

表 6 PUW 对大鼠尾尖出血时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 6 Effects of PUW on BT in rat tail tip ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂 量	出血时间/ min
生理盐水	—	16.4±3.1
PUW	2.5 mg/kg	17.2±3.3
	5 mg/kg	19.2±4.8* [#]
	10 mg/kg	19.8±3.6* [#]
尿激酶	20 000 U/kg	30.2±4.2**
阿司匹林	5 mg/kg	26.1±3.8**

与生理盐水组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与尿激酶或阿司匹林组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs NS group

[#] $P<0.05$ vs urokinase or aspirin group

PT 主要用于检测机体的外源性凝血系统, 它的延长或缩短分别反映凝血因子 、 、 、 (凝血酶原) 和 (纤维蛋白原) 的血浆水平减低或增高^[7]; 另一方面, KPTT 则检测机体的内源性凝血系统状态, 它的延长或缩短分别反映凝血因子 、 、 前激肽释放酶(PK)、 、 和 的血浆水平减低或增高。PUW 对 PT 无明显影响, 但明显延长 KPTT, 提示 PUW 增强了机体的纤溶活性。

上述实验结果提示缩短 ELT 和延长 KPTT 可能是 PUW 具有较强溶栓作用的机制之一。KPTT 延长又提示机体具有出血倾向。临床上, 应用溶栓药或抗凝药物时, 一般使 KPTT 较正常对照延长 1.5~2.5 倍, 这既可取得最佳疗效, 又无严重出血

问题。PUW iv 后 30~90 min 内均明显延长 KPTT, 但仍只为给药前的 2 倍左右, PUW 对家兔全凝血时间无明显影响, 在体内外对血小板聚集功能无明显抑制作用^[2], 虽延长大鼠尾尖出血时间, 但与阿司匹林或尿激酶比较, 出血时间显著缩短。因此, 纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) PUW 有引起出血的倾向, 但不会像抗凝药或阿司匹林、尿激酶等抗栓药造成严重的出血反应, 这对其今后的临床应用是十分有利的。

References:

[1] Shen Z Q, Dong Z J, Wu L O, et al. Effects of PUW on thrombosis and its mechanisms [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(1): 46-50.

[2] Kowalski E. An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis [J]. *J Clin Path*, 1959, 12(3): 215-219.

[3] Huang Z L, Wang K. Anti-coagulation of safflower yellow pigment [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18(1): 24-26.

[4] Gu Y F. Mechanism investigation of charred human hair raw crystalline [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 1987, 3(1): 19-22.

[5] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1995.

[6] Tomihisa K, Masso K, Seiji K, et al. Thrombolysis with intracoronary administration of YM866, a novel modified tissue-type plasminogen activator, in a canine model of coronary artery thrombosis [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1993, 63(7): 319-325.

[7] Wang H L. Reference advice of laboratory monitoring in anti-thrombosis and thrombolysis [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1995, 16(6): 498-499.

抗 EB 病毒口服液对 EB 病毒抗原表达的抑制作用及其细胞毒作用

刘宗潮¹, 简少文¹, 李华忠², 欧景才^{2*}, 谢冰芬¹, 李 端¹, 冯公侃¹

(1. 中山大学 肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 2. 广东省 177 医院, 广东 广州 510317)

摘 要: 目的 观察抗 EB (Epstein-Barr) 病毒口服液对 EB 病毒抗原表达的影响及对鼻咽癌 CNE₂ 细胞的细胞毒作用。方法 用间接荧光法测定抗 EB 病毒口服液对 Raji 细胞早期抗原 (early antigen, EA) 表达及 B₉₅₋₈ 细胞病毒壳抗原 (virus capsid antigen, VCA) 表达的影响; 用 MTT 法测定其对鼻咽癌 CNE₂ 细胞的细胞毒作用。结果 抗 EB 病毒口服液在无毒的浓度下, 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 抗原表达有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 0.667 mg/mL; 对 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 值为 0.89 mg/mL; 对正丁酸钠激发的 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 抗原表达亦有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 为 1.4 mg/mL。抗 EB 病毒口服液对人鼻咽癌细胞 CNE₂ 的 IC₅₀ 为 7.57 mg/mL。结论 抗 EB 病毒口服液能抑制 EB 病毒抗原的表达, 在较高的浓度下对鼻咽癌细胞 CNE₂ 具细胞毒作用。

