

P2X 受体激动剂 ATP 或 α, β -me ATP 引起的伤害性反应与痛觉有关。炎症介质 PGE₂ 可增强伤害性感受器对伤害性刺激的反应,使伤害性感受器敏感。此外, PGE₂ 可上调 P2X 受体水平^[4],使 α, β -me ATP 引起的急性伤害性反应增强。本实验中观察到 iv TMP 对 P2X 受体激动剂 α, β -me ATP 与 PGE₂ 合用引起的伤害性反应具有抑制作用,由此提示 TMP 可阻断炎症介质 PGE₂ 增强 P2X 受体兴奋产生的伤害性信息传递。

ATP 作为外周疼痛的介质是因为细胞溶解的结果,这时贮存在细胞内的 ATP 大量释放^[11],如膝关节炎关节液中 ATP 浓度较高。TMP 具有钙拮抗作用,通过抑制钙超载,保持线粒体的完整性,对细胞具有保护作用^[7]。iv TMP 产生抗伤害性作用,可能与此有关。但也有文献报道,较大剂量 TMP 具有 L-型钙通道开放剂的作用^[12]。此研究中, TMP 的抗伤害性作用与浓度呈正比,高浓度的 TMP 抗伤害性作用更明显。因此,仅用 TMP 影响钙通道的作用来解释其抗伤害性作用尚不完善。结合全细胞膜片钳实验观察到 TMP 抑制 P2X 受体激动剂 ATP 或 α, β -me ATP 在大鼠背根神经节细胞激活的电位,以及 TMP 抑制交感神经节细胞 ATP 兴奋 P2X 受体诱发的去极化电位^[7],提示 TMP 可通过阻断 P2X 受体兴奋的信号传导抑制 P2X 受体激动剂引起的大鼠足底伤害性反应。

References:

[1] Burnstock G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain [J]. *Lancet*, 1996, 347: 1604-1605.
 [2] Chen C C, Akoplan A N, Sivilotti L, et al. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons [J]. *Nature*, 1995, 377: 428-431.
 [3] Blang-Ward P A, Humphrey P P A. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 122: 366-371.
 [4] Hamilton S G, Wade A, McMahon S B. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behavior induced by ATP analogues in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126: 326-332.
 [5] Hamilton S G, Warburton J, Bhattacharjee A, et al. ATP in human skin elicits a dose-related pain response under conditions of hyperalgesia [J]. *Brain*, 2000, 123: 1238-1246.
 [6] Ozaki Y. Anti-inflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 40: 954-956.
 [7] Wu Z G. The development of tetramethylpyrazine in pharmacology [J]. *J Wuhan Inst Chem Tech* (武汉化工学院学报), 2003, 25: 28-32.
 [8] Liang S D. Modulatory effects of tetramethylpyrazine on membrane response mediated by purinoceptors in the paravertebral sympathetic ganglion of toad [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 1999, 7: 47-51.
 [9] Hu H Z, Li Z W. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons [J]. *Brain Res*, 1996, 739(1-2): 163-168.
 [10] Chizh B A, Illes P. P2X receptors and nociception [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53: 553-568.
 [11] Hamilton S G, McMahon S B. ATP as a peripheral mediator of pain [J]. *J Auto Nerv Syst*, 2000, 8: 187-194.
 [12] Pang P K, Shan J I, Chiu K W. Tetramethylpyrazine, a calcium antagonist [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 431-435.

泻心汤抗内毒素有效部位的初步筛选

熊玉霞¹, 孟宪丽^{1*}, 张 艺², 何毓敏²

(1. 成都中医药大学 药理教研室, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学民族药研究所, 四川 成都 610075)

内毒素 (endotoxin, ET) 与临床多种疾病的发生、发展密切相关,近几十年来已发现近百种单味中药、中药复方及中药化学成分有抗内毒素作用,但目前关于中药抗内毒素作用研究主要集中在单味药及其化学成分上,尚缺乏复方有效部位 (群) 抗 ET 的相关研究^[1]。在这一领域,以经方为对象的研究具有十分明显的优势,本课题组选择泻心汤作为研究对象,抓住其清热解毒的主要功效,利用其组方简单的

