

6种中药生物碱对内毒素诱导内皮细胞分泌白介素-1 α 、NO和6-酮-前列腺素F_{1 α} 的影响

胡屹屹, 何孔旺, 温立斌

(江苏省农业科学院 兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:通过研究青藤碱、防己诺林碱、水苏碱、川芎嗪、苦参碱和吴茱萸碱6种中药生物碱对细菌内毒素(LPS)作用下猪血管内皮细胞分泌细胞因子白介素-1 α (IL-1 α)、NO和6-酮-前列腺素F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α})的影响,探讨生物碱抗LPS的药理作用机制.培养猪血管内皮细胞至单层融合状态,加入LPS刺激,3h后加入高、中、低3种质量浓度的上述6种中药生物碱,继续培养21h后收集细胞上清液,用ELISA测定IL-1 α 、NO和6-keto-PGF_{1 α} 的含量.结果显示青藤碱、苦参碱和吴茱萸碱能显著降低内皮细胞分泌IL-1 α 的水平;青藤碱、水苏碱和川芎嗪能显著降低内皮细胞分泌NO的水平;防己诺林碱能显著降低内皮细胞分泌6-keto-PGF_{1 α} 的水平.结果提示6种中药生物碱具有明显的抗细菌内毒素作用,可在由IL-1 α 、NO和6-keto-PGF_{1 α} 介导的机体炎症、水肿和凝血等病理损伤过程中发挥治疗作用.

关键词:生物碱;内毒素;白介素-1 α ;一氧化氮;6-酮-前列腺素F_{1 α}

中图分类号:S853.74

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)03-0407-04

The Inhibitory Effects of Six Alkaloids for IL-1 α , NO and 6-Keto-PGF_{1 α} in LPS-Induced Endothelial Cells

HU Yi-yi, HE Kong-wang, WEN Li-bin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The aim of the research is to investigate the antiendotoxin effects of sinomenine, fangchinoline, stachydrine, chuanxiongazine, oxymartrine and evodiamine. Endothelial cells were challenged with 1 μ g/mL LPS for 3 h and treated respectively with six alkaloids at three concentrations (1, 5 and 10 μ g/mL). The cells were incubated at 37 $^{\circ}$ C in a cell incubator for 21 h. The supernatants were collected and analyzed for the levels of IL-1 α , NO and 6-keto-PGF_{1 α} by ELISA kits. The results revealed that sinomenine, oxymartrine and evodiamin inhibited the production of IL-1 α ; sinomenine, stachydrine and chuanxiongazine inhibited the secretion of NO; fangchinoline down-regulated 6-keto-PGF_{1 α} expression. All these changes were significant. Altogether, these data suggested that six alkaloids would exert beneficial therapeutic effects on inflammation, edema and coagulation via these cytokines.

Key words: alkaloid; LPS; IL-1 α ; NO; 6-keto-PGF_{1 α}

内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性杆菌生长或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分,进入血液循环后,导致炎性级联瀑布反应,引发多器官

功能衰竭甚至机体死亡^[1].生物碱是一大类碱性含氮化合物,是许多药用植物的有效成分^[2].青藤碱具有镇痛镇静和镇咳局麻功效,是很强的组织胺释放

收稿日期:2011-09-21

作者简介:胡屹屹(1981—),男,助理研究员,博士,E-mail:huyiyi6073@sina.com

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金(0250411025)

剂,动物试验提示在休克和器官损害中有保护作用^[3]. 防己诺林碱的生物活性包括抗炎、镇痛,降压,抗肿瘤和抗血小板聚集^[4]. 水苏碱具有降低血管的阻力、改善微循环状态、减缓血小板凝聚等功效,有望成为良好的心血管系统疾病的治疗药物^[5]. 川芎嗪是从中药川芎中分离提纯的生物碱单体,功擅活血行气祛瘀,用于缺血性疾病治疗^[6]. 苦参碱是一种较强的免疫抑制剂,可以抑制多种炎症因子的释放,有明确的抗炎、抗病毒和免疫调节作用^[7]. 吴茱萸碱可以抗高血压和心率不齐,对大肠埃希菌强力抑制,对猪蛔虫有显著杀虫作用^[8]. 本试验测定了6种中药生物碱对LPS刺激后内皮细胞分泌白介素-1 α (IL-1 α), NO 和 6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α}) 水平的影响,旨在探讨生物碱抗内毒素的药理机制,为兽医临床应用生物碱防治细菌性疾病提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及主要仪器

