论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0324-04

不同来源茶树油抑制LPS诱导TNF-α释放的体外实验

王 懿,王振维 (第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 比较国产和进口茶树油(tea tree oil,TTO)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导炎症的抑制作用。**方法** 四唑盐(MTT)比色实验筛选无细胞毒性作用的TTO溶液浓度;各浓度TTO水溶液按量效和时效关系预处理细胞后,测定LPS激活RAW264.7细胞分泌肿瘤坏死因子-α(tumor necrotic factor-alpha, TNF-α)的浓度,以观察国产和进口TTO水溶液对LPS诱导炎症的抑制效果。**结果** 浓度低于0.001%的国产和进口TTO溶液对细胞无毒性作用;0.000 125%~0.001%进口TTO和0.000 25%~0.001%国产TTO各浓度组均能非常显著地抑制LPS诱导细胞释放TNF-α;0.000 25%进口和国产TTO分别在3 h和6 h内对细胞有显著的保护作用。**结论** 国产和进口TTO对LPS诱导的炎症均有显著抑制效果。

关键词: 茶树油; 脂多糖; 肿瘤坏死因子-α; 抑制作用

中图法分类号: R282.71;R364.5;R392.5 **文献标识码:** A

Inhibition effect on LPS-induced TNF-α release by homegrown and Australian *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil

WANG Yi, WANG Zhen-wei (Department of Analytical Chemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the inhibition of the homegrown and Australian tea tree oil (TTO) solution on TNF-α release from RAW264.7 cells induced by LPS. **Methods** MTT assay was used to measure the effects of TTO on viability of RAW264.7 *in vitro*. RAW264.7 cells were pretreated with two kinds of TTO solution in the dose- and time-dependent manners, then stimulated by LPS. TNF-α in the supernate was tested by ELISA. **Results** *In vitro*, two kinds of TTO (<0.001%) showed no cytotoxicity to RAW264.7 cells. Australian TTO (0.000 125%-0.001%) and homegrown TTO (0.000 25%-0.001%) significantly suppressed LPS-induced TNF-α release, respectively. 0.000 25% Australian TTO pretreating for 3 h and homegrown TTO pretreating for 6 h showed significant protections against the stimulations of LPS, respectively. **Conclusion** *In vitro*, two kinds of TTO have the obvious inhibitory action, and there is no significant difference between Australian and homegrown TTO.

Key words: tea tree oil; lipopolysaccharide; tumor necrotic factor-alpha; inhibitory action

茶树油(tea tree oil, TTO)是从一类桃金娘科白千层属植物——茶树中蒸馏得到的香精油,属白千层萜品型香精油。TTO主要含有4-萜品醇(terpinen-4-ol)、1,8-桉叶油素(1,8-cineole)、γ-萜品烯(γ-terpinene)和α-萜品醇(α-terpineol)等化合物。体外实验显示,TTO具有很好的抗炎作用,其中的4-萜品醇是主要的抗炎活性成分,而1,8-桉叶油素和α-萜品醇不具有抗炎活性[1,2]。

基金项目: 重庆市科委攻关项目(2002-13-6-5)
Supported by the Key Project Fundation of Scientific Committee of Chongqing (2002-13-6-5)

作者简介: 王 懿(1979-),男,重庆市人,硕士,主要从事天然药物开发方面的研究。电话:(023)89892352, E-mail: wangyi790112@sohu.com

收稿日期: 2006-04-05;**修回日期:** 2006-09-01

原产TTO中4-萜品醇含量在40%左右,国产TTO中则为25.7%,明显低于前者。而国产TTO中1,8-桉叶油素的含量达到8.3%,原产TTO中则为2.1%~5.5%。目前还不能确定国产TTO成分变化是否会引起其抗炎活性的变化,甚至失去抗炎作用。为了进一步认识国产TTO的开发前景,我们从量效和时效关系上观察2种TTO水溶液对LPS激活RAW264.7细胞分泌TNF-α的抑制效果,以比较二者的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞株

