

通过抑制 I κ B 的降解,从而影响了 NF- κ B 的激活,阻碍了 iNOS mRNA 的转录,最终导致 iNOS 蛋白表达减少。为了进一步证实上述 QGS 通过影响 NF- κ B 的活化而发挥作用的假设,又观察了肺组织中 COX-2 的表达情况。COX-2 在急性肺损伤发病过程中起到很重要的作用,它可以促进前列腺素(PGs)的合成,PGs 会促使白细胞趋化、血小板聚集、肺微血管收缩,从而导致肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤^[9]。与 iNOS 相同,COX-2 的表达也需要 NF- κ B 激活来调节。Western blotting 结果显示,模型组 COX-2 蛋白表达明显高于对照组,预先给予 QGS 可以显著降低 COX-2 的表达量。这种趋势与 iNOS 的表达完全一致,这也从另一角度证实了对 QGS 发挥作用的机制的假设。通过体外实验,还证实了 QGS 对体外纯化 20S 蛋白酶体活性有很强的抑制作用(结果未显示)。由于体内动物试验有别于体外试验,会受到药物代谢、个体差异等因素的影响,因此,为了进一步探讨 QGS 的抗炎机制是否与蛋白酶体有关,还将在细胞水平进行深入研究。

综上所述,QGS 作为一个结构有别于其他吡喃类化合物的分子,具有较好的抑制急性肺损伤的作用,其具体机制可能是 QGS 通过抑制 NF- κ B 信号转导通路,限制了 iNOS、COX-2 等炎症因子的表

达,从而最终减少了 NO 的产生,发挥出了一定程度的抗氧化作用。

References:

- [1] Tadeusz L, Ryszard C, Teresa C, et al. New xanthone derivatives as potent anti-inflammatory agents [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2005, 41(1): 54-58.
- [2] Cottiglia F, Casu L. Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis* [J]. *Z Naturforsch*, 2005, 60(1-2): 63-66.
- [3] Kahdi F, Ed C, Karim T. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Am Fam Physician*, 2003, 67: 315-322.
- [4] Guo A H, Li J, Lin W H, et al. Xanthone derivatives from medicinal plant *Swertia mileensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(2): 107-109.
- [5] Yang Y, Qiu H B, Zhou S X, et al. Role of nuclear factor-kappa B activation in mice with acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Crit Care Med* (中国急救医学), 2003, 23(2): 63-65.
- [6] Wulf D. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47-95.
- [7] Tan Z H, Yu L H, Wei H L, et al. Protective action of ulinastatin against lipopolysaccharides-induced acute lung injury in mice and the relation of it to iNOS and c-Jun expressions [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2006, 41(7): 636-640.
- [8] Tohru Y, Koichi A, et al. Garcinone B reduces prostaglandin E₂ release and NF- κ B-mediated transcription in C6 rat glioma cells [J]. *Neur Lett*, 2006, 394: 206-210.
- [9] Wang J S, Chen Z T. Changes of cyclooxygenase isoenzyme and effects of meloxicam in acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Crit Care Med* (中国急救医学), 2001, 21(3): 125-127.

