DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.03.002

氢溴酸苦甘草碱对肾上腺髓质释放儿茶酚胺的影响

（附儿茶酚胺组织内的测定法）

训练部药理教研室　姚丹帆　李英鄂　程　瑜　曹洪友*　王建新

氢溴酸苦甘草碱是从苦甘草中分离出的一种生物碱，经制成氢溴酸盐，易溶于水①。动物实验证明：它有较强的平喘作用，对豚鼠离体气管平滑肌有直接松弛作用②，此乃是兴奋β受体的结果。临床观察对喘息型慢支交感偏亢型亦有一定疗效③。为进一步证实本药平喘作用是否与促使肾上腺髓质释放儿茶酚胺有关？长期用药能否使儿茶酚胺释放耗竭？现对肾上腺髓质内儿茶酚胺的浓度变化作一测定，为分析苦甘草碱的平喘作用原理，提供依据。

儿茶酚胺又称邻苯二酚胺，包括肾上腺素（E）、去甲肾上腺素（NE）和多巴胺（DA），它们存在于组织中的特定部位。肾上腺髓质细胞所分泌的儿茶酚胺包括有E和NE两种，它由两种不同类型的嗜铬细胞所分泌，皆储存在肾上腺髓质内囊泡结构——嗜铬颗粒之中④，肾上腺髓质细胞内E、NE的变化，可以反映出体内E、NE一定的动态水平。

现参照上海药研所神经药理组与Westerink (1977)⑤、Miller (1970)⑥等对组织内儿茶酚胺的测定方法，结合我们实验室的条件加以改进而建立的，本方法简便、迅速，可在同一组织内同时分离、提出E、NE等，并测定之。

材料和方法

一、试剂：所有试剂均为分析纯规格，未经特殊处理，均用玻璃器皿制备的重蒸馏水配制，所用器皿和试剂均避免橡皮和塑料的沾污。

1. EDTA 0.1M：称EDTA二钠3.72克，加重蒸馏水至 100ml 使溶解，并用NaOH 5N调节pH至7.0。

2. NaOH 5N：100克NaOH溶于重蒸馏水至500ml即可。

3. $HClO_4$ 0.4N：取高氯酸 16.7ml（相当于12N）加重蒸馏水至500ml。

4. HCOOH 1N：取浓甲酸40ml（相当于21N）用重蒸馏水稀释至 840ml，即得。配0.5N HCOOH、0.1N HCOOH、0.01 N HCOOH皆用1N HCOOH稀释而得。

5. 复方碘溶液：取碘化钾10g，加适量重蒸馏水使溶解，再加碘5g，溶于碘化钾溶液中，搅拌、溶解，最后加重蒸馏水至500ml，即成。

6. 碱性亚硫酸钠：临用前取0.25g无水亚硫酸钠溶于1ml重蒸馏水，加入9ml 5N NaOH即成。

7. 醋酸缓冲液（2M pH6.8）：用2N醋酸和2N氢氧化钠等量混合，用5N NaOH调pH至6.8。

8. 氨水0.01N：取浓氨水（NH_4OH）（相当于15N）0.3ml，加重蒸馏水至450ml即成。

9. HAc 6N：取冰醋酸（相当于17.5N）171.4ml，加重蒸馏水至500ml。

10. 标准液：L-E及L-NE按1.0mg/ml用0.1N HCOOH配成贮备液，存于2—4℃冰盒中（可存一个月）。

*渡口市人民医院进修生

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

标准工作液：用0.1N HCOOH稀释贮备液，每次用前配制（1μg/ml）。

11. 葡聚糖凝胶(Sephadex G_{10}) G_{10}（中性），粒度100—200目，先经蒸馏水浸泡24小时，再用0.5N NaOH和0.5N HCOOH交替漂洗处理后，方可装入层析柱内。柱为7×80mm，流速<1.0ml/分。

