DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.024

文章编号:1000-5404(2001)09-0925-03

论著

三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞IP3→CaM信号途径的影响

罗中华,蔡绍丽,黄文华,陈希炜,刘 敬,周 新,付佑梅 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究中药三七皂甙对巨噬细胞(MΦ)肌醇脂质信号系统中IP3→CaM途径的调理作用。**方法** 用中药三七皂甙治疗烫伤昆明种小鼠,通过观察伤鼠MΦ的PLC活性、IP3活性、胞内Ca^{2+}浓度、CaM量和它们参与产生分泌的IL-1。**结果** 三七皂甙能使伤后该途径中升高的信使物质及其产物PLC、IP3、胞内Ca^{2+}、CaM和它们参与产生分泌的IL-1得到一定程度的调理。三七皂甙可使升高的PLC活性从(57.58±8.91)μmol/L降到(27.00±2.31)μmol/L、可使升高的IP3活性从(18 844.5±2 445.9)Bq/10^6 cell降到(4 169.7±543.3)Bq/10^6 cell、可使升高的胞内Ca^{2+}浓度从(393.18±39.62) nmol/L降到(90.56±7.21) nmol/L、可使升高的CaM量从(598.15±50.21) nmol/L降至(316.31±25.35) nmol/L、可使升高的IL-1量从0.998±0.058降至0.590±0.050。**结论** 中药三七皂甙对肌醇脂质信号系统中IP3→CaM途径具有较好的调理作用。

关键词:肌醇脂质信号系统;中药;三七皂甙;烧伤;MΦ
中图法分类号:R285;R329.25;R644 **文献标识码**:A

Effects of panax pseudoginseng saponins on inositol-1,4,5 triphosphate and camodulin pathway of inositol lipid signal system by macrophages in scalded mice

LUO Zhong-hua, CAI Shao-li, HUANG Wen-hua, CHEN Xi-wei, LIU Jing, ZHOU Xin, FU You-mei (Institute of Burns Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the roles of panax pseudoginseng saponins on the PI-PLC signal pathway and IL-1 secretion of macrophages. **Methods** The changes of the activities of postburn inositol lipid signal system factors such as PLC, IP3, intracellular calcium Aoncentration and CaM Aoncentration and the amount of macrophage IL-1 secreted were observed. **Results** The PLC activity decreased from (57.58±8.19) μmol/L to (27.00±2.31) μmol/L, the intracllular calcium concentration from (393.18±39.62) nmol/L to (90.56±7.21) nmol/L, the IP3 activity from (18 844.5±2 445.9) Bq/10^6 cell to (4 169.7±543.3) Bq/10^6 cell CaM amount from (598.15±50.21) nmol/L to (316.31±25.35) nmol/L and the amount of macrophage sereted IL-1 from 0.998±0.058 to 0.590±0.050. **Conclusion** Panax pseudoginseng saponins might play very important role in the modulating of the PI-PLC signal pathway and IL-1 secretion of macrophage.

Key words: inositol lipid signal system; traditional Chinese medicine; panax pseudoginseng saponins; burn; macrophages

严重烧伤后机体免疫系统功能紊乱,主要原因之一是伤后巨噬细胞(MΦ)功能受损。MΦ受损后对异物的吞噬功能降低;抗原提呈功能低下;过多产生和分泌炎症介质并参与机体脏器损伤和免疫系统功能的损害,故对伤后MΦ受损功能进行调理已是烧伤研究中不可忽视的重要问题。本研究在过去研究的基础上,观察中药三七皂甙对烫伤小鼠MΦ肌醇脂质信号系统中IP3→CaM途径及IL-1的影响。通过检测MΦ肌醇脂质信号转导系统中的信使物质及其产物:即磷酯酶C(PLC);三磷酸肌醇(IP3);钙离子(Ca^{2+});钙调蛋白(CaM)和白细胞介素1(IL-1)。藉以了解三七皂甙对MΦ肌醇脂质信号转导系统中三磷酸肌醇→钙调蛋白(IP3→CaM)途径及IL-1产生和分泌的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型

体重21~23 g的昆明种小白鼠,于背部去毛后,用1.035×10^5 Pa压力的蒸汽进行烫伤,烫伤时间为10 s,烫伤面积为16%(根据能导致小鼠机体免疫功能变化的预实验和过去研究的实验结果,小鼠烫伤面积定为16%),深度经病理切片证实为Ⅲ度。烫伤后立即于腹腔补给生理盐水2.0 ml抗休克,并分笼饲养。

