

基质金属蛋白酶 (MMPs), 可有效地降解胶原和纤维帽内其他细胞外基质, 使得纤维帽变薄, 纤维帽的不断变薄将最终导致粥样斑块的破裂。另外, $\text{TNF-}\alpha$ 还能诱导斑块内平滑肌细胞的凋亡, 从而使得平滑肌细胞产生的间质胶原减少, 斑块的稳定性降低。炎症细胞因子还能促使斑块中 VEGF 表达增加^[7], VEGF 能促进斑块新生血管生成, 新生血管形成是斑块不稳定的又一因素^[8]。

目前, 临床上发现的 AS 病人大部分属于中、晚期病变, 这一时期最大的威胁是不稳定斑块破裂后产生的并发症。目前对斑块稳定性的研究也越来越受到重视。本室既往研究发现 PNS 对 AS 的早期病变有防治作用, 在此基础上进一步研究发现 PNS 对 AS 成熟斑块也有改善稳定性作用。本实验发现 PNS 能降低兔 AS 中、晚期病变血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的水平及斑块内 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 表达; 中、高剂量组效果更为显著, 二者无明显差异。PNS 能有效改善斑块稳定性, 其抗炎作用能延伸至 AS 斑块内部, 提示 PNS 改善斑块稳定性的机制可能与其抗炎作用有关。斑块稳定性的影响因素是非常复杂的,

本课题组将继续就 PNS 改善斑块稳定性的机制做进一步探讨。

References:

- [1] Virmani R, Kolodgie F D, Burke A P, *et al.* Lessons from sudden coronary atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1262-1275.
- [2] Liu Y, Li X H. Effect of *Panax notoginseng* total saponin on inflammatory immune factors in atherosclerosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 728-730.
- [3] Li S H, Li X H, Chu Y. Anti-inflammation mechanisms of drugs [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 676-678.
- [4] Sun Q, Gao Z Y, Lu W. Immunohistochemistry and its image analysis study of PCNA in the thyroid tumours [J]. *Chin J Stereol Image Anal* (中国体视学与图像分析), 1998, 3(4): 228-229.
- [5] Mulvihill N T, Foley J B. Inflammation in acute coronary syndromes [J]. *Heart*, 2002, 87(2): 201-204.
- [6] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [7] Li J, Perrella M A, Tsai J C, *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 in rat aortic smooth muscle cells [J]. *J Biochem*, 1995, 270(1): 308-312.
- [8] O'Brien E R, Garvin M R, Dev R, *et al.* Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(4): 883-894.

4 种中药提取液对不同来源成纤维细胞作用的实验研究

郭 军^{1,2}, 陈宝田¹, 刘文超², 孟 华³, 谢 炜¹, 杜永平⁴

(1. 南方医科大学南方医院 中医科, 广东 广州 510000; 2. 第四军医大学西京医院 肿瘤中心, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学 生理教研室, 陕西 西安 710032; 4. 第四军医大学西京医院 中医科, 陕西 西安 710032)

胸部恶性肿瘤患者常需要接受胸部放射治疗, 其中胸部的两个重要脏器心脏和肺脏是最易受到放射损伤的部位, 这不仅限制了肿瘤的照射剂量, 从而也限制了疗效, 也影响患者的生存质量, 有时甚至成为导致肿瘤患者死亡的直接原因。在放射性损伤过程中比较重要的一个机制就是成纤维细胞的过度增殖^[1], 因此本实验体外培养了这两种不同来源的成纤维细胞, 并观察当归、川芎、黄芪及丹参各中药提取液对其的作用。

1 材料

川芎 (*Rhizoma Chuanxiong*, 四川) 购于四川绿色药业科技发展股份有限公司; 当归 (*Radix Angelicae Sinensis*, 甘肃)、丹参 (*Radix Salviae Milti-*

orrhizae, 甘肃), 黄芪 (*Radix Astragali*, 甘肃) 均购于甘肃陇南礼县药材公司, 药材均由第四军医大学西京医院药剂科杨喜忠主任药师鉴定; 1 个月 SD 雄性大鼠由第四军医大学动物中心提供。DMEM (Sigma), 胶原酶 (Gibco), 胰酶 (Gibco)。

2 方法

2.1 中药制备: 当归、川芎、黄芪、丹参粉碎, 各称取 100 g, 其中当归置圆底烧瓶内, 加 50% 乙醇浸泡 30 min, 在水浴锅上加热回流提取 60 min, 搅拌、滤过; 药渣同法提取 60 min, 滤过。川芎、黄芪、丹参置烧杯内, 加蒸馏水 600~800 mL 浸泡 30 min, 在水浴锅上加热 60 min, 搅拌、滤过; 药渣再加蒸馏水同法煎煮 60 min, 滤过。合并两次煎液, 浓缩至含生药

收稿日期: 2005-08-17

作者简介: 郭 军 (1966—), 男, 山西人, 第四军医大学西京医院主治医师、讲师, 南方医科大学中医科博士研究生, 主要研究方向为中西医结合临床药理、肿瘤。Tel: 13008409962 E-mail: guojundoc@163.com

