表 1 红景天苷对全脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 TNF- α 水平的的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of salidroside on TNF- α level in brain tissue of global ischemia-reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(ng·g ⁻¹)
模型	—	110.07±18.42 $\Delta\Delta$
假手术	—	65.27±8.05
川芎嗪	80	75.96±16.85**
红景天苷	18	69.24±6.64**
	36	60.90±17.37**

与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 对模型组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group; ** $P < 0.01$ vs model group

在夜班时间中的疲劳状态,结果证明玫瑰红景天能够缓解处在压力状态下的大脑中枢疲劳。脑组织容易遭受缺血再灌注损伤,其中炎症反应起重要的介导作用^[4]。脑缺血再灌注可激活 TNF- α 的合成机制,使其过度表达。TNF- α 是细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的调控因子,其过度表达可进一步促进血管内皮细胞合成 ICAM-1,增强中性粒细胞-血管内皮细胞的相互作用,加重脑缺血再灌注和炎症反应的损伤^[7]。在脑组织中,TNF- α 主要由胶质细胞与神经细胞产生。史朗峰等^[10]研究证实,脑缺血再灌注大鼠脑组织 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达水平明显升高。Lavine 等^[11]发现前脑室注射 TNF- α 单克隆抗体,可阻断内源性 TNF- α 活性,显著降低脑缺血再灌注引起的脑水肿及损伤^[11]。本研究红景天苷可减少全脑缺血再灌注后脑组织中 TNF- α 的蛋白表达,可能是其发挥脑保护作用的机制之一。红景天苷通过何种途径抑制 TNF- α 的产生。尚待进一步的研究。

致谢:张文成教授和陈燕副主任技师的指导与帮助。

References:

[1] Li J X, Liu J T, Jin Y R, et al. Studies on chemical constituents from stem and leaf of *Rhodiola sachlinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(10): 659-661.

[2] Song Y Y, Qi G, Han J T. Protective effect of hongjingtian on hippocampal area and denate gyrus of complete cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2005, 9(32): 232-233.

[3] Li L, Kong L K, Chen R, et al. Effect of Raiola on Nometabilism in brain ischemia-reperfusion model of rats [J]. *Shandong Med J* (山东医药), 2001, 41(19): 17-19.

[4] Yamasaki Y, Itoyama Y, Kogure K. Involvement of cytokine production in pathogenesis of transient cerebral ischemic damage [J]. *Keio J Med*, 1996, 45(3): 225-229.

[5] Uno H, Matsuyama T, Akita H, et al. Induction of tumor necrosis factor- α in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(5): 491-499.

[6] Buttini M, Appel K, Sauter A, et al. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rats [J]. *Neuroscience*, 1996, 71(1): 1-16.

[7] Meistrell M E, Botchkina G I, Wang H, et al. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia [J]. *Shock*, 1997, 8(5): 341-348.

[8] Pulsinelli W A, Brierley J B, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia [J]. *Ann Neurol*, 1982, 11(5): 491-498.

[9] Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, et al. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue—a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(5): 365-371.

[10] Shi L M, Ren H M, Bai R. Effects of the domestic fibrinolytic on expressions of TNF- α and IL-1 β mRNAs in ischemia/reperfused rats [J]. *Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2004, 21(6): 544-546.

[11] Lavine S D, Hofman F M, Zlokovic B V. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(1): 52-58.

蓝萼甲素对小鼠脾细胞内游离钙离子浓度的影响

陈子珺¹, 李云森², 周吉燕¹, 曹露晔³, 胡月娟¹, 李仪奎³

(1. 上海中医药大学中药研究所 药理二室, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203;

3. 上海中医药大学 科技实验中心, 上海 201203)

蓝萼甲素是由唇形科香茶菜属植物香茶菜 *Rabdosia amethystoides* (Benth.) Hara 中分离提取出的二萜化合物。前期的实验研究表明, 香茶菜能显

著抑制细胞免疫反应而增加体液免疫反应。应用药理与化学密切合作的研究方法, 以活性评价为导向, 对香茶菜影响免疫功能的活性物质进行追踪分离,

收稿日期: 2005-10-20

基金项目: 国家科技部 863 计划“创新药物和中药现代化”新药博士基金资助课题 (2003AA2Z3518)

作者简介: 陈子珺 (1976—), 女, 博士, 助理研究员, 2004 年在上海中医药大学中药新药药理专业获博士学位, 现就职于上海中医药大学中药研究所, 主要从事中药免疫药理研究。Tel: (021) 51322496 E-mail: zichen21@yahoo.com.cn