芦荟大黄素对大鼠巨噬细胞 [Ca²⁺] 和释放 TNF- α 的影响

陈立君, 孙文武, 胡 芬, 王新宇, 刘慧君, 杨文修

(南开大学生物物理系 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘 要:目的 研究芦荟大黄素对正常的和细菌脂多糖(LPS)刺激的大鼠腹腔巨噬细胞(PM ϕ)释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和细胞内自由 Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)的影响。方法 应用 MTT 法检测 TNF- α 量和细胞钙离子成像系统检测单细胞内[Ca²⁺]_i的动态变化。结果 芦荟大黄素可剂量依赖性活化正常 PM ϕ 释放 TNF- α , 同时诱发正常 PM ϕ [Ca²⁺]_i呈波动式变化,[Ca²⁺]_i升高来源于胞外钙内流和胞内钙池释放钙。芦荟大黄素对 LPS 刺激 PM ϕ 升高 [Ca²⁺]_i和释放 TNF- α 的影响有较复杂的剂量依赖性特征,即芦荟大黄素低浓度时对 [Ca²⁺]_i升高有明显的抑制作用;其对 TNF- α 释放的抑制呈随浓度增高而减弱的趋势。大黄素可增强芦荟大黄素对 LPS 升高 [Ca²⁺]_i的抑制作用。结论 芦荟大黄素对 PM ϕ [Ca²⁺]_i和释放 TNF- α 表现出双向调节作用,其对 [Ca²⁺]_i动力学的调制与其调节 PM ϕ 释放 TNF- α 间有明确的对应性。

关键词:芦荟大黄素;巨噬细胞;脂多糖;细胞内自由 Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1359-06

收稿日期:2007-01-07

基金项目:天津市“九五”重点攻关项目《MODS 发病机理及中西医结合治疗的深入研究》资助(983113411)

作者简介:陈立君(1979-),女,山东青岛人,博士生,从事结构生物学和细胞信号转导研究。

Tel: (022) 23010102 E-mail: liu6951@yahoo.com.cn

Effect of aloe-emodin on $[Ca^{2+}]_i$ and TNF- α production in peritoneal macrophages of rats

CHEN Li-jun, SUN Wen-wu, HU Fen, WANG Xin-yu, LIU Hui-jun, YANG Wen-xiu

(Department of Biophysics, Key Laboratory of Bioactive Materials of Education Ministry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of aloe-emodin on free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) dynamics and tumor necrosis factor (TNF- α) production in normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peritoneal macrophages (PM ϕ) of rats. **Methods** To assay TNF- α and to detect cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in single cell by MTT and image analysis system. **Results** Aloe-emodin increased TNF- α production by activating of normal PM ϕ in a dose-dependent manner. Furthermore, aloe-emodin caused $[Ca^{2+}]_i$ oscillation in normal PM ϕ , the medicine induced $[Ca^{2+}]_i$ increase, including calcium influx from extracellular medium and calcium release from intracellular calcium store. Aloe-emodin showed complex effects in a dose-dependent manner on LPS-stimulated PM ϕ . At low concentration, aloe-emodin could attenuate the transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by LPS. The inhibition of aloe-emodin on TNF- α production induced by LPS decreased with the concentration increasing. Rhein could enhance the inhibition of aloe-emodin on increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by LPS. **Conclusion** Aloe-emodin has bidirectional characteristics of regulation on TNF- α production and $[Ca^{2+}]_i$ in PM ϕ . And the regulation of aloe-emodin on $[Ca^{2+}]_i$ obviously corresponds to the regulation on TNF- α production in PM ϕ .

Key words: aloe-emodin; macrophages; lipopolysaccharide (LPS); free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$); tumor necrosis factor (TNF- α)

大承气汤是传统中医药学中通里攻下法的代表方剂,临床治疗多种炎症和早期多脏器功能不全综合征(MODS)有明确和显著疗效。研究表明大承气汤对腹腔巨噬细胞(PM ϕ)活性有双向调节作用:可轻度活化正常的PM ϕ 释放少量肿瘤坏死因子- α (TNF- α),又对脂多糖(LPS)刺激的PM ϕ 失控释放TNF- α 有显著的抑制作用^[1]。大承气汤的主药大黄在临床上有抗炎、抑菌、保肝等多种疗效。大黄对PM ϕ 活性亦有双向调节作用,即大黄可诱发正常PM ϕ 升高细胞内自由 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)和轻度释放TNF- α ;同时又可显著抑制LPS刺激的PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 升高和TNF- α 失控释放^[2,3]。大黄中游离型单蒽醌类的大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素甲醚有多种生物活性^[4]。研究表明大黄酸对LPS刺激的PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 升高和失控释放TNF- α 有很强的抑制作用^[5],大黄素和大黄素甲醚轻度活化PM ϕ ,并可不同程度地抑制LPS刺激的PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 升高和TNF- α 失控释放^[3,6]。为进一步全面了解大黄单蒽醌类提取物各组分调节PM ϕ 活性特征的异同,本实验研究了芦荟大黄素对正常和LPS刺激的PM ϕ 的单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化和释放TNF- α 的作用特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物:健康Wistar大鼠,体重200g左右,购自军事医学科学院卫生学环境医学研究所。

