

喘可治注射液对 COPD 大鼠 IL-12/IL-12R /STAT4 信号通路的影响

黄纯美¹, 张蓓², 许仕杰³, 李耿², 单丽因³, 林旋龄⁴, 刘小虹³(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 4. 广州中医药大学第二附属医院芳村分院, 广东 广州 510370)

摘要: **目的** 观察喘可治注射液(CKZ)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织 IL-12/IL-12R/STAT4 信号通路的影响。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, CKZ 高、中、低剂量(CKZ-H、CHZ-M、CKZ-L)组。除正常组外, 各组复制 COPD 大鼠模型, 并给予相应药物治疗, 观察 CKZ 对 COPD 大鼠血清和肺泡灌洗液(BALF)中 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素 12(IL-12)、白细胞介素 12 受体(IL-12R)以及肺组织信号转导子和转录激活子 4(STAT4)mRNA 表达的影响。**结果** 喘可治注射液各剂量组肺组织病理形态均有不同程度的改善, 且降低 COPD 大鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12、IL-12R(除 CKZ-L 组 BALF 中 IL-12R 外)水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), 可抑制大鼠肺组织 STAT4 mRNA 的表达($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 喘可治注射液能一定程度改善 COPD 大鼠肺组织病理损害, 其作用机制可能与其抑制 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 表达, 干扰 IL-12/IL-12R/STAT4 信号通路对靶基因的激活, 下调 STAT4 mRNA 表达, 进而调节 Th1/Th2 分化失衡有关。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; IL-12/IL-12R/STAT4 信号通路; 喘可治注射液; Th1/Th2 分化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0044-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.011

Effects of *Chuankezhi* Injection on IL-12/IL-12R/STAT4 Signal Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats

HUANG Chunmei¹, ZHANG Bei², XU Shijie³, LI Geng², SHAN Linan³, LIN Xuanling⁴, LIU Xiaohong³(1. First Clinical Medicine School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 4. Fangcun Branch Hospital of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510370 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effects of *Chuankezhi* injection(CI) on IL-12/IL-12R/STAT4 signal pathway in the pulmonary tissue of chronic obstructive pulmonary disease(COPD) rats. **Methods** Fifty SD rats were randomized into 5 groups, i.e., normal group, model group, and high-, medium- and low-dose CI groups. COPD rat model was established, and then were given various concentrations of CI. The effects of CI on serum and bronchoalveolar lavage fluid(BALF) interferon gamma(IFN- γ), IL-12 and IL-12R, and pulmonary mRNA expression of signal transducer and activator of transcription 4(STAT4) in COPD rats were observed. **Results** The pathological morphology of lung tissues was improved to different degrees in CI groups. High-, medium- and low-dose CI could decrease the serum and BALF levels of IFN- γ , IL-12 and IL-12R($P < 0.05$, $P < 0.01$), and inhibit the mRNA expression of STAT4 in lung tissues of COPD rats ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** CI can improve lung tissue pathological damage of COPD rats to certain degree. Its therapeutic mechanism may be associated with the inhibiting IFN- γ , IL-12, IL-12R expression, and interfering the activation ability of IL-12/IL-12R/STAT4 signaling pathway on target genes, down-regulating the mRNA expression of STAT4, and then adjusting the imbalance of Th1/Th2 differentiation.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease; IL-12/IL-12R /STAT4 signal pathway; *Chuankezhi* injection; Th1/Th2 differentiation

收稿日期: 2014-07-23

作者简介: 黄纯美, 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 中西医结合防治慢性阻塞性肺疾病。Email: chunmei@gzucm.edu.cn。通讯作者: 刘小虹, 教授, 研究方向: 慢性阻塞性肺疾病的中西医结合防治研究。Email: rslxh@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B031800268); 广东省中医药局科研项目(20121215)。

