

参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放活性物质的干预作用

阮从潇¹, 李玉洁², 杨庆², 陈颖², 翁小刚², 王岚², 王迎寒²,
周淑媛², 郭琰², 周冰冰², 朱晓新^{1,2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**探讨参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放活性物质的干预作用。**方法:**提取原代大鼠腹腔肥大细胞,纯化后以 5×10^6 个/mL浓度接种于培养板中,加参莲提取物预处理2 h后,用C48/80刺激肥大细胞脱颗粒,ELISA法检测细胞上清液以及细胞裂解液中组胺(histamine),类胰蛋白酶(trypsinase),以及5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的含量,计算活性物质释放率。**结果:**模型组较对照组组胺释放率由32.36%升至61.71% ($P < 0.01$),参莲提取物各剂量(100, 50, 25, 12.5 mg·L⁻¹)作用后,组胺释放率分别降至16.24%, 26.25%, 27.81%, 31.50% ($P < 0.01$);模型组较对照组类胰蛋白酶释放率由13.19%升至21.72% ($P < 0.01$),参莲提取物各剂量(100, 50, 25, 12.5 mg·L⁻¹)作用后,类胰蛋白酶释放率分别降至8.60%, 15.78%, 8.80%, 12.15% (100, 25, 12.5 mg·L⁻¹组 $P < 0.01$, 50 mg·L⁻¹组 $P < 0.05$);模型组较对照组5-HT释放率没有明显变化,但参莲提取物100, 50, 25 mg·L⁻¹组显著增加5-HT释放率($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞有一定的稳定作用。

[关键词] 参莲提取物; 动脉粥样硬化; 肥大细胞; 组胺; 5-羟色胺; 类胰蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0196-04

Effects of Shenlian Extracts on Rat Peritoneal Mast Cells Activation

RUAN Cong-xiao¹, LI Yu-jie², YANG Qing², CHEN Ying², WENG Xiao-gang², WANG Lan²,
WANG Ying-han², ZHOU Shu-yuan², GUO Yan², ZHOU Bing-bing², ZHU Xiao-xin^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China,
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese
Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Shenlian (SL) extracts on mast cells activation. **Method:** Rat peritoneal mast cells (RPMC) were collected and seeded on 96-well plates. Compound 48/80 was added into the cultural supernatants after the cells were pretreated with SL extracts for 2 h. Then we collected the supernatants and detected Histamine, 5-hydroxytryptamine and trypsinase content with ELISA kits. **Result:** The results show Compound 48/80 increased histamine release from 32.36% to 61.71% ($P < 0.01$). SL extracts (100, 50, 25, 12.5 mg·L⁻¹) reduced RPMC histamine release to 16.24%, 26.25%, 27.81%, 31.50% ($P < 0.01$). Compound 48/80 increased trypsinase release from 13.19% to 21.72% ($P < 0.01$), SL extracts (100, 50, 25, 12.5 mg·L⁻¹) reduced RPMC trypsinase release to 8.60%, 15.78%, 8.80%, 12.15% (100, 25, 12.5 mg·L⁻¹, $P < 0.01$, 50 mg·L⁻¹, $P < 0.05$). Compound 48/80 had no obvious effect on RPMC 5-HT release. But 100, 50, 25 mg·L⁻¹ of SL extracts can increase 5-HT release (100, 50 mg·L⁻¹, $P < 0.01$; 25 mg·L⁻¹, $P < 0.05$). **Conclusion:** We concluded SL extracts can stabilize mast cells.

[Key words] SL extracts; atherosclerosis; mast cell; histamine; 5-hydroxytryptamine; trypsinase

[收稿日期] 20121107(005)

[基金项目] 科技部重大新药创制综合性中药新药研究开发技术大平台项目(2009 ZX09301-005-2-4);国家自然科学基金面上项目(30973901);中国中医科学院自主选题项目(ZZ20090207, ZZ2007046)

[第一作者] 阮从潇,在读硕士研究生,从事心血管方向的中药药理学研究, Tel:010-64015008, E-mail: ruancong Xiao@163.com

[通讯作者] *朱晓新,博士,研究员,从事中药药理学及药代动力学研究, Tel:010-64015008, E-mail: zhuxx59@yahoo.com.cn