1.2 药物与试剂:RPMI-1640培养基、胎牛血清

(FBS)、LPS(取自 *Escherichia coli* 0111:B4)、噻唑蓝(MTT)、Fura-2/AM、HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)、rhTNF- α 、放线菌素D购自Sigma公司;芦荟大黄素、大黄素、大黄酸(纯度均为98%)购自天津药物研究院;其他试剂为国产分析纯。无钙培养液:无钙的培养基中加入5 mmol/L EGTA,充分络合培养基中的自由 Ca^{2+} 。

1.3 大鼠PM ϕ 的制备:向健康Wistar大鼠ip 20 mL Hank's液,开腹吸出灌洗液。1 500 r/min离心10 min,弃上清,用RPMI-1640(10% FBS)培养基混悬后,移入样品池贴壁培养4 h(5% CO₂, 37℃)。弃培养基,以去除未贴壁细胞,再加入新鲜RPMI-1640(10% FBS)培养基,温育12 h待用。

1.4 药物处理和TNF- α 量的检测:在PM ϕ 培养液〔正常培养液:培养基中自由钙离子浓度($[Ca^{2+}]_o$)为1.25 mmol/L;无钙培养液: $[Ca^{2+}]_o$ 为0 mmol/L〕中分别加入不同浓度LPS和芦荟大黄素,总反应体积1 mL/孔。8 h后取上清,并取未加药的PM ϕ 上清液为对照。用对TNF敏感的鼠成纤维细胞系L929为靶细胞,将上清液加入指数增生期的L929细胞培养液,用MTT法测A₅₇₀,根据标准曲线计算TNF- α 量,对照样品的TNF- α 量作为基础值^[7]。

1.5 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的检测:以Fura-2做 Ca^{2+} 荧光指示剂。在PM ϕ 培养皿中加入含Fura-2/AM 2

$\mu\text{mol/L}$ 的 $m\text{-HBSS}$ 液,在黑暗、室温条件下负载 50 min;吸去上清,用 $m\text{-HBSS}$ (10% FBS) 液洗涤 3 次,于每个样品槽中加入 1 mL $m\text{-HBSS}$ 液 (10% FBS)。用单细胞钙离子成像分析系统检测 $\text{PM}\phi$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化。由 CCD (型号: 480TVL Colour Digital CCD) 实时拍摄细胞内荧光强度动态变化,并用 Matefluor 分析软件 (美国通用公司) 进行实时采集和分析。用不同浓度的实验药液对细胞进行灌流 (流速: 1 mL/min),测定单细胞在激发光分别为 340 nm 和 380 nm 条件下的胞内发射光的强度 F_{340} 和 F_{380} (两者的发射波长均为 510 nm) 的动态变化,用其比值 (F_{340}/F_{380}) 表征 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

1.6 数据处理: $\text{TNF-}\alpha$ 释放量检测的实验结果均为相同条件下 3 次实验,每次 5 个培养孔数据的 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性用双侧 t 检测判别。检测单细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的实验中,每个实验条件均做 3 次取自不同动物的细胞检测,每次检测 10 个左右细胞。为显示单细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的实时动态变化,在 10 个以上有相似结果的细胞中选取一例作为代表性结果示于图中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的基础值标准化为 1.0,其变化用基础值的倍数表示。