1.2 药物

三七总皂甙购于云南植物药厂,批号:980528。

1.3 实验分组及给药方法

1.3.1 正常对照组 小鼠数为18只。小鼠不烫伤,以生理盐水代替药物于腹腔注射。

1.3.2 单烫组 小鼠数为108只。小鼠烫伤后以生理盐水代替药物于腹腔注射,并根据时相点的不同分别在6、14、26、50、74、98 h活杀小鼠。

1.3.3 治疗组 小鼠总数为324只。根据药物应用剂量的不同分为大剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)、中剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)和小剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)。在小鼠烫伤后补给生理盐水抗休克的同时,开始于腹腔注射三七皂甙液,大剂量组每只小鼠注射100 mg,中剂量组每只注射50 mg,小剂量组每只注射25 mg(根据各种大动物和小动物实验用药量的不同,一般按照成人量的50~200倍计算药物的实验用量,通常小鼠实验为人的200倍药量),每间隔4 h注射1次。并根据时相点的不同分别在6、14、26、50、74、98 h活杀小鼠,(为使药物充分吸收,故在用药后2 h活杀小鼠)取样本进行实验。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L042-5)
作者简介:罗中华(1958~),男,四川省兴文县人,副主任技师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文19篇。电话:(023)68754148-8018
收稿日期:2001-03-26;修回日期:2001-06-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4 观察指标及方法

按照不同时相点活杀小鼠，以冷的 RPMI 1 640 冲洗腹腔取腹腔细胞，并分离纯化 MΦ(95%以上)悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液中待用。

1.4.1 磷脂酰肌醇特异性磷酯酶 C(PI-PLC)活性测定 参照 Manne 等[1]的方法进行，结果以 μmol/L 表示。

1.4.2 IP3 的测定 参照 Olivier 等[2]方法进行，以 Bq/10^6 cell 表示结果。

1.4.3 钙离子(Ca^{2+})的测定 参照 Downes 等[3]方法进行。结果以 nmol/L 表示。

1.4.4 钙调蛋白(CaM)的检测 取 1×10^6/ml MΦ 1.0 ml 加于离心管中，加入终浓度 10 μg/ml LPS，置 37 ℃ 5% CO_2 下孵 2 h，以 150×g 离心 5 min，去上清。加 70% 乙醇固定 1 h，200×g 离心 5 min 去乙醇，用 pH 7.2 PBS 洗 3 次，加入终浓度 0.1 mmol/L 的三氟啦嗪 1.0 ml，放室温 20 min，用紫外线照射 30 min，用 pH 7.2 PBS 洗 3 次后，重悬于 1.0 ml PBS 中。用荧光分光光度计，以 256/530 nm 波长，狭缝 10 nm，测定荧光强度，每个标本作三复管，取均值以 nmol/L 表示结果。

1.4.5 IL-1 的检测 取 MΦ 悬浮于含 10% 小牛血清的RPMI 1640 培养液中，调成 1×10^6/ml。取 1.0 ml 加入 24 孔细胞培养板，加终浓度 10 μg/ml 的 LPS，置 37 ℃，5% CO_2 下 24 h。200×g 离心 5 min，去细胞，收取上清液以常规的酶联免疫方法进行测定(抗体购于 Sigma 公司)。每个标本作三复孔，取均值以酶标仪测定的 D_λ 值表示结果。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$，采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ PLC 活性变化的影响

实验结果显示，正常对照组小鼠的 PLC 活性为(26.88±2.62) μmol/L，小鼠烫伤后 6 h 与正常对照组比较未见显著的差别。至伤后 14 h 和 26 h 比对照组显著升高，到伤后 50 h 又回落，并与 26 h 点比较回落显著，其后 PLC 活性逐渐升高，到 98 h，其活性为最高水平。用大剂量三七皂甙的组对 MΦ PLC 活性未见显著的影响。用中剂量和小剂量二次的组(6 h)未见显著的降低作用。中小剂量组随用药时间的延长，到 14 h 和 26 h 与同时相点的单烫组比较有显著的降低；用药到 50 h，因未用药单烫伤组 PLC 活性回落，故未见有显著的影响。但用药到 74 h 和 98 h，虽然单烫组 PLC 活性逐渐升高，中小剂量治疗组则有显著降低作用，并且逐渐降低至接近正常的水平，见另文[4]。