吸烟激发、T 细胞介导自身免疫失衡是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 可能的发病机制之一^[1], Th1/Th2 细胞分化失衡可诱导 COPD 慢性炎症和气道重构^[2]。研究显示^[3-6], 白细胞介素 12 (Interleukin 12, IL-12) 及其受体 (IL-12R)/ 信号转导子和转录激活子 4 (signal transducers and activators of transcription, STAT4) 即 IL-12/IL-12R/STAT4 信号转导通路可特异性诱导 Th1 型细胞因子表达, 在调节 Th1/Th2 细胞分化中发挥关键作用。中医学认为, 慢性咳嗽的发生与肾中阳气虚损密切相关。补肾平喘中药喘可治注射液是国家二类新药, 由中药淫羊藿和巴戟天组成, 临床上较广泛用于慢性支气管炎、哮喘、COPD 等慢性咳嗽疾病的防治, 对预防、延缓 COPD 的形成及发展疗效显著。本研究基于 COPD “本虚” 的关键病因病机, 采用动物实验的研究方法, 探讨喘可治注射液 “补肾温阳、固本培元” 作用对 COPD 大鼠模型的防治作用, 观察喘可治注射液对 COPD 大鼠血清和肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-12、IL-12R、 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 以及肺组织 STAT4 mRNA 表达的影响, 从 IL-12/IL-12R/STAT4 信号通路阐述喘可治注射液调节 COPD Th1/Th2 失衡和防治该病的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 50 只健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 (200 ± 20)g, 广州中医药大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2008-0020。随机分为正常组, 模型组, 喘可治注射液高剂量组 (CKZ-H)、喘可治注射液中剂量组 (CKZ-M)、喘可治注射液低剂量组 (CKZ-L), 共 5 组, 每组 10 只。

1.2 药物及试剂 喘可治注射液, 广州万正药业有限公司生产, 批号: 12081302; 脂多糖 (LPS), 美国 Sigma 公司, 批号: L2880; 椰树香烟, 广东中烟工业有限公司, 焦油量 11 mg; Rat IFN- γ 、IL-12、IL-12R 酶联免疫检测试剂盒, 广州有田生物科技有限公司; Trizol reagent, 批号: 15596-026, 美国 Invitrogen 公司; cDNA 试剂盒, 美国 Fermentas 公司, 批号: 00093395; SYBR Premix Ex Taq™ II 及引物, 上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 仪器 自制熏烟箱, 规格: 50 cm(长) × 50 cm(宽) × 50 cm(高); TC-3K 电子天平, 深圳市华恒科技有限公司; LF26-MESJ 分析天平, 香港佳立国际有限公司; 光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; FINESSE 自动石蜡切片机, 英国 SHANON 公司;

DT62067 微量移液器, 大龙医疗设备有限公司; RT-2100C 酶标仪, 深圳雷杜公司; R1011122 Rotor-Gene QPCR 仪, 德国 QIAGEN 公司; Ultra Pure UF 纯水系统, 上海和泰仪器有限公司; YXQ-LS-30S II 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; AIR TECH 超净台, 苏州净化集团有限公司; TGL-16G-A 冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; HARRIS ELT-13V-85V34 005L-515999-OL 超低温冰箱, 美国 Revco Technologies 公司。

1.4 COPD 大鼠模型制备 参考宋一平等^[7]香烟烟熏加气管滴注 LPS 方法复制 COPD 大鼠模型。将大鼠放入自制熏烟箱内, 从一侧的进烟孔点燃香烟进行被动吸烟染毒。第 1, 14 d 将模型大鼠用 10% 水合氯醛 (3.5 mL·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉后经气管滴注 200 μ g· μ L⁻¹ LPS 0.2 mL, 第 2~28 d (滴注 LPS 当天不烟熏), 给予模型组及 CKZ 各剂量组大鼠香烟烟熏, 每天 1 次, 每只大鼠 1 支烟, 每次 1 h。模型复制时间共 4 周。模型复制结束后 1~3 d 各组大鼠常温正常喂养, 不予烟熏或滴注 LPS。

1.5 给药及标本采集 CKZ 各组自实验第 4 天分别给予高 (7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中 (3.75 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低 (1.875 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 剂量喘可治注射液腹腔注射, 正常组和模型组予 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 生理盐水腹腔注射。用药至模型复制结束后第 3 天, 共 28 天。第 31 d 末次给药后全部大鼠杀检, 大鼠腹主动脉采血、左主支气管及左肺无菌生理盐水灌洗取 BALF, 经离心、取上清液, 取大鼠左肺组织冻存管装好, 均放置 -80 °C 低温冰箱保存待检; 取右肺中叶 4% 多聚甲醛固定, 用于 HE 染色。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 大鼠肺组织病理检测 常规 HE 染色, 光学显微镜下观察肺组织病理变化。

