

小青龙汤含药血清对 ASMC ET-1 分泌水平和 ECE 基因表达的影响[※]

□ 薛汉荣 洪广祥 付向春 程光宇 兰智慧 王丽华 林色奇

(江西中医学院附属医院呼吸病研究所 江西 南昌 330006)

摘要 目的:进一步观察小青龙汤含药血清对 ASMC ET-1 分泌水平和 ECE 基因表达的影响。方法:实验分6组,正常组(10%正常对照组血清)、模型组(组胺加10%正常对照组血清)、小青龙汤高剂量组(组胺加10%小青龙汤高剂量组血清)、小青龙汤中剂量(组胺加10%小青龙汤中剂量组血清)、小青龙汤低剂量组(组胺加10%小青龙汤低剂量组血清)、地塞米松组(组胺加10%地塞米松组血清),每组8孔。采用ELISA法测定小青龙汤含药血清对 ASMC ET-1 分泌水平;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定 ASMC 内皮素转换酶(ECE)的基因表达。结果:与模型组比较,小青龙汤低剂量组含药血清对 ASMC ET-1 分泌水平有显著性差异($P < 0.05$);小青龙汤高、中剂量组及地塞米松组均有极显著性差异($P < 0.01$)。与模型组比较,小青龙汤低剂量含药血清对 ASMC 内皮素转换酶(ECE)基因表达有显著性差异($P < 0.05$);小青龙汤高剂量组及地塞米松组均有极显著性差异($P < 0.01$)。结论:小青龙汤抑制哮喘大鼠平滑肌分泌 ET-1 是小青龙汤影响哮喘大鼠气道重建的途径之一。

关键词 小青龙汤 气道平滑肌细胞 内皮素-1 内皮素转换酶

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠,30只,体重200~220g,由南昌大学医学院动物中心提供。

1.1.2 药物 小青龙汤颗粒(无糖型)购自吉林省集安益盛药业股份有限公司,批号为040624;醋酸地

※基金项目 江西省自然科学基金资助课题(No: 0340022)

塞米松片购自浙江仙琚制药股份有限公司,批号为040353。

1.1.3 主要试剂 DMEM 培养基(Gibco, USA);胶原酶 II 型(Gibco, USA);胰蛋白酶(Sigma, USA);胎牛血清(杭州四季青);多聚赖氨酸(sigma, USA);

抗生素(青霉素、链霉素,国产);MTT(Amresco, USA);二甲基亚砷(Amresco, USA);组织胺(上海); α -SM ACTIN 免疫组化试剂盒(Sigma,

USA); ET-1 ELISA 试剂盒 (Cayman, USA); RNA 提取试剂盒由上海华舜生物工程有限公司提供; 内皮素转换酶 ECE 的 RT-PCR 试剂盒由广州中山达安基因有限公司提供。

1.1.4 主要仪器 倒置显微镜: OLYMPUS 公司产品; 显微镜: OLYMPUS 公司产品; CO₂ 培养箱: SANYO, MCV-B161S; 超净工作台: SANYO, MCV-B161S (T); CO₂ 培养箱: SANYO, MCO-20AIC; 离心机: 上海安亭科学仪器厂, 800B; 低温离心机: Hettich, Mikro 22R; 酶标仪: Thermo, Multiskan MK3; PCR 仪: 英国 HYBID 公司产品; DM IRB + Q500IM LEICA 图像分析系统: 德国 LEICA 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小青龙汤含药血清的制备

将 25 只雄性 SD 大鼠, 随机分为 5 组: 正常对照组、小青龙汤高剂量组、小青龙汤中剂量组、小青龙汤低剂量组、地塞米松组, 每组 5 只;

给药: 按体表面积折算后小青龙高、中、低组、地塞米松组的每日给药剂量分别为 4.5g/kg、3g/kg、1.5g/kg、0.063mg/kg, 正常组给予等体积蒸馏水, 一日 2 次, 连续 5 次;

血清的制备^[1]: 末次给药 1h 后, 乙醚麻醉, 无菌条件下, 经腹主动脉采血, 冷置 1h, 离心 (4℃, 2500r/min, 25min), 分离血清, -20℃ 冰箱保存备用。所取血清分别为正常组血清、小青龙汤高剂量组血清、小青龙汤中剂量组血清、小青龙汤低剂量组、地塞米松组血清。