1 g/mL, -20°C 冰箱保存 (上述药物均由第四军医大学药物研究所协助制备)。临用时取出于 37°C 水浴中溶解, 加蒸馏水稀释, $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过。经西北大学分析测试研究中心鉴定, 薄层色谱和质谱分析, 均符合《中国药典》2005 年版一部标准。

2.2 肺成纤维细胞培养: 将 1 月龄 SD 大鼠脱颈处死, 将整个大鼠浸泡于 75% 乙醇中消毒约 5 min。在无菌状态下, 开胸尽快取出肺脏, 用 PBS 反复冲洗, 除去胸膜, 将肺组织剪碎, 放入离心管中, 用 0.3% 胶原酶在 37°C 孵箱消化 90 min, 期间每隔 10~15 min 吹打或振摇; 用 100 目筛网滤过, 悬液加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清液, 再加入 PBS 液, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清液。加入含 10% 血清的 DMEM 培养基轻轻吹打混匀, 放入孵箱继续培养。原代培养的细胞汇成单层后用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 每 2~3 天换液 1 次。经形态、免疫组化鉴定。取 2~5 代细胞用于实验。

2.3 心肌成纤维细胞培养: 按 2.2 项方法处死大鼠后, 在无菌状态下, 开胸尽快取出心脏, 用 PBS 反复冲洗, 除去大血管, 再用 PBS 冲洗后剪碎, 放入离心管中, 用 0.3% 胶原酶在 37°C 水浴振摇消化 60 min, 加入 0.02% 胰蛋白酶在 37°C 水浴振摇消化 45 min; 用 200 目筛网滤过, 悬液加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清液, 再加入 PBS 液, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清液。加入含 10% 血清的 DMEM 培养基轻轻吹打混匀, 放入孵箱继续培养。原代培养的细胞汇成单层后用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 每 2~3 天换液 1 次。经免疫组化鉴定。取 1~3 代细胞用于实验。

2.4 形态学观察: 倒置显微镜下观察并记录用药后每天细胞生长情况及形态学改变, 并于用药后 24 h 拍照记录。

2.5 MTT 比色法试验: 取对数生长期细胞, 将消化后的单细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μL , 次日换无血清的 DMEM 培养液培养 24 h, 分别加入不同质量浓度的川芎、当归、黄芪、丹参提取液, 培养 72 h, 加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL , 在 37°C 孵箱中培养 4 h, 然后弃除孔内上清液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 振荡 10 min, 在 Wallac 1420 酶标仪 (美国 Victor 公司产品) 上以 590 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值。

2.6 统计学分析: 各项参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对实验数据采用 t 检验。

3 结果

3.1 形态学观察: 倒置显微镜观察发现, 川芎、当归、黄芪提取液作用 24 h 后细胞数目明显减少, 细胞形态不规则, 排列混乱; 丹参提取液作用 24 h 后细胞数目明显增多, 而且由于增殖旺盛, 有些细胞死亡漂浮于液面。

3.2 MTT 试验: 结果显示, 川芎、当归、黄芪提取液对肺和心肌成纤维细胞增殖有抑制作用。其中对肺成纤维细胞, 川芎、当归的高剂量无抑制作用, 却有明显促增殖作用, 只有中、小剂量有抑制作用, 黄芪的 3 个剂量均有抑制作用; 对心肌成纤维细胞, 当归、黄芪的高剂量无抑制细胞增殖作用, 其中、小剂量有抑制作用, 而川芎的 3 个剂量均有抑制作用 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 1。

表 1 川芎、当归、黄芪和丹参提取液对肺和心肌成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of *Radix Chuanxiong*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Astragali*, and *Radix Salviae Miltiorrhizae* extracts on rat lung and myocardium fibroblast proliferation ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	A 值	
		肺成纤维细胞	心肌成纤维细胞
对照	—	0.84 ± 0.08	0.64 ± 0.03
川芎	200	1.00 ± 0.07	0.57 ± 0.08*
	20	0.67 ± 0.04**	0.49 ± 0.03**
	2	0.73 ± 0.02**	0.41 ± 0.01**
当归	300	1.27 ± 0.07	2.24 ± 0.29
	30	0.74 ± 0.04**	0.62 ± 0.02**
	3	0.62 ± 0.05**	0.43 ± 0.02**
黄芪	400	0.63 ± 0.02**	0.78 ± 0.16
	40	0.66 ± 0.06**	0.54 ± 0.04**
	4	0.72 ± 0.06**	0.48 ± 0.05**
丹参	300	1.12 ± 0.08	2.22 ± 0.41
	30	1.11 ± 0.07	0.99 ± 0.08
	3	1.02 ± 0.05	0.68 ± 0.07

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

4 讨论

放射损伤的最终结果导致纤维化, 这在放射治疗中很常见, 它是一种复杂的组织反应, 其主要特征是大量细胞外基质 (ECM) 的沉积和成纤维细胞的过度增殖。在慢性纤维化过程中, 成纤维细胞是如何被激活, 是这个研究领域的关键问题。多数纤维化病灶, 不管起因如何, 都表现出一些共同的特点。在纤维化形成期, 伴有浸润性炎细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和大量内皮细胞聚集在新生毛细血管内, 被激活的成纤维细胞成为细胞骨架蛋白参与伤口的收缩, 因此在纤维化过程中起了关键作用^[1~5]。近年的

