

# 羌活水提物对迟发型变态反应及炎症反应的影响及其机制

孙业平<sup>1</sup>, 徐强<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009;

<sup>2</sup>南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

**【摘要】** 目的: 探讨羌活水提物对迟发型变态反应及炎症反应的影响及其机理。方法: 考察羌活水提物对2, 4, 6-三硝基氯苯(PCI)致迟发型变态反应(PCI-DTH)机制诱导的肝损伤、二甲苯诱导的耳肿胀及酵母多糖诱导的腹腔炎症等的影响; 考察羌活水提物对人Jurkat T淋巴瘤细胞分泌基质金属蛋白酶及迁移功能的影响。结果: 羌活水提物诱导相和效应相给药均显著地抑制了PCI-DTH诱导的肝损伤。对二甲苯诱导的耳肿胀无影响, 但可显著抑制酵母多糖诱导腹腔白细胞游出。羌活水提物对胶原诱导的Jurkat细胞分泌基质金属蛋白酶及迁移功能亦有显著的抑制作用。结论: 羌活水提物抑制迟发型变态反应及炎症反应的作用可能与下调基质金属蛋白酶从而抑制白细胞的迁移功能有关。

**【关键词】** 羌活水提物; 迟发型变态反应; 炎症; 基质金属蛋白酶; 细胞迁移

**【中图分类号】** R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)01-0051-04

羌活为伞形科植物羌活(*Notopterygium incisum* Ting.)、宽叶羌活(*N. forbesii* Boiss.)或川羌活(*N. franchetii* Boiss.)的根及根茎, 广泛用于风寒湿痹、骨节酸痛、痈疽疮毒等证。现代药理学研究证实具有抗炎、镇痛作用, 但抗炎作用机理不明。前期研究发现, 羌活水提物能显著地抑制2, 4, 6-三硝基氯苯(PCI)所致的小鼠耳壳炎症反应, 其机理与抑制淋巴细胞的移动有关<sup>[1]</sup>。本文在此基础上进一步探讨羌活水提物对特异性免疫机制诱导的炎症反应及与非特异性炎症反应的影响, 并从对白细胞迁移功能的影响这一角度对其抗炎机理进行研究。

## 1 实验材料

### 1.1 动物

雌性昆明种小鼠及ICR小鼠, 6~8周龄, 体重20±2 g, 购自中国药科大学实验动物中心, 饲养于21±2℃的环境中, 自由摄食和饮水。

### 1.2 细胞株

Jurkat细胞株由中科院上海细胞所提供。用含10%的新生牛血清(NBS)的RPMI培养基(Gibco)在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养。

### 1.3 药品和试剂

羌活(*Rhizoma Notopterygii*, RN)购自南京药材公司, 由中国药科大学刘慧娟老师鉴定为*Notopterygium incisum* Ting.。按如下方法制备羌活水提物(RN-ext): 将药材用蒸馏水(10:1)于100℃提取2次, 每次1 h。将1700 r/min离心后所得的上清合并, 干燥后得粉末, 得率为20%。实验中所用的羌活水提物的剂量均按此粉末计算。

2, 4, 6-三硝基氯苯(PCI, Tokyo Kasei Industry Co., Ltd.); 橄榄油(Olive oil, 上海化学试剂集团公司); 酵母多糖(Zymosan A, Sigma); 地塞米松磷酸钠注射剂(Dex, 江苏江阴制药厂); 环磷酰胺(上海华联制药有限公司); 谷丙转氨酶(ALT)测定试剂盒(南京建成生物工程公司); 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2H-四唑溴(MTT, Amresco, USA); 二甲亚砜(DMSO, 上海凌峰化学试剂有限公司); 台盼蓝(上海试剂三厂); 丙烯酰胺, 双丙烯酰胺(上海生工生物技术有限公司); 明胶(Gelatin, Sigma), 考马斯亮蓝R-250(Sigma); I型胶原(Collaborative Biomedical Products, USA); polyvinylpyrrolidone free polycarbonate filters (PVPPF, Costar)。

\*【收稿日期】 2002-05-21 【\*通讯作者】 Tel: 025-3597620

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号: 39925041)

## 2 实验方法

### 2.1 PCI 所致迟发型变态反应(PCI-DTH)机制诱导的肝损伤<sup>[1]</sup>

取 ICR 小鼠, 剃去腹毛, 涂 1% PCI 的乙醇溶液 0.1 ml 致敏, 5 d 后同样再次致敏, 再 5 d 后, 用 0.5% PCI 橄榄油溶液 10  $\mu$ l 在肝脏内注射攻击, 18 h 后, 取血, 分离血清, 按测定试剂盒测其 ALT 值。