1.2.2 大鼠平滑肌细胞的培养及鉴定

1.2.2.1 大鼠气管平滑肌细胞的培养 采用酶消化法^[2,3], (1) 原代培养: 断颈法处死大鼠, 70% 酒精清洗, 无菌剥离气管组织置于盛有 D-Hank's 抗菌素液容器中, 用含抗生素的 D-Hank's 洗 4 遍, 取平滑肌组织移入盛有 DMEM 的无菌平皿中, 用无菌手术剪剪成碎片, 加入 30~50 倍体积的 0.2% 的胶原酶 II, 37℃ 消化 1~3h; 然后加入 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 消化 5~10min, 即得到分离的平滑肌细胞; 强力吹打使组织分散, 将悬液移入 (刻度) 离心管中, 用含 10% FCS-DMEM 终止酶的作用, 以 1000r/min 离心 5min; 弃上清, 加入含抗菌素的 20% FCS-DMEM 重新悬浮细

胞, 在显微镜下调节细胞密度为 10⁵/ml 接种到培养瓶中, 在 CO₂ 培养箱中培养, 每 3d 换液一次。(2) 传代: 约 7~10 天可见培养瓶中形成致密细胞层时即可传代培养。

1.2.2.2 大鼠气管平滑肌细胞的鉴定 (1) 细胞形态: 培养第 2d 呈梭形, 5~7d 后, 70~90% 融合, 可见细胞呈梭形, 密集与稀疏处相互交错呈典型的“峰谷”状 (见图 1); (2) α-actin 免疫细胞化学染色: 取第 3 代气管平滑肌细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 将细胞悬液以终浓度 1×10⁴/ml 接种到培养皿中 (预置多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片), 培养 48h 后取出盖玻片, D-Hank's 冲洗 3 次, 80% 丙酮固定 10min, 室温晾干; 下面按试剂盒说明完成。



图 1 原代培养的大鼠气管平滑肌细胞 (×10)

1.2.3 小青龙汤含药血清的细胞毒作用

1.2.3.1 大鼠气管平滑肌细胞生长曲线测定^[4] 取生长状态良好的细胞, 采用一般传代方法进行消化, 制成细胞悬液。经计数后, 精确地按 1×10⁴ 个/ml 分别接种于 24 孔培养板内, 每天取 3 孔细胞进行计数, 并计算均值。共计数 8d, 以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴, 描绘曲线。结果见图 2。

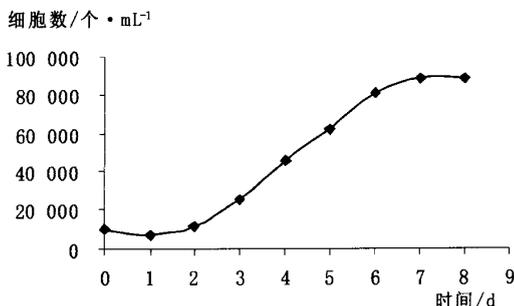


图 2 ASMC 细胞生长曲线

1.2.3.2 MTT法测定空白血清和含药血清的细胞毒作用^[4] 设5%、10%、15%的空白血清和含药血清,共15组,每组6孔,另设无细胞的空白对照孔6孔,用MTT法检测,结果表明各浓度血清培养液对细胞生长均无毒性作用。

1.2.4 小青龙汤含药血清对ASMC培养液内皮素-1(ET-1)水平的影响

实验分6组,正常组(10%正常对照组血清)、模型组(组胺加10%正常对照组血清)、小青龙汤高剂量组(组胺加10%小青龙汤高剂量组血清)、小青龙汤中剂量(组胺加10%小青龙汤中剂量组血清)、小青龙汤低剂量组(组胺加10%小青龙汤低剂量组血清)、地塞米松组(组胺加10%地塞米松组血清),每组8孔。

操作步骤:将3代大鼠气管平滑肌细胞悬液按 10^5 个/ml接种到6孔培养板中,37℃、5%CO₂培养箱中培养,当细胞基本长满时用于实验;用无血清培养液清洗2遍后,加入含 10^{-6} mol/L组胺至10%各组血清的培养液(预试验证明该浓度组胺刺激ET-1分泌作用最强),继续培养24h,收集细胞培养液,于4℃,3000r/min,离心10min,收集上清,-70℃保存;以下操作按ELISA试剂盒说明完成。

1.2.5 小青龙汤含药血清对ASMC内皮素转换酶(ECE)基因表达的影响

采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测

定^[5]ASMC内皮素转换酶(ECE)的基因表达。实验分5组,正常组(10%正常对照组血清)、模型组(组胺加10%正常对照组血清)、小青龙汤高剂量组(组胺加10%小青龙汤高剂量组血清)、小青龙汤低剂量组(组胺加10%小青龙汤低剂量组血清)、地塞米松组(组胺加10%地塞米松组血清),每组4个。操作步骤:(1)ASMC细胞的总RNA提取:据RNA提取试剂盒说明操作;(2)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):1)逆转录合成cDNA:据试剂盒说明操作;2)PCR反应条件如下:94℃变性1min,59℃退火1min,72℃延伸1min.共35个循环,72℃加强延7min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后在凝胶图像分析仪上进行荧光亮度测定,计算ECE/ β -actin值。引物序列如下:ECE:上游:5'-AAGAACGCCTCCG-GTATGTCT-3';下游:5'-TGCTTAATGATGGCTTGTT-GT-3'; β -actin:上游:5'-GTGCCATCTATGAGGTT-TACG-3';下游:5'-CGAAGTCTAGGGCAACATAGCA-3'。

