

# 清开灵对小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙及活性氧的作用

王芳<sup>1</sup>, 岳晓丽<sup>2</sup>, 李萍<sup>1\*</sup>, 张颖<sup>2</sup>, 蒋玉凤<sup>2</sup>

(1. 北京市中医研究所, 北京 100010; 2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 动态观察清开灵(QKL)对小鼠腹腔巨噬细胞(PM $\phi$ )内活性氧及游离钙的作用。方法: 原代培养小鼠腹腔巨噬细胞, 分别以荧光探针二氯荧光素二酯(H<sub>2</sub>DCFDA)和 Fluor-3-AM 标记细胞内活性氧及游离钙, 通过激光共聚焦系统动态观察 QKL 的作用。结果: QKL 激活小鼠腹腔巨噬细胞, 巨噬细胞胞浆内 Fluor-3-AM 的荧光强度迅速上升, 在 1.67min 时达到最高峰, 为静息值的 340%, 随后逐渐下降, 在 5min 时细胞内 Fluor-3-AM 为静息的 143% 上下, 波动幅度小于 200, 持续至 25min; 同时发现 QKL 也明显增强静息状态 H<sub>2</sub>DCFDA 的荧光强度, 在 2min 时达到高峰, 为静息值的 2055%; 随后逐渐缓慢下降, 在 7.5min 时稳定在基础值的 1750% 上下, 波动幅度小于 100, 持续至 25min, 显示巨噬细胞内钙上升的时相变化与活性氧的释放呈平行性变化规律。结论: 清开灵通过提高巨噬细胞内钙离子水平, 激发其呼吸爆发产生和释放活性氧, 清除抗原物质, 发挥巨噬细胞免疫防御反应。

**[关键词]** 清开灵; 巨噬细胞; 游离钙; 活性氧

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0062-02

清开灵注射液(简称清开灵)具有清热解毒之功效, 临床应用对感染性发热解热效果明显。有实验证实清开灵液能明显提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数<sup>[1]</sup>。本实验通过应用激光共聚焦扫描技术, 观察清开灵对小鼠腹腔巨噬细胞内活性氧及游离钙的影响, 从细胞分子水平深入探讨清开灵清热解毒的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** Balb/c 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 6 只。

**1.1.2 主要仪器** 激光共聚焦扫描显微镜: 日本 OLYMPUS FV500 型; 倒置荧光显微镜: 日本 Olympus BX-81 型。

**1.1.3 主要试剂** 清开灵注射液, 北京中医药大学实验药厂, 批号: 99103605; H<sub>2</sub>DCFDA: 美国 Biotium; Fluor-3-AM ester: 美国 Biotium; DMSO: 美国 SIGMA 公司; Hepes: 美国 DNN Company; RPMI1640 培养基: 美国 GIBCO 公司; 新生小牛血清: 中国杭州四季青生

物工程材料有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 巨噬细胞的培养** 无菌取小鼠 PM $\phi$ , 台盼蓝染色计数活细胞率大于 95%, 调细胞浓度为  $2 \times 10^5$  cell/mL, 接种于自制培养皿底部的盖玻片上, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4h, 以 Hepes 缓冲液冲洗两遍, 冲洗掉未贴壁细胞, 加入 RPMI-1640 完全培养基继续培养 24h。

**1.2.2 染液配制** 将 Fluor-3-AM 溶于二甲亚砜(DMSO)配成 0.1mmol/L 储备液, 分装冻存于 -20℃ ~ -80℃ 条件下, 染色前用 Hepes 配成 5 $\mu$ mol/L 浓度。H<sub>2</sub>DCFDA 溶于二甲亚砜(DMSO)配成 1mmol/L 储备液, 分装冻存于 -20℃ ~ -80℃ 条件下, 染色前用 Hepes 配成 2.5 $\mu$ mol/L 浓度。

**1.2.3 荧光探针标记** 吸弃培养皿中的培养基, 用 Hepes 缓冲液冲洗 3 次; 滴加不同的染液: Fluor-3-AM 5 $\mu$ mol/L 滴加 200 $\mu$ L, 37℃ 避光孵育 60min; H<sub>2</sub>DCFDA 2.5 $\mu$ mol/L 加 200 $\mu$ L, 37℃ 避光孵育 30min; 吸除染液, 用 Hepes 缓冲液冲洗 3 次; 加入 200 $\mu$ L Hepes 缓冲液待测, 测定在 6h 之内完成。

**1.2.4 PM $\phi$  内游离钙离子检测** 用激光扫描共聚焦显微镜测定, 测定时将培养皿置于倒置显微镜下受 488nm 激光束激发, 确定测定的细胞后进入扫描

**[收稿日期]** 2005-01-12

**[通讯作者]** 李萍, Tel: (010) 64016677-668; E-mail: liping411@yahoo.com.cn

程序, 调节并确定扫描参数: PMT= 735, GAIN= 3%, OFFSET= 2, ZOOM= 4, 扫描类型为 XYT, 每隔 50s 扫描一次, 共扫描 30 次; 开始动态扫描, 首先测定静息状态下细胞的荧光水平, 之后立即加入测试药物 (QKL 终浓度为 80 $\mu$ g/mL), 监测动态变化并进行实时荧光强度监测, 储存并分析结果。