国产TTO购自涪陵地区,经气相色谱分析,主要成分含量为4-萜品醇25.7%、γ-萜品烯9.9%、α-萜品烯6.2%、1,8-桉叶

油素 8.3%、萜品油烯(terpinolene)4.6%、α-萜品醇 4.9%、α-松萜(α-pinene)3.4%、β-松萜(β-pinene)1.3%。进口 TTO 购于澳大利亚 Thursday Plantation lab 公司,其主要成分含量为 4-萜品醇 41.6%、γ-萜品烯 21.5%、α-萜品烯 10.0%、1,8-桉叶油素 2.0%、萜品油烯 3.5%、α-萜品醇 3.1%、α-松萜 2.4%、β-松萜 1.8%。

LPS(O111: B4 型)、MTT 和 DMSO 均购自美国 Sigma 公司。DMEM 粉和低内毒素胎牛血清均购于美国 Hyclone 公司。小鼠 TNF-α 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

RAW264.7 细胞购自 ATCC,本实验室保存。

1.2　主要仪器

Millipore 纯水机(Milli-Q 公司),Forma Series Ⅱ 水套 CO_2 培养箱(Thermo 公司),Model550 酶联分析仪(BIO-RAD 公司),TDL-50B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),低温冰箱(日本 Sanyo 公司)。

1.3　实验分组

TTO 对 RAW264.7 细胞活性的实验分为对照组、国产 TTO 和进口 TTO 处理组。TTO 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的量效和时效关系实验分为对照组、LPS 单独刺激组、国产 TTO 和进口 TTO 处理组。

1.4　方法

1.4.1　去致热原处理　　细胞培养过程所用的玻璃制品经 260 ℃干烤 3 h,塑料制品经 ^{60}Co 辐照处理。TTO 以去致热原水配制,细胞培养液以去致热原超纯水配制。实验过程中严格无菌操作,严防细菌和内毒素污染。鲎试剂动态浊度法检测 TTO、细胞培养液、细胞培养上清等样本的内毒素含量,确认无明显内毒素污染后用于后续实验。

1.4.2　TTO 对 RAW264.7 细胞增殖的影响　　采用 MTT 法,具体方法参照文献[3]进行。

1.4.3　细胞因子 TNF-α 的测定　　采用 ELISA 检测试剂盒,具体方法参照其说明书进行。

1.4.4　TTO 预处理保护作用的量效关系　　将培养瓶中的 RAW264.7 细胞分装入 48 孔板,每孔约 1.0×10^6 个细胞。孵育 2 h 后,在各孔中加入不同剂量的国产和进口 TTO 以处理细胞,使其终浓度体积分数分别为 0.000 125%、0.000 25%、0.000 5%、0.001%或同体积生理盐水。培养 3 h 后,更换上清液。在各孔中加入 LPS,使其终浓度为 100 ng/ml。孵育 4 h,每孔取200 μl 上清。每组均设 3 复孔,行 ELISA 检测 TNF-α 的浓度。

1.4.5　TTO 预处理保护作用的时效关系　　方法同 1.4.4,只是需要用最佳预保护剂量的国产和进口 TTO 分别预处理细胞 1、3、6 h。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Excel 2000 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　培养体系中致热原的排除

为了排除细胞培养液等试剂中可能存在的微量 LPS 的污染,我们用鲎试剂动态浊度法检测了细胞培养液、TTO 等试剂中 LPS 的含量。结果显示,细胞培养基不含有 LPS,TTO 溶液各试剂中的 LPS 含量(0.9±0.3)ng/ml,均小于 1 ng/ml,该浓度对实验无影响。另外,2 d 后的细胞培养上清中 LPS 含量为(0.4±0.2) ng/ml,也低于 1 ng/ml,说明细胞培养过程中不存在 LPS 污染。

2.2　筛选对 RAW264.7 细胞无毒性作用的 TTO 浓度

当国产和进口 TTO 浓度为 0.000 25% ~0.001%时,各组的吸光度值与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$),说明浓度低于 0.001%的国产和进口 TTO 对 RAW264.7 细胞无毒性作用。因此,在后续的量效实验中将使用的 TTO 浓度为 0.000 25% ~0.001%。虽然 2 种 TTO 的 0.002 5%组与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$),但两者各孔的吸光度值分布不均,国产 TTO 处理组吸光度值分别为 0.011、0.096、0.189;进口 TTO 处理组吸光度值分别为 0.017、0.140、0.171。说明 2 种 TTO 在此浓度下对细胞存在一定的毒性作用,故将此浓度排除。见表 1。

