

# 藏药忍冬果对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及分泌细胞因子的影响

王聚乐<sup>1\*</sup>, 孙洋<sup>2</sup>, 周惠英<sup>1</sup>, 徐强<sup>2</sup>, 顿珠<sup>3</sup>

(1. 西藏大学医学院, 西藏拉萨 850000; 2. 南京大学生命科学学院生物医药技术国家重点实验室, 江苏南京 210093; 3. 西藏自治区藏医学院, 西藏拉萨 850000)

[摘要] 目的: 研究藏药忍冬果水提取物(FLM)对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及分泌细胞因子的影响。方法: 运用吞噬中性红试验观察 FLM 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响, 用小鼠腹腔巨噬细胞分泌物对小鼠胸腺细胞增殖及对 L929 细胞杀伤作用的影响分别测定 IL-1 及 TNF- $\alpha$  的活性, 用 RT-PCR 技术观察药物对小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 表达的影响。结果: FLM 在 1~100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  剂量内对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能有明显促进作用, 同时能诱导巨噬细胞分泌 IL-1 及 TNF- $\alpha$ , 并促进细胞因子 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。结论: FLM 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及分泌细胞因子都有促进作用。

[关键词] 忍冬果; 巨噬细胞; 吞噬作用; 细胞因子

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2006)02-0145-04

藏药忍冬果为小叶忍冬干燥的果实。《甘露本草明镜》记其:“味甘, 性温, 效糙, 轻。”《中华本草藏药卷》记其:“强心, 活血, 调经, 催乳。治心脏病, 月经不调, 乳汁不下。”<sup>[1]</sup> 现代藏医临床研究证明其还有杀菌、消炎等功效。作者的研究证明其能促进小鼠脾细胞的增殖(另文报道)。本实验研究忍冬果提取物对小鼠腹腔巨噬细胞(MF)吞噬功能及分泌 IL-1, TNF- $\alpha$  及对细胞因子 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及细胞株

ICR 小鼠, 雌性, 体重 18~22 g, 购自中国药科大学动物中心; C57BL/6 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司; 小鼠成纤维 L929 细胞株, 购自中国科学院上海细胞所。

### 1.2 药物

忍冬果(FLM)购自西藏自治区藏医学院藏药厂, 经西藏自治区藏医学院藏药教研室顿珠教授鉴定为 *Lonicera microphylla* Willd 的干燥果实; 水煮提取、浓缩、干燥得褐色提取物, 收率为 38%; 实验时

用 RPMI-1640 溶解稀释成所需浓度。

### 1.3 主要试剂

噻唑蓝(MTT, Sigma 公司); RPMI-1640 培养粉(Gibco 公司); 新生牛血清(NBS, 杭州四季青公司); 胰蛋白酶(Trypsin, Sigma 公司); 放线菌素 D(Dactinomycin, 上海新亚药业有限公司); TriPure Isolation Reagent (Roche), M-MLV, RNasin-Ribonuclease inhibitor (PROMEGA), Taq 酶和 dNTP (上海申能博彩生物科技有限公司); primer for TNF-alpha (175 bp): Sense 5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A, Antisense 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC; primer for IFN-gamma (406 bp): Sense 5'-CTT CTT CAG CAA CAG CAA GGC GAA AA; Antisense 5'-CCC CCA GAT ACA ACC CCG CAA TCA (上海捷倍思); 脂多糖(LPS, Sigma 公司)。

### 1.4 方法

1.4.1 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定(吞噬中性红实验)<sup>[2]</sup> 用 RPMI-1640 培养基洗出小鼠腹腔巨噬细胞, 贴壁纯化, 培养在 96 孔板中(加不同剂量药物), 每孔加入 0.072%, pH 7.4 中性红溶液, 温育 30 min, 洗掉细胞外中性红, 加 DMSO 震荡, 用酶标仪测定巨噬细胞吞噬的中性红, 以 A 值表示。