关键词: 抗 EB 病毒口服液; EB 病毒; 抗原表达; 鼻咽癌

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)05-0542-04

* 收稿日期: 2003-09-08
基金项目: 国家“十五”科技攻关计划重大项目基金资助 (2001BA701A 07-10); 中山大学重点学科课题基金联合资助 (98096)
作者简介: 刘宗潮 (1937—), 男, 研究员, 主要从事抗肿瘤药物及其药理作用研究。
Tel: (020) 87343149 Fax: (020) 87343392 E-mail: zongchaoliu@yahoo.com
* 通讯作者 Tel: (020) 84219338-20001

Inhibition of Anti-EB Virus Liquor on EB virus antigen expression and its cytotoxicity

LIU Zong-chao¹, JIAN Shao-wen¹, LI Hua-zhong², OU Jing-cai²,
XIE Bing-fen¹, LI Duan¹, FENG Gong-kan¹

(1. Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510060, China;

2. Guangdong Province No. 177 Hospital, Guangzhou 510317, China)

Abstract: **Object** To study the inhibitory effect of Anti-EB Virus Liquor (AEVL) on EB (Epstein-Barr) virus antigen expression and its cytotoxicity. **Methods** The effect of AEVL on Raji cell early antigen (EA) expression and B95-8 cell virus capsid antigen (VCA) expression was assayed by indirect fluorescent technique; the cytotoxicity on nasopharyngeal carcinoma CNE₂ cells was determined by MTT method.

Results At the non-toxic concentration, AEVL had markedly inhibitory effect on Raji cell EB-virus, IC₅₀ was 0.667 mg/mL and showed powerfully inhibitory effect on B95-8 cell EB-virus VCA expression, IC₅₀ was 0.89 mg/mL; and it had strongly inhibitory effect on B95-8 cell EB virus VCA expression stimulated by sodium n-butyric acid, IC₅₀ was 1.4 mg/mL. The IC₅₀ of AEVL on human nasopharyngeal carcinoma CNE₂ cell was 7.57 mg/mL. **Conclusion** AEVL could inhibit EB virus antigen expression and have cytotoxicity on nasopharyngeal carcinoma cells at high concentration.

Key words: Anti-EB Virus Liquor (AEVL); EB virus; antigen expression; nasopharyngeal carcinoma

华南地区是全世界鼻咽癌 (Nasopharyngeal Carcinoma, NPC) 最高发的地区。病因及发病学研究显示, NPC 与遗传因素有关。此外, EB 病毒在 NPC 的发生中也起着关键的作用, 因此, 控制 EB 病毒在人群中的感染和激活, 降低人群 EB 病毒各种抗体水平, 有可能预防 NPC 或降低 NPC 的发病率。抗 EB 病毒口服液 (AEVL) 是民间验方, 经临床小范围验证, 106 例 EB 病毒 VCA/IgA 阳性患者经服用抗 EB 病毒口服液一个疗程 (30 d) 后, 抗体水平降低和阴转的有效率为 96.0% (102/106), 转阴率为 70.75% (75/106), 对照组抗体水平降低或转阴率仅为 17.19% (6/35), 两组差异非常显著。本实验进一步探讨 AEVL 对 Raji 细胞 EB 病毒早期抗原 (early antigen, EA) 及 B95-8 细胞 EB 病毒壳抗原 (virus capsid antigen, VCA) 表达的影响, 为 AEVL 的抗 EB 病毒作用提供新的依据, 同时观察 AEVL 对鼻咽癌 CNE₂ 的细胞毒作用。

1 材料

1.1 药物: 抗 EB 病毒口服液 (AEVL) 由广东省 177 医院提供, 处方由黄芪、败酱草、女贞子、夏枯草、山豆根等组成, 含生药 1.63 g/mL, 批号 990716, 用时以 RPMI-1640 培养基稀释成不同浓度。阳性药顺氯氨铂 (DDP) 为齐鲁制药厂产品, 批号 0109036。

1.2 细胞株: Raji 细胞是携带 EB 病毒基因组的人 Burkitt's 淋巴瘤细胞株, 只表达 EB 病毒核抗原 (EBNA)。在正丁酸钠 4 mmol/L 和巴豆油 200 ng/mL 的联合激发下可产生 EB 病毒 EA, 由本中心保株; B95-8 细胞为 EB 病毒转化的绒猴淋巴母细胞, 恒定表达 5% 左右的 VCA 在正丁酸钠 4 mmol/L 激