1.6.2 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 的 ELISA 测定 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测实验大鼠血清和 BALF IFN- γ 、IL-12、IL-12R 水平, 严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行。

1.6.3 肺组织 STAT4 mRNA 实时荧光定量 PCR 技术 (RT-PCR) 检测 引物 STAT4 及内参 GAPDH 的设计与合成均由上海生工生物工程股份有限公司完成; GAPDH: 上游 5'-TCT ACA TGT TCC AGT ATG AC T CTA CC -3', 下游 5'-ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA -3'; STAT4: 上游 5'-GCC TCA AGT

GGG TGG AGA AAT G -3', 下游 5'- CTC TCT CCG TCC AGG CAG TG -3', 纯水稀释溶解至 2 μmol L, 分装后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用; 采用 Trizol 法提取总 RNA, 并经过逆转录、RT-PCR 反应获取数据, 反应体系含 DNA 模版 1 μL , SYBR Premix Ex Taq™ II (2 \times) 15 μL , 10 μmol L 引物各 0.5 μL , ddH₂O 13 μL , 共 30 μL , 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环。数据分析则分别测定每个样品的内参 GAPDH 和 STAT4 mRNA 的 CT 值, 每个样品均做复孔以减少误差, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来表示所检测样本相对于对照样本目的基因的表达倍数。

1.7 统计学处理方法 实验数据采用 SPSS17.0 统计软件进行处理, 计量资料做方差齐性检验, 若 $P > 0.05$, 则方差齐, 多组均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 两两之间比较采用 LSD-t test; 若 $P < 0.05$, 则方差不齐, 用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并使用 Brown-Forsythe 或 Welch 校正, 两组间比较采用 Dunnett's T3 检验。实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

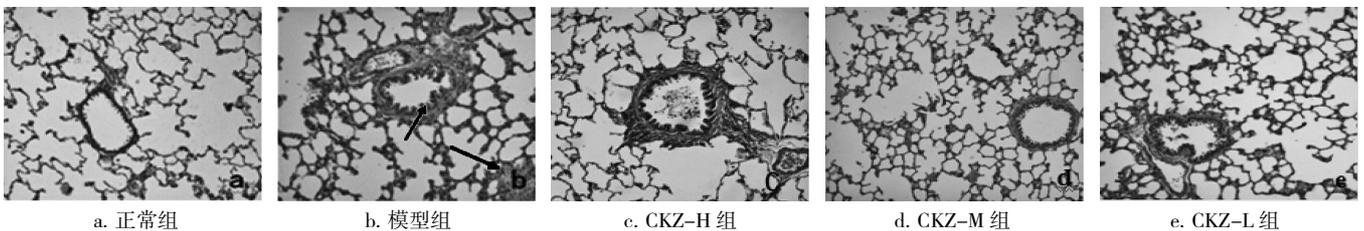


图 1 各组大鼠肺组织病理学形态(HE 染色, 100 \times)

Figure 1 Histopathological changes in lung tissue of rats in different groups(HE staining, 100 \times)

2.2 血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 比较 表 1 显示, 模型组大鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 含量均显著高于正常组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明香烟烟熏加气管滴注 LPS 可促进 COPD 大鼠模型 Th1 型细胞因子分泌; 与模型组比较, CKZ 各剂量组 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 水平(除 CKZ-L 组 BALF 中 IL-12R 外) 均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明喘可治注射液具有下调 Th1 型细胞因子的作用, CKZ-H、CKZ-M 和 CKZ-L 组间两两比较, 血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12 及 IL-12R 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示不同剂量喘可治注射液对降低 COPD 模型大鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12 和 IL-12R 水平作用效果相当, 无明显量效关