越来越多的研究显示,肥大细胞与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的形成以及斑块稳定性有着密切关系。心肌梗死患者易损和破裂斑块血管外膜处有明显增多的活肥大细胞,而且数量与斑块破裂和侵蚀的发生率相关^[1]。其释放的组胺,类胰蛋白酶等活性物质可以促进 As 的发生发展。参莲提取物(SL extracts)主要含丹参酮类、丹酚酸类及穿心莲内酯类等成分,是根据中医临床经验,融合组分配伍的理念和方法,以活血化瘀、清热解毒为法组方用以预防、治疗 As 等心脑血管相关疾病的中药复方提取物。本课题组前期研究表明,参莲提取物可以明显减轻 As 进程,减小斑块面积,对血管内皮细胞等有明显的保护作用^[2-5]。本实验采用原代培养大鼠腹腔肥大细胞,进一步探讨 SL 提取物对肥大细胞的稳定作用。

1 材料

1.1 药物与试剂 SL 提取物由中国中医科学院中药研究所化学室提供(提取率丹参水溶性部分 4.13%,脂溶性部分 2.5%,穿心莲脂溶性部分 2.82%);阳性药阿托伐他丁(atorvastatin, Toronto Research Chemicals 公司,批号 TRC-0509069);阳性药色甘酸钠(cromoglicate sodium,江苏克胜药业有限公司,批号 110711),RPMI 1640(美国 HyClone 公司,批号 NWK0492),Percoll 分离液(北京 biodee 公司,批号 17089101),组胺(histamine)ELISA 试剂盒,类胰蛋白酶(tryptase)ELISA 试剂盒,5-羟色胺(5-HT)ELISA 试剂盒(美国 USCN LIFE SCIENCE & TECHNOLOGY 公司,批号 F290336)。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,由中国食品药品检定研究所提供,动物许可证号 SCXK-(京)-2009-0017。

1.3 仪器 SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);MCO-20AC 细胞培养箱(日本 SANYO 公司);Spectramax190 连续波长酶标仪(美国 MDC 公司)。

2 方法

2.1 大鼠腹腔肥大细胞的提取及培养 正常 SD 大鼠断颈处死后,将大鼠身体(除头部外)80%乙醇浸泡,将动物四肢固定于操作台上,ip 无钙台氏液 20 mL(0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.005 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.11 g D-Glucose 100 mL),轻按揉腹部 4 min,打开腹腔,吸取腹腔冲洗液,1 500 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清,取细胞悬液缓慢加入 30%:80%的 Percoll 梯度分离液中,2 500 r·min⁻¹离心 15 min,收

集 30% 和 80% 交界处细胞,PBS 液洗 2 次(4 ℃, 1 500 r·min⁻¹离心 10 min),置于 RPMI 1640 培养液中镜下计数,调细胞密度至 5 × 10⁶ ~ 6 × 10⁶/mL。台盼蓝染色活力大于 95%,甲苯胺蓝染色纯度大于 90%。

2.2 分组 对照组,模型组,SL 提取物各剂量组(100, 50, 25, 12.5 mg·L⁻¹)及阳性药 1(阿托伐他丁 0.2 mg·L⁻¹),阳性药 2(色甘酸钠 200 mg·L⁻¹)组。药物均以无血清 RPMI 1640 培养基配制,每组设 4 个复孔。

2.3 药物干预及刺激剂刺激肥大细胞脱颗粒 细胞以 5 × 10⁶/mL 密度接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,加药预处理 2 h 后(加药量 10 μL/孔,药物终质量浓度见 2.2),加入刺激剂 compound 48/80 (C48/80) 10 μL(终质量浓度 20 mg·L⁻¹),37 ℃ 孵育 2 h,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,加入 PBS 清洗细胞 1 次,离心后加入 PBS 120 μL 置于 -80 ℃ 冰箱中反复冻融 3 次,离心后取上清(细胞裂解液)。

