

黄芪甲苷对脂多糖刺激单核细胞的保护作用及其机制研究

冀晓俊, 李 昂, 段美丽, 张淑文

(首都医科大学附属北京友谊医院重症医学科, 北京 100500)

【摘要】 目的 观察黄芪甲苷对脂多糖(LPS)刺激的单核细胞能否起保护作用及其机制。方法 以LPS刺激体外培养的大鼠单核细胞,首先观察LPS诱导单核细胞发生凋亡的最佳浓度,再将黄芪甲苷按浓度梯度(分别为1 000、300、100、30、10、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)加入细胞培养上清液中,测定其最大无毒浓度(TD_0)及半数中毒浓度(TD_{50});并以不同浓度黄芪甲苷干预,测定黄芪甲苷的半数有效浓度(ED_{50})和95%有效浓度(ED_{95})。采用异硫氰酸荧光素/藻红蛋白标记的膜联蛋白V (Annexin V-FITC/PI)染色和赫斯特荧光染料(Hoechst33258)荧光单染,流式细胞仪观察黄芪甲苷对LPS所致细胞凋亡的保护作用。结果 LPS在单核细胞培养上清液中的浓度为100 ng/ml时可以诱导细胞凋亡,凋亡率为(43.67 \pm 7.14)%。黄芪甲苷的 TD_0 >1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, TD_{50} 无法测出,其 ED_{50} 和 ED_{95} 分别为27.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和101.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$;用100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 黄芪甲苷进行干预后,培养的细胞贴壁良好,核浓缩、核着边等现象显著减少,凋亡率明显下降(P <0.01)。结论 黄芪甲苷对LPS刺激后的单核细胞有保护作用,其机制与抑制细胞凋亡有关。

【关键词】 脂多糖; 黄芪甲苷; 单核细胞; 凋亡

中图分类号:R285.5;Q813.11 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.006

A study on protection and mechanism of astragaloside IV on monocytes stimulated by lipopolysaccharide JI Xiao-jun, LI Ang, DUAN Mei-li, ZHANG Shu-wen. Intensive Care Unit, Beijing Friendship Hospital, Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100500, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of astragaloside IV on monocytes stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** LPS was introduced into culture medium of monocytes to come into being inflammation model in vitro. And the optimal concentration of inducing monocyte apoptosis was investigated. The concentrations of astragaloside IV used in this experiment were 1 000, 300, 100, 30, 10, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Then the data of maximum nontoxic dose (TD_0), 50% toxic dose (TD_{50}), effective dose in 50% (ED_{50}) and effective dose in 95% (ED_{95}) were calculated by DAS software. Annexin V-fluorescein isothiocyanate/phycoerythrin (FITC/PI) staining and Hoechst 33258 fluorescence staining were used, and flow cytometry was applied to observe the protective effects of Astragaloside IV on LPS-induced apoptosis. **Results** The phenomenon of cell apoptosis was significant when the concentration of LPS in supernatant fluid reached 100 ng/ml, the rate of apoptosis being (43.67 \pm 7.14)%. The TD_0 of astragaloside IV on monocytes was higher than 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the datum of TD_{50} could not be obtained. The data of ED_{50} and ED_{95} of astragaloside IV was 27.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 101.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Astragaloside IV (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) could significantly inhibit the occurrence of apoptosis induced by LPS; the cultured monocytes well adherent to the wall and the phenomena of apoptosis reduced remarkably, such as, chromatin margination and nuclear condensation; the rate of apoptosis was decreased obviously (P <0.01). **Conclusion** Astragaloside IV exhibits the protective effect on monocytes infected by LPS. The mechanism is related to its inhibitory effect on LPS-induced monocyte apoptosis.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Astragaloside IV; Monocyte; Apoptosis

严重脓毒症的抗炎治疗是临床难题。已有研究认为黄芪多糖可发挥部分抗炎作用^[1]。本课题组前期研究已证实多种黄芪分离物均有不同程度的抗炎作用,其中以黄芪作用甲苷尤甚。本研究旨在观察黄芪甲苷对脂多糖(LPS)诱导的细胞凋亡是否具有抑制作用。