2 结果

2.1 肺组织病理学形态 HE 染色 图 1 显示, 正常组大鼠支气管黏膜上皮结构完整, 支气管纤毛排列整齐, 肺泡结构完整, 肺泡腔无扩大, 气管及各级支气管仅见散在的杯状细胞, 未见腺体增生及明显炎症浸润, 血管壁无增厚; 模型组气管黏膜上皮脱落、紊乱, 杯状细胞及腺体增生肥大, 管壁有炎症细胞浸润, 支气管黏膜皱壁增多变长, 杯状细胞显著增生, 腺体导管和小支气管腔内可见黏液栓及大量炎症细胞, 管壁及其周围有明显的炎症细胞浸润, 平滑肌显著增生肥厚, 终末细支气管远端狭窄, 呼吸细支气管及肺泡囊状扩张, 肺泡膨大, 泡壁变薄或断裂, 弹性减弱, 多个肺泡腔增大、破裂, 相互融合, 部分周边肺组织肺泡扩大, 均与人类 COPD 的病理形态学改变相符合, 表明 COPD 大鼠模型复制成功; CKZ-H 组较模型组炎症细胞浸润明显减轻, 支气管管壁无明显增厚, 肺泡相对完整; CKZ-M 组与模型组比较炎症有所减轻, 杯状细胞较少见; CKZ-L 组与模型组相比病理改变有所减轻, 表明经药物干预治疗可显著减轻 COPD 大鼠肺组织病理改变程度。

系。

2.3 肺组织 STAT4 mRNA 表达结果 RT-PCR 法测得各组大鼠肺组织 STAT4 mRNA CT 值, 与内参 CT 值之间相对量的标准化处理, 以正常组样品为对照, 得到各组大鼠肺组织相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)。如表 2、图 2 显示, 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 STAT4 mRNA 相对表达水平极显著升高 ($P < 0.01$), 提示烟熏加气管滴注 LPS 制备 COPD 大鼠肺组织 STAT4 mRNA 表达亢进; 与模型组比较, CKZ 各剂量组大鼠肺组织 STAT4 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.01$), 提示喘可治注射液可抑制 STAT4 mRNA 的表达; 各治疗组间比较, 随着喘可治注射液给药剂量的增加, STAT4 mRNA 表达量呈下降趋势, 但差异无统计学

表 1 各组大鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of IFN- γ , IL-12 and IL-12R in serum and BALF of rats in different groups

组别	IFN- γ /ng·L ⁻¹		IL-12/ng·L ⁻¹		IL-12R/ng·L ⁻¹	
	血清	BALF	血清	BALF	血清	BALF
正常组	1112.31 ± 36.60	1063.54 ± 18.68	23.54 ± 1.07	22.78 ± 0.61	14.67 ± 0.14	14.43 ± 0.24
模型组	1250.15 ± 87.69**	1163.14 ± 44.61**	24.91 ± 1.09**	24.77 ± 0.58**	15.25 ± 0.24**	14.88 ± 0.26*
CKZ-H 组	1098.02 ± 39.88#	1064.91 ± 22.32#	23.32 ± 0.98#	23.07 ± 0.49#	14.65 ± 0.19#	14.43 ± 0.13#
CKZ-M 组	1106.41 ± 23.79#	1079.29 ± 22.43#	23.56 ± 1.08#	23.11 ± 0.73#	14.69 ± 0.19#	14.44 ± 0.17#
CKZ-L 组	1130.11 ± 32.68#	1087.16 ± 18.67#	23.60 ± 0.70#	23.29 ± 0.77#	14.70 ± 0.14#	14.48 ± 0.31

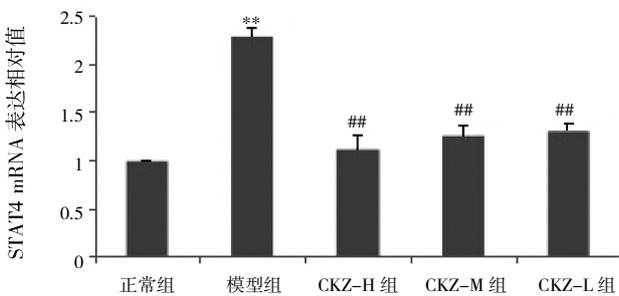
注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠肺组织 STAT4 mRNA 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression levels of STAT4 mRNA in lung tissue of rats in different groups

