

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

究考察了粉防己碱对体外培养牛软骨细胞的影响及应用于组织工程领域的可能性。

1 材料

粉防己碱(质量分数 $>98\%$),中国药品生物制品检定所。细胞增殖酶联免疫检测试剂盒(Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit),瑞士 Roche 公司;MTT、1,9-二甲基亚甲基蓝、鲨鱼硫酸软骨素 C、木瓜蛋白酶, Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA),美国 Amresco 公司;小鼠抗Ⅱ型胶原抗体(单克隆抗体, COL-2), Sigma 公司;过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG,北京中山生物技术有限公司。Tecan Spectra Ⅲ 酶标仪,奥地利。

2 方法

2.1 软骨细胞分离及培养:按照文献方法^[2]培养牛关节软骨细胞,用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化分离单层生长的细胞,制备细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,按每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、湿度 100% 的培养箱中恒温培养。

将粉防己碱溶解在 0.01 mol/L 盐酸中,配制成 100 mg/mL 溶液后再加入 DMEM 培养基中。细胞在培养板中培养 48 h 后换液,加入含有不同质量浓度(0.5~20 mg/L)粉防己碱的培养基,以不加药物的培养基做空白对照。为了保持实验的一致性,在所有培养基中都加入等量的 0.01 mol/L 盐酸。

2.2 溴代尿苷酶联免疫吸附(BrdU ELISA)测定细胞增殖:在 DNA 合成过程中,5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)可以代替胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到细胞新合成的 DNA 中。基于这个原理,通过比色免疫测定的方法,可以对软骨细胞增殖进行定量分析。软骨细胞加入含粉防己碱的培养基 48 h 后,加入 BrdU,使其在培养基中的终浓度达到 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ^[3]。继续培养 18 h,然后使用细胞增殖酶联免疫检测试剂盒,测定新合成的 BrdU-DNA 的量。

2.3 MTT 试验:软骨细胞在加入含粉防己碱的培养基 48 h 后,用 MTT 试验检测细胞活性,利用酶标仪,在 570 nm 波长处测定吸光度(A)值^[4]。

2.4 糖胺聚糖分泌量测定:软骨细胞在加入含粉防己碱的培养基培养 10 d 后,测定软骨细胞分泌的总糖胺聚糖量。用 1,9-二甲基亚甲基蓝法,以鲨鱼硫酸软骨素 C 作为标准品^[5,6],在 525 nm 波长处用酶标仪测定 A 值。

2.5 Ⅱ型胶原细胞酶联免疫吸附(Cell ELISA)测定:利用细胞酶联免疫吸附试验(whole cell

enzyme-linked immunosorbent assay, Cell ELISA)检测在含有粉防己碱的培养基中培养的软骨细胞的Ⅱ型胶原分泌量^[7-9]。软骨细胞在含有粉防己碱的培养基中培养 10 d 后,吸去培养基,用 PBS 冲洗 1 次,用福尔马林溶液(含 4% 甲醛的 PBS)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min。用 PBS 冲洗培养板 2 次,用含有 2% BSA 的 PBS 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭无关抗体 1 h。用 PBS 冲洗 1 次,加入一抗。将小鼠抗Ⅱ型胶原抗体用含有 1% BSA 的 PBS 溶液按照 1:1 500 稀释,配成一抗工作液,每孔加入 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,培养板用含有 0.05% 聚山梨酯 20 的 PBS(PBS/聚山梨酯)洗 4 次,加入二抗。将过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 用含有 1% BSA 的 PBS 溶液按照 1:1 000 稀释,配成二抗工作液。每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,然后用 PBS/聚山梨酯洗 4 次。最后每孔加入 200 μL 含 0.1% 邻苯二胺、0.03% H_2O_2 的 100 mmol/L 柠檬酸钠(pH 5.0)溶液作为过氧化物酶生色底物。显色 20 min 后,每孔加入 20 μL 2.25 mol/L H_2SO_4 终止反应。在 492 nm 波长处用酶标仪测定 A 值。以没有接种软骨细胞的培养板孔作为空白,对实验数据进行校正。

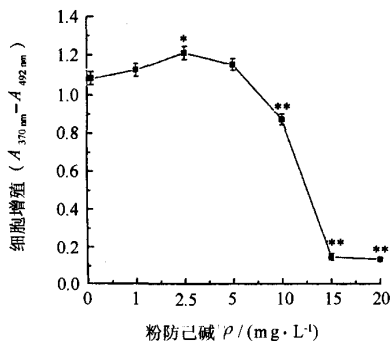
2.6 统计分析:所有各项测试数据除特殊说明外,每组均取 6 个平行对照样本($n=6$),以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过单向方差分析(one-way ANOVA)来评价结果的统计差异性。以 Scheffé 法来衡量组间差异性。