1.4.2 IL-1 生成的测定<sup>[2]</sup> 制取小鼠腹腔巨噬细胞, 调成  $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 种于 24 孔板中 1 mL/孔, 37

[收稿日期] 2005-05-08

[通讯作者] \*王聚乐, Tel: (0891) 6991746, E-mail: jule-wang@

163.com

℃, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 3 h, 弃去上清, RPMI-1640 培养基洗 3 遍, 除去非贴壁细胞, 加不同剂量药物及 LPS(20 μg·mL<sup>-1</sup>), 37 °C, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 4 h, RPMI-1640 培养基洗 3 遍, 加无血清 RPMI-1640 培养基 1 mL, 37 °C, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 24 h, 收集上清。取 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠 2 只, 无菌制备胸腺细胞悬液, 调成 1×10<sup>7</sup>·mL<sup>-1</sup>, 取 96 孔板, 每孔加胸腺细胞悬液 100 μL、上清 50 μL, Con A 50 μL (4 μg·mL<sup>-1</sup>, Con A 终含量 1 μg·mL<sup>-1</sup>), 培养 72 h, 终止培养前 4 h 加入 2 mg·mL<sup>-1</sup>的 MTT 40 μL/孔, 4 °C, 1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min, 吸去上清液, 加入 DMSO 200 μL/孔, 37 °C 放置 20 min, 振荡后在酶标仪上测 A<sub>540</sub> 的值。

**1.4.3 TNF-α 的诱导**<sup>[3]</sup> 制取小鼠腹腔巨噬细胞, 贴壁纯化 2 h, RPMI-1640 洗去未贴壁细胞, 加入不同浓度药物及 LPS, 37 °C, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 6 h, 收集上清-30 °C 保存, 供测 TNF-α 活性时使用。

**1.4.4 TNF-α 活性的测定**<sup>[3]</sup> 取对数生长期的 L929 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞悬液调成 1×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>, 取 96 孔板, 每孔加入 100 μL, 37 °C, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 24 h。吸弃上清, 每孔加入 100 μL 待测上清及 100 μL 放线菌素 D(终含量为 1 μg·mL<sup>-1</sup>) 37 °C, 50 mL·L<sup>-1</sup>CO<sub>2</sub>培养 24 h, 终止培养前 4 h 加入 2 mg·mL<sup>-1</sup>的 MTT 40 μL/孔, 4 °C, 1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min, 吸去上清液, 加入 DMSO 200 μL/孔, 振荡后在酶标仪上测 A<sub>540</sub> 的值。

### 1.4.5 总 RNA 的提取与 RT-PCR<sup>[4]</sup>

**1.4.5.1 total RNA 的制备** 按试剂盒说明书进行, 保存于-70 °C, 待用。

**1.4.5.2 RT-PCR** 在用 0.1% DEPC 水处理过的 PCR 管中加入 9.5 mL 的 nuclease-free water, 2 mL Oligo dT (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) 和 4 mL 总 RNA (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), 70 °C 处理 5 min, 立即放到冰上, 混旋后短暂离心, 再加入 5 mL M-MLV 5×buffer, 2.5 mL dNTP (10 mmol·L<sup>-1</sup>), 1 mL RNasin-Ribonuclease inhibitor, 1 mL M-MLV, 轻弹管壁混匀, 短暂离心, 42 °C 反应 60 min, 获得了 cDNA。取上述 cDNA 1 mL 加入 40.5 mL 重蒸馏水, 再加入 5 mL 10×Buffer(含 25 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>), 1 mL dNTP, 2 mL 引物(sense, antisense 各 1 mL) 和 0.5 mL (5 μ·mL<sup>-1</sup>) Taq DNA 聚合酶, 在 MJ Minicycler PCR 仪进行扩增。扩增条件是 94 °C, 0.5 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物在含 1 mg·mL<sup>-1</sup> EB 的 1% agarose 胶进行电泳, 用 UVP 成像系统拍照, 用软件 LABWORK(UVP)4.0 进行相对定量。

