

黄芩主要成分对 PDB + Ion 诱导的 Jurkat T 细胞 CD69 表达的影响

吴珺¹, 刘欣², 邱泽计¹, 郝钰^{1*}, 李萍^{2*}

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029;

2. 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所, 北京 100010)

[摘要] 目的: 探讨治疗银屑病的临床有效外用黄芩的主要成分黄芩苷(baicalin)、黄芩素(baicalein)和汉黄芩素(wogonic)对 T 细胞早期活化标志 CD69 表达的影响。方法: 以体外培养的 Jurkat T 细胞为模型, 以二丁基佛波醇酯(phorbol 12, 13-dibutyrate, PDB)和离子霉素(Ionomycin, Ion)为刺激剂, 采用单荧光染色流式细胞技术, 检测 Jurkat T 细胞经 PDB + Ion 刺激 4 h 后早期活化表面分子 CD69 的表达, 以观察黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞体外活化的影响。结果: 在体外培养条件下, 黄芩苷(200, 100, 50 mg·L⁻¹)、黄芩素(54, 27, 13.5 mg·L⁻¹)和汉黄芩素(8, 4 mg·L⁻¹)均能抑制 PDB + Ion 刺激时 Jurkat T 细胞 CD69 的表达, 且有剂量依赖性。结论: 黄芩主要成分黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素可明显抑制 Jurkat T 细胞的体外活化, 这可能是黄芩用于治疗银屑病的作用机制之一。

[关键词] 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; T 细胞活化; 银屑病

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0188-04

近年来关于银屑病发病机制的研究取得了较大进展, 现多认为银屑病是一种多基因遗传背景下的免疫异常疾病, 其中异常活化的 T 淋巴细胞及其产生的细胞因子起主要作用^[1], 有关银屑病中 T 细胞活化的机制及其调控已成为当前银屑病研究的热点。芩柏软膏由黄芩、黄柏组成, 是赵炳南老中医自行研制的治疗银屑病的有效外用^[2], 现为北京中医医院的院内制剂, 临床配合凉血活血汤内服治疗进行期银屑病血热证卓有良效^[3]。本实验以 Jurkat T 细胞为模型, 研究芩柏软膏中黄芩的主要成分黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 T 细胞活化的早期标志 CD69 表达的影响, 为阐明黄芩用于治疗银屑病的机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器 黄芩苷(批号 110715-200514)、黄芩素(批号 111595-200604)、汉黄芩素(批号 111514-200403), 中国药品生物制品检定所; 人 Jurkat T 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所协和细胞资源中心; 环孢菌素 A(Ciclosporin A, CsA), 华北制药有限公司; RPMI-1640 培养基、二丁基佛波醇酯(phorbol 12, 13-dibutyrate, PDB, 编号 P1269)、离子霉素(Ionomycin, Ion, 编号 10634)和 3-(4, 5-二甲基 唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、十二烷基硫酸钠(dodecyl sulfate, sodium salt, SDS), 美国 Sigma 公司; Anti-CD69-PE, 美国 BD PharM-ingen 公司; 胎牛血清(FBS), Hyclone 公司。EPICS XL 4Colour 流式细胞仪, 美国 BECKMAN COULTER 公司。

1.2 MTT 法检测黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞活性的影响 将 Jurkat T 细胞用 RPMI-1640 完全培养基重悬, 计数并调整细胞密度为 1×10^6 个/L, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 设空白组(只加 RPMI-1640 完全培养基, 不加细胞和药物)、细胞对照组(Jurkat T 细胞)、试验组(Jurkat T 细胞中分别加入不同质量浓度的黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素及 CsA、药物本底组(不加细胞, 只加入不同质

[收稿日期] 2010-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772813); 北京科技计划重大课题(D08050703550901)

[第一作者] 吴珺, 实验师, 研究方向: 中药免疫调节的机制研究, Tel: 010-64286972, E-mail: wujunccg1973@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 郝钰, 教授, 研究方向: 中药免疫调节的机制研究, Tel: 010-64286973, E-mail: yuhao64@sina.com
* 李萍, 研究员, 研究方向: 炎症、组织损伤与修复的研究, Tel: 010-52176679, E-mail: liping411@yahoo.com.cn