表 1　TTO 对 RAW264.7 细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	D(490)
对照组	0.187 ±0.017
国产 TTO 处理组(体积分数)	
0.0025%	0.099 ±0.089
0.001%	0.219 ±0.019
0.000 5%	0.189 ±0.012
0.000 25%	0.221 ±0.030
进口 TTO 处理组(体积分数)	
0.002 5%	0.109 ±0.081
0.001%	0.229 ±0.055
0.000 5%	0.204 ±0.026
0.000 25%	0.213 ±0.012

2.3　TTO 预处理抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的量效关系

LPS 诱导 RAW264.7 细胞 4 h 后,TNF-α 含量为(1 535.8 ±58.8) pg/ml;正常对照组培养上清中 TNF-α 含量很低,为(39.2±1.9) pg/ml;进口 TTO 处理组培养上清中 TNF-α 含量分别为(947.2 ±63.9)、(678.6 ±98.9)、(520.7 ±78.2)、(589.8 ±56.3)pg/ml,较 100 ng/ml LPS 组有非常显著性差异($P<0.01$),尤其以 0.000 25%进口 TTO 的抑制作用最为明显,抑制率达 66.1%;国产 TTO 处理组培养上清中 TNF-α 含量分别为(938.8 ±42.1)、(579.3 ±36.5)、(563.0 ±78.4)、(1 442.9 ±78.0)pg/ml,前 3 个浓度组较 100 ng/ml LPS 组有非常显著性差异($P<0.01$),尤其以 0.000 25%国产 TTO 的抑制作用最为明显,抑制率达 63.3%。而 0.000 125%国产 TTO 组与 100 ng/ml LPS 组比较无显著性差异($P>0.05$),说明此浓度国产 TTO 已不具有抑制作用。

0.001%、0.000 5%和 0.000 25% 2 种TTO 的抑制效果无显著性差异($P>0.05$),而 0.000 125%的国产 TTO 处理组与进口 TTO 处理组有显著性差异($P<0.01$),前者的作用明显低于后者。2 种 TTO 最佳抑制作用的浓度均为0.000 25%,进口 TTO 对 LPS 刺激作用的抑制率更高。因此,在后续的时效实验中将使用 0.000 25%的 TTO。见表 2。

表2 TTO 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的量效关系($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α 浓度(pg/ml)	抑制率(%)
对照组	39.2 ± 1.9	-
LPS 单独刺激组	1 535.8 ± 58.8	-
进口 TTO 处理组		
0.000 125%	589.8 ± 56.3[a]	61.6
0.000 25%	520.7 ± 78.2[a]	66.1
0.000 5%	678.6 ± 98.9[a]	55.8
0.001%	947.2 ± 63.9[a]	38.3
国产 TTO 处理组		
0.000 125%	1 442.9 ± 78.0[b]	6.0
0.000 25%	563.0 ± 78.4[a]	63.3
0.000 5%	579.3 ± 36.5[a]	62.3
0.001%	938.8 ± 42.1[a]	38.9

a: $P<0.01$,与 LPS 单独刺激组比较; b: $P<0.01$,与同浓度进口 TTO 处理组比较

2.4 TTO 预处理抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的时效关系

LPS 诱导 RAW264.7 细胞 4 h 后,TNF-α 含量为(2 405.7 ± 10.0) pg/ml;正常对照组培养上清中 TNF-α 含量很低,为(183.1 ± 10.8) pg/ml;进口 TTO 预处理细胞 1、3、6 h 后,培养上清中 TNF-α 含量分别为(1 971.9 ± 284.1)、(2 015.9 ± 103.2)、(1 724.6 ± 114.0) pg/ml,与 100 ng/ml LPS 组比较,预处理 6 h 组无显著性差异($P>0.05$),预处理 3 h 组和 1 h 组有非常显著性差异($P<0.01$),预处理 1 h 组的效果更明显,抑制率为 28.3%;国产 TTO 预处理细胞 1、3、6 h 后,培养上清中 TNF-α 含量分别为(1 783.4 ± 317.4)、(1 745.4 ± 343.4)、(1 738.1 ± 232.9) pg/ml,与 100 ng/ml LPS 单独刺激组比较,预处理 6 h 组、3 h 组和 1 h 组有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),预处理 1 h 组的效果更明显,抑制率为 27.8%。