### 1.5 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用成组资料 *t* 检验进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 忍冬果提取物对腹腔 MF 吞噬功能的影响

忍冬果提取物与小鼠腹腔 MF 共育 30 min 各剂量均能显著增强腹腔 MF 的吞噬功能(表 1)。

表 1 忍冬果水提取物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能及分泌 IL-1 和 TNF-α 的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	含量 /μg·mL <sup>-1</sup>	A <sub>540</sub>			
		中性红	IL-1	TNF-α	FIM. LPS
正常组	—	0.135±0.035 6	0.216±0.034 6	1.216±0.084 4	1.216±0.084 4
脂多糖组	20	0.183±0.034 4 <sup>1)</sup>	0.498±0.191 <sup>2)</sup>	0.941±0.253 <sup>3)</sup>	1.166±0.082 7
忍冬果组	100	0.189±0.010 4 <sup>2)</sup>	0.443±0.224 <sup>1)</sup>	0.906±0.278 <sup>1)</sup>	1.145±0.116
	10	0.191±0.025 4 <sup>2)</sup>	0.482±0.194 <sup>3)</sup>	0.904±0.227 <sup>2)</sup>	1.321±0.249
	1	0.157±0.016 4	0.379±0.122 <sup>3)</sup>	1.011±0.096 2 <sup>2)</sup>	1.107±0.309

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> P<0.05, <sup>2)</sup> P<0.01

### 2.2 对腹腔 MF 分泌 IL-1 的影响

FIM 与 MF 培养 24 h 能明显促进 IL-1 的分泌, 实验剂量下各剂量间作用差异不明显。MF 无自发分泌 IL-1 的能力(表 1)。

### 2.3 对腹腔 MF 分泌 TNF-α 的影响

FIM 与 MF 培养 6 h 能明显促进 TNF-α 分泌(表 1), 实验剂量下各剂量间作用差异不明显, 10 μg·

mL<sup>-1</sup>诱导 TNF-α 分泌的作用最强。FIM 和 LPS 对 L929 细胞株增殖无直接影响(表 1)。

### 2.4 FLM 对小鼠腹腔 MF TNF-α mRNA 和 IFN-γ mRNA 表达的影响

在 FLM 的刺激下, 小鼠腹腔 MF TNF-α mRNA 和 IFN-γ mRNA 表达量明显高于正常组(图 1)。

## 3 讨论

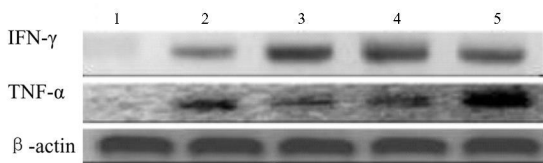


图 1 忍冬果水提物对小鼠腹腔巨噬细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 表达影响的 PCR 产物凝胶电泳  
1. 正常组; 2. 脂多糖组; 3. 忍冬果水提物组 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  
4. 忍冬果水提物组 ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 5. 忍冬果水提物组 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

忍冬作为一种中药在我国应用比较广泛,在内地主要是用忍冬花,也有用藤、叶、皮的,但用果实的比较少见。实验研究证明长白忍冬能明显提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率和吞噬指数并显著提高血清凝集素的水平<sup>[5]</sup>。任茜等<sup>[6]</sup>对 15 种忍冬属药用植物的抗菌作用进行了研究,证明其叶、花蕾、茎皮等都有不同程度的抑菌作用。李永梅等<sup>[7]</sup>也研究证明了金银花有抗腺病毒作用。近年来李丽萍等<sup>[8]</sup>研究证明忍冬藤在小鼠体内有抑瘤作用,对体外培养的瘤细胞株也有抑制其生长作用。藏药忍冬果为小叶忍冬干燥的果实,为近代藏医常用的抗菌消炎药之一,临床上也试用于肿瘤的治疗。作者前期的实验证明 FLM 能对抗地塞米松所致小鼠免疫功能低下(另文报道)。本次实验作者试图从其对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响方面来探讨其作用机制,实验证明 FLM 能激活巨噬细胞,使其吞噬功能增强,促使其释放细胞因子。FLM 对 L929 细胞无促进增殖作用,也无直接杀伤作用,但 FLM 与巨噬细胞培养的上清液有杀 L929 细胞作用。由此可见,FLM 的抑瘤作用不是直接的,而是通过免疫细胞的间接作用,其中巨噬细胞可能是 FLM 调节免疫抑