2.4 检测指标 测上清液及细胞裂解液中组胺、类胰蛋白酶、5-HT 含量,计算释放率

$$\text{释放率} = \frac{\text{上清液含量}}{\text{上清液含量} + \text{细胞裂解液含量}} \times 100\%$$

2.5 数据处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对组胺释放的影响 C48/80 刺激后可显著升高大鼠腹腔肥大细胞内组胺的释放率($P < 0.01$),SL 提取物不同剂量均可显著降低组胺释放率的异常升高($P < 0.01$),且作用呈剂量依赖性,阳性药色甘酸钠及阿托伐他丁对组胺释放率也有显著的降低作用($P < 0.01$)。提取物及阳性药对细胞内组胺总量没有明显影响。见表 1。

3.2 对类胰蛋白酶释放的影响 C48/80 刺激后可显著升高大鼠腹腔肥大细胞内类胰蛋白酶的释放率($P < 0.01$),SL 提取物不同剂量均可显著降低组胺释放率的异常升高(SL 100, 25, 12.5 mg·L⁻¹组 $P < 0.01$, SL 50 mg·L⁻¹组 $P < 0.05$),色甘酸钠对类胰蛋白酶释放率没有明显影响,阿托伐他丁显著降低了类胰蛋白酶释放率($P < 0.01$)。提取物对细胞内类胰蛋白酶总量略有减小的趋势。见表 2。

3.3 对 5-HT 释放的影响 C48/80 刺激后大鼠腹腔肥大细胞内 5-HT 的释放没有明显变化,但 SL

表 1 参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放组胺的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	给药剂量 / mg·L ⁻¹	释放率 / %	释放量 / ng·L ⁻¹	总含量 / ng·L ⁻¹
对照	-	32.36 ± 2.53	1.65 ± 0.07	5.17 ± 1.30
模型	-	61.71 ± 16.05 ²⁾	2.86 ± 0.39 ²⁾	4.69 ± 0.67
参莲提取物	100	16.24 ± 3.90 ⁴⁾	0.78 ± 0.16 ⁴⁾	4.87 ± 1.53
	50	26.25 ± 8.08 ⁴⁾	1.32 ± 0.24 ⁴⁾	5.27 ± 1.25
	25	27.81 ± 3.08 ⁴⁾	1.27 ± 0.15 ⁴⁾	4.69 ± 0.69
	12.5	36.50 ± 2.28 ⁴⁾	1.59 ± 0.12 ⁴⁾	4.14 ± 0.21
色甘酸钠	200	34.94 ± 7.57 ⁴⁾	2.04 ± 0.14 ⁴⁾	5.04 ± 0.47
阿托伐他丁	0.2	40.49 ± 3.67 ⁴⁾	2.02 ± 0.28 ⁴⁾	5.09 ± 0.53

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01 (表 2-3 同)。

表 2 参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放类胰蛋白酶的影晌 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	给药剂量 / mg·L ⁻¹	释放率 / %	释放量 / mg·L ⁻¹	总含量 / mg·L ⁻¹
对照	-	13.19 ± 1.46	0.23 ± 0.03	1.74 ± 0.13
模型	-	21.72 ± 2.54 ²⁾	0.33 ± 0.03 ¹⁾	1.55 ± 0.43
参莲提取物	100	8.60 ± 0.19 ⁴⁾	0.10 ± 0.03 ⁴⁾	1.28 ± 0.25
	50	15.78 ± 2.72 ³⁾	0.20 ± 0.06 ⁴⁾	1.29 ± 0.24
	25	8.80 ± 2.98 ⁴⁾	0.11 ± 0.03 ⁴⁾	1.24 ± 0.16
	12.5	12.15 ± 1.75 ⁴⁾	0.14 ± 0.06 ⁴⁾	1.18 ± 0.19 ³⁾
色甘酸钠	200	19.58 ± 2.85	0.30 ± 0.05	1.44 ± 0.19
阿托伐他丁	0.2	11.08 ± 2.62 ⁴⁾	0.16 ± 0.03 ⁴⁾	1.51 ± 0.13

100, 50, 25 mg·L⁻¹ 组显著升高了 5-HT 的释放率 (SL 100, 50 mg·L⁻¹ 组 P < 0.01, SL 25 mg·L⁻¹ 组 P < 0.05) 且作用呈剂量依赖性。另外 SL 提取物 100, 50 mg·L⁻¹ 组明显升高了细胞内 5-HT 的释放量和总量。见表 3。