比较 2 种 TTO 预处理 1、3、6 h 后抑制 TNF-α 的释放作用,各组结果均无显著性差异($P>0.05$)(表 3)。

表3 TTO 抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的时效关系($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α 浓度(pg/ml)	抑制率(%)
对照组	183.1 ± 10.8	-
LPS 单独刺激组	2 405.7 ± 10.0	-
进口 TTO 预处理		
1 h	1 724.6 ± 114.0[a]	28.3
3 h	2 015.9 ± 103.2[a]	16.2
6 h	1 971.9 ± 284.1	18.0
国产 TTO 预处理		
1 h	1 738.1 ± 232.9[a]	27.8
3 h	1 745.4 ± 343.4[b]	27.4
6 h	1 783.4 ± 317.4[b]	25.7

a: $P<0.01$,与 LPS 单独刺激组比较; b: $P<0.05$,与同浓度进口 TTO 处理组比较

3 讨论

早在几千年前,茶树的抗炎作用就被澳大利亚土著居民有所认识。现代研究也表明,TTO 及主要成分 4-萜品醇在急性炎症中能增强中性粒细胞的活性而加快外源性抗原的清除,在慢性炎症中则是抑制单核细胞分泌超氧化物和炎症介质,减轻炎症反应对机体的损伤[1,2]。而且 TTO 和 4-萜品醇还能有效减轻组胺引起的水肿反应[4,5]。因此,许多研究者认为 TTO 在抗炎药物方面极具开发价值。

本研究顺利进行的关键是有效避免 LPS 污染,防止 LPS 对实验结果的干扰。在本实验体系下,国外大部分实验室报道 10 ng/ml 的 LPS 方能诱导人免疫细胞释放细胞因子[6]。因此,我们认为至少要将内毒素污染控制在 10 ng/ml 以下,才可保证实验结果的可靠性。本研究参照相关文献报道对玻璃制品、塑料制品进行了去致热原处理[7]。同时,改用 Millipore 公司出品的超滤除致热源型纯水机代替普通三蒸水来进行细胞培养液的配制,严格控制细胞培养条件。实验结果也证明了培养体系中确实没有 LPS 的污染。

量效关系的实验结果显示,0.000 25% ~0.001% 国产和进口 TTO 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 有非常显著抑制作用,而且两者的抑制作用没有显著性差异,说明该浓度国产和进口 TTO 有非常好的抗炎效果。0.000 125% 的进口 TTO 仍有很好的抗炎效果,但 0.000 125% 的国产 TTO 组已不具备抗炎作用。这可能与国产 TTO 中的 4-萜品醇含量较低,在 0.000 125% 的浓度下不能形成有效的药物浓度有关。

时效关系的实验结果显示,进口 TTO 在 3 h 内对 RAW264.7 细胞有非常显著的保护作用,国产 TTO 在 6 h 内对细胞有显著的保护作用,而比较 2 种 TTO 各预处理组的抗炎效果均无显著性差异。这可能由于是该实验选择的时间隔较大,反映出的时效关系还不够准确,使得国产 TTO 保护时间明显长于进口 TTO。该结果也说明该浓度的 2 种 TTO 对 LPS 诱导的炎症有较为持久的保护作用。

综上所述,本实验从量效和时效关系上显示出国产和进口 TTO 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 有显著的抑制作用,而且两者的抑制作用没有显著差异,说明 2 种 TTO 均有很好的抗炎作用,证实了国产 TTO 组分含量的变化,特别是 4-萜品醇含量显著降低,并未引起其抗炎活性明显变化,进一步证实了国产 TTO 可以替代进口 TTO 在该领域中应用。国产 TTO 的抗炎活性未发生显著变化,这可能是由于种植区的气候、土壤条件等环境因素导致茶树产生新的抗炎成分[8],或其中某些成分浓度轻微的变化补偿了 4-萜品醇含量的显著降低,这些成分的抗炎作用有待进一步研究。而且不能排除国产 TTO 中新成分出现的可能。我们对国产 TTO 中含量增加的成分如萜品油烯等活性和作用特点还不是很了解。因此,在今后的工作中,

需要对国产TTO组分进行全面的分析，详细了解各组分的活性和作用特点，为国产TTO进一步研究与开发提供依据。

参考文献：

[1] Brand C, Ferrante A, Prager R H, *et al*. The water-soluble components of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*[J]. Inflamm Res, 2001, 50(4): 213-219.