获得了具有免疫活性的化学单体蓝萼甲素。在对小鼠脾细胞增殖影响的实验中,观察到蓝萼甲素对伴刀豆蛋白 A (ConA) 和脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾脏淋巴细胞增殖以及混合淋巴细胞培养反应具有抑制作用^[1]。为进一步探讨蓝萼甲素对免疫功能的影响,本实验应用钙荧光指标剂 Fura-2/AM 测定小鼠脾脏淋巴细胞内游离钙离子浓度,以观察蓝萼甲素对其的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂:蓝萼甲素(质量分数 98%),由中国科学院上海药物研究所制备;Fura-2/AM (Caibiochem); Triton-X-100 (Sigma 公司);二氧二乙醚二胺四乙醇 (EGTA, 上海实生细胞生物技术有限公司, SERVA 分装);牛血清白蛋白 (BSA, 上海实生细胞生物技术有限公司);ConA (Sigma 公司)。

1.2 仪器:DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);荧光分光光度计 (F-4500, 日本日立),附岛津 TB-85 恒温水浴。

1.3 动物:健康昆明种小鼠,体重(20±2)g,雄性,由上海中医药大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 小鼠脾细胞悬液的制备^[2]:将小鼠摘眼球放血后脱颈处死,取出脾脏,按常规制成单细胞悬液,用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 液洗 2 次后,用含 0.2% BSA 与 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 液重悬细胞,调细胞浓度至 1×10⁷/mL,备用。

2.2 Fura-2/AM 负载^[3]:取 1×10⁷/mL 的小鼠脾细胞悬液 2 mL,37℃ 预温 10 min,加 500 μmol/L 的 Fura-2/AM 20 μL (Fura-2/AM 终浓度为 5 μmol/L),于 37℃ 恒温振荡 30 min。负载后的脾细胞用含 0.2% BSA 和 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 液洗 2 次,调细胞浓度至 3×10⁸/mL。测定前细胞预先在 37℃ 复温 2~3 min。

2.3 荧光测定:将负载 Fura-2/AM 的脾细胞加 100、10、1 mg/L 蓝萼甲素和 ConA (终质量浓度为 5 μg/mL) 后,采用 F-4500 荧光分光光度计及 F-4500 Intracellular Cation Measurement System 生化离子计算系统软件进行数据的采集和处理。测定条件:激发波长和发射波长的狭缝宽度分别为 5、10 nm,激发波长分别为 340 和 380 nm,发射波长为 510 nm,激发波长变换时间为 1.9 s,测定时仪器可同时收集静息时、Triton-x-100 加入及 EGTA 加入后及校正中的 340、380 nm 的荧光强度和二者的

比值 (R),测定完毕后仪器软件可根据公式:
 $[Ca^{2+}]_i = K_d(F_{min}/F_{max}) (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$,直接给出胞浆内游离 Ca²⁺ 的浓度 (nmol/L)。R_{max} 和 R_{min} 分别为最大和最小荧光强度比值,即在细胞外液钙离子浓度大于 1 mmol/L 情况下分别加入终浓度为 0.1% Triton-x-100 和高于 2 倍细胞外液钙离子浓度的 EGTA (pH>8.5) 后所测得的 340 和 380 nm 的荧光强度比值;F_{min} 和 F_{max} 分别为 Fura-2 在游离状态下和饱和状态下 380 nm 测得的荧光强度。测定时或加药后均用吸管吹吸细胞悬液数次,以使细胞分布均匀。加药各组均于 37℃ 水浴中平衡 10 min 后上机检测^[4~8]。

2.4 数据处理及统计:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 静息状态(对照)下小鼠脾细胞 [Ca²⁺]_i 测定结果:在细胞外 Ca²⁺ 浓度为 1.3 mmol/L 情况下,应用 Fura-2/AM 双波长荧光法测得的静息状态下小鼠脾细胞 [Ca²⁺]_i 为 (100.5±25.1) nmol/L。此结果与文献报道基本一致^[2]。

3.2 ConA 活化状态下小鼠脾细胞 [Ca²⁺]_i:应用 Fura-2/AM 双波长荧光法测得 ConA 状态下小鼠脾细胞 [Ca²⁺]_i 为 (211.3±35.0) nmol/L,较静息状态下明显升高。

3.3 蓝萼甲素对 ConA 活化的小鼠脾细胞 [Ca²⁺]_i 的影响:加入不同质量浓度的蓝萼甲素,与 ConA 组相比可见有 [Ca²⁺]_i 降低,其中以终质量浓度为 100 mg/L 时下降最为明显 (P<0.01),结果见表 1。

表 1 蓝萼甲素对小鼠脾脏淋巴细胞 [Ca²⁺]_i 的影响
($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	[Ca ²⁺] _i /(nmol·L ⁻¹)
对照	—	100.5±25.1
ConA	5	211.3±35.0**
蓝萼甲素	100	148.5±19.0△
	10	166.2±48.9*
	1	193.5±37.8**

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

与 ConA 组比较: △P<0.05

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

△P<0.05 vs ConA group

4 讨论

Ca²⁺ 作为第二信使,在细胞活动中占有重要的地位。细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高,是淋巴细胞激活和增殖早期呈现的一个重要现象,这个过程主要发生

