

• 方法探讨 •

细菌脂多糖体外诱导子宫 内膜细胞炎症模型的建立

付灵梅, 游 慧, 尤昭玲, 谭朝阳

(湖南中医学院中西医结合系, 湖南 长沙 410007)

子宫内膜是衬于子宫腔内面的一层粘膜。它成分复杂, 功能多样, 每月都要经历一次增生、分泌和剥脱的特征性变化。临床上炎症因素所导致的妇产疾病尤为常见。有报告表明, 异常子宫出血患者子宫内膜细菌检出率为 79.5%, 其中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌比例最高, 被认为是异常出血的主要致病菌^[1]。本实验采用大肠杆菌产生的细菌脂多糖(LPS)(SIGMA 公司 0127: B8)诱导子宫内炎症模型, 为进一步对子宫内膜炎症相关机理的研究和治疗药物疗效的评定奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 LPS(SIGMA 公司 0127: B8, 溶于 D-MEM/F-12(含 10% 胎牛血清)的培养液中, 用 0.22 μ m 滤膜加压过滤除菌, 置 4℃ 过夜备用)、D-MEM/F-12 培养基(GIBCO 产品, 加入青霉素 100U/mL, 链霉素 100U/mL, 肝素 50mg/mL)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、胰蛋白酶(配制成 0.25% 浓度后 4℃ 冷藏过夜)、乙二胺四乙二钠盐(EDTA)、四氢唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)。主要仪器设备: CO₂ 培养箱(德国贺利氏 Heracell)、超净工作台(苏州 SW-CJ-2FD)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、酶标仪(芬兰 Labsystem MK3)、荧光显微镜(江南光学仪器厂)。检测药盒: 鼠抗人波形蛋白抗体(vimentin)、鼠抗人角蛋白抗体(cytokeratin)(鼎国生物)、人白介素-1 β (IL-1 β)定量 EIA 试剂盒、人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)定量 EIA 试剂盒(上海森雄)。

1.2 标本来源及子宫内膜细胞的培养方法 组织标本均来自于门诊病人, 患者年龄 18~45 岁, 3 个月内未服用任何激素类药物, 如避孕药、氟灭酸等影响内分泌的药物。刮取月经周期 7~14d 患者的子宫腔前、后壁正常内膜各 2 条。全过程均在无菌条件下完成, 标本在 30min 内低温转送到实验室进行处理。取病理检查正常的子宫内膜组织进行实验。

培养方法参照文献^[2]。用 0.25% 的胰蛋白酶 2~3mL, 置 37℃ 恒温水浴箱中振荡消化 10min 后, 加入 D-MEM/F-12(含胎牛血清 15%)终止消化。反复吹打未消化的组织块, 经台盼蓝染色证明活细胞数大于 90%, 并调整细胞密度为 1 ×

10⁵/mL, 吸出细胞悬液放入培养瓶, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。传代后的细胞接种于 96 孔培养板中, 待细胞重新长满汇合后, 用于以下实验。

1.3 实验方法 (1) LPS 的药物剂量确定筛选实验。细胞分组: 取 96 孔细胞培养板中生长良好的处于对数生长期的细胞, 随机分为 6 组(5 个不同浓度的 LPS 组, 浓度分别为(1、10、100、1000、10000) μ g/mL, 和 1 个空白对照组), 每组 5 个孔, 各 LPS 组换液后添加 100 μ L 不同剂量的 LPS, 空白对照组添加 100 μ L 的 D-hanks。放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 48h。48h 后每孔加入 5mg/mL 的 MTT20 μ L, 继续温育 4h。吸去培养液, 加入含 100 μ L 的 DMSO, 震荡 5min, 使微小黑色结晶溶解, 形成均匀蓝紫色溶液。用酶标仪测定吸光度(A), 测定波长 570nm, 以不加细胞的孔调零, 计算药物对细胞的抑制率(IR \leq 10%), 确定 LPS 的最佳浓度进行下面的实验, 同时进行形态学观察。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

(2) 炎症模型实验。将接种于 96 孔培养板中处于对数生长期的细胞, 随机分为 3 组, 每组 5 个样本, 空白对照组、48h 模型组、72h 模型组。收集(48、72)h 两个时间段的细胞培养液, 离心后取培养上清液进行 IL-1 β 、TNF- α 的检测。同时每个时间段用倒置相差显微镜进行各组细胞的形态学观察。

1.4 IL-1 β 和 TNF- α 的测定 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 IL-1 β 或 TNF- α 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 IL-1 β 或 TNF- α 与单抗结合, 加入生物素化的抗人 IL-1 β 或 TNF- α 抗体, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合, 加入酶底物 OPD, 出现黄色, 加终止液硫酸, 颜色变深, 在 492nm 处测 OD 值, IL-1 β 或 TNF- α 浓度与 OD 值成正比, 通过绘制标准曲线求出标本中 IL-1 β 或 TNF- α 的浓度。