组别	n	STAT4 mRNA
正常组	3	1
模型组	3	2.2896 ± 0.0838**
CKZ-H 组	3	1.1274 ± 0.1412##
CKZ-M 组	3	1.2645 ± 0.0990##
CKZ-L 组	3	1.3136 ± 0.0691##

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。



注：横坐标各柱形所对应的数据为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值。与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠肺组织 STAT4 mRNA 的表达水平

Figure 2 Expression levels of STAT4 mRNA in lung tissue of rats in different groups

意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

COPD 的病因和发病机制复杂，目前仍未完全阐明。COPD 患者表现出典型的自身免疫反应特征，香烟烟雾刺激后可产生自身抗原和抗体，趋化并活化中性粒细胞、巨噬细胞等多种细胞因子和趋化因子，启动 COPD 免疫炎症，促进气道重塑和肺气肿形成。T 细胞在诱导和维持 COPD 炎症中起着重要作用^[8]，有

研究提示，COPD 患者存在 Th1 细胞优势分化状态的 Th1/Th2 失衡^[9]，该情况还与 COPD 肺功能降低密切相关^[10]，其可能机理是 T 细胞中 STAT 4 活化和 IFN- γ 的表达亢进，诱导了 Th1 细胞的产生^[11]。而 Th1 型细胞因子及其伴随产生的炎症介质、炎症因子直接参与了 COPD 肺组织损伤和肺功能下降过程^[10]。IL-12、IFN- γ 被认为是 Th0 细胞向 Th1 细胞分化最有力的调节因子。IFN- γ 是 Th1 效应细胞，可上调 IL-12R 表达促 IL-12 产生；IL-12 通过特异性识别靶细胞膜表面的 IL-12R，选择性激活 STAT4 向胞内转导信号，特异性诱导了 Th1 型细胞的分化。

中医学根据 COPD 临床表现，将其归属于“咳嗽”、“喘证”、“肺胀”、“痰饮”等范畴；认为本病证属本虚标实，“本虚”以肺虚为始、肾虚为基，以气虚为本、时或及阴阳。肾中阳气虚损导致肺气失摄纳而咳喘上气，津液失温煦、气化而痰瘀互阻，机体失先天濡养而防御功能低下、易感邪发病，是 COPD 反复发作的重要内因。中药喘可治注射液是国家二类新药，主要成分为淫羊藿和巴戟天，其“补肾固本”可作用于 COPD “本虚”的根本发病内因，可预防 COPD 的发生或延缓疾病的发展。体外细胞实验表明，喘可治对 Th1 /Th2 平衡有双向调节作用^[12]，临床研究^[13-14]显示其可显著改善 COPD 患者临床症状、血气分析和肺通气功能^[13-14]；但关于喘可治影响 T 淋巴细胞群分化的作用机理尚未见报道。

本研究发现，COPD 大鼠血清和 BALF 中 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 呈高水平表达，此结果与 Eppert 等^[15-16]的研究相似；且肺组织 STAT4 mRNA 相对表达量亦明显增多，均提示 COPD 大鼠存在 Th1/Th2 失衡且呈现 Th1 细胞优势分化状态，进一步提示 COPD 的发病与 Th1 细胞分泌亢进的细胞免疫应答失衡密切相关。而在制备 COPD 大鼠模型早期使用喘可治注射液进行干预后，COPD 大鼠肺组织病理损害明显减轻，血清和 BALF IFN- γ 、IL-12、IL-12R 水平、肺组织 STAT4 mRNA 的表达均显著降低，提示喘可治注射液“补肾固本”对 COPD 早期干预的效果明显，可抑制 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 及 STAT4 mRNA 的过度表达，调节由 IFN- γ 、IL-12 启动的，经 IL-12R、STAT4 信号转导的 Th1 细胞分化亢进过程，从而缓解 COPD 大鼠 Th1/Th2 失衡。由此推测喘可治注射液改善 COPD 肺组织病理损害、防治 COPD 的可能作用机制与其抑制 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 表达，干扰 IL-12/IL-12R/STAT4 信号通路对靶基因

的激活,下调 STAT4 mRNA 表达,进而调节 Th1/Th2 分化失衡有关。而随着喘可治注射液浓度的增加, COPD 大鼠 IFN- γ 、IL-12、IL-12R 及 STAT4 mRNA 的表达量虽呈下降趋势,但未提示明显的量效关系,这可能与低剂量药物浓度已接近或达到药物效能有关。

