

肾脏病理组织学损伤。免疫组化结果显示复方鳖甲软肝片低、中、高剂量组与模型组对比 TGF- β_1 的表达具有明显抑制作用,有统计学差异 ($P < 0.05$),与蒙诺组相比无统计学差异。复方鳖甲软肝片低、中、高剂量组各组间在 GSI、肾小管-间质损伤评分和 TGF- β_1 的表达上均无统计学差异。由此推测复方鳖甲软肝片治疗 CRF 的可能疗效机制之一是通过抑制肾组织 TGF- β_1 的表达,进而减少 ECM 的合成和沉积,减轻肾脏病理组织学损伤从而发挥抗肾纤维化作用。目前已知复方鳖甲软肝片成分中的冬虫夏草和三七对肾纤维化有一定治疗作用,其中冬虫夏草能明显抑制 LDL 引起的肾小球系膜细胞增殖[7],抑制人成纤维细胞的增殖、分裂及生长,并有抑制其合成 III 型胶原及透明质酸的作用[8]。三七的主要成分三七总皂甙(PNS)可促进人肾间质成纤维细胞凋亡,导致细胞生存数量减少,延缓肾间质纤维化,其机理可能与 c-myc 蛋白过度表达有关[9];还有研究发现 PNS 可明显抑制人肾成纤维细胞(KFB)增殖及分泌 I 型胶原,同时显著降低 KFB 上整合素 β_1 的表达,具有体外抗肾间质纤维化的作用[10]。

有学者把中医望诊进行微观延伸,认为显微镜下看到的肾纤维化的病理形态学改变,包括 ECM 积聚、球囊粘连、血管襻闭塞和肾疤痕形成等均是发生于肾脏的微癥积,从而提出了益肾消癥法治疗 CRF[11]。复方鳖甲软肝片其组方与《金匱要略》中的鳖甲煎丸有类似之处,而鳖甲煎丸正是常用于治疗各种癥积。用复方鳖甲软肝片治疗 CRF 正是充分体现了益肾消癥之法,鳖甲软坚散结,消癥散积,滋阴益肾,冬虫夏草益肾补阳,紫河车补肾益精,益气养血,三药益肾扶正治本。当归、赤芍、三七、炮山甲活血祛瘀治标,佐以连翘解毒,党参健脾益气。

总之,我们前期的临床研究表明,复方鳖甲软肝片能益肾消癥,对 CRF 有确切临床疗效,本实验研究证实该药能下调 CRF 大鼠肾组织 TGF- β_1 的过度表达,减轻肾脏病理组织学损伤从而发挥抗肾纤维化作用,提示复方鳖甲软肝片对肾组织 TGF- β_1 表达的下调作用可能是该药治疗 CRF 和抗肾纤维化的机制之一。复方鳖甲软肝片对肝、肾纤维化均有改善作用,因此,我们认为该药不应仅仅用于治疗早期肝硬化,临床上还可以在治疗 CRF 方面进一

步推广使用。

参考文献

1. 沈维增,谢峥伟,蔡军红,等.复方鳖甲软肝片延缓慢性肾功能衰竭进展的临床观察.中华实用中西医杂志,2004,17(4):353-355
2. Raji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. Kidney Int, 1984, 26: 137-143
3. Kang DH, Joly AH, Oh SW. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12: 1434-1447
4. 丁炜. TGF- β 与肾小球疾病进展的关系[J]. 国外医学·泌尿系统分册, 1999, 17: 274.
5. 易毛, 韩晋. 复方鳖甲软肝片. 中国新药杂志, 1999, 8(9): 631..
6. 谷海璞, 赵宗江, 杨美娟. 复方鳖甲软肝片对单侧输尿管结扎大鼠肾组织 NF- κ B 表达的影响. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(3): 137-139
7. 王筱霞, 吴兆龙. 冬虫夏草对离体人肾小球系膜增殖的影响. 中国临床药理学杂志, 2001, 10(1): 25
8. 王要军, 孙自勤, 权启镇, 等. 冬虫夏草对人成纤维细胞的形态及细胞外基质合成功能的影响. 滨州医学院学报, 1999, 22(3): 226
9. 张国强, 叶任高, 孔庆瑜, 等. 三七总皂甙诱导间质纤维化人肾成纤维细胞凋亡及其分子机理初探. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(2): 93-95
10. 韦颖, 樊均明, 潘丽萍. 三七总皂甙对人肾成纤维细胞的影响. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(1): 47-49
11. 王永钧, 张敏鸥. 痰瘀互结与肾内微型积. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(1): 1-3