1.5 统计学处理 所有数据均用 SPSS10.0 软件包进行处理, 方差齐用方差分析, 两两比较用 *q* 检验, 方差不齐用秩和检验。

2 结果

2.1 LPS 的药物剂量确定筛选实验 诱导药物 LPS 剂量筛选的 MTT 实验发现, 从 100 μ g/mL 的浓度起才有作用, 呈浓度依赖性。最接近 IR \leq 10 为 100 μ g/mL 组的浓度, 所以最后选取的最佳浓度为 100 μ g/mL 组的浓度。形态学观察: 1000 μ g/mL 组细胞明显收缩, 形态不规则, 少量飘浮死亡, 与空白对照组相比, 细胞出现超微结构的改变包括细胞核极度不规则, 核膜明显内陷。在胞浆中出现大量的空泡和脂肪体, 线粒体肿胀并扩大, 溶酶体增多, 细胞之间的间隙增宽。10000 μ g/mL 组细胞大量崩解死亡。其余各组形态基本正常。

2.2 炎症模型实验 见表 2、表 3。正常对照组在培养期间 IL-1 β 、TNF- α 的分泌很低, 但是在模型组, 随着 LPS 诱导时间的延长, 这两种细胞因子的分泌呈上升趋势。经统计学分析显示, 48h 和 72h 模型组 IL-1 β 、TNF- α 的含量明显高于同时段

收稿日期: 2004-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C30271633)

通讯作者: 付灵梅, Tel: (0731) 5381112

正常对照组 ($P < 0.01$); 同时模型组 72h 时间段 IL-1 β 、TNF- α 的含量明显高于 48h 时间段 ($P < 0.01$)。形态学观察显示, 48h 时间段正常对照组细胞接种后, 经过贴壁、伸展、分裂增殖, 布满整个培养板的孔底。细胞形态正常, 生长良好, 间质细胞形态呈梭形, 平行排列成束生长, 上皮细胞形态类似蝌蚪形, 形成漩涡状排列, 细胞间连接紧密。经 LPS 作用后的模型组较多的细胞仍维持正常外观, 少数细胞形态发生变化。倒置相差显微镜和普通显微镜下主要表现为少数细胞收缩成圆形固缩状, 细胞间隙稍增宽, 有少部分细胞发生脱落并出现异常颗粒。72h 后再次在显微镜下观察, 正常对照组细胞分裂增殖, 数目明显增多。细胞形态正常, 生长良好。而 LPS 模型组的细胞形态发生显著变化。镜下观察发现较多的细胞发生严重的收缩, 细胞连接消失, 间隙较前大大增加, 细胞脱落数目增加。胞浆中出现大量的空泡和脂肪体, 溶酶体增多。并有大部分上皮细胞失去原有的形态, 细胞纵轴拉长, 横轴缩短, 表现为成纤维细胞型外观。

表 1 LPS 对正常子宫内膜细胞生长的抑制作用 ($n = 5$)

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	吸光度值	抑制率 (%)
空白对照组	0.559 \pm 0.002	—
1	0.556 \pm 0.023	—
10	0.555 \pm 0.008	—
100	0.501 \pm 0.205 ¹⁾	10.3
1000	0.449 \pm 0.036 ²⁾	19.6
10000	0.375 \pm 0.019 ²⁾	30.8

注: 与空白对照组相比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 LPS 对子宫内细胞培养液 IL-1 β 含量的影响
(pg/mL , $n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (pg/mL)	
	48h	72h
模型组	1031.62 \pm 54.5 ^{1), 2), 3)}	1334.64 \pm 82.86 ³⁾
正常对照组	589.26 \pm 17.67 ²⁾	597.76 \pm 7.85 ²⁾

注: 每组 48h 和 72h 时间段相比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组 72h 时间段相比较, ²⁾ $P < 0.01$; 与同时段正常对照组相比较, ³⁾ $P < 0.01$ 。(下同)

表 3 LPS 对子宫内细胞培养液 TNF- α 含量的影响
(pg/mL , $n = 5$, $\bar{x} \pm s$, n)

组别	TNF- α (pg/mL)	
	48h	72h
模型组	204.00 \pm 47.94 ^{1), 2), 3)}	281.51 \pm 18.23 ³⁾
正常对照组	63.55 \pm 6.14 ²⁾	64.83 \pm 4.33 ²⁾