特点,对其进行化学部位分离,采用甾剂动态凝胶法和内毒素发热动物模型对泻心汤不同提取部位进行内毒素作用的研究。

1 材料

1.1 药材及其极性部位制备:大黄、黄连和黄芩购自四川省药材公司,大黄、黄连、黄芩按质量比 2 : 1 : 1 比例进行常规水提得水煎液 (得率 31.2%) ;另取水煎液依次用氯仿和正丁醇萃取,得

收稿日期:2006-04-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30371756)

作者简介:熊玉霞,女,四川成都人,讲师,在读硕士研究生,主要从事中药药理和毒理研究。E-mail: zyj7525@163.com

* 通讯作者 孟宪丽 Tel: 13540488646 E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn

到氯仿部位(得率 0.42%,含游离蒽醌 21.2%)、正丁醇部位(得率 4.43%,含总黄酮 18.76%),及水溶部位(得率 24.3%,含结合蒽醌 11.2%),将浸膏粉置于干燥器中备用。以上药物由成都中医药大学民族药研究所提供。

1.2 试剂:细菌内毒素工作标准品(E-coli o111:B4,每支 20 EU,批号 0401170,中国药品生物制品检定所);动态比浊法鲎试剂(灵敏度 0.25 EU/mL,041123),细菌内毒素检查用水(BET 水,041222),以上均购于湛江安度斯生物有限公司;细菌内毒素(05:B111,Sigma 公司)。

1.3 仪器:BET-32M 内毒素测定仪(天津大学无线电厂),XW-80A 型旋涡混合器、电子温度计、烘箱(上海医用仪器厂),立式自动电热压力蒸气灭菌锅(上海申安医疗器械厂),电热恒温水浴箱(常州国华电器有限公司)。

1.4 动物:雄性 SD 大鼠(200~220 g),四川医学科学院实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 动态比浊法测定泻心汤不同极性提取部位抗内毒素活性

2.1.1 实验准备:参照细菌内毒素检查法^[2]。实验所用器皿(反应试管、吸头等)经 250 °C 干烤 2 h 以除去可能存在的外源性内毒素。

2.1.2 供试药液的制备:根据各提取部位的得率,取各浸膏粉适量,以 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)配成含生药量 1 g/mL 混悬液,用安瓿分装、封口,调节 pH 7.0~7.5,流通蒸汽灭菌 30 min 备用。

2.1.3 标准曲线的绘制:取细菌内毒素工作标准品一支,加入 1 mL BET 水,混旋 15 min,使其为 20.0 EU/mL;并依次稀释成 5.0、1.0、0.2、0.04 EU/mL 内毒素标准溶液。分别吸取 0.1 mL 于反应试管中,加入 0.1 mL 鲎试剂,混合均匀,迅速插入内毒素仪检测孔内测定临界时间。每一稀释度平行作 2 管,同时以 BET 水作阴性对照。当阴性对照结果不超过标准曲线最低浓度时,将实验数据进行线性回归,得标准曲线: $\lg t = -0.322 022 \lg C + 2.986 99$ (t 为临界时间, C 为内毒素浓度), $r = -0.996 3$,结果表明,内毒素在 0.04~5.0 EU/mL 与临界时间呈线性关系。

2.1.4 干扰实验:为排除受试样品的质量浓度对鲎试剂凝固的影响,需要做干扰实验,取受试样品做 10 倍以下的几个梯度质量浓度,不加内毒素,将之直接与鲎试剂混合,观察鲎试剂的浊度变化,与含终

浓度为 1.0 EU/mL 内毒素的样品阳性管做比较,当内毒素回收率于 50%~200% 时可认定该稀释度下的受试样品对鲎试剂凝固基本无影响,本实验中以水煎液为标准,依次用 BET 水稀释 10、50、100、150、200、250、300 倍,取各稀释液 0.5 mL 加入 0.5 mL 内毒素标准溶液(2.0 EU/mL)于 37 °C 下孵育 1 h,同时各取 0.5 mL 各稀释药物加入 0.5 mL BET 水,作为药品阴性对照,吸取孵育后的混合液 0.1 mL 于反应试管中,加入 0.1 mL 鲎试剂,迅速插入内毒素仪检测孔内测定临界时间。结果表明稀释 300 倍时内毒素回收率为 172%,在此稀释倍数以下受试药物对鲎试剂基本无干扰。