2 结果

2.1 芦荟大黄素活化正常 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的量-效关系: 制备好的 $\text{PM}\phi$ 样本中,在正常培养液和无钙培养液条件下分别加入不同浓度芦荟大黄素 (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L),另设不加芦荟大黄素的对照组。检测细胞温育 8 h 后上清中的 $\text{TNF-}\alpha$ 释放量。由图 1 可见,与正常细胞比较,正常培养液条件下加入 1×10^{-7} nmol/L 芦荟大黄素,开始呈现促进 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的作用;随芦荟大黄素浓度升高,促 $\text{TNF-}\alpha$ 释放作用增强, 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素使 $\text{TNF-}\alpha$ 释放量为基础值的 19.6 倍。在无钙培养液条件下加入不同浓度芦荟大黄素产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 的量-效关系与正常培养液的相似,但量值明显降低, 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素对应的 $\text{TNF-}\alpha$ 量为基础值的 16.3 倍。

2.2 芦荟大黄素影响 LPS 刺激 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的量-效关系: 制备好的 $\text{PM}\phi$ 样本中,在正常培养液条件下加入 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 和 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素,检测温育 8 h 后上清液中的 $\text{TNF-}\alpha$ 量。由图 2 可见,芦荟大黄素对 LPS 刺激 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的抑制效应随浓度增加而衰减, 1×10^{-7} mol/L 芦荟大黄素抑制了 $\text{TNF-}\alpha$ 释放量的 54.6%。

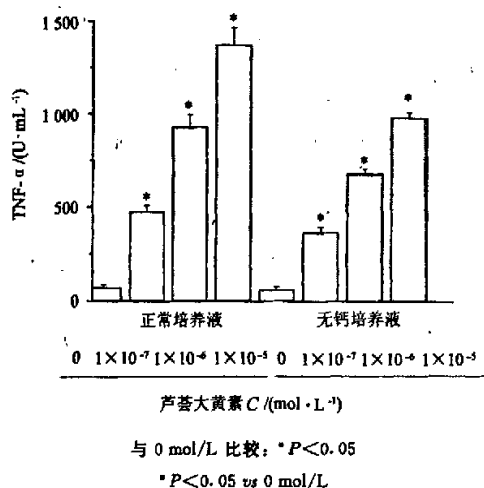


图 1 芦荟大黄素对正常 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Fig. 1 Effects of aloe-emodin on $\text{TNF-}\alpha$ production in normal $\text{PM}\phi$ ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

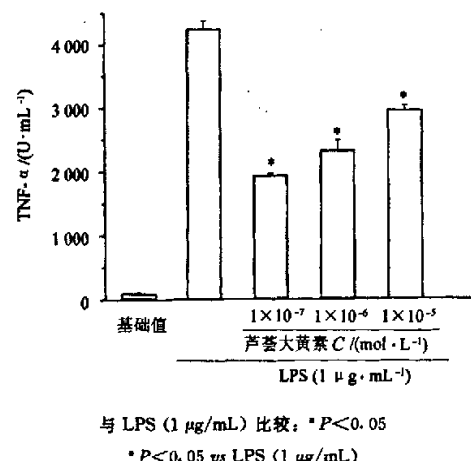


图 2 芦荟大黄素对 LPS 刺激 $\text{PM}\phi$ 释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

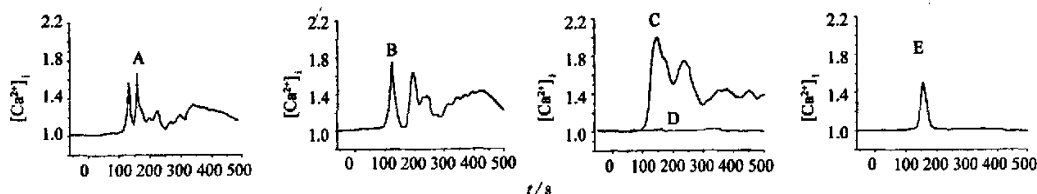
Fig. 2 Effects of aloe-emodin on $\text{TNF-}\alpha$ production in LPS-stimulated $\text{PM}\phi$ ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