3 讨论

LPS 是革兰氏阴性杆菌细胞壁外膜的主要组成成分, 是引起炎症反应的关键性介质之一。临床上子宫内膜局部发生炎症反应时, 它能刺激单核-巨噬细胞、多形核细胞和子宫内膜细胞等分泌众多细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 。根据有关

文献报道^[3, 4] 本实验利用最原始的刺激物大肠杆菌型 LPS 诱导细胞, 模拟临床常见的妇产科炎症的发病机理。选取 IL-1 β 、TNF- α 这两个经典的急性炎症早期细胞因子作为衡量模型成功与否的标准。通过细胞毒实验对诱导剂的 5 个梯度浓度进行筛选, 确定既适合细胞生长, 又可导致炎症模型的 LPS 浓度。然后按照此浓度施加于正常子宫内膜细胞, 分别检测 48h 和 72h 的细胞培养液中 TNF- α 、IL-1 β 的含量。实验结果证明, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时, 细胞可正常生长, 且两时段的 TNF- α 、IL-1 β 含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。且 TNF- α 、IL-1 β 的分泌在 72h 内与时间成正比。结果显示, 该子宫内膜炎症模型成功, 且在 72h 内存在将炎症反应不断放大、加重的过程。目前所建立的细胞炎症模型中, 关于子宫内膜细胞的炎症模型甚少。而临床上炎症因素所导致的妇产科疾病临床却尤为常见。本实验利用最原始的刺激物诱导细胞, 对于诱导时间及用量进行定量化, 检测方法标准化, 为进一步的实验提供了必要的基础。本模型的建立为今后妇产科子宫内膜的炎症反应机理的研究和相关药物疗效的评价及药理学方面的研究奠定了基础。

本实验的结果表明正常的子宫内膜细胞在筛选浓度的 LPS 培养液的诱导下, TNF- α 和 IL-1 β 的浓度在 72h 内与时间成正相关, 分泌的急性炎症早期细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的浓度呈上升趋势, 与正常对照组同时段相比有显著的差别 ($P < 0.01$)。可推测其中存在将炎症反应不断放大、加重的过程。解放军 304 医院姚咏明研究员的内毒素增敏假说^[5] 从分子和基因水平揭示了内毒素增敏系统——脂多糖结合蛋白(LPS binding protein, LBP) 和脂多糖受体(CD14) 在严重创伤后内毒素血症诱发多器官损害中的作用。LPS 介导的细胞激活需要血浆中或细胞表面存在能够与 LPS 结合的蛋白质的参与。这些蛋白包括 LPS 结合蛋白和 CD14, LPS-LBP 复合物与 CD14 结合后可介导细胞反应^[6]。创伤、烧伤、休克等应激状态一方面引起 LBP/CD14 表达上调, 使机体对内毒素的敏感性增高。另一方面, 组织内毒素通过表达上调的 LBP/CD14 激活多种炎症细胞, 释放炎症细胞因子, 致使炎症反应不断放大、加重, 最终导致全身失控炎症反应和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。

在炎症反应的复杂细胞因子网络中, 核因子 κB (NF- κB , nuclear factor κB) 的激活可能是一个中心环节^[7, 8]。NF- κB 是一种广泛存在于各种细胞, 具有多种调节作用的转录因子。它在正常情况下在胞浆内与抑制蛋白(I κB) 结合而呈非活性状态。当细胞受到各种刺激原, 如: 紫外辐射、细胞因子(如 TNF- α 、IL-1) 活性氧作用时, NF- κB 与 I κB 解离并进入细胞核内, 与特定的启动因子结合, 从而调控各种基因的表达, 如: 细胞因子、炎症因子、粘附分子、趋化因子和急性期反应蛋白等。在子宫局部发生炎症时, 细菌脂多糖(LPS) 和白细胞呼吸暴发过程产生的活性氧均可通过激活腺上皮细胞 NF- κB 引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1) 转录增多, 二者又是 NF- κB 的激活剂, 从而引起中性粒细胞(neutrophils, Neu) M Φ 、淋巴细胞 NF- κB 激活, 通过 TNF- α 、IL-1 的正反馈作

用, NF- κ B 的激活进一步增加, 形成级联反应^[4,7,9], 从而使炎症反应放大及延续。

本实验通过观察 LPS 诱导的子宫内膜细胞分泌炎症细胞因子的规律, 在一定程度上支持了内毒素增敏假说和 NF- κ B 的级联反应。为后续的实验奠定了基础。

参考文献:

- [1] 唐林, 施志欣, 李志明. 异常子宫出血患者子宫内膜的细菌培养[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(8): 502-503.
- [2] 蒋洲梅, 黄玉珠, 洪淡华. 人子宫内膜细胞培养及形态学观察[J]. 生殖与避孕, 1994, 14(4): 271-274.
- [3] Wong P M, Chugn S W, Sultzer B M. Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin in [J]. Scand J Immunol, 2000, 51(2): 123-127.
- [4] 卢应民, 李锦华, 顾军. P38MAPK 在脂多糖诱导人单核细胞产生肿瘤坏死因子中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 620-623.
- [5] 李红云, 姚咏明, 施志国, 等. 内毒素及其增敏系统在烫伤后金葡菌脓毒症中的改变及意义[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(5): 426-429.
- [6] Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin [J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13(3): 437-457.
- [7] 高飞, 易静, 汤雪明. 核因子 κ B 研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(4): 199.
- [8] Lenard MJ, Baltimore D. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue specific gene control [J]. Cell, 1998, 58: 227.
- [9] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Ludwig S. Multiple signaling pathways regulate NF- κ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein 1 gene in primary endothelial cells [J]. Blood, 2001, 97(1): 46-55.

中药剂型改革中的几点看法

郭宇洁, 马燕琼, 吴晓洋, 刘建勋

(中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

中药剂型发展有着悠久的历史, 张仲景《伤寒论》及《金匮要略》都较系统地记载了汤剂、栓剂、浸出制剂、丸剂等中药传统剂型; 明·李时珍《本草纲目》记载的药物制剂多达 40 余种, 除现代的片剂、注射剂等一些新剂型外, 其他剂型几

乎齐备。

近年来, 随着现代科技手段的应用以及新工艺、新设备、新技术的出现, 有力促进了中药剂型改革, 使得西药的一些成熟剂型在中成药上也有广泛的运用, 如软胶囊、肠溶片、泡腾片、气雾剂、雾化液、滴鼻剂、直肠给药剂等, 还有近些年研究比较活跃的中药注射液。

中药改革剂型作为现代中药研究成果的最主要表达形式和最终的商品形式, 一直在现代化研究工作的推进过程中起到标志性作用。然而, 当我们以“市场”作为检验标准, 从中药近 3 4 年的进出口态势上分析, 结果不令人满意。

我国中药进出口统计资料显示^[1], 1995 年曾达到创纪录的 7.7 亿美元, 而 1996~1998 年持续 3 年大幅度滑坡, 1999 年出口有所回升, 但海关统计数据仍比 1995 年低 31.8%。从中药出口来看, 1999 年中药材出口接近 30 万吨, 比上年增长 12%; 中药提取物出口 9937 吨, 比上年增长 23.3%; 中成药出口 7899 万美元, 比上年下降 6.6%。从进口情况看, 中药材进口 6704 万美元, 比上年下降 1.4%; 中成药进口 2516 万美元, 比上年增长 59.1%, 植物提取物进口 894 万美元, 比上年增长 131%。这一态势表明, 低加工、低附加值的中药材和饮片出口仍是我国中药出口的主要品种, 中成药的出口下降与国际上天然药物市场贸易额的不断递增、进口“洋中药”的快速增长所形成的两方面反差, 反衬出我国在成品中药上其“品质”与世界上“领先一步”的国家和地区相比较还有较大差距。

反思现状, 我们认为从根本上分析应该考虑的问题是: 中药传统剂型改革能不能盲目效仿化学制剂?

首先, 任何一次现代剂型改革的尝试都伴随着大量未知成分的丧失, 而这种丧失的现状是我们只知道留下的大概是什么, 而不知道丧失掉的是什么。随着剂型现代化程度越高, 对原料药的纯度要求也越苛刻, 而这种丧失也就越严重, 临床使用的不可控现象和毒副作用就逐渐显现出来。其次, 各种中药制剂在稳定性、生物利用度、药代动力学方面研究匮乏, 这与目前国际上对药品安全、有效、稳定的要求尚有一定差距。另外, 中药剂改中应该注意中医辨证论治, 并以此来考虑中药的提取方式, 拟定药品剂型和剂量大小等问题, 不脱离中医的治疗原则和要求, 不发生废医存药的倾向, 达到剂型改革与原有疗效的统一, 体现中药剂型改革的优越性和必要性。

在我们面前有这样一个严峻现实: 目前在日本只批准了 210 个汉方药制剂生产, 而其原料的 75% 又由我国输入, 但在国际市场的覆盖率达到 80%。而拥有约 4000 种中药制剂的我国, 在国际市场上的覆盖率仅为 3%~5%。其成功的经验可总结为:

1. 政府承认汉方药制剂的组方合理性和疗效, 但只限于张仲景时代的 210 种中药经典方剂。

2. 作为内服制剂, 原则上只承认浸膏制剂, 并提出了“标准汤剂”的概念。要求制定标准汤剂的化学基准与生物学基准。