参考文献:

- [1] Cosio MG. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 2004, 24(1): 3-5.
- [2] Mottolis S, Cawston T, Carrere S, et al. CD8+ and CD4+ T cell subsets in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239: 146-149.
- [3] Coccia EM, Passini N, Battistini A, et al. IL-12 induces expression of interferon regulatory factor-1 via stat4 in human T helper type 1 cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(10): 6698-6703.
- [4] Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. The IL-12/IL-12R system: role in normal and pathologic immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 495-521.
- [5] Yamada S, T sukada J, Yoshimura A, et al. Computer simulation of the role of SOCS family protein in helper T cell differentiation[J]. Int Immunol, 2006, 18(2): 335-345.
- [6] Ouyang W, Jacobson NG, Bhattacharya D, et al. The Ets transcription factor ERM is specific and induced by IL-12 through a stat4-dependent pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3888-

- 3893.
- [7] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8): 556-557.
- [8] Cosio MG, Majo J. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells[J]. Chest, 2002, 121(5 Suppl): 160-165.
- [9] Chung KF. Cytokine as targets in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Curr Drug Targets, 2006, 7: 675-681.
- [10] Magno F, Di Stefano A. Contribution of bronchial biopsies in the evaluation of pathogenesis and progression of COPD[J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2007, 67(4): 229-233.
- [11] Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 2004, 24(1): 78-85.
- [12] 肇静娴, 曾耀英, 王青. 喘可治注射液对外周血单个核细胞 Th1/Th2 细胞因子谱的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(4): 356-359.
- [13] 郑盛杰, 戴勇, 魏成功. 喘可治穴位注射治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的临床疗效及其对 IL-2、IL-10 的影响[J]. 新中医, 2006, 38(7): 63-64.
- [14] 陈弘群, 余荣环, 黄运平. 喘可治注射液改善 COPD 患者免疫功能观察[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(11): 1162-1163.
- [15] Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, et al. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Immunol, 2013, 190(3): 1331-1340.
- [16] 王成阳, 李泽庚. 慢性阻塞性肺病大鼠肺功能降低与 Th1/Th2 极化、STAT4/6 表达的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1233-1236, 1241.

(编辑: 修春)

知母皂苷 A III 对黑色素瘤 B16 细胞生长和 Bax, Bcl-2 mRNA 的影响

潘会君¹, 史海霞², 陈中建¹, 姜泽静¹ (1. 上海市皮肤病医院药剂科, 上海 200443; 2. 上海交通大学医学院附属第三人民医院中医科, 上海 201999)

摘要: **目的** 观察知母皂苷 A III 对体外培养黑色素瘤 B16 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 体外培养 B16 细胞, 分别以浓度为 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的知母皂苷 A III 作用 24 h, 通过 MTT 比色法检测对细胞生长的影响; 倒置显微镜观察对细胞形态的影响; Annexin V-FITC/PI 双染流式检测对细胞凋亡的影响; 逆转录 PCR 检测对细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 的影响。**结果** 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的知母皂苷 A III 明显抑制细胞增殖, 24 h 的半数抑制浓度(IC_{50})为 10.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 细胞形态显示 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的知母皂苷 A III 使细胞体积缩小变圆, 细胞减少。与对照组比较, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 知母皂苷 A III 细胞凋亡率为 $(4.83 \pm 0.25)\%$ ($P < 0.01$), 而 Bax/Bcl-2 比值升高 ($P < 0.05$)。**结论** 体外实验显示知母皂苷 A III 能明显抑制 B16 细胞生长, 并能诱导部分细胞发生凋亡。由于诱导细胞凋亡率与 24 h 的 IC_{50} 有一定差距, 因此知母皂苷 A III 对 B16 细胞生长的影响可能不仅仅与激活凋亡信号通路有关, 还与其他细胞生长信号通路有关。

收稿日期: 2014-09-09

作者简介: 潘会君, 男, 博士。主管中药师, 研究方向: 中药药效。Email: pppphhhjjj@163.com。

基金项目: 上海市皮肤病医院青年人才培养计划 (No.2013)。