2.3 芦荟大黄素影响正常 $\text{PM}\phi$ 单细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动力学特征: 在正常培养液 ($[\text{Ca}^{2+}]_0 = 1.25 \text{ mmol/L}$) 条件下,将已负载 Fura-2 的 $\text{PM}\phi$ 分别加入 1×10^{-7} (A)、 1×10^{-6} (B)、 1×10^{-5} (C) mol/L 芦荟大黄素;无钙培养液条件下,在已负载 Fura-2 的 $\text{PM}\phi$ 中加入 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素 (D),以不加药的 $\text{PM}\phi$ 为对照 (E),图 3 是检测的代表性结果。在胞外有钙条件下,不同浓度芦荟大黄素均诱发正常 $\text{PM}\phi$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 动力学呈波动式变化。加药后首先引发较高幅值的双峰,后期出现 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较宽时程的升

高相;随芦荟大黄素浓度增高, $[Ca^{2+}]_i$ 峰值升高, 时程加宽。 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素对应的第一个峰值为基础值的 2.0 倍, 且在加药后 300 s 出现明显的 $[Ca^{2+}]_i$ 持续性升高现象。如图 3E 所示, 胞外无钙条件下 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素诱发 PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 呈单峰状升高, 与图 3B 比较有显著差别, $[Ca^{2+}]_i$ 增加明显减弱。可见芦荟大黄素诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高既包含胞内 Ca^{2+} 释放又包含胞外 Ca^{2+} 内流。

2.4 芦荟大黄素影响 LPS 升高 PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 的动力学特征: 正常培养液条件下, 在已负载 Fura-2 的

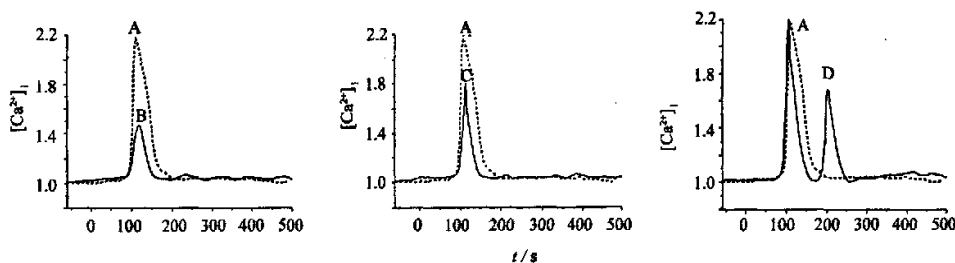
PM ϕ 培养液中, 加入 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS (A); 分别加入 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 和 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素 (B、C、D)。检测 PM ϕ 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 随时间的变化, 结果见图 4。可见, 胞外有钙条件下芦荟大黄素对 LPS 刺激 PM ϕ 的影响有较复杂的剂量依赖性特征: 与单独 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素 (图 3A、B) 或 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS (图 4A) 升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用比较, 同时加入芦荟大黄素和 LPS 明显抑制了 $[Ca^{2+}]_i$ 升高; 而 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素与 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 的共同作用则呈现复杂的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高动力学特征。



A~C- 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L 芦荟大黄素 ($[Ca^{2+}]_o = 1.25$ mmol/L) D-对照值 E- 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素 ($[Ca^{2+}]_o = 0$)
A~C- 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、and 1×10^{-5} mol/L aloe-emodin ($[Ca^{2+}]_o = 1.25$ mmol/L) D-control
E- 1×10^{-6} mol/L aloe-emodin ($[Ca^{2+}]_o = 0$)

图 3 芦荟大黄素诱发正常 PM ϕ 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化动力学 (加药时间 $t=0$ s)

Fig. 3 Dynamics of normal PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ change induced by aloe-emodin (adding drug time: $t=0$ s)