### 2.2 二甲苯致耳肿胀<sup>[3]</sup>

取 ICR 小鼠, 连续 6 d ig RN-ext 或肌注地塞米松。最后一次给药后 1 h, 在小鼠右耳涂二甲苯 30  $\mu$ l 致炎, 2 h 后测两耳的厚度, 将其厚度差作为炎症反应的强度。

### 2.3 Zymosan 致急性腹腔炎症<sup>[4]</sup>

取昆明种小鼠, ig RN-ext 或 im 地塞米松连续 6 d。末次给药后 1 h, ip 含 Zymosan A 0.5 mg/ml 的生理盐水 1 ml。4 h 后断颈处死, 向 ip 含 10 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液 5 ml, 收集灌洗液 4 ml, 用血细胞计数板计数其中的细胞。

### 2.4 用 MTT 法检测药物的细胞毒活性

将 Jurkat 细胞以每毫升  $1 \times 10^5$  的密度在 96 孔板中培养, 同时加入不同浓度的 RN-ext。24 h 后每孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 200  $\mu$ l DMSO, 待充分溶解后在用酶标仪在 540 nm 处测吸光度。

### 2.5 Gelatin 酶谱分析<sup>[5]</sup>

取 Jurkat 细胞, 以每毫升  $2 \times 10^7$  的密度悬于无血清的 RPMI-1640 培养基中, 加入预先用 I 型胶原 (2.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l 的 PBS 缓冲液) 包被的 96 孔板, 同时加入不同浓度的 RN-ext, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h, 取上清。将上清 20  $\mu$ l 与 Tris 缓冲液 (62.5 mmol/L Tris, 10% 甘油, 0.00125% 溴酚蓝, 12% SDS) 10  $\mu$ l 混合, 以含 2 mg/ml gelatin 的 5% SDS-PAGE 分离。电泳后将凝胶用洗涤缓冲液 (2.5% Triton X-100, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ mol/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub>) 洗 2 次, 每次 30 min, 以除去 SDS。而后将凝胶置于孵育缓冲液 (1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ mol/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub>) 中, 在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 48 h, 用蒸馏水将凝胶洗涤 2 次, 再用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min, 并用含 10% 醋酸和 10% 异丙醇的溶液脱色 8 h。蓝色背景上的亮带 (gelatin 降解区) 即显示蛋白裂解活性。

### 2.6 迁移分析<sup>[6]</sup>

迁移分析在 Transwell 体系中进行。在 8  $\mu$ m PVPF 膜的底面包被含 2.5  $\mu$ g 的 I 型胶原的 PBS 溶液 50  $\mu$ l。将  $10^5$  个 Jurkat 细胞向 Transwell 系统的内室, 外室则加入不同浓度的药物 0.5 ml, 两室间液体可以相互渗透。37  $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后, 于下室中加入 20 mg/ml 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l, 继续培养 10 h, 1000 r/min 离心 5 min, 除去上清, 加入 DMSO 0.2 ml, 待溶解后转至 96 孔板中, 在酶标仪上于 540 nm 处测吸光度。

### 2.7 统计

所有数据均以平均值  $\pm$  标准差表示, 组间差异采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 RN-ext 对 PCI-DTH 肝损伤的影响

小鼠自 PCI 致敏当日起 ig RN-ext 或 im 环磷酰胺 (Cy) 连续 10 d。与对照组相比, 100 和 200 mg/kg 的 RN-ext 显著地降低血清 ALT 水平, Cy (10 mg/kg) 也显示了降低血清 ALT 的作用 (见表 1)。

Tab 1. Effect of RN-ext and cyclophosphamide (Cy) on the liver injury induced by delayed-typed hypersensitivity to PCI

Groups	Dose (mg/kg)	<i>n</i>	ALT (Kamen unit)
Induction phase			
Control	-	8	170.0 $\pm$ 54.7
RN-ext	100	8	69.3 $\pm$ 49.3 *
RN-ext	200	8	84.7 $\pm$ 52.2 *
Cy	10	8	48.5 $\pm$ 52.2 **
Effector phase			
Control	-	5	198.4 $\pm$ 21.2
RN-ext	100	8	107.7 $\pm$ 63.8 *
RN-ext	200	8	170.7 $\pm$ 44.3
Cy	10	7	133.5 $\pm$ 27.5 *

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs control

当药物在 PCI 攻击后 0, 5, 10, 15 h 4 次给予动物时, 与对照组相比 100 mg/kg 的 RN-ext 及 Cy (10 mg/kg) 显著地降低了血清 ALT 水平 (见表 1)。