二、药品：

1. 氢溴酸苦甘草硷注射剂：40mg/ml由上海南昌制药厂供给。

2. 利血平注射剂；1mg/ml。作为阳性对照药用。为市售广州第二制药厂出品。

三、仪器：荧光分光光度计（日本日立）氙灯光源，1厘米×1厘米石英比色杯，每次测定时皆用标准硫酸奎宁（10^{-6}）溶液校正仪器（370nm/470nm）。

四、动物：选用健康大白鼠体重为100—150克，雌雄均可，将其分为：

1. 氢溴酸苦甘草硷组：又分为两组：

小剂量组为10mg/kg/日(按体表面积计算相当于成人80mg/日），灌胃一月。

大剂量组为25mg/kg/日（按体表面积计算相当于成人200mg/日）灌胃一月。

2. 生理盐水对照组：用量与给药组相同（5ml/kg）灌胃一月。

3. 利血平组（作为阳性药物对照）0.4mg/kg/日，肌注，一周。另有盐水组作为利血平的对照1ml/kg/日，肌注，一周。

五、方法：

1. 组织制备：取给药组和对照组大白鼠分别断头活杀、放血，迅速取一侧肾上腺剥离去周围脂肪组织，用滤纸将组织表面水分吸干，称重，置于加有0.01%L-半胱氨酸(每10mg—0.01ml)和冷的0.4N $HClO_4$ 3ml中，制成匀浆（全部操作过程均在冰浴冷冻下进行）。

2. 离心：在4℃，5000转/分，离心30分钟，取上清液（组织样品）作分离提取。

3. 分离提取：取上清液0.6ml分为Ⅰ Ⅱ两管，Ⅰ管加内标准（E、NE混合标准液）0.5μg/0.5ml，Ⅰ、Ⅱ管皆用0.4N $HClO_4$ 调整体积至3ml，分别过柱(G—10柱)，弃去过柱的上清液后，立即用0.01N HCOOH洗脱，收集洗脱液Ⅰ—3ml，Ⅱ—3ml，至两支刻度离心管内，作反应测定之。(G-10柱在用前，先用3ml 0.01N NH_4OH 和3ml 0.01N HCOOH洗涤、滴干，备用。详细过程见图1）

4. 荧光反应：取各管洗脱液1ml，分别加入0.1M EDTA 0.4ml和醋酸缓冲液1.5ml混匀，然后置于30℃水浴中，加碘溶液0.2ml，摇匀，2分钟后，加入新鲜配制的碱性亚硫酸钠0.4ml，摇匀，再过2分钟后，加入6N醋酸0.5ml，摇匀后立即从水浴中取出测定之（图1）。

5. 荧光强度的测定：E—以激发光波长410nm，发射光波长510nm，狭缝为4，S=3.4，测定之。待E全部测定完毕后，再于沸水浴中加热2分钟，取出后在自来水中冷却，又以激发光波长385nm和发射光波长485nm，测定NE的荧光强度。

E和NE的组织空白管，是取每组第Ⅰ管洗脱液中1ml，先加碱性亚硫酸钠溶液，后加氧化剂复方碘溶液，其他试剂加入顺序相同，此即谓非氧化空白对照管。

每次测定各组样品，均随同作外标准（不经G—10柱）的测定。

每个组织样品所测定的E、NE荧光读数，均代入以下公式计算其含量和回收率。

$$\text{外标准 (Se)} = \frac{\text{外标准加入量}}{\text{标准荧光读数}} = X \text{ ng/格}$$

$$\text{内标准 (Si)} = \frac{\text{内标准加入量}}{\text{内标准荧光读数—样品荧光读数}} = X \text{ ng/格}$$