表 3 参莲提取物对大鼠腹腔肥大细胞释放 5-羟色胺的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	给药剂量 / mg·L ⁻¹	释放率 / %	释放量 / mg·L ⁻¹	总含量 / mg·L ⁻¹
对照	-	29.10 ± 1.35	0.79 ± 0.08	2.71 ± 0.20
模型	-	32.84 ± 2.01	1.03 ± 0.11	3.12 ± 0.20
参莲提取物	100	58.79 ± 2.19 ⁴⁾	2.83 ± 0.45 ⁴⁾	4.86 ± 0.62 ⁴⁾
	50	45.92 ± 6.85 ⁴⁾	1.76 ± 0.44 ⁴⁾	3.79 ± 0.48 ³⁾
	25	41.97 ± 4.14 ³⁾	1.51 ± 0.16	3.59 ± 0.12
	12.5	36.38 ± 2.08	1.16 ± 0.12	3.20 ± 0.18
色甘酸钠	200	33.14 ± 4.74	1.05 ± 0.16	3.17 ± 0.07
阿托伐他丁	0.2	32.95 ± 2.70	1.02 ± 0.12	3.08 ± 0.12

4 讨论

肥大细胞内含有大量的嗜碱性颗粒,内含有肝素,组胺,5-HT,中性蛋白酶(胃促胰酶,类胰蛋白酶等),炎症因子(IL-1, TNF-α)等,在受到外界刺激后,通过脱颗粒将这些炎症因子释放到周围组织及

循环血液中,引起多种病理生理反应,如组胺通过调节 NF-κB,清道夫受体,基质金属蛋白酶等炎症调节物的基因表达从而影响 apoE^{-/-} 小鼠 As 进程^[6]。类胰蛋白酶通过降解细胞周和细胞外基质中的胶原,斑块纤维帽中的主要蛋白成分,调节内皮和平滑肌细胞的增殖和凋亡,导致斑块不稳定^[7],通过降解高密度脂蛋白(HDL),阻止胆固醇从动脉壁向外转运^[8],另一方面促进单核巨噬细胞摄取脂质,促进泡沫细胞形成^[9]。5-HT 能刺激血管新生^[10],引起平滑肌增生血管收缩^[11],增加巨噬细胞对 OX-LDL 的摄取,诱导泡沫细胞形成,诱导 As 斑块形成等。另外,肥大细胞非脱颗粒性质的持续释放炎症介质也在慢性炎症中起重要作用。持续释放的炎症介质可能与 As 脂纹形成以及不稳定斑块的破裂有关^[12]。

C48/80 是 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物,其具有强大的促进肥大细胞脱颗粒作用。研究显示,C48/80 复合物分子中含有大量的阳性电荷,其不通过受体、直接作用于肥大细胞细胞膜上的 G 蛋白,通过一系列复杂的细胞内信号过程引起肥大细胞的活化、释放活性物质,引起生理及病理反应。本实验的结果显示,在加入 C48/80 后,肥大细胞的组胺和类胰蛋白酶释放量和释放率都有明显升高,而加入 SL 提取物或者色甘酸钠、阿托伐他丁预处理后,明显的逆转了 C48/80 的刺激作用,且 SL 提取物对组胺的释放率呈现明显的剂量依赖性,提示我们 SL 提取物可能对肥大细胞的细胞膜有稳定作用,可以减少肥大细胞被激活后的脱颗粒作用。另外实验结果显示 C48/80 对 5-HT 的释放没有明显作用,但 SL 提取物大剂量明显增加了 5-HT 的释放量和释放率,且作用主要是影响了细胞内 5-HT 的总量,提示我们 SL 提取物可能促进了细胞内 5-HT 的合成,但机制不明确,还需要实验的进一步证明。

前期研究结果已经证实,SL 提取物能够明显抵抗慢性炎症,对 As 的发生发展有明显的抑制作用。这一结果提示,SL 提取物有可能通过稳定肥大细胞来减缓 As 发生发展,增加 As 斑块的稳定性。

[参考文献]

[1] Kaartinen M, van der Wal A C, van der Loos C M, et al. Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32(3):606.