青藤碱、防己诺林碱、水苏碱、川芎嗪、苦参碱和吴茱萸碱,中国药品生物制品鉴定所产品,批号分别为:0774、110793、110712、110817、110780、110802. LPS (O₅₅: B₅), Sigma 公司产品,批号 L-2880. 临用前用维持培养基作倍比稀释. IL-1 α 、NO 和 6-keto-PGF_{1 α} 检测试剂盒,美国 GBD 公司产品. 猪髌动脉内皮细胞,中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心产品,批号 GNO15. 酶标检测仪(美国 BioTek 公司,型号 ELx800)等.

1.2 细胞分组处理

传代培养的内皮细胞经过胰酶消化、吹打悬浮,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,重新接种到新的细胞培养板上继续培养. 48 h 后镜检可见排列紧密、鹅卵石样的内皮细胞成片生长,此时进行分组处理. 空白对照组,不加 LPS 和药物;LPS 对照组,LPS 溶解于维持培养基中,终质量浓度 $1 \mu\text{g/mL}$;药物对照组,6 种生物碱溶解于维持培养基中,终质量浓度 $10 \mu\text{g/mL}$;药物的高、中、低剂量组,维持培养基中先加入 LPS,使 LPS 质量浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$,3 h 后添加药物,使药物终质量浓度分别为 1 、 5 、 $10 \mu\text{g/mL}$,每质量浓度重复 5 孔. 各组细胞在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数为 5% CO₂ 的条件下培养 24 h 后,收集各孔细胞液,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测.

1.3 细胞因子检测

严格按照试剂盒说明书要求,ELISA 法检测 IL-1 α 、NO 和 6-keto-PGF_{1 α} 的含量.

1.4 数据处理

各项检测指标结果采用平均数 \pm 标准差 (Mean \pm

SD) 表示,应用统计软件 SPSS 17.0 中的 ANOVA (One way analysis of variance) 模型进行方差分析, LSD 法检验差异显著性.

2 结果

2.1 各组 IL-1 α 的质量浓度

空白对照组 IL-1 α 的质量浓度比 LPS 对照组极显著 ($P < 0.01$) 降低. 各组 IL-1 α 的质量浓度见表 1, 其中苦参碱高剂量组的 IL-1 α 质量浓度极显著 ($P < 0.01$) 低于 LPS 对照组,青藤碱高剂量组和中剂量组、苦参碱中剂量组和吴茱萸碱高剂量组显著 ($P < 0.05$) 低于 LPS 对照组.

表 1 各组 IL-1 α 的质量浓度¹⁾

Tab. 1 The contents of IL-1 α in every group

组别	低剂量	中剂量	高剂量	药物对照
青藤碱	28.28 \pm 1.26	27.45 \pm 0.92 *	27.28 \pm 0.63 *	23.78 \pm 1.03
防己诺林碱	29.20 \pm 1.73	28.45 \pm 0.78	28.12 \pm 1.42	23.45 \pm 0.57
水苏碱	29.12 \pm 2.27	28.62 \pm 1.53	27.78 \pm 0.92	23.62 \pm 0.79
川芎嗪	28.87 \pm 1.23	28.53 \pm 2.15	28.03 \pm 1.44	24.28 \pm 0.74
苦参碱	28.20 \pm 1.48	27.20 \pm 1.14 *	26.87 \pm 1.04 **	22.78 \pm 0.99
吴茱萸碱	28.45 \pm 1.17	28.78 \pm 1.29	27.37 \pm 1.65 *	24.45 \pm 0.83
LPS 对照组	29.37 \pm 1.90			
空白对照组	22.95 \pm 1.26 **			

1) 表中数据为平均数 \pm 标准差, $n = 4$, LSD 法检验差异显著性,与 LPS 对照组相比, * 示差异显著 ($P < 0.05$), ** 示差异极显著 ($P < 0.01$).