3 结果

3.1 细胞增殖:软骨细胞加入含不同质量浓度粉防己碱的培养基后细胞增殖情况可以通过细胞新合成的 DNA 的量反映出来。在 DNA 合成过程中,通过 BrdU 掺入到细胞新合成的 DNA 中的量,得到了在不同质量浓度粉防己碱影响下软骨细胞的增殖速率。图 1 表明低质量浓度的粉防己碱(2.5 mg/L)可以促进软骨细胞的增殖($P < 0.05$),而高质量浓度的粉防己碱(>10 mg/L)抑制软骨细胞的增殖($P < 0.01$)。

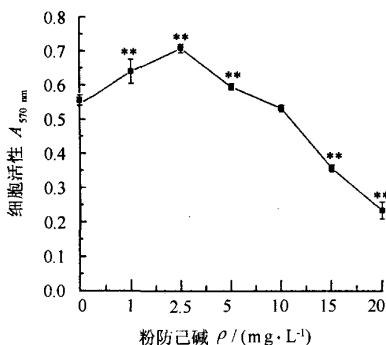
3.2 细胞活性:通过 MTT 试验测定培养基中不同质量浓度粉防己碱对软骨细胞活性的影响。图 2 表明低质量浓度的粉防己碱(1、2.5、5 mg/L)能够提高软骨细胞的活性,高质量浓度的粉防己碱(15、20 mg/L)抑制软骨细胞的活性。

3.3 糖胺聚糖分泌:图 3 所示,低质量浓度的粉防己碱(1、2.5 mg/L)能够提高软骨细胞分泌糖胺聚糖的量,高质量浓度的粉防己碱(10、15、20 mg/L)抑制软骨细胞分泌糖胺聚糖。



与粉防己碱 0 mg/L 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs tetrandrine 0 mg/L group

图 1 不同质量浓度粉防己碱对软骨细胞增殖的影响
Fig. 1 Effect of tetrandrine in various concentrations on chondrocytes proliferation



与粉防己碱 0 mg/L 组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs tetrandrine 0 mg/L group

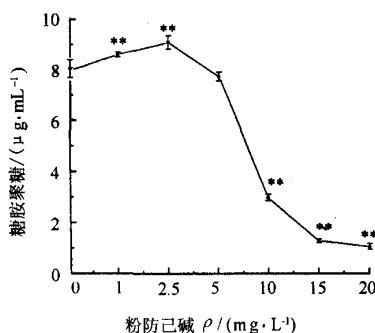
图 2 不同质量浓度粉防己碱对软骨细胞活性的影响
Fig. 2 Effect of tetrandrine in various concentrations on chondrocytes viability

3.4 II 型胶原合成分泌: 图 4 表示低质量浓度的粉防己碱 (1、2.5 mg/L) 能够提高软骨细胞分泌 II 型胶原的量, 高质量浓度粉防己碱 (10、15、20 mg/L) 抑制软骨细胞分泌 II 型胶原。

4 讨论

本实验结果表明, 在体外培养软骨细胞的培养基中加入粉防己碱, 对软骨细胞的增殖、细胞活性、糖胺聚糖和 II 型胶原的分泌量都有显著影响。培养基中的粉防己碱在低质量浓度时, 可以促进软骨细胞的增殖, 提高软骨细胞的活性, 维持软骨细胞的功能表达。而当培养基中粉防己碱的质量浓度高于 5 mg/L 时, 软骨细胞的功能表达 (糖胺聚糖和 II 型胶原分泌) 即受到抑制, 但却仍能促进细胞增殖和提高细胞活性。当培养基中粉防己碱的质量浓度高于 10 mg/L 时, 细胞增殖和细胞活性也受到抑制。

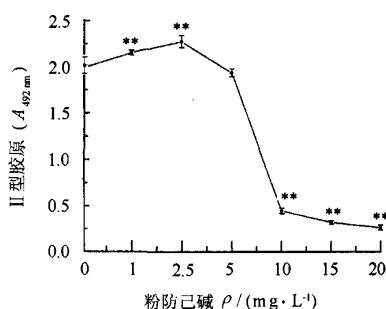
由粉防己碱对体外培养软骨细胞的作用, 结合



与粉防己碱 0 mg/L 组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs tetrandrine 0 mg/L group

图 3 不同质量浓度粉防己碱对软骨细胞分泌糖胺聚糖的影响

Fig. 3 Effect of tetrandrine in various concentrations on secretion of total sGAG produced by chondrocytes



与粉防己碱 0 mg/L 组比较: ** $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs tetrandrine 0 mg/L group

图 4 不同质量浓度粉防己碱对软骨细胞分泌 II 型胶原的影响

Fig. 4 Effect of tetrandrine in various concentrations on secretion of collagen Type II produced by chondrocytes

防己的中医传统临床用途分析, 粉防己碱用于风湿、类风湿性关节炎治疗的机制, 可能不仅限于抗炎、抗变态反应, 还有维持软骨细胞功能表达和促进病损软骨组织修复的作用。

以往的研究表明, 大剂量口服和静脉注射粉防己碱会引起中毒, 体外软骨细胞培养实验也得到了与此一致的结果。按照 MTT 试验作为细胞毒性评价的标准, 高质量浓度的粉防己碱对软骨细胞具有细胞毒性。研究结果也提醒临床医生在处方使用粉防己碱时, 应该注意剂量, 避免不良反应。