### 3.2 RN-ext 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

RN-ext 100 和 200 mg/kg 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀无显著影响, 地塞米松则有极显著的抑制作用 (见表 2)。

### 3.3 RN-ext 对 Zymosan 致急性腹腔炎症中白细胞游出的影响

Zymosan 能明显引起白细胞在腹腔游出、聚集。RN-ext 以剂量依赖性的方式抑制白细胞游出, 而地塞米松却未显示出对白细胞游出的抑制作用(见表 3)。

Tab 2 Effect of RN-ext and dexamethasone(Dex) on the ear swelling induced by xylene( $n=8$ )

Groups	Dose (mg/kg)	Ear swelling (mg/kg)	Inhibition (%)
Control		87.5 ± 37.1	
RN-ext	100	114.9 ± 62.3	-31.3
RN-ext	200	93.6 ± 70.5	-7.0
Dex	20	36.5 ± 26.2**	58.3

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control

Tab 3 Effects of RN-ext and dexamethasone(Dex) on leukocytes recruitment in zymosan-induced peritoneal inflammation( $n=6$ )

Groups	Dose (mg/kg)	Cell counting ( $\times 10^7$ )
Saline		0.65 ± 0.2
Control		3.2 ± 1.4 <sup>##</sup>
RN-ext	100	1.8 ± 0.4*
RN-ext	200	1.1 ± 0.4**
RN-ext	400	1.1 ± 0.5**
Dex	10	2.9 ± 1.3

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs saline; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control

### 3.4 RN-ext 对胶原诱导的 Jurkat 细胞分泌基质金属蛋白酶的影响

如图 1 所示, Jurkat 细胞接触胶原后表达的 72KD 基质金属蛋白酶(MMP-2)的活性明显增强, 而 RN-ext 在实验所用的 3 个浓度下对胶原诱导的 MMP-2 分泌均有明显的抑制作用。

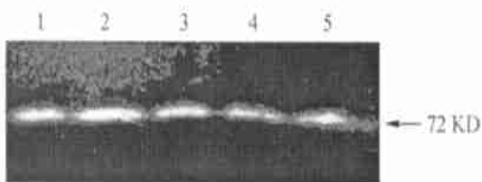


Fig 1. Effect of RN-ext on type I collagen-induced MMP expression in Jurkat cells

Lane 1. Non-coated; Lane 2. Type I collagen coated (CC); Lane 3. CC + RN ( $10^{-6}$  g/ml); Lane 4. CC + RN ( $10^{-5}$  g/ml); Lane 5. CC + RN ( $10^{-4}$  g/ml)

### 3.5 RN-ext 对胶原诱导的 Jurkat 细胞迁移的影响

如图 2 所示, 在 Transwell 系统中, Jurkat 细胞穿越包被了胶原的 PVPF 膜的能力比穿越未包被胶原

的 PVPF 膜的能力显著增强。而 RN-ext 在高浓度下能显著抑制 Jurkat 细胞穿越胶原的 PVPF 膜包被。

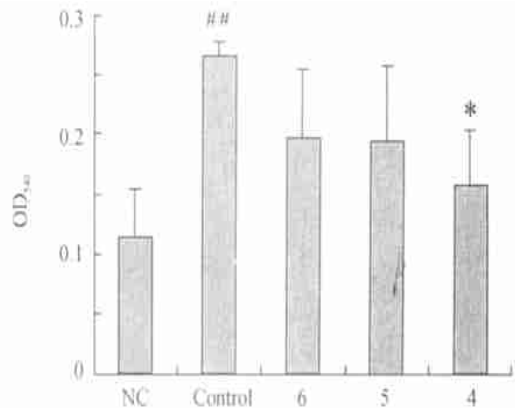


Fig 2 Effects of RN-ext on type I collagen-induced Jurkat cells migration.

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs NC; \* $P < 0.05$  vs control