2.2 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ IP3 变化的作用

烫伤后小鼠 MΦ 的 IP3 各时相点均显著高于正常对照组，并且随时间的延长逐步升高，本实验结束时升高至正常对照组的四倍以上。经用大剂量三七皂甙的组，未见有显著的改善。中剂量和小剂量用药 4 次也未见有显著效果，但随用药次数的增加，至 26 h 后与同时相点单烫组比较有显著的降低作用，结果见表 1。

2.3 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ 胞内钙离子变化的影响

结果显示，伤鼠 MΦ 胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于正常组小鼠。经用三七皂甙治疗后，大剂量组与同时相点单烫组比较未见显著的作用；中剂量组用药致 14 h 后可见有显著的降低；小剂量组用药致 26 h 后有显著的作用。并且中小剂量组随用药时间和次数的增加，其作用更为显著，见另文[4]。

表 1 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ IP3 变化的作用(cpm /10^6 cell，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of Panax Pseudoginseng Saponins on IP3 of macrophages in scald mice(cpm /10^6 cell，$\bar{x}\pm s$)

Time	Scald group	Large dosage group	Middle dosage group	Small dosage group
6 h	206.23±31.80△	196.55±28.50	192.33±30.12	203.13±32.15
14 h	213.50±33.70△	199.38±28.61	168.51±26.11	175.25±28.10
26 h	585.38±62.50△	523.65±53.13	150.26±18.20*	163.28±21.33*
50 h	296.23±38.16△	262.99±33.11	139.50±19.80*	138.26±27.16*
74 h	625.66±78.18△	588.15±60.12	169.83±16.81*	199.30±32.69*
98 h	628.15±81.53△	599.32±58.18	138.99±18.11*	150.20±27.65*

1 cpm = 30 Bq；△：$P<0.05$ *vs* control (Control：138.65±21.30)；*：$P<0.05$ *vs* scald group

2.4 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ CaM 的作用

小鼠烫伤 6 h MΦ CaM 已显著高于正常小鼠的水平，到伤后 14 h 和 26 h 逐步增高。到 50 h 又有所回落。其后又反弹升高到本实验结束时的最高水平。经用三七皂甙后，中剂量组最好，可使升高的伤鼠 MΦ CaM 降低到正常的水平，小剂量组次之，用药到 26 h 可有显著降低。而大剂量的各时相点均未见有显著的作用，见表 2。

表 2 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ CaM 的作用(C_B/nmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of Panax Pseudoginseng Saponins on CaM of macrophages in scald mice (C_B/nmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$)

Time	Scald group	Large dosage group	Middle dosage group	Small dosage group
6 h	418.20±38.11△	418.00±30.11	398.71±26.71	413.88±38.60
14 h	435.58±36.21△	417.80±28.12	363.62±28.65*	408.15±30.10
26 h	595.62±46.18△	575.66±38.38	358.65±30.10*	361.70±26.38*
50 h	403.61±30.11△	405.68±20.66	319.80±29.33*	333.81±22.56*
74 h	585.63±39.90△	569.81±46.81	318.00±26.56*	336.75±22.58*
98 h	598.15±50.21△	568.51±39.88	316.31±25.35*	361.78±23.32*

△：$P<0.05$ *vs* control (Control：318.51±30.16)；*：$P<0.05$ *vs* scald group

2.5 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ 分泌 IL-1 的影响

烫伤小鼠 MΦ 分泌 IL-1 在伤后 6 h 有所升高，但不显著；到伤后 14 h 已显著高于正常，随伤后时间的延长，其 IL-1 的分泌有逐步增高的趋势。经用三七皂甙大剂量处理的组，IL-1 分泌与同时相点单烫组比较未见显著的作用。用中剂量处理的伤鼠到 26 h 可显著降低 MΦ 分泌 IL-1。小剂量用药到 50 h 能显著降低 MΦ 对 IL-1 的分泌。并且，中、小剂量组随用药时间的延长其降低 MΦ 分泌 IL-1 的作用更显著，见表 3。

表 3 三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ 分泌 IL-1 的影响(D_λ)