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$\text{组织含量}(C)=\frac{(Si)\times\text{样品荧光读数}\times(\text{取上清液量}\times\text{总量})}{\text{组织重量（克）}}=X\ \mu g/g$$

$$\text{回 收 率}(R)=\frac{Se}{Si}\times 100\%=X\%$$

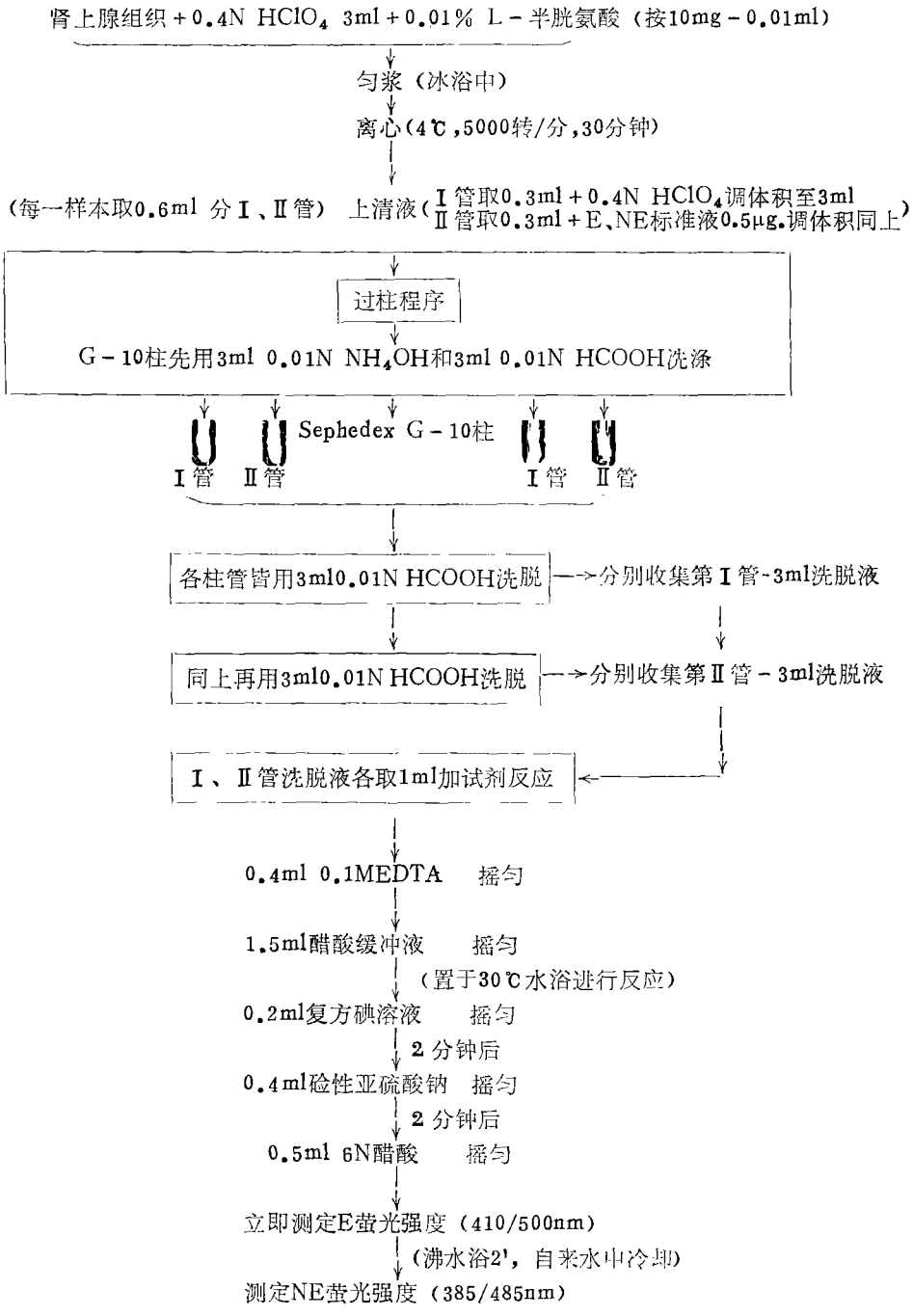


图1 肾上腺组织内E、NE分离、提取和测定的程序

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果和讨论

一、各组大白鼠肾上腺内儿茶酚胺的含量变化（表1）。

从各组所测得的E、NE的含量提示，氢溴酸苦甘草硷不论大剂量组（25mg/kg/日）或小剂量组（10mg/kg/日）与盐水对照组比较，肾上腺内儿茶酚胺含量相差不显著