2.2 各组 NO 的浓度

空白对照组 NO 的浓度比 LPS 对照组极显著 ($P < 0.01$) 降低. 各组 NO 的浓度见表 2, 其中水苏碱高剂量组的 NO 浓度极显著 ($P < 0.01$) 低于 LPS 对照组,青藤碱高剂量组、水苏碱中剂量组和川芎嗪高剂量组显著 ($P < 0.05$) 低于 LPS 对照组.

表 2 各组 NO 的浓度¹⁾

Tab. 2 The contents of NO in every group

组别	低剂量	中剂量	高剂量	药物对照
青藤碱	56.15 \pm 3.59	53.44 \pm 3.03	52.40 \pm 3.06 *	25.38 \pm 3.34
防己诺林碱	57.13 \pm 1.86	55.46 \pm 2.93	55.82 \pm 2.72	24.66 \pm 1.79
水苏碱	55.26 \pm 3.34	52.55 \pm 4.44 *	48.50 \pm 1.82 **	23.59 \pm 3.72
川芎嗪	55.02 \pm 2.51	53.80 \pm 3.56	51.57 \pm 3.89 *	23.98 \pm 2.33
苦参碱	56.06 \pm 2.87	54.90 \pm 4.39	52.96 \pm 4.57	27.19 \pm 3.15
吴茱萸碱	57.22 \pm 3.21	54.87 \pm 5.42	54.45 \pm 2.63	25.55 \pm 4.28
LPS 对照组	57.49 \pm 2.27			
空白对照组	24.48 \pm 1.88 **			

1) 表中数据为平均数 \pm 标准差, $n = 4$, LSD 法检验差异显著性,与 LPS 对照组相比, * 示差异显著 ($P < 0.05$), ** 示差异极显著 ($P < 0.01$).

2.3 各组 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的质量浓度

空白对照组 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的质量浓度比 LPS 对照组显著 ($P < 0.05$) 降低。各组 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的质量浓度见表 3, 其中防己诺林碱高剂量组和中剂量组的 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 质量浓度显著 ($P < 0.05$) 低于 LPS 对照组。

表 3 各组 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的质量浓度¹⁾

Tab.3 The contents of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in every group

组别	低剂量	中剂量	高剂量	药物对照
青藤碱	18.22 ± 1.57	17.96 ± 0.97	18.03 ± 0.88	16.17 ± 0.99
防己诺林碱	17.83 ± 1.03	16.68 ± 1.23 *	16.29 ± 0.68 *	15.91 ± 0.44
水苏碱	17.26 ± 0.95	16.94 ± 0.57	16.81 ± 1.14	16.55 ± 0.79
川芎嗪	18.09 ± 1.29	17.77 ± 1.37	17.64 ± 1.07	16.49 ± 0.53
苦参碱	17.90 ± 1.01	17.58 ± 1.60	17.71 ± 0.77	16.36 ± 0.66
吴茱萸碱	18.28 ± 1.15	17.71 ± 1.32	17.06 ± 2.07	16.68 ± 0.76
LPS 对照组		18.22 ± 0.67		
空白对照组		16.36 ± 0.66 *		

1) 表中数据为平均数 ± 标准差, $n = 4$, LSD 法检验差异显著性, 与 LPS 对照组相比, * 示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

IL-1 α 参与机体各种急慢性炎症的病理过程, 引起中性粒细胞数量增加, 活化 T 细胞、NK 细胞和内皮细胞, 促进粘附分子的表达, 促进 B 细胞的分化和活化等^[9]。本试验证明, 青藤碱、苦参碱和吴茱萸碱都能显著降低 LPS 诱导内皮细胞分泌 IL-1 α 的水平, 以苦参碱效果最为明显, 并且呈现一定的量效关系。给动物直接注射 IL-1 α 可引起与临床上细菌感染导致的败血症相同的病理生理变化。IL-1 α 是通过促进与机体炎症反应过程相关物质基因的表达 (如环氧化酶、NO 和内皮细胞粘附因子等), 以及影响某些酶的活性 (如乳酸脱氢酶和脂蛋白酶等), 对几乎所有类型细胞都产生作用。吴红娟等^[10] 发现, 青藤碱可抑制骨关节炎病变中关节液炎性细胞因子 PGE $_2$ 、IL-1 的生成, 这一过程是其减轻软骨损伤与滑膜炎症的作用机制。有报道称, 丹参、丹参素对 LPS 刺激下分泌的 IL-1 α 等细胞因子有明显的抑制作用, 并呈现剂量依赖性关系^[11]。徐维敏等^[12] 研究表明, 雷公藤红素能降低 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞胞外和胞内的 IL-1 α 活性。