制肿瘤的靶细胞之一。在实验浓度下,FLM 能显著促进巨噬细胞分泌 IL-1。IL-1 对机体的免疫反应具有启动、放大效应和正向调节作用,能协同 IL-2、IFN $\gamma$  诱导 CTL 和 NK 细胞的杀伤活性,促进杀伤细胞 IL-2 的表达,刺激成纤维细胞分泌 IL-6,对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用<sup>[9]</sup>。巨噬细胞在静息状态下,仅有极少量的 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达,而在 FLM 刺激后, TNF- $\alpha$  mRNA 和 IFN- $\gamma$  mRNA 表达明显增多,提示 FLM 通过提高 TNF- $\alpha$  和 IFN $\gamma$  mRNA 的表达水平从而诱导巨噬细胞分泌更多的 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 。关于 FLM 体内体外抑瘤作用及增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 强巴赤烈, 占堆, 次仁巴珠. 中华本草藏药卷. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 202.  
[2] 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 710.  
[3] 张庆, 雷林生, 杨淑琴, 等. 大枣中性多糖对小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子及其 mRNA 表达的影响. 第一军医大学学报, 2001, 21(8):592.  
[4] Holan V, Vitova A, Pindjakova J, et al. Corneal stromal cells selectively inhibit production of anti-inflammatory cytokines by activated T cells. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136: 200.  
[5] 朱大胜, 赵蕊, 戴丽梅, 等. 长白忍冬药理实验研究. 中国医学理论与实践, 2003, (1): 111.  
[6] 任茜, 李强, 李万波, 等. 15 种忍冬属药用植物的抗菌作用研究. 国土与自然资源研究, 1991, (2): 68.  
[7] 李永梅, 李莉, 柏川, 等. 金银花的抗腺病毒作用研究. 华西药理学杂志, 2001, 16(5): 327.  
[8] 李丽萍, 王海江, 童竞亚, 牡丹皮、忍冬藤及泽兰抗肿瘤作用的实验研究. 中药新药与临床药理, 2000, 11(5): 274.  
[9] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2001. 137.

## Effects of traditional tibetan medicine, Fructus Lonicerae microphyllae on phagocytosis and cytokines production of murine macrophages

WANG Ju-le<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>2</sup>, ZHOU Hui-ying<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>2</sup>, DUN Zhu<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, Tibet University, Lasa 850000, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

3. Tibet Tibetan Medicine College, Lasa 850000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of traditional Tibetan medicine, Fructus Lonicerae microphyllae (FLM) on phagocytosis

and cytokines production of murine macrophages. **Method:** The phagocytosis of murine macrophages was analyzed by neutral red phagocytosis assay. The activities of IL-1 and TNF- $\alpha$  were measured by biological methods. The mRNA of TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  expressed by macrophages was detected by RT-PCR. **Result:** The phagocytosis of murine macrophages was significantly enhanced by FLM at a concentration from  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  to  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and the secretions of IL-1 and TNF- $\alpha$  from macrophages were markedly induced by FLM. Meanwhile, FLM also increased the expression of TNF- $\alpha$  mRNA and INF- $\gamma$  mRNA from macrophages *in vitro*. **Conclusion:** FLM could promote phagocytosis and cytokines production of murine macrophages.