近年来软骨组织工程和软骨组织体外重建研究方兴未艾, 本研究结果表明低质量浓度粉防己碱不仅促进体外培养的软骨细胞增殖, 而且增强软骨细

胞的功能表达,有利于体外软骨组织重建。在组织工程与生物材料研究领域有着很好的应用前景。

References:

- [1] Reddi A H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials [J]. *Tissue Eng*, 2000, 6(4): 351-359.
- [2] Cui Y L, Qi A D, Liu W G, et al. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(21): 3859-3868.
- [3] Maghni K, Nicolescu O M, Martin J G. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4⁺ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(2): 185-194.
- [4] Marques A P, Reis R L, Hunt J A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites; *in vitro* studies [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1471-1478.
- [5] Farndale R W, Buttle D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosamino-

glycans by use of dimethylmethylene blue [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 883(2): 173-177.

- [6] Wyre R M, Downes S. An *in vitro* investigation of the PEMA/THFMA polymer system as a biomaterial for cartilage repair [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(4): 335-343.
- [7] Boyan B D, Schwartz Z, Swain L D, et al. Initial effects of partially purified bone morphogenetic protein on the expression of glycosaminoglycan, collagen, and alkaline phosphatase in nonunion cell cultures [J]. *Clin Orthop*, 1992 (278): 286-304.
- [8] Frahm S O, Rudolph P, Dworeck C, et al. Immunoenzymatic detection of the new proliferation associated protein p100 by means of a cellular ELISA: specific detection of cells in cell cycle phases S, G2 and M [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(2): 147-153.
- [9] Fuhrmann S, Kirsch M, Wewetzer K, et al. Use of cell ELISA for the screening of neurotrophic activities on minor cell populations in retinal monolayer cultures [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 75(2): 199-205.

蜂胶提取物对流动血液中血小板与纤维蛋白原聚合作用的影响

张云香^{1,2}, 李伟¹, 潘艳华³, 韩纪举¹, 任道玲¹, 吴亚平⁴, 王家富^{1*}

(1. 泰山医学院, 山东 泰安 271000; 2. 潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261041;
3. 泰安市中心医院, 山东 泰安 271000; 4. 乌特勒兹大学, 荷兰)

在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生、发展过程中, 脂质代谢紊乱、血管内皮损伤、炎症反应和血栓形成等因素起关键性作用。血栓的形成常与血小板、血管、凝血因子、纤溶系统、抗凝系统、红细胞、白细胞、血黏度和血液流变性等因素有关。其中血小板数量增多, 黏附、聚集性增高、血液凝固性增强和纤溶活性减弱等尤为重要。在高切变率条件下, 血小板黏附聚集是依赖于 von Willebrand factor (vWF) 与血小板糖蛋白 (glycoprotein, GP) I b 的交互作用, 导致血小板活化和血小板整合素 $\alpha_{11b}\beta_3$ 的构象改变, 使整合素上的纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 与血小板之间形成的稳定的聚集物网络群^[1], 造成附壁血栓的形成, 促进了 AS 的发生、发展。因此, 抗血小板黏附和聚集在 AS 的防治中具有重要作用。

蜂胶是蜜蜂采集松树和杨树等植物的芽孢分泌物和树脂等, 并混入蜂蜡及其上颚腺分泌物混合而

成的一种具有芳香味的胶状物。其抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用已研究甚多^[2~4], 但改善血小板活性的形态学研究尚未报道, 本实验运用体外灌注的方法, 研究了蜂胶提取物对血小板与纤维蛋白原聚合作用的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂: 7 mg/mL 纤维蛋白原 (荷兰乌特勒兹大学吴亚平博士赠送); 阿魏酸 (批号 20031118, 国药集团化学试剂有限公司); 蜂胶 24% 乙醇提取 (EEP, 源自新鲜的泰山松柏蜂胶); 肝素钠 (天津市生物化学制药厂); 牛血清白蛋白 (BSA, 上海伯奥生物科技有限公司); 乙醇和甲醇均为分析纯; 三蒸水。阿魏酸和蜂胶提取液均用 24% 乙醇配制成 2.0 mg/mL 溶液用于灌注实验^[5]。

1.2 设备: 体外灌注设备—灌注池 (荷兰乌特勒兹大学血栓与凝血实验室提供) 见图 1, 恒温水箱 (宁波新芝生物科技股份有限公司); micromfusion

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 山东省教育厅基金资助项目 (J00K62)

作者简介: 张云香 (1971—), 女, 山东省潍坊市人, 主治医师, 硕士, 2006 年上半年在荷兰乌特勒兹大学从事血栓与凝血研究, 现于潍坊市人民医院病理科工作, 研究方向为 AS 的发病机制。E-mail: dewdrop720@163.com

* 通讯作者 王家富 Tel: (0538) 6229902 E-mail: jfwang@tsmc.edu.cn.