A-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ B-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +芦荟大黄素 1×10^{-7} mol/L C-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +芦荟大黄素 1×10^{-6} mol/L
D-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +芦荟大黄素 1×10^{-5} mol/L
A-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ B-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +aloe-emodin 1×10^{-7} mol/L C-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +aloe-emodin 1×10^{-6} mol/L
D-LPS $1 \mu\text{g/mL}$ +aloe-emodin 1×10^{-5} mol/L

图 4 芦荟大黄素对 LPS 诱发的 PM ϕ 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 动力学的影响 (加药时间 $t=0$ s)

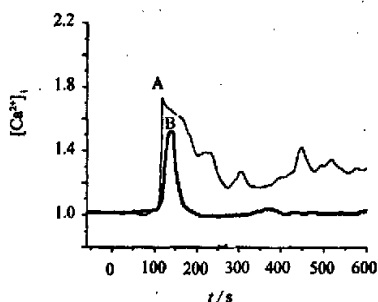
Fig. 4 Effect of alone-emodin on dynamics in LPS-induced single PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ (adding drug time: $t=0$ s)

2.5 大黄素和大黄酸对芦荟大黄素抑制 LPS 升高 PM ϕ $[Ca^{2+}]_i$ 的影响: 在已负载 Fura-2 的 PM ϕ 培养液中, 分别加入 (A) $1 \mu\text{g/mL}$ LPS + 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素 + 1×10^{-5} mol/L 大黄素; (B) $1 \mu\text{g/mL}$ LPS + 1×10^{-6} mol/L 芦荟大黄素 + 1×10^{-5} mol/L 大黄酸。图 5 是检测的各一例代表性结果。与图 4C 中芦荟大黄素单独作用比较, 图 5A 中同时加入大黄素后减弱了芦荟大黄素抑制 LPS 升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。相反, 图 5B 中同时加入大黄酸后加

强了芦荟大黄素抑制 LPS 刺激的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。

3 讨论

本研究结果证明: 对正常 PM ϕ , 芦荟大黄素可剂量依赖性地使其适度活化, 增加 TNF- α 释放量; 同时诱发单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高呈波动式的变化亦随浓度增加而增强, 表明芦荟大黄素参与大黄适度活化巨噬细胞的作用。与胞外有钙时比较, 正常 PM ϕ 胞外无钙时相同浓度芦荟大黄素产生的 TNF- α 量明显减少; 相应的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高亦显著降低。以上结



A-LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ + 芦荟大黄素 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ + 大黄素 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ B-LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ + 芦荟大黄素 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ + 大黄素 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
A-LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ + aloe-emodin $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ + emodin $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ B-LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ + aloe-emodin $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ + rhein $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

图 5 大黄素和大黄酸对芦荟大黄素抑制 LPS 升高 PM ϕ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 (加药时间 $t=0 \text{ s}$)

Fig. 5 Effect of aloe-emodin plus emodin or aloe-emodin plus rhein on LPS-induced single PM ϕ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (adding drug time: $t=0 \text{ s}$)

果表明,芦荟大黄素诱发正常 PM ϕ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高包括胞内钙释放和胞外钙内流,并且芦荟大黄素诱发正常 PM ϕ 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是调节 TNF- α 释放的重要环节。当 PM ϕ 受 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 刺激失控性释放 TNF- α 时,低浓度芦荟大黄素 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) 抑制 PM ϕ 释放 TNF- α 量的 54.6%,但随浓度增加,抑制作用减弱。相应的 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 芦荟大黄素显著降低了 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 升高 PM ϕ 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 峰值,其抑制作用亦随浓度增加而减弱。通过比较芦荟大黄素对正常的和 LPS 刺激的 PM ϕ 的作用特征,可以看出:一方面,芦荟大黄素对 LPS 刺激 PM ϕ 失控释放 TNF- α 和升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有抑制作用;但另一方面,芦荟大黄素单独对 PM ϕ 作用时介导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高和 TNF- α 释放随浓度增加而增强。芦荟大黄素本身活化 PM ϕ 的这种效应将抵消其对 LPS 的抑制作用,且这种抵消效应将随芦荟大黄素浓度增加而增强,所以,两种效应迭加的结果会导致芦荟大黄素抑制 LPS 的效应随浓度增加而降低。其具体机制还有待进一步深入研究。综合本实验的研究结果表明:芦荟大黄素在一定浓度范围对 PM ϕ 释放 TNF- α 有双向调节作用,并且与对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的调节之间有明确的对应性。