量浓度的药物), 每药物每浓度做 3 个复孔。培养 20 h 后, 每孔吸去 100 μL 上清液, 加入 10 μL MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中避光孵育 4 h 之后每孔加入 100 μL 0.01N HCl-10% SDS 溶解孔底结晶。于酶联免疫标记分析仪以 570 nm 波长检测各孔的吸光度 (A), $A = A_{\text{试验组}} - A_{\text{药物本底组}}$, 并计算各组的相对抑制率。

细胞相对抑制率 = $[1 - (A_{\text{试验}} - A_{\text{药物本底}}) / (A_{\text{细胞对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.3 PDB + Ion 诱导的 Jurkat T 细胞早期活化分子 CD69 的检测 将 Jurkat T 细胞用 RPMI-1640 完全培养基重悬, 调整细胞密度为 1×10^9 个/L, 接种于 12 孔板, 每孔 1 000 μL , 分别设空白对照组、PDB + Ion 刺激组、不同浓度中药单体干预的 PDB + Ion 刺激组及 CsA 干预下的 PDB + Ion 刺激组, 每组 3 复孔。加入不同浓度的中药单体以及 PDB ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ion ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育 4 h 后, 收集每孔细胞, 分别以 1 mL PBS 洗涤 2 次 (4°C , $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 重悬于 300 μL PBS 中, 加入 anti-CD69-PE (终浓度 $1 \mu\text{g}/10^6$ 细胞), 混匀后在室温下放置 30 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 每样本重悬于 500 μL PBS 中, 立即上流式细胞仪检测 CD69 阳性表达细胞率及荧光强度。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 15.0 统计软件, 试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞活性的影响 由表 1 可知, 黄芩苷 50 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性的抑制率为 6.84% ~ 23.54%; 黄芩素 13.5 ~ 54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性的抑制率为 0.43% ~ 4.9%; 汉黄芩素 2 ~ 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性的抑制率为 7.72% ~ 48.8%; CsA 浓度为 1 ~ 8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞活性的抑制率为 11.89% ~ 4.91%。说明黄芩 3 个单体对 Jurkat T 细胞的活性均有一定的抑制作用, 但在本试验的浓度范围内, 除汉黄芩素 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外, 抑制作用均不强, 且在显微镜下观察细胞均无死亡现象。因此选用各中药成分的较低的 3 个浓度检测对 Jurkat T 细胞 CD69 表达的影响。

2.2 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对活化 Jurkat T 细胞 CD69 分子表达的影响 表 2 显示, 空白对照组 (未经 PDB + Ion 刺激) 的细胞仍处于静息状态,

表 1 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 /%
空白	-	0.031 3 ± 0.003	-
对照	-	1.279 7 ± 0.025	-
黄芩苷	200	0.978 4 $\pm 0.054^{3)}$	23.54
	150	1.006 0 $\pm 0.048^{3)}$	21.38
	100	1.080 1 $\pm 0.059^{3)}$	15.60
黄芩素	50	1.192 1 $\pm 0.044^{2)}$	6.84
	54	1.217 0 $\pm 0.026^{2)}$	4.90
	40.5	1.222 3 ± 0.060	4.48
	27	1.255 6 ± 0.025	1.88
汉黄芩素	13.5	1.274 1 ± 0.024	0.43
	16	0.655 2 $\pm 0.054^{3)}$	48.80
	8	0.866 3 $\pm 0.022^{3)}$	32.30
	4	1.119 9 $\pm 0.012^{3)}$	12.48
CsA	2	1.180 9 $\pm 0.007 8^{3)}$	7.72
	8	1.226 0 $\pm 0.013 5^{1)}$	4.19
	4	1.178 4 $\pm 0.037 3^{2)}$	7.91
	2	1.151 7 $\pm 0.008 9^{3)}$	10.00
	1	1.127 6 $\pm 0.017 1^{3)}$	11.89

注: 与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

表 2 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞 CD69 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CD69 ⁺ Jurkat T/%	CD69 ⁺ 荧光强度
空白	-	0.47 $\pm 0.03^{3)}$	1.05 $\pm 0.10^{3)}$
PDB + Ion	-	84.95 ± 3.47	18.23 ± 1.05
PDB + Ion + 黄芩苷	200	38.06 $\pm 1.09^{3)}$	7.09 $\pm 0.26^{3)}$
	100	40.34 $\pm 1.09^{3)}$	7.48 $\pm 0.39^{3)}$
	50	71.21 $\pm 2.21^{2)}$	12.50 $\pm 0.70^{2)}$
PDB + Ion + 黄芩素	54	10.38 $\pm 0.52^{3)}$	3.49 $\pm 0.16^{3)}$
	27	39.45 $\pm 0.90^{3)}$	7.50 $\pm 0.38^{3)}$
	13.5	61.95 $\pm 1.54^{3)}$	10.40 $\pm 0.63^{3)}$
PDB + Ion + 汉黄芩素	8	28.28 $\pm 0.76^{3)}$	6.39 $\pm 0.30^{3)}$
	4	67.65 $\pm 1.93^{2)}$	11.73 $\pm 0.32^{3)}$
	2	80.39 ± 1.08	17.60 ± 0.73
PDB + Ion + CsA	1	1.94 $\pm 0.06^{3)}$	2.08 $\pm 0.14^{3)}$