1 材料与方

1.1 实验动物与试剂:8周龄雄性Wistar大鼠,体重210~230 g,平均(220 \pm 15) g,购自中国医学科学院基金项目:国家知识产权局专利(200810101220.8)

作者简介:冀晓俊(1973-),男(汉族),山西省人,医学博士,主治医师。

学院实验动物研究所(动物许可证号:SCXKII-07-0012);RPMI1640培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(北京元亨圣马公司),LPS(E. coli, O111:B4,北京碧云天生物技术研究所);异硫氰酸荧光素/藻红蛋白标记的膜联蛋白V (Annexin V-FITC/PI)染色和赫斯特荧光染料(Hoechst33258)荧光单染试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 药物制备:黄芪甲苷由中国科学院兰州化学物理研究所提纯分离,纯度97.6%。使用时用二甲亚砜(DMSO)将药物完全溶解,再溶于DMEM培养基中,过滤除菌,4℃保存备用。使用时用倍比稀释

方法分别稀释为 1 000、300、100、30、10、3 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.3 LPS 刺激单核细胞模型建立^[2-3]: 分离并培养外周血单核细胞, 以锥虫蓝染色检查细胞存活率 [(细胞总数 - 蓝色细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$]。细胞贴壁后 24 h 换液, 以生理盐水溶解 LPS, 过滤除菌; 分别以 1 000、500、100、10 ng/ml 梯度浓度加入细胞培养上清液, 通过流式细胞仪检测 LPS 对单核细胞的影响。

1.4 黄芪甲苷的药物毒性实验: 测定黄芪甲苷最大无毒浓度 (TD_0) 及半数中毒浓度 (TD_{50})^[4]。正常培养单核细胞, 待细胞融合达 75% 时加入不同浓度黄芪甲苷, 同时设空白对照组, 作用 72 h 后, 加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 进行活细胞染色, 酶标仪检测各组波长 570 nm 处的细胞吸光度 (A) 值, 依据 DAS 软件计算黄芪甲苷对单核细胞的毒性。

1.5 黄芪甲苷的药效学实验: 测定黄芪甲苷半数有效浓度 (ED_{50}) 和 95% 有效浓度 (ED_{95})^[4]。在 96 孔板中培养单核细胞, 分为空白对照组、LPS 刺激组、药效测定组 (不同浓度黄芪甲苷 + LPS)。当 LPS 刺激组细胞接近全部死亡时 (约 72 h), 加入 MTT 进行活细胞染色, 利用酶标仪检测细胞 A 值, 依据 DAS 软件计算黄芪甲苷药效学指标。

1.6 细胞凋亡实验: 用流式细胞仪分析细胞凋亡率^[5]。将各组细胞培养 48 h 后, 进行消化、乙醇固定; 加入 RNA 酶 A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min; PI 暗染 30 min, 用流式细胞仪进行凋亡分析。

1.6.1 Annexin V-FITC/PI 染色方法: 将单核细胞分组培养至显微镜下有明显差异后, 弃上清液, 用冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次; 依次加入 Binding 缓冲液和 Annexin V-FITC, 避光室温反应 15 min 后加入 2.5 μl PI; 用激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 检测并照相。

1.6.2 Hoechst33258 荧光单染观察染色质凝聚: 细胞消化后以 PBS 冲洗 2 次, 加入 Hoechst33258 (终浓度 10 $\mu\text{g/ml}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱染色 30 min; 涂片, 荧光显微镜下观察并摄像。

1.7 统计学方法: 实验数据采用 SPSS 统计软件分析, 药效学指标依据 DAS 软件。统计数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 one-way ANOVA 检验及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪甲苷的药物毒性结果 (图 1): 不同浓度黄芪甲苷作用于单核细胞后 MTT 染色显示, 各组 A 值间比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 无法测