研究证实,肺成纤维细胞是肺纤维化发生发展的重要效应细胞,分泌炎症介质、释放大量 ECM^[6],因此研究药物对肺成纤维细胞的作用也尤其重要。

本实验应用消化法成功培养了来源于肺脏和心脏的成纤维细胞,并用中药干预。倒置显微镜下观察,肺成纤维细胞呈梭形或三角形,心肌成纤维细胞多呈梭形,当归、川芎、黄芪作用 24 h 后成纤维细胞数目明显减少,丹参作用 24 h 后成纤维细胞数目明显增多,而且由于增殖旺盛,有些细胞死亡漂浮于液面。通过 MTT 比色法对两种来源的成纤维细胞进行测定,观察细胞的增殖,结果显示不同质量浓度的川芎、当归、丹参、黄芪对成纤维细胞的作用有差异。其中中、小剂量的当归、川芎及大、中、小剂量的黄芪对肺成纤维细胞的增殖有抑制作用,而大剂量当归、川芎及各剂量丹参对肺成纤维细胞有促进增殖的作用;而对心肌成纤维细胞而言,中、小剂量的当归、黄芪及大、中、小剂量的川芎有抑制作用,大剂量当归、黄芪及各剂量丹参有促进作用。中药川芎、黄芪对肺、心肌成纤维细胞的不同特点,可能与药物对不同靶器官的作用不同而异。总之,中、小剂量的当归、川

芎、黄芪提取液对成纤维细胞均有抑制作用,而丹参却无此作用。可以看出,不同药物对不同成纤维细胞的作用有差异;同一种药物的不同剂量对成纤维细胞具有不同的作用结果;这些药物是通过怎样的途径发挥其作用的,其作用机制如何,有待进一步研究。

References:

- [1] Li R Q, Jin Y N. Effect and significance of TGF- β in the process of radiation fibrosis [J]. *China Oncol* (中国癌症杂志), 2001, 11(3): 267-269.
- [2] Desmouliere A. Factors in influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis [J]. *Cell Biol Int*, 1996, 19(5): 471-476.
- [3] Powell D W, Mifflin R C, Valentich J D, et al. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(1Pt1): C19.
- [4] Vergara J A, Raymand U, Thetl A, et al. Changes in lung morphology and cell number in radiation pneumonia and fibrosis: a quantitative ultrastructure study [J]. *Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 13(5): 723.
- [5] Phan S H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis [J]. *Chest*, 2002, 122 (6 Suppl): 286S-289S.
- [6] Roy S G, Nozaki Y, Phan S H. Regulation of α -smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33: 723-734.

葡萄提取物消除 O157 大肠埃希氏菌耐药性的作用

王秀英,刘世贵,高 荣,蒋舜媛,朱 冰,陈 恬

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,四川 成都 610064)

O157 肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC),是出血性肠炎的主要致病菌,不仅致病性、传染性强,还可并发溶血性尿毒综合征 (hemolytic uremic syndrome, Hus) 等严重疾病。自 1982 年以来,已在美国、日本等地多次引起疾病的暴发流行。1990 年 5~8 月日本爆发了到目前为止世界上最大的一次 O157:H7 大肠埃希氏菌 (简称大肠杆菌) 感染,9 000 多人患病,10 余人死亡。欧洲一些国家也先后发生了 O157 大肠杆菌感染,在我国 O157 大肠杆菌感染也散在发生。因此,O157 大肠杆菌已成为威胁人类生命的重要病菌之一。随着 O157 大肠杆菌疾病的暴发以及伴随着抗菌药物的广泛应用,O157 大肠杆菌对抗菌药物的耐药性也随之增加,给疾病

的控制带来了影响。为了克服日趋严重的细菌耐药性,从天然产物中寻找能够致敏细菌的生物活性物质,是增强抗菌药物疗效的有效途径。本实验室从中国西部食源性植物中筛选具有消除细菌耐药性的植物种类,自葡萄科 (Vitaceae Lindley 或 Ampelidaceae Kunth) 葡萄属 (*Vitis* L.) 植物提取物中,发现具有消除 O157 大肠杆菌耐药性的作用。

1 材料与方法

1.1 3 株受试大肠埃希氏菌株来源:大肠埃希氏菌标准菌株 *Escherichia coli* ATCC-25922,由中国科学院微生物研究所提供;*E. coli* O157:H7 出血性大肠埃希氏菌,由中国疾病预防控制中心微生物流行病学研究所提供;*E. coli* O157:88ac:19 出血性大

收稿日期:2005-09-13

基金项目:科技部重大基础研究前期研究专项 (2001CC02700);四川省科技厅科技攻关项目 (04SG022-015-01)

作者简介:王秀英(1956—),女,博士研究生,主任医师,于成都军区疾病预防控制中心从事病原微生物预防研究工作。

Tel: (028) 66179465 E-mail: wangxy48@163.com