清抗体效价,从而增强体液免疫。

研究表明,肿瘤的发生、发展和转移过程与肿瘤自身的细胞凋亡密切相关,凋亡一旦发生便不可逆转。本研究发现,中、高剂量松节藻醇提取物诱导脾淋巴细胞凋亡的能力要显著高于空白对照组,说明松节藻醇提取物的肿瘤抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡而产生的。

本研究表明松节藻醇提取物具有一定的抗肿瘤药活性,虽然作为药物开发尚有大量的工作要做,但为开发利用海洋生物资源带来了希望,其潜在的药用价值应予重视。

References:

- [1] Fan X, Xu N J, Shi J G. Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 455-458.
- [2] Pederson M. Bromochlorophenols and a brominated diphenylmethane in red algae [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(2): 291-293.
- [3] Tan W D, Jin H, Luo D X, et al. Comparison of MTT with SRB assays *in vitro* anticancer drug screening [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11(3): 17-22.
- [4] Xu S B, Xiang H, Su J Y, et al. Antitumor effect of some compounds with unsaturated lactone from marine natural products [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1994, 49(1): 1-5.
- [5] Shi X Y. *Laboratory Animal Science of Medicine* (医学实验动物学) [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1989.
- [6] Yao X S. View of marine antitumor medicine [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2002, 23(3): 233-235.

复方血尿停经肝微粒体代谢后对肾小球系膜细胞的影响

张红敏¹, 丁 樱², 陈世伟^{3,4}, 王丽英¹

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450008; 3. 四川大学华西公共卫生学院 营养与食品卫生教研室, 四川 成都 610041; 4. 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450003)

摘要:目的 探讨复方血尿停治疗以系膜增生为主要病理改变的肾小球疾病的作用机制。方法 将复方血尿停与大鼠肝微粒体共同孵育后加入到肾小球系膜细胞(GMC)体外培养体系中, MTT法观察细胞增殖情况, 放射免疫法测定白细胞介素-6(IL-6)、内皮素-1(ET-1)水平, 速率法检测乳酸脱氢酶(LDH)的含量。结果 经肝微粒体代谢后, 复方血尿停 2、4、8 mg/mL 均抑制 GMC 的增殖及 IL-6、ET-1 的产生, 且呈剂量依赖方式。结论 复方血尿停能抑制 IL-6、ET-1 的分泌和 GMC 的增殖, 此作用可能是其治疗系膜增生性肾小球疾病的作用机制之一。

关键词: 复方血尿停; 肾小球系膜细胞; 增殖; 白细胞介素-6(IL-6); 内皮素-1(ET-1)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0233-04

Effects of Compound Xueniaoting metabolized by liver microsomes on glomerular mesangial cells

ZHANG Hong-min¹, DING Ying², CHEN Shi-wei^{3,4}, WANG Li-ying¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. The First Affiliated Hospital, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Henan Province Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of traditional Chinese medicine Compound Xueniaoting (CXNT) in treating glomerulus diseases with the main pathological changes of proliferation in mesangial cells. **Methods** CXNT and rat liver microsomes were incubated together, and then the incubated CXNT was added into cultured glomerular mesangial cells (GMC) *in vitro*. The proliferation of GMC was observed by MTT assay, the levels of interleukin-6 (IL-6) and endothelin-1 (ET-1) were determined by radioimmunoassay, and content of lactic dehydrogenase (LDH) was determined by velocity assay. **Results** CXNT (2, 4, 8 mg/mL) metabolized by rat liver microsomes could all inhibit the proliferation of GMC and production of IL-6 and ET-1 in a dose-dependent manner. **Conclusion** CXNT can inhibit the proliferation of GMC and restrain the secretion of IL-6 and ET-1, this function may be one of CXNT mecha-

收稿日期: 2004-05-08

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (0111023200)

作者简介: 张红敏(1969—), 女, 河南濮阳人, 主治医师, 成都中医药大学 2002 级在读博士, 主要从事内分泌与肾脏疾病的防治研究。
E-mail: zhm0916@126.com

nisms in treating some mesangial proliferative glomerulonephritis.