1.3 统计学分析 实验结果皆以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA),各组与模型组相比采用dunnet't检验。

2 结果

2.1 小青龙汤含药血清对ASMC培养液内皮素-1(ET-1)水平的影响 见表1。

表1 各组ASMC培养液的ET-1的变化($\bar{x} \pm s$, ng·L⁻¹)

组别	n	给药说明	ET-1
正常组	8	10%正常对照组血清	4.89 \pm 2.2**
模型组	8	组胺加10%正常对照组血清	10.32 \pm 2.64
小青龙汤高剂量组	8	组胺加10%小青龙汤高剂量组血清	5.54 \pm 2.21**
小青龙汤中剂量组	8	组胺加10%小青龙汤中剂量组血清	6.33 \pm 3.07**
小青龙汤低剂量组	8	组胺加10%小青龙汤低剂量组血清	7.10 \pm 2.08*
地塞米松组	8	组胺加10%地塞米松组血清	5.01 \pm 1.47**

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.2 小青龙汤含药血清对ASMC内皮素转换酶(ECE)基因表达的影响 见表2。

表2 各组 ASMC 中 ECE 基因表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药说明	ECE/ β -actin
正常组	4	10% 正常对照组血清	0.116 \pm 0.009**
模型组	4	组胺加 10% 正常对照组血清	0.168 \pm 0.026
小青龙汤高剂量组	4	组胺加 10% 小青龙汤高剂量组血清	0.125 \pm 0.014**
小青龙汤低剂量组	4	组胺加 10% 小青龙汤低剂量组血清	0.133 \pm 0.011*
地塞米松组	4	组胺加 10% 地塞米松组血清	0.113 \pm 0.016**

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

3 讨论

小青龙汤具有温肺化饮，止咳平喘之功效，在临床上被广泛用于哮喘防治，疗效确切。我们采用细胞培养的方法，从细胞分子水平，探讨了小青龙汤治疗哮喘的作用机理，结果表明本方药物血清能有效降低 ASMC 培养液中内皮素-1 (ET-1) 的水平、ASMC 内皮素转换酶 (ECE) 基因表达亦明显低于模型组，而且与给药剂量呈正比关系，从而可见抑制哮喘大鼠平滑肌分泌 ET-1 是小青龙汤影响哮喘大鼠气道重建的途径之一。

参考文献

- [1] 刘建文. 药理实验方法学——新技术与新方法 [M]. 北京: 化学工业出版社现代生物技术与医药科技出版中心, 2003. 259.
- [2] 罗雅玲, 赖文岩, 徐健, 等. 沙丁胺醇在诱导培养人气管平滑肌细胞凋亡中的作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24 (4): 219-224.
- [3] 文思成, 徐军, 钟南山. 反义寡核苷酸对气道平滑肌细胞内皮素转换酶及内皮素 1 表达的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22: 279-282.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 世界图书出版社, 2004.
- [5] Rossi GP, Albertin G, Franchin E, et al. Expression of the endothelin-converting enzyme gene in human tissues [J]. Bio Chem Biophys Res Commun, 1995, 2 (11): 249-253.

《中西医结合肝病杂志》2007 年征订启事

《中西医结合肝病杂志》是由中国中西医结合学会与湖北中医学院主办的、国内外肝病领域内唯一的一份中西医结合的国际标准连续出版物，系中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊；中国期刊全文数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、万方数据-数字化期刊群入网期刊、美国《化学文摘》收录。

本刊以国内外知名的肝病专家为学术顾问，严格遵循“基础与临床并重”、“普及与提高兼顾”、“中西医结合”的办刊宗旨，力求以最快的速度如实报道国内外中西医防治肝病的新理论、新成果、新进展、新动向、新疗法、新药物、新经验。深受广大肝病临床医务人员和研究人员的喜爱。

本刊所设栏目有专论、临床论著、基础理论研究、学术探讨、实验研究、临床检验、影像学诊断、肝病治疗新技术、老中医心法、经验交流、病例报告、讲座、综述、海峡之窗、会议纪要、患者之友、思路与方法、译文等。

本刊为双月刊，逢双月月末出版，国际大 16 开，64 页，单价 5.00 元，全年订价 30.00 元。国内外公开发行，可在全国各地邮局订阅，如错过邮局订阅时间，可直接汇款至本编辑部邮购。

邮发代号为：38-179。

编辑部地址：武汉市武昌区花园山 4 号

邮编：430061 电话：027-88929354；88854726