在细胞受到刺激剂激活的最初几十秒到几分钟内, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高, 可激活钙调蛋白激酶; 使一系列特异蛋白底物的磷酸化水平增加, 其中包括细胞因子的转录因子, 如核因子 κB (NF- κB), 使细胞因子的 mRNA 水平升高, 大量细胞因子生成。本研究发现, 小鼠脾脏淋巴细胞被 ConA 激活后, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高。蓝萼甲素可降低 $[Ca^{2+}]_i$, 使之接近正常水平, 进而可能抑制与细胞因子有关的基因的表达, 从而抑制 T 细胞增殖。以往研究表明蓝萼甲素具有免疫抑制作用, 蓝萼甲素抑制小鼠脾脏淋巴细胞内钙释放可能是其产生免疫抑制作用的机制之一。

References:

- [1] Chen Z J, Li Y S, Zhou J Y, et al. Study on screening immunocompetent position in *Rabdosia amethysteoides* (Benth) Hara. [J]. *J Chin Mater Med* (中草药), 2005, 28(11): 1015-1017.
- [2] Zhu L P, Chen X Q. *Experimental Methods of Immunology in Common Use*. (免疫学常用实验方法) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2000.
- [3] Fu H Q, Lu Z, Ju G Z. Examination of the effect of low dose radiation on $[Ca^{2+}]_i$ in splenocytes of mice by fura-2 dual-wavelength method [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1999, 25(6): 679-681.
- [4] Van Tits L J, Michel M C, Motulsky H J, et al. Cyclic AMP counteracts mitogen-induced inositol phosphate generation and increases in intracellular Ca^{2+} concentrations in human lymphocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 1991, 103(2): 1288-1294.
- [5] Jin Z H, Lin X Z, Ma D L. Effect of emodin and *Rhubarb* polysaccharide on level of intracellular Ca^{2+} in splenocyte of mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(8): 413-415.
- [6] Cui R F, Lin X Z. Effect of Emodin on level of intracellular Ca^{2+} by rat peritoneal macrophage [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 28(4): 199-200.
- [7] Zhang J, Weng F H, Li H Q, et al. Effect of emodin on secretion of TNF- α , IL-1, IL-6, and level of intracellular Ca^{2+} by rat peritoneal macrophage [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(8): 718-721.
- [8] Zeng Q L, Zheng Y F, Lu Z L. Immunomodulatory effects of polysaccharide of *Cistanche deserticola* Y V Ma [J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci* (浙江大学学报: 医学版), 2002, 31(4): 284-287.

苦味叶下珠不同制剂对鸭体内乙肝病毒的抑制作用

韩 林, 梁睿敏, 刘 斌

(北京汉典中西药研究开发中心, 北京 100071)

苦味叶下珠 *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. 为大戟科叶下珠属植物, 味苦、性凉, 具有清肝明目、收敛利水和解毒的功效^[1]。1982 年印度学者 Thyagajan 等首次报道苦味叶下珠体外对 HBsAg (乙型肝炎病毒表面抗原) 有灭活作用^[2], 引起国内外研究的热潮, 被认为是一种极具潜力的抗乙肝药物。苦味叶下珠含有大量化合物, 主要包括酚类、三萜类及生物碱类物质^[3], 初步研究表明鞣质为主要活性成分, 但是目前尚无统一的质量标准。有关苦味叶下珠的基础及临床研究日渐增多, 但是结论不一, 药材的产地和制剂都对活性产生很大的影响。目前国内还没有对此进行系统的比较研究。为了研究制剂对药物活性的影响, 为苦味叶下珠药物生产提供依据, 本实验选用云南景洪产苦味叶下珠作为药物原料, 分别采用提取和粉碎的方法获得受试药物, 比较两种制剂体内抗鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 活性的差异。

1 材料

- 1.1 动物: 1 日龄北京鸭, 购自北京前进种鸭饲养场。
- 1.2 药物: 苦味叶下珠采自云南西双版纳景洪, 经中国中医研究院胡世林老师鉴定为大戟科植物苦味叶下珠。苦味叶下珠粉剂 (P1, 苦味叶下珠全草粉碎, 过 80 目筛, 经分光光度法及滴定法测定, 含鞣质 2.48%)、苦味叶下珠提取剂 (P2, 苦味叶下珠粉末先用 80% 乙醇回流提取 1.5 h, 提取 3 次, 合并提取液, 浓缩; 提取残渣继续用水煮 3 次, 每次 1.5 h, 合并水液, 浓缩。两次浓缩液合并得到苦味叶下珠提取液, 质量浓度为 0.5 mg/mL, 含鞣质 2.87%) 均为自制; 阳性药物拉米夫定 (葛兰素威康制药公司, 批号 00211004)。
- 1.3 主要试剂: 鸭乙型肝炎病毒 DNA (DHBV-DNA) 强阳性鸭血清 (采自上海麻鸭, -70 °C 保存); α -32p-dCTP (北京福瑞生物技术工程公司);