发下, 可增加 VCA 的表达, 由本中心保株。人鼻咽癌细胞 CNE₂ 由广东医学院建株, 在体外能长期稳定生长, 本实验室保株。

1.3 试剂: FITC-抗人 IgG 购于中国科学院上海生物化学研究所, RPMI-1640 培养基、MTT 购自 Sigma 公司, 小牛血清购自广州畜牧场兽医站。

2 方法

2.1 台盼蓝拒染法^[1]: 在显微镜下观察, 死细胞染成蓝色, 活细胞不着色。测定 AEVL 对 Raji 细胞和 B95-8 细胞的最大无毒浓度。

2.2 Raji 细胞 EA 检测: 将待测的 Raji 细胞悬液 (5×10^5 /mL) 分装入试管, 对照组加等体积的生理盐水 (NS), 实验组加入不同浓度的药液, 使药物的终浓度分别为 0.156, 0.313, 0.625 和 1.250 mg/mL。每个药物浓度设 3 个平行管, 同时加入正丁酸钠和巴豆油联合激发 EA 表达。培养 48 h 后收获细胞, 制成细胞涂片, 丙酮固定。加入适当浓度 EA 阳性人血清为一抗, 用二抗 FITC-抗人 IgG 染色, 再用伊文思蓝复染, 在荧光显微镜下每管细胞涂片计数 500 个细胞中 EA 阳性的细胞数。实验重复 1 次, 按下列公式计算抑制率 (IR)。

$$IR = (\text{对照组阳性细胞百分率} - \text{药物处理组阳性细胞百分率}) / \text{对照组阳性细胞百分率} \times 100\%$$

2.3 B95-8 细胞 VCA 检测: 将待测的 B95-8 细胞悬液 (5×10^5 /mL) 分装入试管, 对照组加等体积的 NS, 实验组加入不同浓度的药液, 使药物的终浓度分别为 0.313, 0.625, 1.250 和 2.500 mg/mL。每个药物浓度设 3 个平行管, 有两批实验不加正丁酸钠, 另两批实验加入正丁酸钠激发 VCA 表达。培养 48

h 后收获细胞,制成细胞涂片,丙酮固定。加入适当浓度 VCA 阳性人血清为一抗,用二抗 FITC-抗人 IgG 染色,再用伊文思蓝复染,在荧光显微镜下每管细胞涂片计数 500 个细胞中 VCA 阳性的细胞数。按 2.2 项公式计算抑制率 (IR)。

2.4 MTT 法:取对数生长期的人鼻咽癌细胞 CNE₂,配成细胞浓度为 1×10⁶/mL,分装于 96 孔板中,每孔细胞悬液 0.2 mL,每组设 3 个平行孔,阴性对照加入 NS,阳性对照加入顺氯氨铂 (DDP),给药组分别加入 AEVL (终浓度分别为 6.3, 8.4, 11.3 和 15.0 mg/mL)。置 37℃,5% CO₂培养箱中培养 48 h,实验终止前 4 h 加入 MTT 液,继续培养 4 h。除去每孔液体,加入 DMSO 溶解,充分振荡,待结晶溶解后,置于 570 nm 波长于 DC3022 酶联检测仪测定每孔的吸光度 (A) 值,按下列公式计算生长抑制率 (IR)。按计算机程序 (46) Litchfield & Wilcoxon 方法算出 IC₅₀值。

$$IR = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 台盼蓝拒染法结果:AEVL 对 Raji 细胞和 B₉₅₋₈细胞最大无毒浓度分别为 1.25, 2.50 mg/mL。

3.2 AEVL 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用:表 1 可见,各浓度 AEVL 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达均有抑制作用,且抑制作用随浓度的增加而增强,其 IC₅₀为 0.667 mg/mL。表明 AEVL 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达有较强的抑制作用。

表 1 AEVL 对 Raji 细胞 EB 病毒 EA 表达的抑制作用
Table 1 Inhibition of AEVL on EB virus EA expression in Raji cells

组别	药物终浓度/(mg·mL ⁻¹)	阳性百分率/%	IR/%
NS	—	11.3±0.1	—
AEVL	0.156	10.4±0.5	8.0
	0.313	8.4±0.5	25.6
	0.625	6.4±0.7	43.3
	1.250	2.9±0.8	75.2