2.1.5 统计学处理:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据适用条件,组间差异比较采用 One-way ANOVA 或非参数检验,应用统计软件 SPSS 13.0 处理。

2.1.6 实验方法和结果:取泻心汤提取部位,用 BET 水稀释 150 倍,得溶液,各取 1.0 mL 加入 1.0 mL 内毒素标准溶液(1.0 EU/mL)于 37 °C 下孵育 1 h,同时各取 1.0 mL 药液加入 1.0 mL BET 水,作为药品阴性对照。吸取孵育后的混合液 0.1 mL 于反应试管中,加入 0.1 mL 鲎试剂,迅速插入内毒素仪检测孔内测定临界时间。每组供试品平行做 6 管,同时取 0.5% CMC 同比稀释后作空白对照。按下式计算内毒素降解率:

内毒素降解率 = (空白对照组临界时间差值 - 药物组临界时间差值) / 空白对照组临界时间差值 × 100%

结果发现提取物的颜色对实验干扰很大,为了排除这一干扰,本实验对每个药品均设阴性对照(不外加内毒素),以药品阴性对照(临界时间 1)与药品(加内毒素,临界时间 2)之间的临界时间差值表示其抗内毒素活性,其值大小与抗内毒素活性成反比关系。由表 1 可见,与空白对照组比较,内毒素经各组药液(终质量浓度为 3.33 mg/mL)孵育作用后发生了不同程度地中和降解,其中泻心汤水煎液的降解率最大(56.7%),显示其体外抗内毒素活性最强,水溶部位和氯仿部位次之(33.8%、24.3%),正丁醇部位的作用较差。

2.2 体外鲎试验测定泻心汤不同极性提取部位含药血清抗内毒素活性

2.2.1 实验准备同 2.1.1 方法。

2.2.2 供试含药血清的制备^[3]:取泻心汤不同极性部位浸膏,按其得率以 0.5% CMC 配成含生药量为 1.392 g/mL 混悬液。取雄性 SD 大鼠,体重 200~220 g,每组 3 只,大鼠按生药 13.92 g/kg(相

表 1 泻心汤各提取部位体外抗内毒素作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Anti-endotoxin effect of different fractions from Xiexin Decoction *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	临界时间 1 (无内毒素)/s	临界时间 2 (外加内毒素)/s	临界时间 差值/s	内毒素 降解率/%
空白对照	—	938.67±37.45	610.17±10.56	328.58±31.77	—
泻心汤水煎液	3.33	952.38±18.17	810.83±16.48	142.40±17.44**	56.7
泻心汤氯仿部位	3.33	858.17±15.25	610.52±27.51	248.00±29.71*	24.3
泻心汤正丁醇部位	3.33	1 213.83±25.26	913.41±20.94	300.00±23.48	8.5
泻心汤水溶部位	3.33	802.00±24.37	585.00±15.40	217.40±18.47*	33.8

与空白对照组比较: *P<0.05. **P<0.01

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

当于临床用量的 15 倍) ig 给药,每天 2 次,连给 3 d,同时取大鼠 ig 0.5% CMC 为对照。末次给药后 1 h 无菌下腔静脉取血,室温静置 2 h,2 500 r/min 离心 15 min,分离血清,合并同组 3 只大鼠血清,56℃ 灭活 30 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过除菌,置 -25℃ 低温冰箱保存备用。

2.2.3 干扰实验:取大鼠空白血清,依次用 BET 水稀释 2.5、5、10、20、40 倍,按 2.1.4 项操作,结果表明稀释 10 倍时内毒素回收率为 103%,在此稀释倍数下受试药含药血清对鲎试剂基本无干扰。

2.2.4 方法和结果:取上述各含药血清,用 BET 水稀释 5 倍,按 2.1.5 项方法检测。与空白对照组比较,内毒素经各含药血清孵育后发生了不同程度的中和降解,其中水煎液含药血清的降解率(64.5%)最大,显示其体外抗内毒素活性最强,水溶部位和氯仿部位次之(54.5%、5.1%),正丁醇部位的作用最差(9.5%),结果见表 2。