Key words: Compound Xueniaoting (CXNT, a traditional Chinese medicine prescription); glomerular mesangial cell (GMC); proliferation; interleukin-6 (IL-6); endothelin-1 (ET-1)

复方血尿停是儿科肾病专家丁樱教授的经验方,具有养阴、清热、活血化瘀作用,经临床观察,对过敏性紫癜性肾炎、IgA 肾病、急性肾炎恢复期、慢性肾炎等临床以血尿为主要表现、病理类型以系膜增生为主要表现者有较好的疗效^[1]。考虑肾小球系膜可能为该方的主要作用部位,为深入研究其作用机制,本实验利用肾小球系膜细胞(GMC)体外培养技术,观察复方血尿停对 GMC 增殖的影响。由于目前中药体外药效试验药物添加方式——直接添加和含药血清添加都存在一定问题,因此,本实验借鉴毒理学的试验方法,将大鼠肝微粒体与中药共同孵育,来模拟体内代谢过程,再加入到体外培养体系中,以期探讨复方血尿停治疗系膜增生性肾小球肾炎的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞:从 4 周龄 C57B1/6J×SJL/J 小鼠肾小球分离克隆的系膜细胞(GMC),由南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所刘志红研究员惠赠。

1.2 主要药品与试剂:复方血尿停提取物(以下简称血尿停,XNT)为复方血尿停颗粒剂相同处方药物的不含任何赋形剂的提取物,主含药物:生地、水牛角粉、知母、当归、旱莲草、生蒲黄、虎杖、三七,提取物相当于含生药 4 g/mL,由河南中医学院儿科所特别制备。脂多糖(LPS)、MTT 为 Sigma 产品;白细胞介素-6(IL-6)、内皮素-1(ET-1)放免试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,北京中生生物工程高技术公司生产;氧化型辅酶 I(NADP)和还原型辅酶 I(NADH)均为进口分装,购自北京百泰生化试剂公司;6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)为 Sigma 产品。

1.3 仪器:LNA-111DH 型 CO₂培养箱,日本生产。V1.2 型全自动酶标分析仪,芬兰生产。SPACE 型全自动生化分析仪,美国生产。SN-695B 型智能放免 γ 测量仪,上海原子核研究所日环仪器一厂生产。

2 方法

2.1 肝微粒体制备:参考文献方法^[2],取经苯巴比妥诱导[ip 苯巴比妥 60 mg/(kg·d),连续 4 d]、禁食不禁水过夜的健康成年雄性 SD 大鼠(体重 200

g 左右)的肝脏,在 0~4 °C 条件下,用冷的 0.15 mol/L KCl 溶液漂洗后,按 1 g 肝湿重加 3 mL 冷 TMS 缓冲液(pH7.5,50 mol/L Tris-HCl,3 mol/L MgCl₂、200 mol/L 蔗糖)制备肝匀浆,10 000×g 离心 10 min,弃去最上面脂肪层后的上清液 25 000×g 离心 10 min,取上清液,再 105 000×g 离心 60 min,沉淀部分为微粒体。将微粒体悬浮在 TMS 缓冲液中(1 g 肝湿重加 1 mL TMS 缓冲液)。按 Lowry 法进行肝微粒体蛋白含量的鉴定,合格者储存在液氮中备用。

2.2 血尿停肝微粒体代谢物的制备:参考文献方法^[3],取血尿停提取物,用 I 号液(RPMI 1640 培养液,加 L-谷氨酰胺 300 mg/L、丙酮酸钠 2 mmol/L、Hepes 15 mmol/L、青霉素 100 U/mL 及链霉素 100 U/mL,碳酸氢钠调 pH 至 7.1~7.4)配制成 1 g/mL 溶液,取 1 mL,加肝微粒体(LM)混合液[含微粒体蛋白 2 mg/mL、1 mmol/L NADP、1 mmol NADH、1 IU/mL G-6-PDH、10 mmol/L 6-磷酸葡萄糖(G-6-P)、4 mmol/L 硫酸镁和 0.2 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)]1 mL,37 °C 水浴孵育 30 min 后,冰浴终止反应,105 000×g 离心 60 min,取上清液,用 I 号液稀释 10 倍,调 pH 至 7.1~7.4,微孔滤膜滤过除菌,即得 0.05 g/mL 血尿停肝微粒体代谢物。