Tab 3 Effect of Panax Pseudoginseng Saponins on IL-1 secretion of macrophages in scald mice (D_λ)

Time	Scald group	Large dosage group	Middle dosage group	Small dosage group
6 h	0.708±0.058△	0.718±0.065	0.706±0.053	0.709±0.055
14 h	0.789±0.055△	0.776±0.071	0.776±0.067	0.781±0.061
26 h	0.895±0.061△	0.980±0.092	0.628±0.058*	0.753±0.059
50 h	0.965±0.060△	0.885±0.068	0.606±0.051*	0.685±0.050*
74 h	0.983±0.068△	0.965±0.083	0.600±0.052*	0.636±0.048*
98 h	0.998±0.058△	0.988±0.095	0.590±0.050*	0.618±0.051*

△：$P<0.05$ *vs* control (Control：0.586±0.051)；*：$P<0.05$ *vs* scald group

3 讨论

烧伤后机体的免疫系统功能紊乱，组织细胞和多

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

器官功能受损，乃至死亡的重要原因之一与 MΦ 功能异常及过多产生和分泌某些细胞因子密切相关。如 MΦ 产生和分泌的 IL-1，它在适量时对机体的免疫系统功能及其它功能是有益的，若产生和分泌过多则有害。并且，IL-1 在组织细胞的损伤或变化中具有特别重要的意义[5]，如作用于血管内皮细胞，在血管内形成血栓、造成组织缺血缺氧性损伤[6]；作为内源性致热原，作用于体温调节中枢使体温升高；作用于下丘脑局部细胞产生 PGE_2，抑制免疫系统功能；作用于骨髓使 PMN 产生和释放，聚集于炎症部位，激活后可发生呼吸骤发和脱颗粒，导致恶病质状态，使其厌食、贫血、消瘦、体重下降；作用于肝细胞抑制白蛋白的合成，促进某些急性期蛋白的生成等[7]。因此，对异常的 MΦ 功能进行调理，降低 IL-1 的过多产生和分泌已是烧伤研究中不可勿视的重要课题。由于细胞因子的产生与分泌是通过细胞的某个或某几个信号传导系统完成的，故本研究在过去实验的基础上[8]，着重观察中药三七皂甙对 MΦ 肌醇脂质信号系统中与 IL-1 产生和分泌有关的 IP3→CaM 途径的影响。

