

· 药物研究 ·

板蓝根有效部位 F₀₂₂ 对脂多糖

刺激小鼠组织膜结构伸展刺突蛋白 mRNA 表达的影响*

刘云海, 谢 委, 方建国, 李 敬

(华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨板蓝根抗内毒素活性部位 F₀₂₂ 对脂多糖(LPS)刺激小鼠组织膜结构伸展刺突蛋白 mRNA (moesin mRNA) 表达的影响。方法 实验前 1 周用卡介苗腹腔注射小鼠 0.2 mL · (20 g)⁻¹, 30 只小鼠平分为 5 组, 药物实验组分别灌胃给予 1.00%、0.50% 和 0.25% F₀₂₂ 液 0.4 mL · (20 g)⁻¹, 阴性对照组灌胃给予 1.00% F₀₂₂ 液 0.4 mL · (20 g)⁻¹, LPS 模型组灌胃给予同等量 0.9% 氯化钠溶液。1.5 h 后重复给药 1 次。第 2 次给药后 30 min, 药物实验组、LPS 模型组小鼠尾静脉注射 LPS 0.2 mL · (20 g)⁻¹, 9 h 后小鼠乙醚麻醉, 取肝、脾、肾组织作 moesin mRNA 原位杂交处理, 显微镜下观察胞浆被染色情况。结果 组织胞浆着色呈棕黄色者为阳性。LPS 可致小鼠肝、肾、脾组织 moesin mRNA 表达增加, 而预先给予板蓝根 F₀₂₂ 部位者 moesin mRNA 表达被抑制, 且有剂量依赖特征。结论 板蓝根 F₀₂₂ 部位对脂多糖致小鼠肝、肾、脾组织 moesin mRNA 表达有抑制作用。

[关键词] 板蓝根; 内毒素; 脂多糖; 膜伸展刺突蛋白 mRNA

[中图分类号] R282; R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2006)01-0001-03

Effect of Component F₀₂₂ in *Radix Isatidis* on the Expression Upregulation of Moesin mRNA in Mice Induced by Lipopolysaccharide

LIU Yun-hai, XIE Wei, FANG Jian-guo, LI Jing (Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To probe into the effect of the anti-endotoxic part in *Radix Isatidis* on the expression of moesin mRNA in tissues of mice induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** One week before the test, an intraperitoneal injection of 0.2 mL · (20 g)⁻¹ bacillus calmette-guerin (BCG) was given to each of 30 mice, which were then randomized equally into 5 groups. Mice of the test groups were given 0.4 mL · (20 g)⁻¹ of 1.00%, 0.50% and 0.25% solution of F₀₂₂ by gastrogavage, mice of the control group were given 0.4 mL · (20 g)⁻¹ of 1.00% solution of F₀₂₂ by gastrogavage, and mice of the model group were given each an equal volume of 0.9% sodium chloride. The above procedures were repeated 1.5 h later, and 30 min following the second drug administration, the test groups and the model group were given 0.2 mL · (20 g)⁻¹ of LPS. Mice were anesthetized 9 h later by ether with the liver, kidney and spleen tissues treated by moesin mRNA hybridization in Situ and the staining of cytoplasm observed under microscope. **Results** A brown yellow staining of the tissue cytoplasm was taken as positive, and the administration of LPS could increase moesin mRNA expression. With prior administration of F₀₂₂ part in *radix isatidis* the moesin mRNA expression by LPS was inhibited with a dose dependent characteristic. **Conclusion** The F₀₂₂ part in *radix isatidis* can inhibit the LPS induced moesin mRNA expression in tissues of mice liver, kidney and spleen with an anti-endotoxic mechanism possibly at the molecular level.