2.3 细胞培养、实验分组及药物处理:将第 5 代生长良好的小鼠 GMC 经胰蛋白酶-EDTA 消化液消化后,收集于离心管中,加 I 号液(I 号液中加入 20% 灭活小牛血清、0.66 U/mL 胰岛素,调 pH 至 7.1~7.4)配制成 3.3×10⁴/mL 细胞悬液,按每孔 150 μL 转种至 96 孔培养板(Nunc 产品)中。37 °C、5% CO₂培养箱中孵育 32 h 后,吸弃上清液,更换 I 号液,继续培养 24 h,使细胞生长同步于生长间期。实验共分 4 大组:空白对照组、LPS 诱导组、肝微粒体对照组(LM 对照组)和血尿停肝微粒体代谢组(XNT-LM 组),其中血尿停肝微粒体代谢组包括血尿停低、中、高剂量(2、4、8 mg/mL)组。每组设 6 个复孔,除空白对照组外,各组均加入 LPS (50 μg/mL) 50 μL,肝微粒体对照组加肝微粒体混合上清液 4 μL,血尿停肝微粒体代谢低、中、高剂量组分别加血尿停肝微粒体代谢物 10、20、40 μL,余加 I 号

液使每孔终体积为 250 μL 。LPS 诱导组含 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，肝微粒体对照组含肝微粒体混合液 16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ，血尿停肝微粒体代谢低、中、高剂量组血尿停的终质量浓度分别为 2、4、8 mg/mL 。

2.4 GMC 及上清液的收集：将加好样品的 96 孔培养板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱，12 h 后收集无细胞上清液，测定 IL-6 及 ET-1 水平。48 h 后收集无细胞上清液，测定 LDH 水平；同时将抽净上清液的细胞加 I 号液 150 μL 洗涤 1 次，以除去药物颜色对 MTT 测定法的干扰，检测系膜细胞增殖。

2.5 指标测定：GMC 增殖采用 MTT 法^[4]测定。培养上清液中 IL-6、ET-1 采用放射免疫法测定。培养上清液中 LDH 采用速度法，用全自动生化分析仪测定。

2.6 统计学处理：数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多个样本均数的比较用方差分析，多样本均数间的两两比较用 q 检验。

3 结果

3.1 复方血尿停对 GMC 增殖及其 LDH 的影响：由表 1 可知，LPS 诱导组的吸光度 (A) 值及 LDH 水平较空白对照组明显提高 ($P < 0.01$)，表明 LPS 可明显刺激 GMC 增殖，同时对 GMC 有一定的破坏作用。肝微粒体对照组的 A 值及 LDH 水平与 LPS 诱导组比较差异不显著，表明肝微粒体对 GMC 的影响与 I 号液相当。血尿停肝微粒体代谢各组的 A 值较肝微粒体对照组明显降低，呈剂量依赖趋势。表明血尿停经肝微粒体代谢后可抑制 GMC 的增殖。血尿停肝微粒体代谢各组的 LDH 水平与肝微粒体对照组比较差异不显著，表明血尿停的细胞毒作用不明显。

表 1 复方血尿停对 GMC 增殖及其 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of CXNT on GMC proliferation and its LDH level ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MTT 法 /(A 值)	LDH /($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白对照	—	0.107 $\pm$ 0.009	1.833 $\pm$ 1.472
LPS 诱导	—	0.205 $\pm$ 0.009**	17.667 $\pm$ 2.994**
LM 对照	—	0.201 $\pm$ 0.010**	18.383 $\pm$ 3.124**
XNT-LM	2	0.158 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta$	17.667 $\pm$ 1.033**
	4	0.149 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta$	18.333 $\pm$ 1.033**
	8	0.135 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta$	18.667 $\pm$ 1.366**

与空白对照组比较：** $P < 0.01$

与 LM 对照组比较： $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs LM control group