出黄芪甲苷的 TD_{50} , 可以认为黄芪甲苷在单核细胞水平的 $\text{TD}_0 > 1 000 \mu\text{g/ml}$ 。

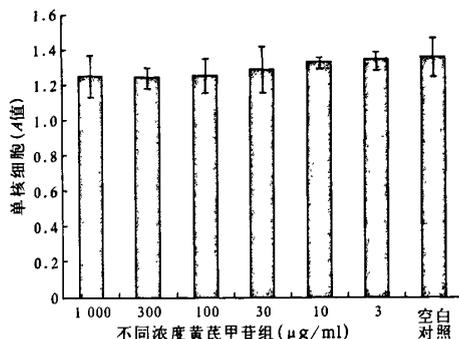


图 1 不同浓度黄芪甲苷作用于单核细胞 MTT 染色后 A 值

2.2 黄芪甲苷的药效学结果 (图 2): 约 72 h 倒置显微镜下观察 LPS 刺激组细胞接近全部死亡, 用酶标仪检测细胞 A 值, 依据 DAS 软件计算出黄芪甲苷 ED_{50} 为 27.31 $\mu\text{g/ml}$ 、 ED_{95} 为 101.29 $\mu\text{g/ml}$ 。在后续实验中, 以 100 $\mu\text{g/ml}$ 作为黄芪甲苷的实验浓度。

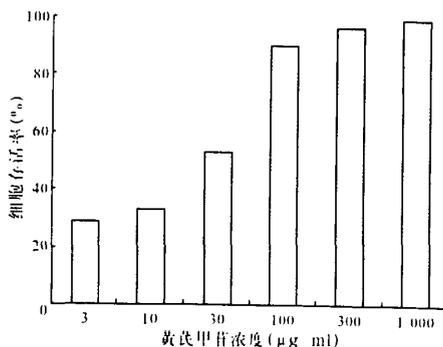


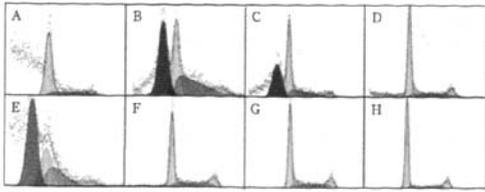
图 2 不同浓度黄芪甲苷干预 LPS 刺激后的单核细胞存活率

2.3 黄芪甲苷对 LPS 引起细胞凋亡的影响 (表 1; 图 3): LPS 浓度为 1 000 ng/ml 时, 单核细胞大部分坏死, 流式细胞仪检测不出凋亡细胞的存在; 当浓度 $< 100 \text{ng/ml}$ 时, 能够检测到显著的凋亡峰。黄芪甲苷浓度在 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上能够显著抑制 LPS 诱导的细胞凋亡 (均 $P < 0.01$)。

表 1 黄芪甲苷对不同浓度 LPS 致细胞凋亡率的影响 ($n=8$)

LPS 浓度 (ng/ml)	黄芪甲苷浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	LPS 浓度 (ng/ml)	黄芪甲苷浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)
1 000	0	—	100	50	36.37 \pm 6.54
500	0	48.84 \pm 6.88	100	100	6.15 \pm 2.24*
100	0	43.67 \pm 7.14	100	200	0.93 \pm 0.21*
10	0	14.21 \pm 2.17	0	0	0.34 \pm 0.07

注: *代表坏死, 与 LPS 100 ng/ml 、黄芪甲苷 0 时比较, * $P < 0.01$



A、B、C、D 仅加入 LPS, 浓度分别为 1 000、500、100 和 10 ng/ml; E、F、G 中加入固定浓度的 LPS(100 ng/ml), 黄芪甲苷浓度分别为 50、100 和 200 μg/ml; H 为空白对照组

图 3 黄芪甲苷对 LPS 引起细胞凋亡的影响

2.4 黄芪甲苷对单核细胞的保护作用(彩色插图 4~5): 空白对照组细胞贴壁良好。LPS(100 ng/ml) 刺激组大部分细胞已死亡, 开始脱离贴壁, 存在的细胞表现为明显的凋亡形态; 核着边、核浓缩。黄芪甲苷(100 μg/ml) 干预组细胞贴壁良好, 观察不到凋亡变化, 说明黄芪甲苷抑制 LPS 引起细胞凋亡发生。

3 讨论

脓毒症时过度全身炎症反应是引起器官功能损害甚至死亡的根本原因, 目前针对脓毒症炎症反应治疗的临床效果并不理想, 未能提高治愈率及患者生存率。因此, 寻找有效抗炎治疗手段有重要意义。