## 4 讨论

本研究在前期研究发现 RN-ext 能显著抑制 PCI 诱导的小鼠耳壳接触性皮炎<sup>[1]</sup>的基础上, 进一步探讨了对 PCI-DTH 小鼠肝损伤的影响。结果表明, RN-ext 无论在诱导相还是在效应相给药均可显著抑制 PCI-DTH 所致的肝损伤(表 1)。PCI 诱导的小鼠耳壳接触性皮炎及肝损伤均属于由 T 淋巴细胞介导的迟发型变态反应, 包括 T 淋巴细胞的活化、分化、效应细胞形成的过程(诱导相), 和抗原特异性 T 细胞向炎症局部移动并产生多种细胞因子发挥效应功能及其以后的炎症过程(效应相)。RN-ext 对于 PCI-DTH 肝损伤的诱导相和效应相均有显著抑制作用, 提示其对 T 淋巴细胞的活化和功能以及此后的非特异性炎症反应均有抑制活性。为探讨 RN-ext 的作用机制, 又进一步选择二甲苯致耳肿胀及酵母多糖致腹腔炎症这两个模型来考察 RN-ext 的活性。二甲苯所致炎症反应为一单纯的血管神经性水肿, RN-ext 对这一炎症无抑制作用(表 2), 表明其不能抑制炎症进展过程中毛细血管通透性的增加; 酵母多糖致腹腔炎症的主要特征为中性粒细胞的游出, RN-ext 对这一炎症模型有显著抑制作用(表 3), 提示其有可能作用于炎症细胞的跨血管迁移。鉴于 T 淋巴细胞在 DTH 反应中的重要作用, 我们进一步应用人 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞模拟白细胞的跨血管迁移过程, 证实 RN-ext 可显著抑制 T 淋巴细胞的移动能力, 其机理可能与

调节基质金属蛋白酶(MMP)活性等有关。MMP是一个内肽酶家族,其特征是可消化非常稳定的细胞外基质成分,在T细胞降解血管基膜及迁移的过程中起重要作用<sup>[6,7]</sup>。RN-ext对胶原诱导的MMP-2分泌有明显的抑制作用(图1),亦能抑制胶原诱导的细胞迁移(图2)。用MTT法测定的结果表明RN-ext对Jurkat细胞无细胞毒活性(数据未给出),因此RN-ext对MMP及迁移功能的影响并非由细胞毒作用所引起。鉴于迟发型变态反应是由T淋巴细胞介导的反应,这些结果提示RN-ext对迟发型变态反应的抑制作用可能与下调T淋巴细胞分泌基质金属蛋白酶、削弱其跨血管迁移能力等有关。

#### 参考文献

[1] Sun Y, Xu Q. Aqueous extract from *Rhizoma Notopterygii* reduces contact sensitivity by inhibiting lymphocyte migration via down-regulating metalloproteinase activity[J]. *Pharmacol Res*, 2002, **46**: 333-337.

- [2] Xu Q, Wang R, Jiang J, *et al.* Liver injury model in mice induced by a cellular immunologic mechanism-delayed-type hypersensitivity-induced liver injury to picryl chloride and phenotype of effector cell[J]. *Cell Immunol*, 1996, **167**(1): 38-43
- [3] Huguët A, Del-Carmen-Recio M, Manez S, *et al.* Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **410**(1): 69-81.
- [4] Insug O, Thomas KM, Laszlo O, *et al.* Peptide mimicking sialyl-lewisa with anti-inflammatory activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**: 106-111.
- [5] Esparza J, Viñardell C, Calvo J, *et al.* Fibronectin upregulates gelatinase B(MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A(MMP-2) and its activator MT1-MMP(MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathway[J]. *Blood*, 1999, **94**(8): 2754-2766.
- [6] David L, Emmanuelle W, Raouard G, *et al.* Cell Gelatinases mediated basement membrane transmigration *in vitro*[J]. *J Immunol*, 1995, **154**: 4379-4389
- [7] Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1994, **732**: 11-21.

## Effects of Aqueous Extract from *Rhizoma Notopterygii* on the Delayed-Type Hypersensitivity and Inflammatory Reactions and Its Mechanisms

SUN Ye-Ping<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, Nanjing 210009, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

**【ABSTRACT】** AIM: To examine the effects of aqueous extract from *Rhizoma Notopterygii* (RN-ext) on the delayed-type hypersensitivity (DTH) and inflammatory reactions and its mechanisms. **METHOD:** Liver injury induced by DTH to picryl chloride (PCI), xylene-induced ear swelling and zymosan-induced peritoneal inflammation were used. The assays for the activity of matrix metalloproteinase (MMP) in human Jurkat T leukemia cells and for the cell migration were also used. **RESULT:** RN-ext significantly inhibited the DTH-induced liver injury in both induction and effector phases. The extract did not inhibit the xylene-induced ear swelling but significantly reduced the leukocyte recruitment induced by zymosan. RN-ext also inhibited the MMP activity in Jurkat cells as well as the migration of the cells. **CONCLUSION:** The inhibition on the migration of leukocytes via down-regulating MMP activity might be involved in the anti-DTH and anti-inflammatory activities of RN-ext.

**【KEY WORDS】** Aqueous extract from *Rhizoma Notopterygii*; Delayed-type hypersensitivity; Inflammation; Matrix metalloproteinase; Cell migration

**【FOUNDATION ITEM】** This project was supported by National Natural Science Foundation of China(No. 39925041)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>