KEY WORDS *Radix isatidis*; Endotoxin; Lipopolysaccharide; Membrane-organizing extension spike protein mRNA

细菌内毒素(endotoxin)是革兰阴性菌细胞外膜中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)成分,可刺激机体防御系统过度释放炎症细胞因子——肿瘤坏死因子

(TNF α)、白细胞介素-6(IL-6)及一氧化氮(NO)等,引起发热、脓毒性休克、弥散性血管内凝血(DIC)、多器官功能衰竭综合征(MODS),以致死亡。现有抗菌药物对革兰阴性菌感染的防治仍未取得突破性进展^[1,2]。笔者曾研究报道了板蓝根的抗内毒素作用^[3-5],亦有实验证实板蓝根的抗内毒素作用^[6-8]。为了筛选板蓝根抗内毒素的活性成分,笔者将板蓝根乙醇提取物用不同极性溶剂萃取,从中筛选出抗内毒素活性最强的 F₀₂₂ 部位^[9-12],但其抗内毒素机制尚未阐明。笔者在本实验探讨板蓝根抗内毒素活性部位

[收稿日期] 2005-02-22

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目(基金编号: 39170877, 39870872); 卫生部科学研究基金资助项目(基金编号: 98-2-110)

[作者简介] 刘云海(1942-),男,江苏如东人,主任药师,学士,主要从事医院药学研究。电话: 027-83649095, E-mail: liuyunhaitongji@yahoo.com.cn。

F₀₂₂对LPS致小鼠组织膜结构伸展刺突蛋白 mRNA (moesin mRNA)表达的影响。

1 材料

1.1 板蓝根来源及其抗内毒素活性部位 F₀₂₂ 制备 板蓝根(Radix Isatidis)产于河北省邢台市,经邢台市药材公司张有生鉴定为十字花科菘蓝(Isatis Indigotica Fort)的干燥根。将其粉碎成细粉,用95%乙醇浸泡72 h,继用乙醇渗漉,回收乙醇至无醇味并浓缩,用石油醚反复萃取,除尽石油醚部位,继用氯仿反复萃取得氯仿部位 F₀₂(提取率0.8%);按硅胶柱层析法,用不同比例氯仿-甲醇液作梯度洗脱,得到抗内毒素活性强的部位(F₀₂₂,提取率0.31%)。

1.2 试剂 脂多糖(LPS, E. coli O₂₆B₆,每支5 mg, Sigma公司);卡介苗(BCG,每支50 mg,上海生物制品研究所);moesin mRNA原位杂交试剂盒(武汉博士德生物公司)。鲎试剂溶解水(每支10 mL,中国湛江海洋生物制品厂),其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 昆明种小鼠,体重18~22 g,雌雄各半,华中科技大学同济医学院医学实验动物中心提供。

1.4 仪器 XW-80A型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);CHA型光学显微镜,恒温培养箱。

2 方法与结果

2.1 溶液制备 样品溶液:分别取板蓝根 F₀₂₂ 部位适量,加适当助溶剂,加纯化水配制成溶液,调pH值7.0~7.5,密封,消毒,即得浓度分别为1.00%,0.50%和0.25%样品液。LPS液:取LPS 1支(5 mg),用鲎试剂溶解水溶解成10 mL(500 μg · mL⁻¹),旋涡振荡30 s;再取0.8 mL稀释到100 mL(4 μg · mL⁻¹)。BCG液:取BCG 1支(50 mg)加鲎试剂溶解水5 mL溶解(10 mg · mL⁻¹)。

2.2 组织标本制备 实验前1周腹腔注射小鼠BCG液0.2 mL · (20 g)⁻¹;实验前14 h小鼠禁食不禁水,实验当天,将30只小鼠随机分为5组,每组6只。药物实验组分别灌胃给予1.00%,0.50%和0.25% F₀₂₂液0.4 mL · (20 g)⁻¹,阴性对照组灌胃给予1.00% F₀₂₂液

0.4 mL · (20 g)⁻¹,LPS模型组灌胃给予同等量0.9%氯化钠溶液。1.5 h后重复给药1次。第2次给药后30 min,药物实验组、LPS模型组小鼠尾静脉注射LPS 0.2 mL · (20 g)⁻¹,9 h后小鼠乙醚麻醉,处死小鼠,取肝、肾、脾组织,立即用4%多聚甲醛固定。