**1.2.5 PM $\phi$  内活性氧检测** 方法同前, 扫描参数为 PMT= 755, GAIN= 5%, OFFSET= 2, ZOOM= 3, 每隔 30s 扫描一次, 共扫描 50 次; 其余同上。

## 2 结果

### 2.1 清开灵对小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙的作用

未加任何刺激物时单个巨噬细胞内 Fluor-3-AM 的荧光强度无明显变化, 于扫描开始后第 4.2min 末以 80 $\mu$ g/mL QKL 刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 发现 Fluor-3-AM 的荧光强度明显增强, QKL 刺激后 0.83, 1.67, 2.5, 3.33, 4.17min, 上升幅度分别是 299, 340, 295, 243, 189%, 随后稳定在 143% 上下, 波动幅度小于 200, 持续至扫描结束, 见图 1。

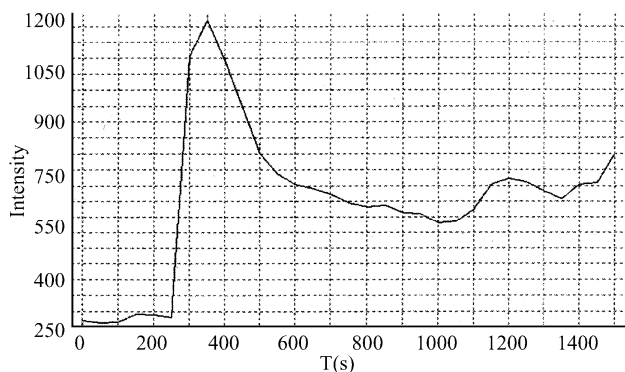


图 1 清开灵致小鼠腹腔巨噬细胞游离钙离子的动力学变化

### 2.2 清开灵对小鼠腹腔巨噬细胞内活性氧的作用

未加任何刺激物时单个巨噬细胞内 H<sub>2</sub>DCFDA 的荧光强度很低, 于扫描开始后第 12.5min 末以 80 $\mu$ g/mL QKL 刺激培养的小鼠腹腔巨噬细胞, 发现 H<sub>2</sub>DCFDA 的荧光强度明显增强, 与静息水平相比, QKL 刺激后 1, 2, 4, 5.5, 7.5min 上升幅度分别是 1966, 2055, 1954, 1882, 1778%, 随后稳定在 1750% 上下, 波动幅度小于 100, 持续至扫描结束, 见图 2。

## 3 讨论

2',7' 二氯化荧光素乙二酯 (H<sub>2</sub>DCFDA) 为不发光的荧光染料, 进入细胞后, 经脂酶作用, 脱去二酯生成 2',7' 二氯化荧光素 (DCFH), DCFH 被活性氧自由基氧化生成发荧光的 2',7' 二氯荧光素 (DCF),

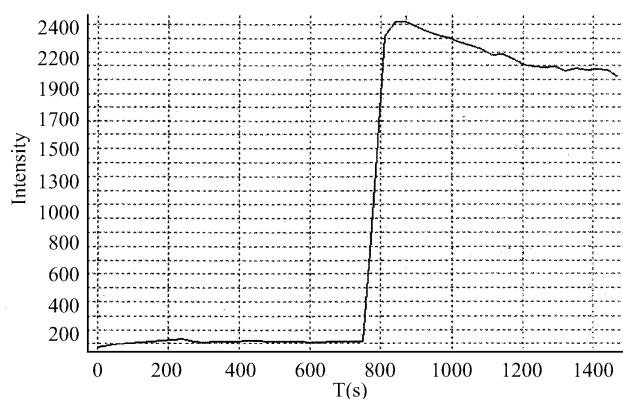


图 2 清开灵致小鼠腹腔巨噬细胞活性氧的动力学变化

因活性氧自由基的含量与荧光探针的荧光强度成正比, 通过检测 DCF 的荧光强度, 可定性定量观察氧自由基的静态、动态变化。利用荧光探针 DCHF-DA 和激光扫描共聚焦显微镜不仅可像其他方法一样检测到细胞活性氧的总体水平, 还能显示单个不同细胞的实际变化。由于是对活细胞作原位实时检测, 贴壁细胞经荧光探针标记后即上机测试, 弥补了化学发光法及生化方法不能检测到细胞内新生成的部分超氧化物和过氧化物、流式细胞术需对样品作特殊处理而影响实验结果等不足。更重要的是, 测试时可在激光扫描间隙进行原位加样处理, 追踪到活细胞在加样瞬间的动态变化, 对药效的评价更客观、准确。

巨噬细胞作为一种具有多种功能的免疫细胞, 在正常情况下, 处于未激活状态, 只有激活的巨噬细胞才具有强大的胞内杀菌作用。清开灵液能明显提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数<sup>[1]</sup>。本实验结果显示, QKL 可使未经 LPS 刺激的巨噬细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 活性氧自由基生成增多, 且巨噬细胞内钙上升的时相变化与活性氧的释放显平行性变化规律。提示清开灵通过提高巨噬细胞内钙离子水平, 激发其呼吸爆发产生和释放活性氧, 以清除抗原物质, 发挥巨噬细胞免疫防御反应。

## [参考文献]

- [1] 蒋玉凤, 李萍, 孔令菲, 等. 清开灵对巨噬细胞吞噬功能和多形核白细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的影响[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(3): 68-69.