[作者简介] 沈维增 (1972 -), 男, 硕士, 副主任医师。深圳市宝安区人民医院中医科工作。本项目为深圳市宝安区科技局立项课题 (NO: 2003169)。

灵芝孢子油诱导 Jurkat 细胞凋亡作用的研究

冯敏₁, 朱锦龙₂, 沈建₁, 冯鹏₁, 侯亚义₂

(1、南京中科集团股份有限公司中科研究院; 2、南京大学医学院免疫与生殖生物实验室)

灵芝孢子油是从灵芝中提取出来的天然药物成分, 具有调节血脂^[1], 增强免疫, 抗肿瘤等多方面作用。据

《神农本草经》记载, 灵芝, 苦平, 无毒, 益心气, 解胸中结, 增智慧, 不忘, 延年^[2]。其主要的提取成

分为三萜类和多糖类。相对于灵芝孢子粉,灵芝孢子油集中了灵芝孢子中的三萜类、核苷类及部分多糖类化合物,是灵芝孢子有效成分的集合体,是灵芝孢子抑瘤作用的“主力”。统计显示,20克灵芝孢子粉中才可以提纯出1克灵芝孢子油。刘景田等观察到,灵芝有增强淋巴细胞的免疫效应^[3],还有试验证实,小鼠腹腔注入灵芝孢子油可有效抑制Lewis瘤的生长,延长小鼠的生存时间^[4]。灵芝孢子油具有多方面的生物功能,但其作用的机制仍需进一步研究。

白血病是一种常见的临床恶性肿瘤,目前常规的治疗方法仍为放疗、化疗和手术,但这些手段副作用强烈,对病人的免疫功能损伤很大,而有报道指出,灵芝在白血病患者运用常规方法治疗时,辅以孢子油的服用,可有效抑制肿瘤的增值和扩散^[5],并且灵芝还能起到对放化疗的减毒作用^[6]。Jurkat细胞是白血病来源的T淋巴细胞系。在此实验中,以不同浓度的孢子油分别处理Jurkat细胞,24h后MTT法测定其增值和活力;以PI染色测定Jurkat细胞的凋亡情况;罗丹明123染色检测经孢子油处理后的细胞线粒体的膜电位的变化。

1 材料和方法

灵芝孢子油取自中国科学院南京中科集团股份有限公司, Jurkat细胞系购自上海中科院, PI染色液购自南京博士得公司, MTT购自南京凯基生物公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, 其他试剂都购于Sigma公司。流式细胞仪(FACSCalibur)为美国Becton Dickinson公司产品。酶标仪为美国Bio-Rad产品(型号为550)。灵芝孢子油的使用剂量按该产品的人体服用推荐量折算后配制。

1.1 细胞培养及处理

将处于对数生长期的Jurkat细胞($1 \times 10^6/\text{ml}$) 100ul接种到96孔培养板, 设定5个不同的处理组和一个不加药的对照组(标记为组1), 不同的浓度组从高到低分别加入孢子油40ul, 20ul, 10ul, 5ul和2.5ul(分别标记为组2、3、4、5、6), 共5个浓度组。然后加入RPMI1640培养液使得每孔液体量都达到150ul, 置于37℃, 5%的CO₂的培养箱中培养24h。

1.2 细胞增值和活力的测定

MTT法测定细胞活性, 将上述培养的细胞中每孔加入25 μl/孔MTT(5mg/ml), 置37℃, 含5%CO₂饱和湿度的培养箱中继续培养4h, 每孔中加入50 μl的20%SDS, 置于37℃过夜, 次日于BIL-RAD MODEL酶标仪570nm光波长处测定OD值; 每组重复5次。

1.3 FCM检测PI染色

取培养的各組细胞200 μl, 4℃, 400g, 离心5min, 获得细胞, 用PBS洗两次, 4℃, 400g × 5min; 加入1ml70%的乙醇固定, 过夜; 用PBS洗2次, 4℃, 3200g × 5min; 在离心后的细胞中加入1mlPI应用液,