3.2 复方血尿停对 GMC 产生 ET-1 及 IL-6 的影响：由表 2 可知，上清液中，LPS 诱导组的 ET-1 与 IL-6 水平均较空白对照组明显提高 ($P < 0.01$)，表明 LPS 对 GMC 有一定的促 ET-1 与 IL-6 分泌作用。而肝微粒体对照组与 LPS 诱导组比较差异不显著，表明肝微粒体对 GMC 分泌 ET-1 与 IL-6 的作用与 I 号液相当。血尿停肝微粒体代谢各组的 ET-1 与 IL-6 水平较肝微粒体对照组降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量依赖趋势，说明血尿停有抑制 GMC 释放 ET-1 与 IL-6 的作用。

表 2 复方血尿停对 GMC 产生 ET-1 及 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of CXNT on proliferation of ET-1 and IL-6 in GMC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ET-1 /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6 /($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照	—	8.33 $\pm$ 1.32	75.74 $\pm$ 19.82
LPS 诱导	—	31.91 $\pm$ 3.30**	140.53 $\pm$ 16.15**
LM 对照	—	34.84 $\pm$ 4.19**	149.42 $\pm$ 15.22**
XNT-LM	2	8.54 $\pm$ 1.13 $\Delta\Delta$	49.59 $\pm$ 3.80 $\Delta\Delta$
	4	5.76 $\pm$ 0.67 $\Delta\Delta$	35.90 $\pm$ 4.86 $\Delta\Delta$
	8	2.59 $\pm$ 0.56 $\Delta\Delta$	24.41 $\pm$ 2.22 $\Delta\Delta$

与空白对照组比较：** $P < 0.01$

与 LM 对照组比较： $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs LM control group

4 讨论

目前，中药的体外药效试验有两种药物添加方式：直接加药和血清药理学方法。由于很多中药是药效活性和毒性成分的前体，直接加药法不能反应药物在体内经生物转化后起作用的真实药物成分。虽血清药理学方法可以避免这种不足，但血清本身是最有效的促增殖成分^[5]，且血清中含多种细胞因子，以往的研究显示，将含药血清加入 GMC 培养体系中，GMC 生长极好，远远超过 LPS 刺激组，严重干扰血尿停对 GMC 作用的观察和评价。因此，本实验借鉴了药物的体外代谢方法，使血尿停与肝微粒体温孵，以模拟体内代谢过程，然后加入细胞培养体系中，这样既模拟了体内代谢过程，又避免了血清成分对实验的干扰，能比较好地评价血尿停对 GMC 增殖的影响。

在肾小球肾炎发生与发展过程中，GMC 既是受害者(靶细胞)，又是炎症过程的直接参与者(炎症细胞)，处于炎症的中心地位^[6]。GMC 增殖及系膜基质增加是肾小球疾病中最常见而又突出的病理学特征，也是导致肾小球硬化的主要原因。本实验表明，

血尿停经肝微粒体代谢后可抑制 GMC 的增殖,考虑与血尿停由生地、水牛角粉、知母、当归、旱莲草、生蒲黄、虎杖、三七等组成,具有养阴清热、活血化瘀的功效有关。近年来,大量的实验研究显示,具益气养阴、清热利湿、活血化瘀作用的中药复方能明显抑制系膜增生性肾小球肾炎动物模型的 GMC 增生和系膜基质增多^[7,8],本实验结果与体内实验结果一致。

IL-6 和 ET 都是 GMC 的自分泌细胞因子,也是重要的炎症介质。IL-6 在细胞增生激活转导信号和 Ras/Map 级联反应或 HGF/c-met 轴中起重要作用^[9]。IL-6 在一定浓度范围内以剂量依赖方式诱导 GMC 增生^[10],在肾小球肾炎的发病中有重要作用^[11]。ET 是一种具有 21 个氨基酸的强烈缩血管多肽,肾脏也是其合成的场所。ET-1 是一个能导致 GMC 持续增殖的细胞因子,在肾小球肾炎发病机制中起着重要作用^[12,13]。大量的体内外实验研究显示有多种细胞因子参与 GMC 的增生、迁移和黏附。在病理情况下,这些细胞因子刺激 GMC 过度增生,增殖的 GMC 分泌出一系列细胞因子及炎症介质,使损伤进一步扩大。随着 GMC 的增殖及系膜基质的增多,最终导致肾小球硬化、肾单位毁损^[14]。血尿停经肝微粒体代谢后可明显地抑制 IL-6 和 ET-1 的产生,推测血尿停抑制 GMC 增殖的机制可能是通过抑制 IL-6 和 ET-1 的产生,打破了 IL-6、ET-1 和 GMC 增殖之间的恶性循环而实现的。