黄芪具有良好的免疫调节作用, 可通过提高血清白细胞介素-2(IL-2)改善机体细胞免疫功能^[6]。本课题组前期研究表明, 黄芪可抑制急性感染患者血中一氧化氮(NO)的大量产生, 使肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-1、IL-6 水平迅速下降, 减轻促炎因子的病理损害等作用, 表明黄芪具有抑制炎症反应的作用^[7-9], 但其有效药用部位的物质基础及作用靶位一直没有明确定论。黄芪主要含有黄芪苷 I、II、IV 等皂苷类、黄酮类、氨基酸类、多糖类、生物碱等。目前, 黄芪多糖是研究最多的化学组分, 其药理作用非常广泛, 包括免疫调节、抗肿瘤、调节血糖、抗菌抗病毒等^[10-13]; 但是对于黄芪的其他化学成分研究不多。本课题组经过多年研究, 证实多种黄芪分离物均有不同程度的抗炎作用, 其中黄芪甲苷作用尤甚, 而且黄芪甲苷作为一种单体化合物, 具备开发一类新药的潜力, 通过包括本研究在内的系列实验, 目前已获取黄芪甲苷在体外的毒性数据(TD₅₀和 TD₀), 并掌握黄芪甲苷对抗 LPS 损伤单核细胞的药效学数据, 充分证明黄芪甲苷在抗炎治疗方面具有极大的潜在药用价值。在本研究药理学实验中, 通过对 LPS 引起单核细胞凋亡的观察, 明确了抑制细胞凋亡是黄

芪甲苷保护单核细胞的主要机制之一。但是, 细胞凋亡是一个复杂的过程, 其机制不仅涉及细胞内多条通路, 如膜受体激活、细胞色素 C 释放和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活途径、线粒体途径等, 而且与体内免疫状态(各种细胞因子及免疫细胞活性)存在密切关系。因此, 本课题组下一步将利用大鼠建立体内炎症模型, 进一步探索黄芪甲苷抑制细胞凋亡机制的确切机制, 为黄芪甲苷应用于抗炎治疗奠定理论基础。

参考文献

- [1] Gao XH, Xu XX, Pan R, et al. Saponin fraction from Astragalus membranaceus roots protects mice against polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture by inhibiting inflammation and upregulating protein C pathway. *J Nat Med*, 2009, 63(4): 421-429.
- [2] Diebel LN, Amin PB, Liberati DM. Sequence of immunoglobulin isotype exposure modulates inflammatory response to bacteria and lipopolysaccharide in vitro. *Surg Infect (Larchmt)*, 2010, 11(2): 145-150.
- [3] 唐文红, 崔燕红, 邓小明, 等. 丙泊酚对 LPS 刺激人单核细胞分泌 TNF-α 及 TLR4 表达的影响. *山东医药*, 2008, 48(26): 52-53.
- [4] 刘建文. 药理实验方法学——新技术与新方法. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [5] Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(6): 1019-1028.
- [6] 蔡葵, 黄青青, 苏美仙, 等. 肠内营养加黄芪对创伤大鼠白介素-2 水平的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(3): 160-161.
- [7] Hu JY, Han J, Chu ZG, et al. Astragaloside N attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte damage in rats by upregulating superoxide dismutase-1 levels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(4): 351-357.
- [8] 张成明, 于金玲, 王海霞, 等. 黄芪注射液对感染性休克大鼠心肌损伤的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(1): 47-50.
- [9] Jiang B, Yang Y, Jin H, et al. Astragaloside N attenuates lipolysis and improves insulin resistance induced by TNFα in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res*, 2008, 22(11): 1434-1439.
- [10] 杨富国, 刘革新, 王力. 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤血管内皮细胞核转录因子-κB 表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6): 367-369.
- [11] Zhang ZC, Li SJ, Yang YZ, et al. Effect of astragaloside on cardiomyocyte apoptosis in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(2): 145-151.
- [12] Song S, Liu Z, Wang H, et al. QiHong prevents death in coxsackievirus B3 induced murine myocarditis through inhibiting of virus attachment and penetration. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232(11): 1441-1448.
- [13] 余林中, 胡孔友, 刘建新, 等. 内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织信号转导和转录激活因子 1 的调控作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(7): 387-389.