4℃显色30min; 然后4℃, 1000g × 5min, 去上清; 用0.4mlPBS复悬细胞; FCM检测细胞的凋亡情况, Cellquest软件分析; 每组重复5次。

1.4 罗丹明123染色结果测定

取培养细胞悬液, 4℃, 400g, 离心5min, 获得细胞; 弃上清, 加入500ul罗丹明123染色液; 37℃培养箱中孵育15min; 4℃, 400g, 离心5min, 弃上清, 获得细胞; 用PBS洗2次, 4℃ 400 × g离心5min; 用500ul PBS复悬细胞; 在荧光酶标仪上检测530nm处的荧光强度值。每组重复5次。

1.5 统计学处理

实验数据以均数±标准差(mean ± s), 然后与对照组进行配对t检验, P<0.05时认为有显著性的差异。作图采用Origin软件。

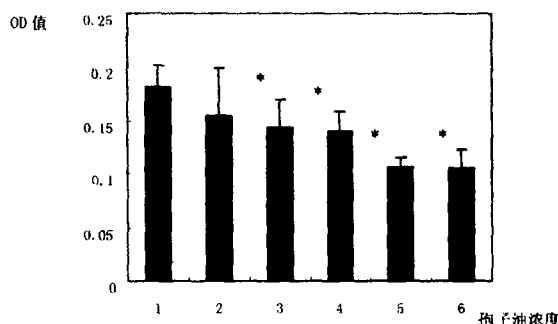
2 结果

2.1 细胞增值和活力

MTT分析发现, 与对照组相比, 孢子油能明显抑制Jurkat细胞的活力和增值, 并有剂量依赖效应(P<0.05)(图1)。在组2中, 数据无统计学意义, 而当孢子油的浓度继续上升, 在组3, 4, 5, 6中, 和对照组相比, 细胞活力指数和增值情况有明显的降低, 并且具有统计学意义(P<0.05), 这种降低趋势在最高两个浓度组尤为明显。

图1 孢子油对Jurkat细胞增值和活力的影响

2.2 细胞凋亡的情况



PI染色后流式细胞仪检测, 培养24h后对照组的凋亡率仅为3.24%, 经不同浓度的孢子油处理后, 细胞凋亡率逐渐升高, 2、3、4、5、6各组的凋亡率分别为4.08%、4.15%、4.25%、4.82%、10.98%。结果显示, 随着处理浓度的上升, Jurkat细胞的凋亡率亦有增强的趋势, 这在高浓度组尤为明显。(图2)

2.3 罗丹明123染色结果

罗丹明123染色后在530nm处检测其荧光强度, 对照组的荧光强度最高, 而随着处理浓度的上升, 荧光强

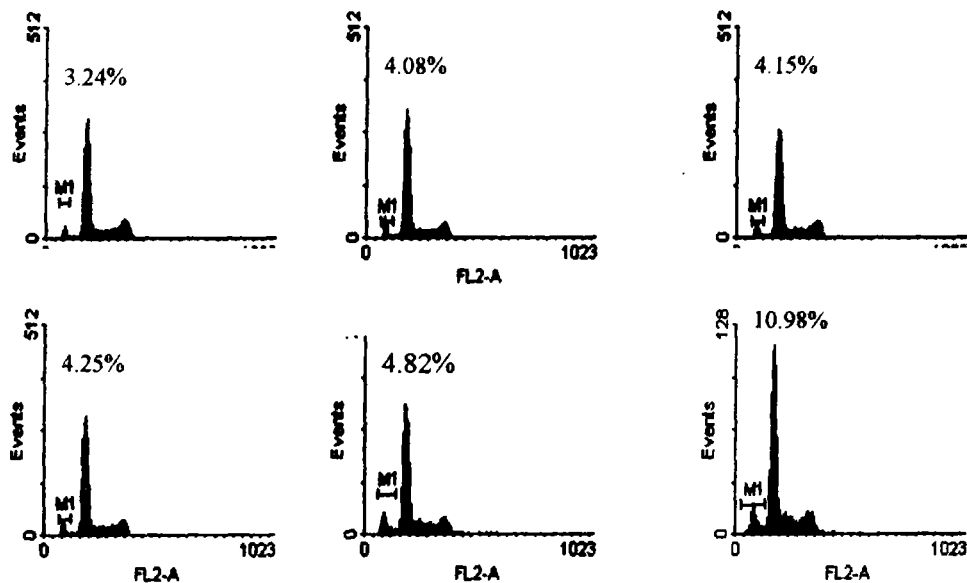


图2 不同孢子油浓度组处理24h后的Jurkat细胞的凋亡情况

度值有下降的趋势 ($P < 0.05$), 这在最高浓度组(组6)和对照组的比较中更为明显(图3)。组2和对照组相比, 荧光强度有轻微的降低, 组3虽有下降, 但无统计意义, 而高浓度组(4, 5, 6)明显降低, 罗丹明结合减少, 且都具有统计意义。