大黄对大鼠 PM ϕ 释放 TNF- α 和升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 表现为双向调节作用,其单蒽醌组分中大黄素和大黄素甲醚亦呈现出对 PM ϕ 的双向调节作用,而大

黄素只呈现对 LPS 的显著抑制作用。与大黄素和大黄素甲醚的双向调节作用比较^[2,5,6],本实验结果表明,芦荟大黄具有更强的活化正常 PM ϕ 的作用,而对 LPS 刺激 PM ϕ 的抑制效应则较弱。本实验还研究了芦荟大黄素分别与大黄素和大黄酸的组合药物对 LPS 刺激 PM ϕ 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响;与单独芦荟大黄素的作用比较,加入大黄素减弱了芦荟大黄素的抑制作用,而加入大黄酸则增强了其抑制作用,提示单蒽醌类不同单体的组合产生不同的效应。大黄及其一些单蒽醌组分既可活化免疫细胞,增强其免疫反应能力,又能抑制 LPS 刺激免疫细胞失控释放炎性介质引发的多种病理反应,这是该类药物的重要特点和优势。在医学临床应用研究中,可根据对实际病情的判断,考虑不同单蒽醌组分的各自特点单独用药或组合用药。

本实验得到的芦荟大黄素抑制 LPS 刺激的 PM ϕ 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和释放 TNF- α 间的密切相关性,表明对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的抑制是抑制 TNF- α 释放的关键环节。关于 LPS 诱发胞内 Ca^{2+} 释放相关的上游和下游信号传导通路,报道指出:LPS 作用于 TLR₄ 受体后活化酪氨酸激酶 (PTK),进而激活磷脂酶 C (PLC γ),水解 PIP₂ 升高胞浆 IP₃ 和 DAG 水平,触发内质网释放 Ca^{2+} 并激活 PKC 同工酶,从而介导 MEKK 同工酶的活化并调控 I κ B 激酶 (IKKs) 的磷酸化,导致 NF- κ B 活化并参与 TNF- α 等多种细胞因子的表达^[8-12]。提示,芦荟大黄素可能通过抑制信号通路上游的 PTK 活性而降低胞内 Ca^{2+} 释放。为了适应不同的病症和治疗的需要,开发新型的中药提取物单体及其组合药物,有必要对大黄多种有效成分及其不同组合药物的作用途径和机制进行系统深入的研究。

References:

- [1] Yang W X, Liu M, Wang H, et al. Inhibitory role of Dachengqi Decoction on endotoxin stimulated secretion of TNF- α in macrophage [J]. *Chin J Surg Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合外科杂志), 2001, 7(6): 390-392.
- [2] Wang H, Dong Z Y, Yu Y, et al. Effects of emodin on increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and TNF- α production in rat peritoneal macrophages [J]. *Acta Biophys Sin* (生物物理学报), 2002, 18(3): 345-349.
- [3] Yang W X, Liu M, Wang H, et al. The inhibition of rhubarb on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and TNF- α release in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(Suppl): 216-219.
- [4] Bao E Q. Research on progress of Chinese medicine rhubarb [J]. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 2003, 7(4): 318-319.
- [5] Yang W X, Li X D, Liu B H, et al. The inhibition of rhein