萎胃康及其拆方对慢性萎缩性胃炎 大鼠胃黏膜 G, D 细胞的影响

林海燕¹, 赵岩^{1*}, 于佳宁²

(1. 滨州医学院, 山东烟台 264003; 2. 滨州医学院烟台附属医院, 山东烟台 264100)

[摘要] 目的:探讨萎胃康及其拆方治疗慢性萎缩性胃炎(CAG)的可能机制。方法:70只Wistar大鼠随机抽取12只为正常对照组(正常组),其余58只采用多重刺激6周复制大鼠CAG模型。确定造模成功的50只随机分为5组,即模型组、萎胃康全方组(全方组)、拆方I号组(补益组)、拆方II号组(祛邪组)、西药维霉素对照组(西药组),分别ig 0.9%生理盐水(10 mL·kg⁻¹)、萎胃康水煎液(8 g·kg⁻¹)、拆方I号水煎液(5.5 g·kg⁻¹)、拆方II号水煎液(2.5 g·kg⁻¹)和维霉素混悬液(0.3 g·kg⁻¹),1次/d。给药30 d后,观察对大鼠胃黏膜组织形态及胃黏膜促胃液素细胞(G细胞)、人生长抑素细胞(D细胞)的影响。结果:全方组大鼠胃黏膜组织学接近正常组。模型组G, D细胞数分别为(24.46±3.39), (14.66±1.57)个/mm²,较正常组G, D细胞数(63.54±6.73), (38.32±3.87)个/mm²明显降低(P<0.01)。与模型组比较,各用药组大鼠胃黏膜G, D细胞数显著升高(P<0.01);与全方组G细胞数(56.66±5.70)个/mm², D细胞数(34.72±4.01)个/mm²比较,补益组、祛邪组、西药组大鼠胃黏膜G, D细胞数显著降低(P<0.01或P<0.05)。结论:萎胃康能改善和逆转实验性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜萎缩,其机制可能与改善胃肠激素对胃功能的调节作用有关。

[关键词] 萎胃康; 拆方; 萎缩性胃炎; G细胞; D细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0199-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0929.006.html>

[网络出版时间] 2013-01-24 9:29

[收稿日期] 20120727(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072782);山东省科技发展计划项目(2011YD19012);滨州市科技发展计划项目(2011ZC0911)

[通讯作者] *赵岩,教授, E-mail: lanzhouzy@163.com

- [2] 李玉洁, 杨庆, 翁小刚, 等. 参莲提取物对脐静脉内皮细胞功能的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010(12): 2202.
- [3] 李玉洁, 朱晓新, 杨庆, 等. 参莲提取物对动脉粥样硬化家兔血管病理形态和脂质代谢的影响[J]. 中草药, 2011(4): 760.
- [4] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 272.
- [5] 游云, 龚曼, 李玉洁, 等. 剪应力联合参莲提取物对血管内皮细胞炎症蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 261.
- [6] Wang K Y, Tanimoto A, Guo X, et al. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein E knockout mice independently of serum cholesterol level[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(4): 800.
- [7] Czyzewska-Buczyńska A, Witkiewicz W. Role of mast cells in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Przegl Lek, 2011, 68(3): 171.
- [8] Kovanen P T. Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis[J]. Immunol Rev, 2007, 217: 105.
- [9] Yeong P, Ning Y, Xu Y, et al. Tryptase promotes human monocyte-derived macrophage foam cell formation by suppressing LXRA α activation[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(5): 567.
- [10] Iwabayashi M, Taniyama Y, Sanada F, et al. Role of serotonin in angiogenesis: induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT1B/Akt/eNOS pathway in diabetic mice [J]. Atherosclerosis, 2012, 220(2): 337.
- [11] Nishihira K, Yamashita A, Tanaka N, et al. Serotonin induces vasoconstriction of smooth muscle cell-rich neointima through 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor in rabbit femoral arteries[J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(7): 1207.
- [13] Kovanen P T. Mast cells in atherogenesis: actions and reactions [J]. Curr Atheroscler Rep, 2009, 11(3): 214.

[责任编辑 聂淑琴]