内毒素降解率=(药物组临界时间-空白对照组临界时间)/药物组临界时间×100%

2.3 泻心汤不同极性提取部位对内毒素(LPS)性发热大鼠体温的影响

2.3.1 实验方法:选取基础体温 36.5~38℃ 的大鼠,随机分为泻心汤不同极性提取部位组、0.5%

表 2 泻心汤各提取部位含药血清体外抗内毒素作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Anti-endotoxin effect of drug-containing serum of different fractions from Xiexin Decoction *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	临界时间/s	内毒素降解率/%
空白对照	—	410.00±10.78	—
泻心汤水煎液含药血清	13.92	1 156.33±27.41**	64.5
泻心汤氯仿部位含药血清	13.92	632.50±18.61*	35.1
泻心汤正丁醇部位含药血清	13.92	453.67±16.98	9.5
泻心汤水溶部位含药血清	13.92	902.38±20.48*	54.5

与空白对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

CMC 空白对照组、模型对照组和阿司匹林组,大鼠提前 3 d 测肛温预适应。实验时测 3 次肛温作为正常体温,大鼠按原生药 9.28 g/kg (相当于临床用量的 10 倍) ig 各提取部位药液,阿司匹林组按 20 mg/kg 给药,空白对照组和模型组予以等体积 0.5% CMC,1 h 后除空白对照组外,其他各组大鼠按 80 μg/kg ip 内毒素溶液,内毒素造模后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6 h 测定各组动物肛温,以最大体温上升高度(ΔT)和 6 h 内体温随时间变化的体温反应指数(TRI6,6 h 内大鼠体温变化曲线下面积,横坐标 1 h 代表 1 cm,纵坐标 0.2℃ 代表 1 cm)分析各组动物的体温变化。

2.3.2 实验结果:泻心汤各提取部位对大鼠内毒素性发热均有不同程度的解热作用,大鼠 ip 80 μg/kg 的内毒素可引起典型的双峰热,第 1 个高峰约出现在造模后 1 h,泻心汤各提取部位均能抑制该时段体温升高;第 2 个高峰约出现在 5~6 h,各给药组在该时段的体温也呈上升趋势,但上升幅度低于模型组。各提取部位均能降低大鼠的 ΔT 值和 TRI6,各药物组解热作用按由强到弱顺序为:水煎液、水溶部位、正丁醇部位和氯仿部位,其中尤以水煎液的解热作用突出,几乎与阿司匹林强度相同,结果见表 3。

表 3 泻心汤各提取部位对大鼠内毒素性发热体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of different fractions from Xiexin Decoction on fever induced by LPS in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ΔT/℃	TRI6/cm ²
空白对照	—	0.09±0.10	1.15±1.09
模型	—	1.20±0.38*	20.59±6.39*
阿司匹林	0.02	0.36±0.32 [#]	2.78±0.79 [#]
泻心汤水煎液	9.28	0.33±0.37 [#]	2.42±0.81 [#]
泻心汤氯仿部位	9.28	1.10±0.29	18.38±6.97
泻心汤正丁醇部位	9.28	0.97±0.82	16.65±6.85
泻心汤水溶部位	9.28	0.78±0.29	13.42±9.24

与空白对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: [#]P<0.05

*P<0.05 vs blank control group; [#]P<0.05 vs model group

3 讨论

泻心汤为医圣张仲景名方,由大黄、黄连和黄芩 3 味药组成,具有泻火解毒、清热燥湿的功效,是治疗邪火内炽的常用方剂,后世广泛用于里热火毒之证。以泻心汤为代表进行复方有效部位(群)抗内毒素研究是一种有益的尝试,而建立一个快速、稳定的筛选平台则是课题成功与否的一个关键。