[ Key words ] Fructus Lonicerae microphyllae; macrophage; phagocytosis; cytokine

[ 责任编辑 方文贤 ]

## 鬼臼毒素纳米脂质体抗肿瘤作用的研究

张晓云<sup>1</sup>, 倪京满<sup>1\*</sup>, 乔 华<sup>2</sup>

(1. 兰州大学药学院, 甘肃兰州 730000; 2. 兰州大学第一医院, 甘肃兰州 730000)

[ 摘要 ] 目的: 比较鬼臼毒素纳米脂质体和鬼臼毒素混悬液抗肿瘤作用。方法: 以每只 0.2 mL 肿瘤细胞悬液, 接种于小鼠右前肢腋部皮下, 24 h 后将小鼠随机分组, 各组分别给不同浓度的鬼臼毒素纳米脂质体、鬼臼毒素混悬液、环磷酰胺(CX)、生理盐水。环磷酰胺 1 次性腹腔注射, 其他组每 4 天腹腔注射 1 次, 共 3 次, 停药后第 12 天将小鼠拉颈处死, 剥取瘤块称重, 计算抑瘤率。结果: 鬼臼毒素纳米脂质体和鬼臼毒素混悬液在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量时对小鼠肝癌 H<sub>22</sub> 瘤体生长有抑制作用, 抑瘤率分别为 52.37% 和 38.25%。结论: 鬼臼毒素纳米脂质体和鬼臼毒素混悬液有抗肝癌作用, 且相同剂量下, 鬼臼毒素纳米脂质体比鬼臼毒素混悬液抑瘤效果显著。

[ 关键词 ] 鬼臼毒素; 纳米脂质体; 混悬液; 抗肿瘤作用

[ 中图分类号 ] R 285.5 [ 文献标识码 ] A [ 文章编号 ] 1001-5302(2006)02-0148-03

为了增强传统抗癌药物鬼臼毒素的靶向性, 降低其毒性, 提高疗效, 作者研制了鬼臼毒素纳米脂质体。本实验探讨了鬼臼毒素纳米脂质体与鬼臼毒素混悬液对肝癌瘤株的抑制作用, 结果显示, 鬼臼毒素纳米脂质体和鬼臼毒素混悬液对小鼠肝癌瘤株引发的肿瘤均有一定的抑制作用, 但同等剂量的鬼臼毒素纳米脂质体的抑瘤作用更为显著, 组间差异具有显著的统计学意义。

### 1 材料

鬼臼毒素纳米脂质体和鬼臼毒素混悬液: 自制; 环磷酰胺(CX): 市售, 由上海华联制药有限公司生产, 批号 20040606。瘤株: H<sub>22</sub> 肝癌瘤株, 由兰州大学药学院药理教研室传代和提供。昆明种雌性小鼠, 体重 18~22 g, 甘医动字 14-005, 由兰州大学实验动物中心提供。

### 2 方法和结果

2.1 鬼臼毒素脂质体和鬼臼毒素混悬液对小鼠肝癌的抑制作用 将健康的昆明种雌性小鼠 80 只, 体重 18~22 g, 无菌条件下, 右前肢腋部皮下接种  $5 \times 10^5$  个瘤细胞 ( $2.5 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ , 0.2 mL/只), 24 h 后随机分成 8 组, 每组 10 只。阴性对照组为同体积生理盐水。鬼臼毒素脂质体大、中、小 3 个不同剂量组: 大、中、小剂量分别为 5.00, 2.50, 1.25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。鬼臼毒素混悬液大、中、小 3 个不同剂量组 5.00, 2.50, 1.25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。阳性对照组(治疗组)为环磷酰胺(CX) 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 1 次性腹腔注射。前 7 组每 4 天腹腔注射 1 次, 共 3 次, 自由摄食饮水, 实验期为 12 d。第 12 天停止供食供水, 称体重, 拉颈处死, 解剖皮下肿瘤, 称重, 计算肿瘤抑制率(%)<sup>[1]</sup>。为了避免动物的个体差异、实验条件、操作等带来的误差,

[ 收稿日期 ] 2005-04-01

[ 通讯作者 ] \*倪京满, Tel: (0931) 8617780, E-mail: lynjm2004@sohu.com