肌醇脂质信号系统包括肌醇磷脂及其产物，肌醇脂质的转换是以磷脂酰肌醇-4,5 二磷酸（PIP2）水解产生第二信使物质三磷酸肌醇（IP3）和甘油二脂（DAG）为中心，通过 PIP2→PLC→IP3→Ca^{2+}→CaM 途径和 PIP2→PLC→DAG→PKC 途径而发挥作用的[9]。磷脂酶（PLC）是 PIP2 循环中最重要的一种分解酶。Kovacs 等[10]发现上述途径中 IP3→Ca^{2+}→CaM 途径参与了 IL-1 的产生和分泌，故本研究选择 PLC，IP3，Ca^{2+}，CaM 和 IL-1 作为研究对象，观察中药三七皂甙对 MΦ 过多产生和分泌 IL-1 的调理作用。结果显示，单烫伤组小鼠 MΦ 的 PLC 活性在伤后 6 h 就开始升高，到 14 h，26 h 显著高于正常对照组小鼠，到伤后 50 h 又有所回落，其后至 74 h 和 98 h 的时相点更显著高于对照组（见另文）[4]。应用中药三七皂甙大剂量的组与单烫组比较，各时相点均未见显著的疗效，而应用中剂量三七皂甙的组分别在 14、26、74 和 98 h 的时相点，对升高的伤鼠 MΦPLC 活性有显著的降低作用（$P<0.05$），应用小剂量药物的组，只有 74 h 和 98 h 的时相点有疗效，其它未见显著的作用。单纯烫伤小鼠 MΦ 的 IP3，Ca^{2+}，CaM 和 IL-1 在伤后的各时相点，均有不同程度的升高，其中的变化除 50 h 的时相点外，均接近 PLC 活性的变化趋势。应用三七皂甙治疗的组，除大剂量以外的中、小剂量组，用药到 26 h，即应用 6 次药物以上者对伤鼠 MΦ 升高 IP3、Ca^{2+}，CaM 和 IL-1 均有显著的降低作用。其中注射中剂量三七皂甙的组，可使高于正常 148.7% ~ 453.0% 的伤鼠 MΦ IP3，降至正常的 101% ~ 123%；可使比正常对照组升高 156% ~ 444% 的伤鼠 MΦ 胞内 Ca^{2+}，降至正常的 102% ~ 153%；能使比正常升高 127% ~ 188% 的伤鼠 MΦ CaM，降至正常的 99% ~ 114%；能使比正常组升高 153% ~ 170% 的 MΦ IL-1 分泌，降至正常的 101% ~ 107%。小剂量组可使比正常升高的 IP3 活性，降至正常的 99% ~ 114%；Ca^{2+} 降至 134% ~ 166%；CaM 降至 105% ~ 114%；IL-1 分泌降到 105% ~ 117%。另外，单烫伤组 50 h 检测各指标反应均有所回落，Manne 等[11]认为 PLC 水解时需要一定浓度的 Ca^{2+} 存在才可发生，PLC 的激活是外部信号作用于细胞表面受体，继之通过细胞膜 G 蛋白的介导作用，而使细胞内 PLC 激活。而 50 h PLC 活性与 26 h 比较显著回落，提示有细胞内因素调节 PLC，其原因可能是 PLC 过度活化后补充来源不足而处于一种耗竭状态[11]，其后回升可能是由于细胞内因素调节 PLC 使其补充来源，外部因素信号进一步作用所致。其余指标的反应是因 PLC 反应所影响的。综上所述结果显示，可以说明三七皂甙对烫伤小鼠 MΦ 肌醇脂质信号系统中的 IP3→CaM 途径及降低 IL-1 的产生和分泌具有较好的调理作用。MΦ 的信号转导途经虽然最近有许多新的发现，但有的还不够确立或有一些争论。本研究选择的信号系统是经国内外很多学者研究证实了的信号系统，将中药对动物处理后研究其调理的作用，可获得肯定的结果。所以，经我们的实验显示，也获得了较满意的结果。三七皂甙对其它疾病已在广泛的应用，如用于心脏病患者，已发现它对心肌钙，钙调蛋白及其它都有很大的影响。但三七皂甙应用于调理烧伤后受损免疫细胞的信号转导异常的报道，目前在国内外尚未见报道。

参考文献：

[1] Manne V, Kung H F. Characterization of phospho-inositide specific phospholipasec from human platelets[J]. Biochem J, 1987, 243(3): 763 - 771.

[2] Olivier M, Baimbridge K G, Reiner N E. Stimulus-response coupling in monocytes infected with leishmania[J]. J Immunol, 1992, 148(4): 1 188 - 1 196.

[3] Downes C P, Hawkins P T, Irvine R F. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-trisphosphate is agonist-stimulated parotid gland[J]. Biochem J, 1986, 238(2): 501 - 506.

[4] 罗中华，蔡绍丽，黄文华，等.三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞的调理作用[J].中华外科杂志，2000，38(11)：868 - 871.

[5] Luger A, Graf H, Schwarz H P, *et al*. Decreased serum interleukin-1 activity and monocyte interleukin-1 production in patients with fatal sepsis[J]. Crit Care Med, 1986, 14(5): 458 - 461.

[6] Tonnesen Marcia G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium[J]. J Invest Dermatol, 1989, 93(2 suppl): 53 - 58.

[7] Yuman F, Lowry Stephen F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis[J]. Clin Immuno Immunopath, 1990, 55(1): 157 - 165.

[8] 罗中华，蔡绍丽，何保斌，等.三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞产生 NO 和 TNF 的作用[J].第三军医大学学报，2001，23(6)：664 - 666.

[9] Abdel Latit A A. Calcium-mobilizing recerptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers[J]. Pharmacol Rev, 1986, 38(3): 227 - 272.

[10] Kovacs E J, Radzioch D, Yoang H A, *et al*. Differential inhibitior of IL-1 and TNF-α mRNA expression by agents which blook second messenger pathways in marine macrophages[J]. J Immunol, 1988, 141(9): 3 101 - 3 105.

[11] Berridge M J, Irvine R F. Inositol phosphates and cell signaling[J]. Nature, 1989, 341(1): 179 - 204.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net