鲎试剂动态浊度法是一种操作简单、准确度高的内毒素检测法,但由于鲎试验属于生化反应,其影

响因素较多,为了排除干扰,实验中除了调节药物 pH 值外,还进行了内毒素回收率实验,在相同的稀释度下比较各提取部位抗内毒素活性。本实验中发现由于各提取部位的颜色干扰,使得测定的内毒素值变异度非常大,有的远超过外加内毒素量,如果不设立药品阴性对照以消除颜色干扰,实验结果的可靠性就值得商榷,目前采用鲎试剂抗内毒素研究中有的提到了颜色的干扰,他们虽然设了药品阴性对照,但在计算内毒素破坏率时并没有说明药物组内毒素量与药品阴性对照之间的关系^[4],因此笔者考虑用药品阳性和药品阴性的临界时间差值代替实测内毒素值,差值小说明抗内毒素活性越强。此外,在体外实验中还首次采用血清药理学方法制备含药血清,参照文献方法得到的含药血清与药物直接加入反应系统的实验结果基本相符。为了弥补体外实验的不足,本实验还建立了内毒素诱导的大鼠发热模型,该方法能够有效地观察药物对内毒素致热的抑制作用。通过以上体内实验的结合,以期达到相互印证,互为补充的目的。

本实验发现全方水煎液无论是体内还是体外均显示出良好的抗内毒素活性,其次是水溶部位和氯

仿部位,结果表明各提取部位的药理作用弱于全方,说明泻心汤抗内毒素作用是多种化学成分共同作用的结果,其中发挥关键作用的可能是水溶部位中的结合葱醌和氯仿部位中的游离葱醌。氯仿部位和正丁醇部位在体内和体外实验中作用强度有所改变,氯仿部位在体外实验中作用强于正丁醇部位,但解热作用却略弱于正丁醇部位,这可能是药物在体内体外抗内毒素作用机制不同造成的。综合结果分析,水溶部位是本实验筛选出的一个有效部位。总的说来,以上 3 个实验结果的重复性还是比较理想的,以它们作为筛选平台是切实可行的,这些工作为下一步泻心汤的各个拆方抗内毒素有效部位(群)的研究打下了基础。

References:

- [1] Zhou H, Mei G Y, Wang Q. Advances of traditional Chinese medicine on antiendotoxin [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2005, 40(3): 235-237.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [3] Xue J, Xie M L. Advances in studies on methodology in serum pharmacology of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): a-ix-xi.
- [4] Liu Z F, Li G S, Fu F H, et al. Studies of antiendotoxin effect of eight Chinese herb injections *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 58-59.

粉防己碱对体外培养软骨细胞的影响

崔元璐^{1,2,3}, 姚康德², 戚爱榛³, 王 虹^{1,3}

(1. 天津中医药大学 中医药研究中心, 天津 300193; 2. 天津大学高分子材料研究所, 天津 300072;

3. 天津中医药大学 方剂学省部共建教育部重点实验室, 天津 300193)

防己是传统中药,始载于《神农本草经》,有祛风湿、止痛、利水的功效;在传统中药方剂中常用于治疗风湿痹痛,现多用于风湿、类风湿性关节炎的治疗。现代研究表明,防己最主要的有效成分是粉防己碱(tetrandrine),属于双苄基异喹啉类生物碱,具有抗炎和免疫抑制作用,可以抑制炎症过程的多个环节,包括抑制炎症细胞功能、抗自由基损伤、抑制炎症介质释放和对抗炎症介质的效应。

在近年发展起来的组织工程研究中,体外培养的细胞可能会逐渐去分化,丧失细胞表型与功能。此时可利用骨形态发生蛋白(BMPs)、软骨衍生形态

发生蛋白(CDMPs)、转移生长因子(TGF- β)等保持细胞再分化^[1]、调节细胞增殖并改变细胞的产物合成而作用于组织形成的过程。因此在组织工程研究中,用支架材料控制释放这些因子,以达到促进组织修复重建,维持细胞表型与功能的作用。生长因子多为来源于人或动物体内的水溶性蛋白质,价格昂贵,生物性质很不稳定,使其负载于支架材料有一定难度。传统中药的某些有效成分具有与细胞因子类似的功能和相应的药理作用,且价格低廉,理化性质相对稳定,具有作为细胞因子替代物应用的良好前景。基于粉防己碱已知的药理作用和临床治证,本研

收稿日期: 2006-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570495); 天津市应用基础研究重点资助项目(06YFJZJC01900)

作者简介: 崔元璐(1972—),男,天津市人,博士,研究员,博士生导师,主要从事中药药理学和中药制剂学研究。

E-mail: cuiyl@tju.edu.cn