3.3 AEVL 对 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用:表 2 可见,AEVL 各浓度对 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达均有抑制作用,且抑制作用随浓度的增加而增强,IC₅₀为 0.890 mg/mL。表明 AEVL 对 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达有较强抑制作用。

3.4 AEVL 对正丁酸钠激发的 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用:表 3 可见,AEVL 各浓度对正丁酸钠激发 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达均有抑制作用,且抑制作用随浓度的增加而增强,其 IC₅₀为 1.40 mg/mL,表明 AEVL 对正丁酸钠激发的 B₉₅₋₈

表 2 AEVL 对 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用
Table 2 Inhibition of AEVL on EB virus VCA expression in B₉₅₋₈ cells

组别	药物终浓度/(mg·mL ⁻¹)	阳性百分率/%	IR/%
NS	—	5.4±0.7	—
AEVL	0.313	3.5±0.8	35.2
	0.625	2.7±0.4	50.0
	1.250	2.6±0.2	51.9
	2.500	1.7±0.4	68.5

表 3 AEVL 对正丁酸钠激发的 B₉₅₋₈细胞 EB 病毒 VCA 表达的抑制作用
Table 3 Inhibition of AEVL on EB virus VCA expression stimulated by sodium *n*-butyric acid in B₉₅₋₈ cells

组别	药物终浓度/(mg·mL ⁻¹)	阳性百分率/%	IR/%
NS	—	7.7±0.9	—
AEVL	0.313	6.4±0.6	16.9
	0.625	5.4±0.3	29.9
	1.250	4.2±0.5	45.5
	2.500	2.5±0.2	67.5

细胞 EB 病毒 VCA 表达同样有较强的抑制作用。

3.5 AEVL 对人鼻咽癌 CNE₂细胞的细胞毒作用:DDP 作为阳性对照药,在各浓度下对人鼻咽癌 CNE₂细胞有显著的抑制作用。抑制率随浓度的升高而增强,IC₅₀为 1.26 (1.02~1.56) μg/mL。表明人鼻咽癌 CNE₂细胞对常用抗癌药物 DDP 是敏感的,结果见表 4。AEVL 各浓度对人鼻咽癌 CNE₂细胞的抑制作用随其浓度的升高而增强,IC₅₀为 7.57 (6.89~8.30) mg/mL。表明 AEVL 对人鼻咽癌 CNE₂细胞有细胞毒作用。

表 4 AEVL 对人鼻咽癌 CNE₂细胞的细胞毒作用
Table 4 Cytotoxicity of AEVL on human NPC CNE₂ cells

组别	终浓度/(μg·mL ⁻¹)	IR/%
DDP	0.63	31.2±5.7
	1.25	51.7±4.0
	2.50	70.6±11.0
	5.00	80.4±11.7
AEVL	6.300	40.1±14.7
	8.400	58.7±16.0
	11.300	79.9±7.0
	15.000	85.3±6.0

4 讨论

实验证明 EB 病毒在 PNC 发生中起致病因素的作用。曾毅^[2]报道完整的 EB 病毒能诱发上皮细胞癌变,EB 病毒也诱发人鼻咽黏膜上皮细胞癌变。他对 2 万人 EB 病毒 VCA/IgA 抗体阳性和阴性人群进行了 10 年的追踪观察,93% 的 PNC 来自 EB 病毒 VCA/IgA 抗体阳性人群,抗体消失或下降后不出现 PNC。闵华庆^[3]等的研究表明 EB 病毒多种抗体阳性人群 PNC 检出率为阳性人群的 40 倍。上

述的研究证明 EB 病毒在 PNC 发生中起着病因的作用。因此,降低 EB 病毒在人群中的感染有可能预防和降低 PNC 的发病率。刘宗潮等^[4]报道,鼻咽清毒剂能抑制 EB 病毒 EA 的表达。刘宗潮等^[5]又报道,茶多酚与亚硒酸钠联合使用能强烈抑制 Raji 细胞 EB 病毒 EA 和 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 的表达。寻找出无毒或低毒的抗 EB 病毒的药物是预防和降低 PNC 发病率的有效途径。