注: 与 PDB + Ion 比较 ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

CD69 的表达率为 0.47%, 荧光强度 1.05; 经 PDB + Ion 刺激 4 h 后, CD69 表达率为 84.95%, 荧光强度

为 18.23, 阳性对照 CsA 使 CD69 表达率降为 1.94%。试验所用各浓度的黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素(除 2 mg·L⁻¹外)均能显著抑制 PDB + Ion 刺激的细胞 CD69 的表达($P < 0.001$), 并具有剂量依赖关系。

3 讨论

多年来表皮细胞的过度增生一直被认为是银屑病的病变所在。近年来随着对银屑病免疫学机制的深入了解, 人们已逐渐认识到 T 细胞的活化在银屑病的发病中具有重要作用, T 淋巴细胞的异常浸润与活化所释放的大量细胞因子作用于角质形成细胞和血管内皮细胞产生红斑鳞屑症状^[4]。针对 T 细胞活化的一些特异性 T 细胞免疫抑制剂对银屑病有较好疗效, 如抗 CD3 和抗 CD4 单克隆抗体、CsA 和他克莫司等, 在银屑病治疗中均有一定效果。

中医认为, 血热是银屑病的主要根源^[5], “热壅毒盛, 毒热入血, 伤及血络”从而病发^[6]。清热凉血解毒为主要治则。芩柏软膏由黄芩、黄柏组成, 具有清热除湿、消肿止痛、养血活血、凉血解毒之功效。作者认为“热壅毒盛”的病理基础为 T 细胞的过度活化, 芩柏软膏中具有清热燥湿、泻火解毒作用的主要组分黄芩可能具有抑制 T 细胞活化的作用。

Jurkat T 为人 T 细胞淋巴瘤细胞, 在功能上与人类 T 淋巴细胞有很多共同的特点, 已广泛用于实验研究。本研究观察黄芩的主要成分黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 Jurkat T 细胞体外活化后早期表达的 CD69 的影响, 初步探讨它们对 T 细胞活化的作用。本研究采用 PDB + Ion 刺激 T 细胞活化, PDB 是一类 PKC 的激活剂, 是非生理性的二酯酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 的类同物, 模拟 DAG 直接作用于活化信号通路上的蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC); Ion 是钙离子载体, 使细胞外 Ca²⁺ 内流、胞内钙库释放, 导致胞内 Ca²⁺ 浓度升高。PDB 和 Ion 两者协同作用可诱发基因活化和增殖反应, 因此, 选择 PDB +

Ion 可较好地模拟 T 淋巴细胞活化的状态。

CD69 是目前已知的 T 细胞活化后表达最早的一个表面分子, 在多克隆刺激剂作用下迅速表达, 发生从 2% ~98% 的大幅度变化^[7]。它可作为协同刺激分子与 PDB 交联, 使 T 细胞活化, 导致钙离子的流动、细胞因子及其受体的合成与表达、c-myc 与 c-fos 原癌基因的表达和细胞的增殖。因此检测 CD69 的表达情况即可推知 T 细胞的活化程度。

本研究结果表明, 黄芩的主要成分黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素对 PDB + Ion 刺激的 Jurkat T 细胞早期活化抗原 CD69 的表达有明显抑制效应, 且浓度越大其抑制效应越强, 为该几种黄芩单体化合物抑制 T 细胞活化的作用提供了直接证据。由此推论, 这可能是芩柏软膏治疗银屑病的机制之一。

[参考文献]