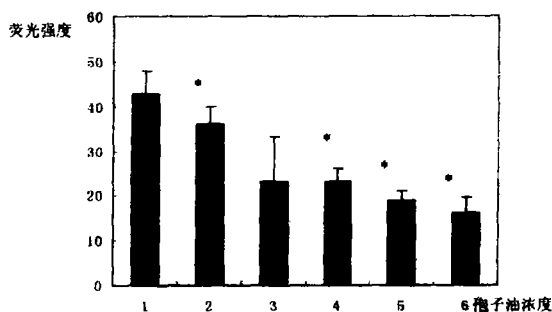


图3 不同孢子油浓度组处理Jurkat细胞24h后罗丹明123染色结果

3 讨论

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是中国古老的药草。据《本草纲目》和《神农本草经》记载, 灵芝具有广泛的调节人体机能, 增强抵抗力, 延缓衰老的功效, 是良好的保健和医疗用品。而灵芝孢子油则是灵芝孢子破壁之后运用高科技提取的精炼成分, 集中了灵芝孢子中三萜类、多糖类、核酸类等全部有效成分^[7]。

有研究指出, 干扰素- $\alpha 2b$ 联合灵芝孢子油胶囊对乙型肝炎病毒有显著的缓解作用^[8], 联合治疗后, 治疗组HBV-DNA的转阴率均高于对照组, 结果显示干扰素- $\alpha 2b$ 联合灵芝孢子油胶囊可抑制病毒的复制, 提高HBV-DNA的转阴率, 缓解病情。还有报道指出, 通过给荷瘤小

鼠进行不同剂量的灵芝孢子油灌胃, 实验发现灵芝孢子油可以有效减小瘤体的大小和重量, 表明孢子油有良好的抑瘤作用, 并且其抑瘤作用呈量效关系^[9]。

Jurkat细胞是一种白血病的T淋巴细胞系, 有接触依赖性的辅助性T细胞活性。我们以它为材料来研究孢子油是否对其生长有促进或是抑制作用。

肿瘤在人体的发生过程是一个长期的过程, 是一个可逆的过程, 尽管不同的致癌机理不同, 但它们均能引起细胞的选择性克隆性增殖, 直到形成一个过够大的增殖细胞群, 产生并累计新的遗传性损伤, 不再依赖促癌因素而持续性生长。在肿瘤的形成过程中, 一方面致癌基因发挥作用, 一方面抑癌基因、免疫细胞, Trail、Fas/Fal介导到的细胞凋亡作用也对抑制肿瘤的生长有很大的作用^[10]。研究表明线粒体膜电位的降低和去极化可停止合成ATP, 使得能量代谢受损, 从而导致线粒体膜渗透性开放, 细胞发生凋亡^[11, 12]。

在我们的实验中, 结果显示, 灵芝孢子油作用于Jurkat细胞24h后, 高浓度组与对照组相比, 有明显的抑制细胞活力和促进凋亡的趋势; 流式细胞仪检测, 孢子油作用24h后效应尤为明显, 其凋亡峰升高显著; 酶标仪测定罗丹明123染色后的荧光强度, 高浓度组的强度值低于对照组, 提示处理后的罗丹明结合减少, 而细胞线粒体膜电位有倒塌和变化情况发生, 并且在实验中发现, 孢子油对Jurkat细胞的诱导凋亡作用有明显的剂量效应关系。但其发挥作用的机制不清楚, 这方面机理的探讨对于孢子油能否在肿瘤的预防和治疗方面发挥作用有很重要的意义。

