 1.6 g/kg (相当于人等效剂量的 1/2); B 组每天 ig 中药冻干粉 3.2 g/kg (相当于人等效剂量); C 组每天 ig 中药冻干粉 6.4 g/kg (相当于人等效剂量的 2 倍); D、E 组分别为空白对照组和 MPP<sup>+</sup> 模型组, 每天 ig 与 B 组药物稀释液等体积生理盐水。各组动物每天 ig 2 次, 共 3 d。于最后 1 次 ig 后 1 h, 颈动脉放血, 4℃ 过夜, 2 500 r/min, 离心 25 min, 小心分离血清, 于 56℃ 灭活 30 min, 经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌, -20℃ 保存。

1.3 药物处理: 倒置显微镜下观察传代培养细胞呈

\* 收稿日期: 2003-07-07

基金项目: 国家中医药管理局科研基金资助项目 (2000-J-P69)

作者简介: 陈建宗 (1957-), 男, 陕西省扶风县人, 医学博士, 副教授, 硕士生导师, 副主任医师, 多年来从事中西医结合治疗老年脑病临床与基础研究。Tel: (029) 83375354

均匀贴壁生长时,用对照兔血清和含不同剂量中药兔血清的培养液代替原培养液:各组培养液所含血清量均为 10%,培养 3 d 后,除空白对照组外,其他各组加入 MPP<sup>+</sup> (Sigma 公司),使其终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ,置 37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱培养 24 h 后进行指标测定,每组平行重复 3 次。

1.4 透射电镜观察:药物处理 24 h 后,收集细胞加入离心管中,1 500 r/min,4℃ 离心 5 min,再加入 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,1 500 r/min,4℃ 离心 5 min,弃上清液,沿管壁缓缓加入 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 2 h,用直头滴管剥离细胞团块,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,锇酸 4℃ 固定 1 h 后,梯度丙酮脱水,环氧树脂浸透和包埋,用 LKB-2188 型超薄切片机切片,醋酸铀-枸橼酸铅染色,JEM-2000EX 型透射电镜观察并拍照。

1.5 流式细胞仪检测:各组经药物处理 24 h 后,以 0.125% 胰蛋白酶消化贴壁的 PC12 细胞,取细胞约  $\times 10^6$ ,PBS 洗 2 次,加入 490  $\mu\text{L}$  结合缓冲液,充分混匀,加入 5  $\mu\text{L}$  annexin V FITC 和 10  $\mu\text{L}$  溶解的 PI,轻轻混匀,将试管置于 4℃,避光孵育 10 min,上 Coulter Epics 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 检测。每组平行重复 3 次。数据统计用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 透射电镜观察结果:电镜下可见正常培养的 PC12 细胞,细胞核染色均匀,核膜清楚完整,胞浆线粒体丰富,胞浆细胞器完整。PC12 细胞经 MPP<sup>+</sup> 作用后,透射电镜下细胞的超微结构变化明显,细胞膜完整,细胞表面微绒毛消失,胞质浓缩,染色质固缩、断裂、高度凝聚,并边集于核膜内面,表现出凋亡细胞特征,此时电镜下以早、中期的凋亡细胞为主。

2.2 流式细胞仪检测结果:当 MPP<sup>+</sup> 浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  时,A~E 5 组的凋亡细胞比率分别为:(11.3 $\pm$ 1.18)%,(7.2 $\pm$ 0.65)%,(4.7 $\pm$ 0.78)% ,

(1.9 $\pm$ 0.26)%, (13.6 $\pm$ 1.51)%, E 组与 D 组比较差异显著 ( $P < 0.01$ ); A 组与 E 组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), A, B 组间比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), B, C 组间比较差异显著 ( $P < 0.01$ )

## 3 讨论

PD 是中老年神经系统常见病,随着人口老龄化,该病发病率有逐年增高趋势。本病病因不甚明确,可能与年龄、环境、遗传等因素有关。近年研究表明,PD 发生与细胞凋亡关系密切<sup>[4]</sup>。近年临床实践证明,培补肝肾中药治疗 PD 有确切疗效,配合左旋多巴制剂起“增效减毒”效果。PC12 细胞来源于大鼠嗜铬细胞瘤,能合成、储存并释放适量儿茶酚胺<sup>[5]</sup>,目前已广泛用于神经细胞死亡方式和毒性机制研究。本实验采用神经毒素 MPP<sup>+</sup> 建立 PC12 细胞凋亡模型,并采用血清药理学方法,流式细胞仪 (FACS) 检测,透射电镜观察等手段,探讨含培补肝肾中药兔血清对 PC12 细胞凋亡模型的保护作用。结果表明,培补肝肾中药对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡有一定抑制作用,2 倍等效剂量中药的抑制作用明显优于 1/2 等效剂量及等效剂量中药的抑制作用。本实验为培补肝肾中药治疗 PD 提供理论依据,培补肝肾中药抗凋亡具体机制有待进一步研究。

## References

- [1] Chen JZ, Jiang W, Shi J, *et al.* Parkinson's disease treated by Chinese materia medica of Peibuganshen [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 1999, 23 (3): 14-15.
- [2] Che JZ, Jiang W, Wu B R, *et al.* 40 Cases of Parkinson's disease treated by Oral Liquid of Pingzhan-I [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 1999, 18(2): 9.
- [3] Liao T F, Huang S Y, Jian Y M, *et al.* Central inhibitory effects of water extract of Acorin Gramine Rhizome in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 1998, 61: 185-193.
- [4] Zvi I, Melamed E, Nardi N, *et al.* Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons—a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1994, 170: 136-140.
- [5] Estrvez A G, Radi R, Barbeito L, *et al.* Peroxynitrite induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors [J]. *Neurochem*, 1995, 65: 1543-1550.

# 9 种中药提取物对乙型溶血性链球菌的抑菌作用比较

王 莘,苏玉春,董 浩,杨会敏,王建华,李金凤\*

(吉林农业大学生物技术学院,吉林 长春 130118)

乙型溶血性链球菌是人体易感染的菌体,能引

起变态反应性肾炎、风湿病、心肌炎等疾病。本实验

\* 收稿日期: 2003-07-12

作者简介: 王 莘 (1959-),女,硕士,副教授,研究方向为农业生物工程。