- on increase in $[Ca^{2+}]_i$ and TNF- α release in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *Acta Nankai Univ Nat Sci* (南开大学学报, 自然科学版), 2003, 6(3): 1-5.
- [6] Liu H J, Hu F, Sun W W, et al. Effects of physon on $[Ca^{2+}]_i$ and TNF- α production in rat peritoneal macrophages [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(Suppl): 283-287.
- [7] Kierner A K, Hartung T, Vollmar M. CGMP-mediated inhibition of TNF- α production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 175-181.
- [8] Monich M M, Hunninghake G W. Activation of second messenger pathway in alveolar macrophages by endotoxin [J]. *Eur Respir J*, 2002, 20: 210-222.
- [9] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF- κ B [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 2195-2224.
- [10] Shen J, Sakaida I, Uchida K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(13): 1502-1515.
- [11] Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, et al. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(4): 316-324.
- [12] Zhou X Y, Yang W X, Li J Y. Ca^{2+} and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor- κ B activation, inducible nitric oxide synthase expression, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 31337-31347.

赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

许惠玉¹, 陈志伟², 王继峰¹, 沈丽霞¹, 梁欣钰¹, 牛建昭^{1*}

(1. 北京中医药大学 细胞生化实验室, 北京 100029; 2. 齐齐哈尔医学院 组胚教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161042)

摘要:目的 探讨赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤生长及肿瘤细胞凋亡的影响及其机制。方法 60 只健康昆明小鼠, 随机分 5 组, 分别为模型组, 环磷酰胺 (100 mg/kg) 组, 赤芍总苷 (240、120 mg/kg) 组, 环磷酰胺 (100 mg/kg) + 赤芍总苷 (240 mg/kg) 组。复制小鼠 HepA 肝癌皮下移植模型后, 第 2 天 ig 给药, 连续给药 7 d, 第 8 天处死, 取肿瘤组织, 计算抑瘤率, 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率和分析细胞周期, 以及免疫组化法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 赤芍总苷高、低剂量明显抑制 HepA 肝癌小鼠肿瘤的生长; 肿瘤细胞凋亡指数增加; 抑制肿瘤细胞 G₀/G₁ 期比例, 向 S 期细胞转化, 凋亡率增高; 下调肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白的表达, 同时明显提高肿瘤细胞中 Bax 蛋白的表达。结论 赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤生长有明显抑制作用, 并诱导肿瘤细胞凋亡, 其主要机制与调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达有关。

关键词: 赤芍总苷; 肝癌 HepA; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1364-04

Effect of total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on apoptosis of hepatoma cell in mice

XU Hui-yu¹, CHEN Zhi-wei², WANG Ji-feng¹, SHEN Li-xia¹, LIANG Xin-yun¹, NIU Jian-zhao¹

(1. Laboratory of Cell and Biochemistry, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Department of Histoembryo, Qiqihaer College of Medicine, Qiqihaer 161042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on the growth and apoptosis of hepatoma cells HepA and its mechanism. **Methods** KM Mice (60) inoculated with hepatoma cells were randomly divided into five groups; the model group, the cyclophosphamide (CY, 100 mg/kg) group, the groups with high- and low-doses (240 and 120 mg/kg) of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* the group with combination of CY (100 mg/kg) and high-dose (240 mg/kg) of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra*, ig administration was given to the mice in day 2, respectively. The administration lasted 7 d, then the mice were sacrificed at day 8 and the tumor tissue was weighed. The inhibitory rates were calculated by weighing the tumor separately; The flow cytometer (FCM) was used to determine the apoptosis rates of hepatoma cells; The expression levels of Bcl-2 and Bax of the hepatoma cells were assayed by immunohistochemistry. **Results** The hepatoma

收稿日期: 2006-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助 (305404200032; 30510403202); 长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT0413); 博士点基金资助项目 (20050026012); 齐齐哈尔市科学技术计划重点项目

作者简介: 许惠玉 (1973-), 女 (朝鲜族), 讲师, 2005 级博士生, 研究方向为中药抗肿瘤。

Tel: (010) 64287538 E-mail: czwzp@tom.com

* 通讯作者 牛建昭 Tel: (010) 64286716 E-mail: niujz@263.net