巨噬细胞激活后因分泌高水平的 NO 而产生细胞毒作用, LPS 可以诱导体外培养的大鼠巨噬细胞凋亡。NO 还具有神经递质的作用, 可以改变小肠的蠕

动性和肠液的电解质平衡^[13], 这也是临床上 LPS 血症常伴有动物机体腹泻脱水、形体消瘦的原因。本试验证明, 青藤碱、水苏碱和川芎嗪都能显著降低 LPS 诱导内皮细胞分泌 NO 的水平, 以水苏碱效果最为明显, 并且呈现一定的量效关系。研究表明, 感染和败血症过程与诱导型 NO 合酶关系密切^[14], 此外还包括一些慢性炎症, 例如肠炎和风湿性关节炎^[15]。朱虹等^[16] 研究发现, 水苏碱通过调节子宫血管舒缩因子 NO 和内皮素的分泌, 来治疗功能失调性子宫出血。川芎嗪能显著改善慢性肺心病急性发作期患者 NO 的水平, 有利于肺动脉高压降低^[17]。刘珍等^[18] 报道, 青藤碱本身无成瘾性, 但能显著减轻吗啡依赖小鼠的戒断征状, 其作用机制可能与青藤碱影响小鼠与脊髓中的 NO/nNOS 系统有关。本研究中, LPS 刺激猪髂动脉内皮细胞后, NO 的分泌量约为静息状态下的 2.3 倍; 而简华刚等^[19] 的试验结果显示, LPS 作用于大鼠肺微血管内皮细胞后, NO 的含量升高 8 倍, 这可能与不同动物不同器官的内皮细胞在分泌功能上的异质性有关。

前列素 I $_2$ (PGI $_2$) 是由血管内皮细胞摄取花生四烯酸后经环氧合酶、前列腺素合成酶加工而成。机械性损伤、化学性刺激及部分药物均可使内皮细胞释放 PGI $_2$ 。PGI $_2$ 是很强的血小板聚集抑制剂和血管平滑肌舒张剂, 能扩张血管, 并使已聚集的血小板解聚^[20]。作用机制是与细胞膜上相应受体结合后, 激活腺苷酸环化酶, 增加细胞内的 cAMP 含量, 发挥松弛平滑肌和抑制血小板聚集的功效^[21]。PGI $_2$ 是一种局部激素, 生物半衰期约 3 min, 直接测量有困难, 一般通过测定其稳定的代谢产物 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 来了解 PGI $_2$ 的生成。正常状态下, 内皮细胞分泌的 PGI $_2$ 与血栓素 A $_2$ (TXA $_2$) 之间存在着一定的动态平衡关系, 防止血栓形成和维持血管的正常舒缩。孔炜等^[22] 发现, 急性缺血后的肺动脉内皮细胞分泌的 TXA $_2$ 和 PGI $_2$ 均增加, 但两者比值降低, 提示这种变化可能在急性缺氧性肺血管收缩中起调节作用。本试验证明, 防己诺林碱能显著抑制内皮细胞高水平分泌 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 。

LPS 是机体发热、腹泻、炎症、水肿、凝血、休克等综合征发生的病理基础。它可以促进内皮细胞释放多种炎症因子、趋化因子、粘附因子、促凝因子和血小板活化因子等, 它们的相互作用是炎症应答、水肿发展与凝血转归的关键步骤^[23]。镜检显示, 内皮细胞受 LPS 刺激后, 细胞长宽比值增大, 间隙变宽, 排列混乱, 受损程度与 LPS 呈现量效关系, 这与程君涛

等^[24]的报道结果相符. 本试验中药物对照组显示, 高浓度的生物碱不影响内皮细胞正常的形态结构和分泌功能. 至今, 对 LPS 的治疗仍无特效措施, 抗生素虽然能够控制细菌感染, 但有增加 LPS 血症的危险; LPS 抗体作用微弱, 由于细菌的血清型较多, 抗原复杂, 很难推广一种在不同地区都有效的疫苗. 本试验证明, 6 种中药生物碱青藤碱、防己诺林碱、水苏碱、川芎嗪、苦参碱和吴茱萸碱具有一定的抗 LPS 药理作用, 机理可能在于维护机体炎症反应平衡、开启内源性细胞的保护功能和调节凝血因子过度释放等. 本研究可为兽医临床使用生物碱防治细菌性疾病提供理论依据, 对生物碱制剂的系列开发也具有重要的借鉴意义.