参考文献

1. 魏. 吴普等述, 清. 孙星衍辑 神农本草经 沈阳 辽宁科学技术出版社, 1997, 9
2. 张卫民, 孙晓明等. 灵芝孢子粉免疫调节作用的研究. 中国野生植物资源, 2001, 20 (2): 14-16
3. 刘景田, 党小军. 中药多糖增强淋巴细胞免疫效应和机制的研究. 中国药理学杂志, 1999, 34 (12): 807-808
4. Ma L, Lin Z B. Antitumor effects of Ganoderma lucidum polysaccharide peptides. 中国药理学报, 1995, 16 (1): 78
5. 孙美芳, 魏凌珍. 灵芝孢子拮抗环磷酰胺毒副作用作用的试验研究. 中国公共卫生, 2001, 17 (6): 509-510
6. 张馨, 崔文明. 灵芝孢子油抗突变和抑制肿瘤作

用的实验研究. 中国公共卫生, 2003, 19 (2): 173-175

7. 河山 科技托起国药粹 仁心悬壶济苍生[J], 医药世界 企业专刊: 60-62.

8. 钱小奇, 陈红, 金泽秋, 吴荣民. 干扰素-a2b 联合灵芝孢子油胶囊对 39 例乙型肝炎病毒 DNA 的影响[J], 中医研究, 2005, 18 (1): 29-30.

9. 袁玉荪. 灵芝孢子油抗移植性肝癌实验研究[J], 安徽医药, 2004, 9(3): 173-174.

10. Wisor JP, Nishino S, Sora I, et al. Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness[J], J Neurosci, 2001, 21(5): 1787-1794.

11. Yihong Wei, Liu Guoqing Inhibition of Hydrogen Peroxide-induced PCI2CeU Apoptosis[J], Journal of China pharmaceutical University 2004, 35(3): 271-275

[12. Scorrano L, Niccoli A, Basso E. Two modes of activation of the permeability transition pore: the role of mitochondria cyclophilin. Mol Cell Biochem, 1997, 174: 181-184

中药促进脑缺血损伤后神经干细胞增殖分化研究进展与华佗再造丸药理研究

余善强 王波

(广州奇星药业有限公司 510310)

缺血性脑中风是临床上最多见的急性脑血管疾病, 具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高和并发症多等“四高一多”的特点, 其发病原因、发病机制及治疗方法目前仍不是很清楚。特别是对其恢复期和后遗症的治疗, 可以说还基本上没有什么好办法。虽然有一些药物或中药对中风后神经功能的恢复有一定的帮助, 但具体作用机制和作用环节不明, 现有的一些研究结论也显然没有足够的说服力。如从增加脑部供血、改善微循环、保护脑细胞、抑制细胞凋亡、拮抗兴奋性毒性、清除自由基、抗炎、促进神经营养因子合成等角度来证明药物的疗效, 但专家认为具有这些作用的药物, 甚或根据这些药理作用针对性开发的专门药物, 在临床上并无确切的疗效。

近年来, 随着人们对成年动物脑组织中存在的具有多种潜能的神干细胞 (NSC) 研究的深入, 发现 NSC 能自我更新和向多方向分化, 并可在一定条件下分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等, 据此认为中枢神经系统神经元是有可能再生和重建的。所以, 对中枢神经系

统变性疾病和损伤性疾病, 如运动神经元病、帕金森氏病、脑卒中、颅脑外伤或老年痴呆等的治疗观念发生了根本性变化, 已不是单纯着眼于阻止神经变性疾病的恶化和减少可逆性受损神经元的死亡, 而是更注重各种治法对 NSC 增殖、分化、迁移和神经元再生的促进作用, 甚或直接进行外源性 NSC 移植。其中 NSC 移植, 由于伦理学和技术方面还不成熟, 故较难应用于缺血性脑中风的治理。

中药对脑中风的治疗有非常悠久的历史, 也取得了不错的疗效。特别是清朝以来, 在西学的影响下, 以王清任为代表的医学家提出了中风是由于瘀血入脑, 闭阻脑络, 并开始应用以活血化瘀为主的方药进行治疗, 疗效也更为明显。但中药对脑中风后神经功能的恢复作用是否与其促进脑缺血后 NSC 的增殖分化和迁移有关? 华佗再造丸是根据活血化瘀、化痰通络的原则, 采用纯植物药组方的治疗中风的中成药, 临床应用已有 20 年的历史, 为政府规定的保密处方产品, 对中风恢复期和后遗症的治疗效果肯定, 1988 年曾被国家科委组织的专家