2.3 moesin mRNA原位杂交 按常规操作,将各组织切片,脱蜡入水,3%过氧化氢溶液室温处理10 min以灭活内源性过氧化物酶,暴露mRNA核酸片段,切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃消化25 min。充分洗涤后,按每张切片加含寡核苷酸探针的原位杂交液20 μL,在湿盒中,37~40℃杂交过夜。每张切片取2 μL杂交探针稳定液A和18 μL杂交探针稳定液B混匀,加在切片上,于湿盒中37~40℃反应6 h后洗涤(5 min × 3次)。滴加封闭液,37℃孵育20 min。滴加兔抗地高辛,37℃60 min。充分洗涤后,滴加生物素化羊抗兔IgG,37℃孵育20 min。充分洗涤后,滴加SABC,37℃孵育20 min。DAB显色20~30 min,用苏木精复染,充分水洗,乙醇脱水,二甲苯透明,封片。显微镜下观察胞浆着色呈棕黄色者为阳性。

2.4 板蓝根 F₀₂₂ 部位对LPS刺激鼠组织 moesin mRNA表达的抑制作用 图像分析采用北京航空航天大学医学图像处理系统给予原位杂交显色强度计分。抑制率 r(%) = [1 - (药物实验组 - 阴性对照组) / (LPS模型组 - 阴性对照组)] × 100% [13]。结果见表1。表1显示,LPS可刺激小鼠肝、肾、脾组织 moesin mRNA的表达,而预先给予板蓝根 F₀₂₂ 部位可抑制其表达,且有剂量依赖特征。经用ANOVA方差分析,高、中剂量药物实验组与LPS模型组比较差异有显著性(P < 0.05)。

3 讨论

在内毒素诱导的信号传递过程中,内毒素受体起了关键性作用。目前已发现的内毒素受体主要有CD₁₄、moesin、钟声样(toll like)蛋白及低密度脂蛋白(LDL)等,前三者与致病关系密切。已有文献报道,应用moesin单克隆抗体可阻止细菌内毒素毒性中心LPS

表1 各组小鼠肝、肾、脾组织 moesin mRNA 表达计分

组别	药物剂量/%	LPS浓度/ [mL · (20 g) ⁻¹]	肝		肾		脾	
			分值	抑制率/%	分值	抑制率/%	分值	抑制率/%
药物实验组	1.00	0.2	18.2 ± 0.7 ^{*1}	93.5	9.8 ± 3.5 ^{*1}	88.6	5.9 ± 0.6 ^{*1}	87.8
	0.50	0.2	37.4 ± 29.6 ^{*1}	82.7	30.1 ± 21.8 ^{*1}	82.2	20.0 ± 15.7 ^{*1}	83.0
	0.25	0.2	99.1 ± 28.7	26.9	88.9 ± 26.2	30.5	69.6 ± 25.4	23.3
LPS模型组	-	0.2	128.9 ± 10.3	-	123.6 ± 25.5	-	88.9 ± 12.7	-
阴性对照组	1.00	-	25.4 ± 23.0 ^{*1}	-	22.8 ± 20.0 ^{*1}	-	16.0 ± 13.0 ^{*1}	-

与LPS模型组比较, ^{*1}P < 0.05

的生物效应达 $>90\%$ ^[14], 而 CD₁₄ 的抗体只能拮抗 LPS 生物效应的 50%。早期认为 moesin 对维持细胞形态和运动有关。近年来, Tohme 用抗体抑制实验发现, 抗 moesin 抗体在低浓度时就抑制 LPS 刺激单核细胞分泌 TNF α , 但对细胞其他功能影响不大, 说明 moesin 单克隆抗体能选择性终止 LPS 信号传导, 而不是通过抑制整个细胞非特异性地发挥作用^[15]。本实验结果显示, 小鼠给予 LPS 刺激 9 h 后, 其肝、肾、脾组织 moesin mRNA 表达较明显, 与 LPS 模型组比较, 板蓝根抗内毒素活性部位 F₀₂₂ 可抑制 LPS 刺激的 moesin mRNA 表达, 且有剂量依赖性。这从分子水平阐述了板蓝根抗内毒素机制。