参考文献:

- [1] 张含飞, 张金龙, 王振华. 抗内毒素药物的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2008(1): 57-60.
- [2] 韩进, 郭莹, 万海同. 中药生物碱类的药理作用及药代动力学研究[J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(12): 2326-2328.
- [3] ZENG Yang-ying, GU Bing-jie, JI Xiao-hui, et al. Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(8): 1438-1444.
- [4] KIM H S, ZHANG Y H, YUN Y P. Effects of tetrandrine and fangchinoline on experimental thrombosis in mice and human platelet aggregation[J]. Planta Med, 1999, 65(2): 135-138.
- [5] 李林. 水苏碱的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 930-931.
- [6] XIAO H J, WANG T, CHEN J, et al. Chuanxiongine relaxes isolated corpus cavernosum strips and raises intracavernous pressure in rabbits[J]. Int J Impot Res, 2010, 22(2): 120-126.
- [7] 王晓燕, 李伟忠, 梁磊, 等. 苦参碱对小鼠免疫器官的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2545-2546.
- [8] TAKADA Y, KOBAYASHI Y, AGGARWAL B B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaBalpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion[J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 17203-17212.
- [9] DINARELLO C A, CANNON J G, MIER J W, et al. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1[J]. J Clin Invest, 1986, 77(6): 1734-1739.
- [10] 吴红娟, 孙必强, 朱传湘, 等. 盐酸青藤碱对家兔骨关节炎关节液 IL-1 β 、PGE₂ 生成与关节组织结构的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 84-86.
- [11] 许锋, 陆伯刚, 姚智, 等. 丹参及丹参素对内毒素刺激下肝巨噬细胞分泌细胞因子影响的动态观察[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(5): 262-265.
- [12] 徐维敏, 张罗修, 程彰华, 等. 雷公藤红素对 IL-1、IL-2 活性及 PGE₂ 释放的抑制作用[J]. 药学报, 1991, 26(9): 641-645.
- [13] IZZO A A, MASCOLO N, CAPASSO F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport[J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(8): 1605-1620.
- [14] WONG J M, BILLIAR T R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation[J]. Adv Pharmacol, 1995, 34: 155-170.
- [15] BOUGHTON N K, EVANS S M, HAWKEY C J, et al. Nitric oxide synthase activity in uncreative colitis and Crohn's disease[J]. Lancet, 1993, 342: 338-340.
- [16] 朱虹, 龙子江, 李国忠. 合成水苏碱对功血模型大鼠子宫血管舒缩因子的影响[J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(6): 66-68.
- [17] 许崇德. 川芎嗪注射液对慢性肺心病急性发作期患者 NO、ET-1 的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(8): 665-667.
- [18] 刘珍, 郑济芳, 杨露青, 等. 青藤碱对吗啡依赖与戒断小鼠小脑与脊髓 NO/nNOS 系统的影响[J]. 生理学报, 2007, 59(3): 285-292.
- [19] 简华刚, 周继红. 内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 457-459.
- [20] ICHIDA F, UESE K, HAMAMICHI Y, et al. Chronic effects of oral prostacyclin analogue on thromboxane A₂ and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension[J]. Acta Paediatr Jpn, 1998, 40: 14.
- [21] HARRISON W F, BARNETT H F. Differences in prostaglandin metabolism in cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells exposed to acute and chronic hypoxia[J]. Cir Res, 1991, 68: 1446.
- [22] 孔炜. 急性缺氧对肺动脉内皮细胞血栓素合酶基因表达及 PGI₂、TXA₂ 代谢产物的影响[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(4): 295-297.
- [23] SWERLICK R A, LAWLEY T J. Role of microvascular endothelial cells in inflammation[J]. J Invest Dermatol, 1993, 100: 111-115.
- [24] 程君涛, 袁建成. 内毒素对人脐静脉内皮细胞形态和功能的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(3): 155-158.