[2] Hart P H, Brand C, Carson C F, *et al*. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes[J]. Inflamm Res, 2000, 49(11): 619-626.

[3] 郑永唐，贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的MTT方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266-269.

[4] Carson C F, Hammer K A, Riley T V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1): 52-60.

[5] Brand C, Townley S L, Finlay-Jones J J, *et al*. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears[J]. Inflamm Res, 2002, 51(6): 283-289.

[6] Manimtim W M, Hasday J D, Hester L, *et al*. Ureaplasma urealyticum modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 3906-3915.

[7] 潘文东，周 红，郑 江，等. 大肠杆菌DNA对小鼠致死作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(4): 395-397.

[8] Bergonzelli G E, Donnicola D, Porta N, *et al*. Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10): 3240-3246.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2007)04-0327-01

个案与短篇

放射性核素骨显像在临床法医学中的初步应用

余 舰，程华刚，代克波 （遵义医学院附属医院司法医学鉴定中心，遵义 563003）

单光子发射计算机断层显像仪(single photon emission computed tomography, SPECT)自1979年研制成功后，经过20余年的技术发展和经验积累，已广泛应用于临床各科，尤其在功能显像方面[1]。本研究尝试将其应用于隐匿性骨折、新旧骨折的鉴别等一些复杂疑难伤情的司法医学鉴定，收到了良好的效果。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

我院司法医学鉴定中心从1998-2004年鉴定2 500例(涉及骨折的鉴定1 453例)，有25例进行了放射性核素骨显像，其中X线明确骨折诊断10例，X线不能明确骨折诊断(可疑骨折)15例，部位涉及肋骨6例，椎体5例，舟骨2例，眼眶内板1例，肩胛骨1例。男性14例，女性11例，年龄10~68岁，平均年龄38.5岁。

1.2 方法

本组25例患者均行X线检查，伤后1~6个月再行放射性核素显像。骨显像剂为^{99}锝^{m}-亚甲基二膦酸盐(^{99}Tc^{m}-MDP)，静脉注射555~1 110 MBq后嘱患者多饮水，2~3 h排空小便后用SPECT系统行仰卧位静态平面全身骨显像，然后对病损骨区域进行SPECT断层显像。采用计算机断层处理软件，Winer滤波重建，得到横断、矢状及冠状三维切面图像。

2 结果

所有X线明确骨折诊断的、骨折处均有串珠状排列、团块状的放射性核素浓聚灶。15例可疑骨折，通过SPECT检查明确骨折诊断9例(肋骨骨折4例，椎体压缩骨折2例，舟骨骨折1例，眼眶内板骨折1例，肩胛骨骨折1例)；排除骨折诊断6例。

3 讨论

3.1 隐匿性骨折的发现

不同程度外伤造成的不易被常规X线所发现的骨折，称为隐匿性骨折。虽然CT可发现一些隐匿性骨折[2]，因受到本身技术的限制，对如下一些隐匿性骨折，不及SPECT骨显像有价值[3]：①无移位型肋骨骨折或腋下段肋骨骨折等，由于骨折程度轻微或位置特殊，X线检查时有漏诊，但核素显像可清晰显示。②一些四肢骨和躯干骨，特别是小骨和附属结构的骨折，有时X线难以做出诊断，如胸骨、肩胛骨、舟骨、脊椎骨的附属结构等，SPECT骨显像多可显示。③面部严重创伤后，X线片上难以显示眼眶、上颌骨内侧、颅骨和蝶骨翼等部位的骨折。④应力性骨折、急性青枝骨折、椎体压缩性骨折、骨不连等。但在核素显像，无论从哪个方位，都可以看到骨折部位呈核素浓聚影像。受伤后24~48 h做核素扫描，如无放射性浓聚，则在很大程度上可排除骨折。⑤多部位损伤者进行全身骨显像有助于发现无局部症状的隐匿性骨折。

（下转331页）

作者简介：余 舰(1962-)，男，贵州省遵义市人，硕士，副教授，主要从事法医病理学及临床法医学方面的研究。电话：(0852)8608282

收稿日期：2005-05-30；修回日期：2006-06-26