(收稿日期: 2010-07-13)

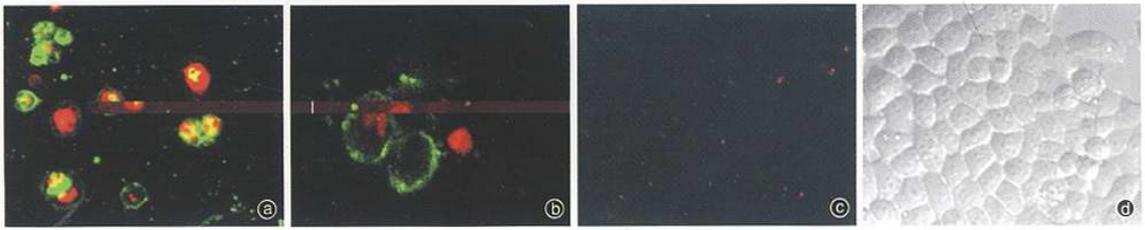
(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ① 珠海健帆: 血液灌流器 (封二)
- ② 天津红日药业: 血必净注射液 (封底)

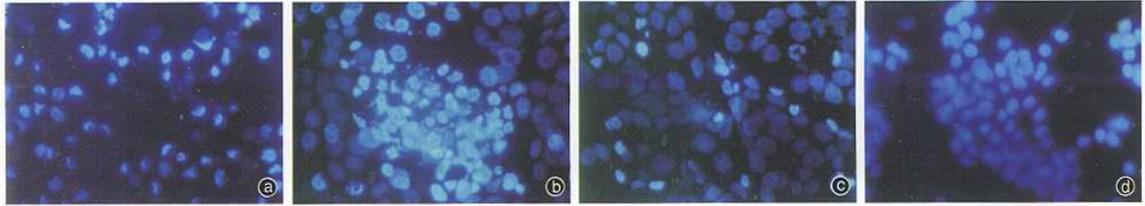
黄芪甲苷对脂多糖刺激单核细胞的保护作用及其机制研究

(正文见271页)



①: LPS 刺激组 (AnnexinV-FITC/PI 染色, ×500), ②: LPS 刺激组 (AnnexinV-FITC/PI 染色, ×1 000),
③: 黄芪甲苷干预组 (AnnexinV-FITC/PI 染色, ×500), ④: 黄芪甲苷干预组 (×500)

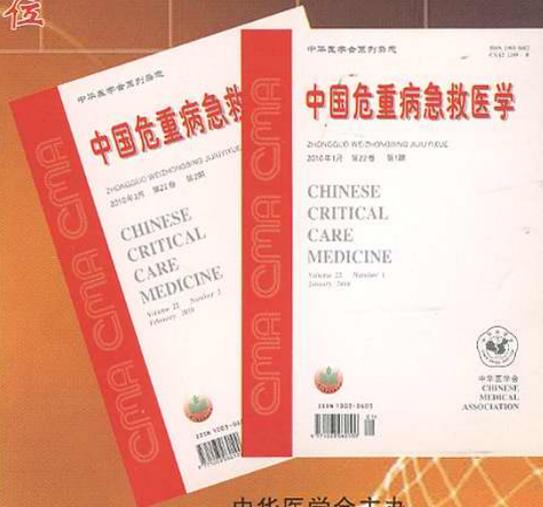
图4 LSCM 下观察黄芪甲苷对LPS刺激单核细胞的保护作用



①: LPS 刺激组 (细胞凋亡), ②: LPS 刺激组 (细胞死亡), ③: 黄芪甲苷干预组, ④: 空白对照组

图5 荧光显微镜下观察黄芪甲苷药理学结果 (Hoechst33258 荧光单染, ×200)

中文核心期刊 论文统计源期刊
影响因子分别排全国前三位



欢迎订阅
欢迎投稿

中华医学会主办
邮发代号: 6-58
月刊 全年定价: 168.00元

中国中西医结合学会主办
邮发代号: 6-93
双月刊 全年定价: 60.00元

刊社地址: 天津市和平区睦南道122号 邮编: 300050

请到当地邮局办理订阅手续, 也可到本刊发行部订阅

电话: 022-23197150 传真: 022-23306917

Email: cccm@em120.com

万方数据