- [1] Ksatelan M, Massari L P, Pasic A, et al. New trends in the immunopathogenesis of psoriasis [J]. Acta Dermatovenrol Croat, 2004, 12(1): 26.
- [2] 赵炳南, 张志礼. 简明中医皮肤病学 [M]. 北京: 中国展望出版社, 1983: 200.
- [3] 徐佳, 张苍, 瞿幸, 等. 芩柏软膏治疗进行期银屑病血热证的临床观察和实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(7): 614.
- [4] 郑利星. 银屑病发病机制研究进展 [J]. 临床误诊误治, 2006, 19(5): 61.
- [5] 时水治. 从血论治寻常型银屑病的经验 [J]. 北京中医, 2005, 24(4): 251.
- [6] 王萍, 张芑, 邓丙戌, 等. 张志礼中医辨证治疗银屑病方法及临床研究(一) [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2004, 3(4): 191.
- [7] Testi R, Ambrosio D D, Maria R D, et al. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells [J]. Immunol Today, 1994, 15(10): 479.

[责任编辑 何伟]

· 临床 ·

中西医结合治疗糖尿病患者泌尿系感染 46 例

谢东霞^{*}, 李忠

(南阳理工学院张仲景国医学院临床教研室, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 观察糖尿病患者泌尿系感染的细菌学特点、药敏情况、临床特点及中西医结合治疗糖尿病患者泌尿系感染的临床疗效。方法: 88 例糖尿病合并泌尿系感染的患者随机分为两组, 均采用常规抗菌治疗, 治疗组(46 例) 加服中药煎剂, 观察糖尿病患者泌尿系感染的细菌学特点、药敏情况、临床特点及治疗前后临床症状和实验室检查指标的变化。结果: 细菌培养结果显示近年引起感染的菌群仍以革兰氏阴性杆菌为主, 但革兰氏阳性菌比例较以往报道有所升高; 革兰氏阴性菌对亚胺培南、头孢哌酮 + 耐 内酰胺酶类抗生素敏感性高; 革兰氏阳性菌对万古霉素、哌拉西林或阿莫西林 + 耐 内酰胺酶类抗生素敏感性高; 而以往尿路感染常用的 诺酮类抗生素耐药性相对偏高。感染者往往血糖高、尿糖高、年龄大。治疗组综合疗效总有效率为 95.65%, 对照组综合疗效总有效率为 88.09%。组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 糖尿病患者泌尿系感染的细菌学特点以革兰氏阴性杆菌为主, 但常用西药耐药性增加; 中西医结合对糖尿病患者泌尿系感染具有良好防治作用。

[关键词] 中西医; 糖尿病; 泌尿系感染

[中图分类号] R587.2, R285.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0191-03

Clinical Observation of 46 Diabetics with Urinary Tract Infection by Treatment of Combining Traditional Chinese and Western Medicine

XIE Dong-xia^{*}, LI Zhong

(ZHANG Zhong-jing Chinese Medicine College Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

[Abstract] Objective: To observe bacteriological characteristics, antimicrobial susceptibility, clinical characteristics of the diabetic's urinary tract infection and clinical curative effect cured by the treatment of combining traditional Chinese and western medicine. **Method:** 88 diabetics with urinary tract infection were randomly divided into two groups and conventional antibiotic therapy was used in both groups. The treatment group (46 cases) additionally used traditional decoction. Observing diabetic's urinary tract infection bacteriological characteristics, antimicrobial susceptibility, clinical characteristics, clinical symptoms before and after treatment and the index changes detected by laboratory. **Result:** Bacterial culture results show that, in recent years, bacterial group causing infections caused by the bacterium is still gram-negative bacilli. However, the ratio of gram-positive bacteria is higher than reported before. Susceptibility: gram-negative bacterium have higher sensitivity to imipenem, cefoperazone combining resistant to lactam antibiotics enzymes. Gram-positive bacterium have higher sensitivity to vancomycin, piperacillin or amoxicillin combining resistant to lactam antibiotics enzymes. Whereas quinolone antibiotic usually used for urinary tract infection have higher resistance relatively. The main factors causing infection are high blood sugar, high urine sugar and older age. The total effective rate in treatment group is 95.65% and comparison group is 88.09%. Comparison difference between groups has statistically significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** The treatment combining traditional Chinese and western medicine for diabetic patients with urinary tract infection has good effects of prevention and cure.

[Key words] Traditional Chinese and Western medicine; Diabetes; Urinary infection

[收稿日期] 20100426(011)

[通讯作者] * 谢东霞, 硕士, 副教授, 主要从事中医内科临床及教学, Tel: 13513776369, E-mail: XDX6369@163.com