References:

[1] Xiao L, Ding Y. The effect of drug granules of Xueniaoting on treating Henoch Schonlein purpura nephritis in children [J]. *Chin J Pediatr Tradit Chin Med* (中国中医儿科杂志), 1999, (2): 120-124.
 [2] Yang X W, Hao M R, Hatoli M. *Metabolite Analysis for Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicines* (中药

成分代谢分析) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2003.
 [3] Yao Q Q, Wang M Z. Metabolic transformation of (L)-clausenamide in rat liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(4): 296-299.
 [4] Zheng Y T, Fen K L. The establishment of MTT assay in estimating cell survival and proliferation [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 1992, 8(4): 266-269.
 [5] E Z. *Technique of Tissue Culturation and Molecular Cytology* (组织培养和分子细胞学技术) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1996.
 [6] Wang H Y. *Nephrology* (肾脏病学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
 [7] Zhao J X, Huang W Z, Jia Z J, et al. The experimental study of Yishen Tang treating membrane proliferative nephritis [J]. *Shanxi J Chin Tradit Med* (山西中医), 1993, 9(2): 26.
 [8] Ding Y, Ren X Q. An experimental study of effect of the Shenbining Granule on the mesenteries of mesentery proliferation nephritis models [J]. *Henan J Tradit Chin Med* (河南中医), 2000, 6: 21-23.
 [9] Gohda J, Makita Y, Shike T, et al. Dilazep hydrochloride, an antiplatelet drug, inhibits LPS-induced mouse mesangial cell IL-6 secretion and proliferation [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2001, 24(1): 33-38.
 [10] Wang H J, Zhang Z G, Zhang N, et al. Effect of IL-6, IL-1, and PDGF on the growth of rat mesangial cells *in vitro* [J]. *J Clin Urol* (临床泌尿外科杂志), 2000, 15(12): 556-558.
 [11] Pecoits F R, Lindholm B, Axelsson J, et al. Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(6): 1042-1045.
 [12] Li M H, Shen Y P, Zhang Z W, et al. Inhibition of mesangial cell proliferation and mesangial matrix expansion by antisense oligodeoxy nucleotide targeting preproendothelin 1 mRNA *in vivo* [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1999, 79(2): 133-135.
 [13] Li M H, Shen Y P, Zhang Z W, et al. The mediation effect of endothelin 1 on human mesangial cell proliferation stimulated by thrombin [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 1999, 38(3): 153-156.
 [14] Haas C S, Schocklmann H O, Lang S, et al. Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation [J]. *J Nephrol*, 1999, 12(6): 405-415.

补阳还五汤 4 类有效部位对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积的影响

唐映红¹, 邓常青^{2*}, 刘旺华², 张秋雁², 李 花², 贺福元³

(1. 湖南中医学院 药理教研室, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医学院 病理生理实验室, 湖南 长沙 410007; 3. 湖南中医学院 药剂学教研室, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 研究补阳还五汤 (BYHWD) 中生物碱、多糖、苷、苷元 4 类有效部位对大脑中动脉闭塞 (MCAO) 后局灶性脑缺血大鼠脑梗死的作用。方法 用颈内动脉线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型, 检测脑梗死体积, 并比较其神经功能行为评分。结果 脑缺血 6 h, 模型组脑梗死体积显著增大 ($P < 0.01$), 神经功能行为评分显著升高

收稿日期: 2004-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171132); 教育部高等学校学术与技术带头人资助项目; 湖南省优秀博士论文作者科研项目

作者简介: 唐映红 (1962-), 女, 湖南株洲人, 医学硕士, 副研究员, 主要从事心脑血管药理研究。Tel: (0731) 5381272

* 通讯作者 Tel: (0731) 5381111 E-mail: dchangq@sohu.com