小鼠对内毒素为低敏动物, 需较大剂量内毒素 ($16 \sim 27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 才能造成小鼠内毒素性休克。根据文献, 给小鼠用 BCG 增敏, 可大大降低致小鼠休克/死亡的内毒素用量^[16]。本实验研究中, 考虑到实验动物种族差异, 内毒素及 BCG 的来源、效价与文献所用试剂的差异, 笔者对增敏的天数及给药量进行预实验, 发现腹腔注射 BCG $2 \text{ mg} \cdot (20 \text{ g})^{-1}$ 的小鼠饲养 7 d 即可达到较好的增敏效果。BCG 使小鼠对内毒素敏感是降低其免疫功能, 不损伤组织器官。阴性对照组给予 1.00% F₀₂₂ 液且结果用于已知百分率的计算, 可以更准确显示样品对脂多糖致鼠组织 moesin mRNA 表达的抑制作用。

[参考文献]

- [1] 梁存河. 抗生素诱导内毒素释放研究进展[J]. 国外医学外科学分册, 2000, 27(5): 259 - 261.
- [2] 杨 焯, 盛 杰. 血浆内毒素水平的意义[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(2): 162 - 163.
- [3] 刘云海, 杜 光, 韩洪刚. 板蓝根抗内毒素研究[J]. 医

药导报, 2001, 20(9): 547 - 548.

- [4] 刘云海, 黄 巍, 汤 杰, 等. 板蓝根对脂多糖诱导 P38 丝裂原活化蛋白激酶的影响[J]. 医药导报, 2004, 23(11): 799 - 801.
- [5] 舒 文, 刘云海. 抗内毒素药物进展[J]. 医药导报, 1996, 15(增刊): 17.
- [6] 乔传卓, 张汉明, 刘 盛, 等. 抗内毒素实验评价四倍体板蓝根[J]. 第二军医大学学报, 1995, 16(40): 395 - 396.
- [7] 李耀维, 张素梅. γ -辐射对板蓝根抗内毒素作用的影响[J]. 中国药房, 1995, 6(2): 9 - 10.
- [8] 刘志峰, 李桂生, 傅风华, 等. 8 种中药注射剂体外抗内毒素作用的观察[J]. 中草药, 2003, 33(1): 58 - 59.
- [9] 刘云海, 林爱华, 丁水平, 等. 板蓝根氯仿提取物及其 4 组份抗内毒素作用[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(6): 326 - 328.
- [10] 刘云海, 方建国, 王文清. 板蓝根抗内毒素活性物质筛选[J]. 中南药学, 2004, 2(6): 326 - 329.
- [11] 刘云海, 方建国, 王文清, 等. 板蓝根抗内毒素活性物质研究(I)[J]. 中南药学, 2004, 2(4): 195 - 198.
- [12] 刘云海, 方建国, 王文清. 板蓝根抗内毒素活性物质研究(II)[J]. 中南药学, 2004, 2(5): 263 - 266.
- [13] 杜冠华, 李学军, 张永祥. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 528 - 529.
- [14] 张顺财. 内毒素基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 46 - 51.
- [15] 林剑国, 石淑仙, 刘云海. Moesin 分子及其特征[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(3): 168 - 170.
- [16] Vogel S N, Moore R N, Sipe J D, *et al.* BCG-induced enhancement of endotoxin sensitivity in C3H/HeJ mice [J]. *J Immunol*, 1980, 124 (10): 2004.

三氧化二砷和维生素 C

联合诱导肝癌细胞凋亡的作用研究*

李 媛, 李晶晶, 胡本容, 汤 强, 付 琴, 向继洲

(华中科技大学同济医学院药理学系, 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨维生素 C (Vit C) 与三氧化二砷 (As₂O₃) 促肝癌细胞株 (HepG2) 凋亡的协同效应。方法 体外培养人肝癌细胞株 HepG2, 以 As₂O₃, Vit C, 以及它们不同浓度组合孵育细胞, 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法, Annexin-V/PI 双染色流式细胞术来观察各组的细胞凋亡情况, 并通过流式软件分析细胞周期变化。结果 As₂O₃ 与 Vit C 联用能显著提高单用 As₂O₃ 的细胞抑制率和细胞凋亡率 ($P < 0.05$), Vit C 能显著增强 As₂O₃ 诱导细胞集中于 S 期的作用, 从而增强其促细胞凋亡作用。结论 Vit C 增强三氧化二砷诱导细胞凋亡的作用, 该作用可能与影响细胞周期有关。

[关键词] 三氧化二砷; 维生素 C; 肝癌; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] 977.5; R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2006)01-0003-03