AEVL 是一种纯中药制剂,成分复杂。按中药分类属于扶正祛邪、清热解毒药物,且有抗菌及抗病毒作用。本实验证明 AEVL 在无毒浓度下能抑制 Raji 细胞 EB 病毒 EA 的表达,亦能抑制 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 的表达,表明 AEVL 对 EB 病毒有

杀伤作用,从作用强度来看,优于鼻咽清毒剂。

References:

- [1] Zhang H Q. *Methodology and Technology of Experiment on Cell Biology* (细胞生物学实验方法及技术) [M]. Beijing: Beijing Normal University Publishing House, 1992.
- [2] Zeng Y. Etiological study on nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Tumor* (中国肿瘤), 1996, 5(5): 8.
- [3] Min H Q, Huang T B. Prospective observation on EB virus and nasopharyngeal carcinoma relationship [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 1991, 10(5): 367.
- [4] Liu Z C, Jian S W, Feng G K, *et al.* Effect of Biyanqing duji on EB virus antigen expression and its cytotoxic effect [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(Suppl): 158-159.
- [5] Liu Z C, Jian S W, Li Z U, *et al.* Inhibitory effect of teapophenol and sodium selenite combination on EBV antigen expression [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(2): 110-112.

复方鳖甲片预防肺纤维化大鼠细胞外基质过度形成的实验研究

张东伟, 王继峰*, 牛建昭, 李健, 杨美娟, 金焕, 高宝华
(北京中医药大学 细胞与生化实验室, 北京 100029)

摘要:目的 研究复方鳖甲片预防盐酸博莱霉素致大鼠肺纤维化细胞外基质过度沉积的作用。方法 SD 雄性大鼠气管滴注盐酸博莱霉素造模,第 2 天 ig 复方鳖甲片 1.4, 0.7, 0.35 g/kg, 每周连续给药 6 d, 给药 4 周, 观察第 28 天大鼠肺组织羟脯氨酸和血清中 Ⅰ型胶原(-C)、Ⅲ型胶原(-C)及层黏连蛋白(LN)和透明质酸(HA)的含量,同时取肺组织行 HE、Masson 染色。结果 复方鳖甲片可降低肺纤维化大鼠血清 Ⅰ-C、Ⅲ-C、LN 及 HA 的含量,降低肺组织纤维性增生。结论 复方鳖甲片可能是通过降低肺纤维化大鼠细胞外基质含量而发挥治疗作用。

关键词: 复方鳖甲片; 肺纤维化; Ⅰ型胶原; Ⅲ型胶原; 层黏连蛋白; 透明质酸

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)04-0545-04

Experimental study on protection of Compound Biejia Tablet on exaggerated extracellular matrix accumulation of pulmonary fibrosis rats

ZHANG Dong-wei, WANG Ji-feng, NIU Jian-zhao, LI Jian,

YANG Mei-juan, JIN Huan, GAO Bao-hua

(Laboratory of Cell and Biochemistry, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Key words: Compound Biejia Tablet; pulmonary fibrosis; Ⅰ-collagen (-C); Ⅲ-collagen (-C); laminin (LN); hyaluronic acid (HA)

肺组织的细胞外基质与肺纤维化关系最为密切^[1]。肺纤维化可由多种疾病引起,致病因素首先造成肺组织损伤,在修复过程中,细胞外基质成分首先填补损伤肺组织,当其过度沉积时,可形成肺间质纤维化。此病理过程导致肺组织重建,肺结构破坏,肺泡膜增厚,换气面积减少,最终发生呼吸衰竭。细胞

外基质与炎症也有密切关系^[2]。因此研究细胞外基质形成对于认识上述疾病的发病机制及对该病诊断、防治均具有重要意义。复方鳖甲片由鳖甲、当归、三七、冬虫夏草、黄芪、板蓝根、连翘等中药组成。本实验室研究表明该方对肝纤维化有较好的疗效。为探讨其对肺纤维化的作用,本实验以博莱霉素 A5

* 收稿日期: 2003-08-03

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30130220); 教育部首批非典型科技攻关项目 (15)

作者简介: 张东伟 (1974—), 男, 河南洛阳人, 北京中医药大学 2001 级博士研究生, 研究方向为中药作用的生化机制。

E-mail: zhdw1006@163.com

* 通讯作者 Tel: (010) 64286995 E-mail: wangjifengbeijin@163.com