表1 氢溴酸苦甘草硷、利血平对肾上腺内E、NE含量的影响

分组	观察结果 / 分测	动物数	平均值±标准差（μg/g）	两平均数相差±标准误（μg/g）	t 值
给药组	氢溴酸苦甘草硷 25mg/kg/日（灌胃一月）	E	11	280.2±188.9	17 ±70.2	0.2422(P>0.5)
		NE	11	117.6± 81.4	16.1±171.3	0.0937(P>0.5)
	10mg/kg/日（灌胃一月）	E	15	364.4±297.5	101.2±96.7	1.046 (P>0.2)
		NE	15	171.1±178.3	37.4±58.7	0.4661(P>0.5)
对照组	盐水组 5ml/kg/日（灌胃一月）	E	11	263.2±133.3		
		NE	11	133.7±108.6		
给药组	利血平组 0.4mg/kg/日（肌注一周）	E	10	10.27±23.3	171±51.5	3.32(P<0.005)
		NE	10	0.6±0.82	50.3±21.14	2.397(P<0.05)
对照组	盐水组 1ml/kg/日（肌注一周）	E	7	180.9±162.8		
		NE	7	50.9±68.5		

* 药物组与盐水对照组比较

（P>0.2以上），也就是说对大白鼠肾上腺嗜铬细胞内E、NE含量无重大影响。但利血平组肾上腺内E、NE含量明显降低，与对照组比较相差显著（P<0.05以上）。根据我们所测得的大白鼠肾上腺内E、NE的正常含量按μmol/g计算，分别为1.4μmol/g（E）和0.31μmol/g（NE），与Head[7]（1977）儿茶酚胺的半自动测定所得的结果相比稍偏低（大白鼠肾上腺内E为2.2μmol/g，NE为0.5μmol/g）。

二、本测定法之研讨：

1. 浓度与荧光强度的关系：按上述显荧光方法，分别观察了各种不同浓度的已知标准混合溶液（E与NE），含0—0.05μg、0—0.1μg、0—0.15μg、0—0.2μg与荧光强度之间的关系，在所测定的浓度范围内，两者存在直线关系。

2. Sephedex G-10柱的性能与洗脱液：G—10柱能较好地将儿茶酚胺分离、提取，按Westerink(1977)[6]方法修改后，用0.01N HCOOH作洗脱液，其洗脱峰大部分集中在第Ⅰ管3ml内，第Ⅱ管洗脱液（3ml）含量很少或几乎无有。据Viktora(1968)[8]意见，柱的洗脱液最适当的量为3ml，它可将85%ENE被回收，若增加洗脱液的量，仅增加稀释度而不能提高洗脱的百分率。我们实验的结果与其相符。故证明G—10层析柱，分离效果好，特别是HCOOH洗脱液，能迅速而较完全地将E、NE从柱上洗脱下来，比过去用醋酸（HAc）洗脱峰值集中，无拖尾现象。

3. E、NE的分测：用三羟吲哚荧光法（THI），以碘溶液作氧化剂，将E、NE形成氧化产物，在碱性亚硫酸钠溶液中荧光较稳定，但E荧光衰退比NE荧光衰退快，利用其稳定

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性不同用来鉴别E与NE⑥。并利用E和NE的激发光波与发射光波上的不同，分别测定：（E为410/500nm，NE为385/485nm）。但目前国内外多用$K_3Fe(CN)_6$作为氧化剂⑧，它较I_2溶液氧化产生的荧光强，I_2氧化变异较大，我们分测E、NE的含量其标准差较大，可能是其原因之一，尚待今后研究改进。Chang提出⑩E在反应后1—2分钟荧光强度最大，萤光形成快，但在室温下衰减也快，沸水浴上很快消失。NE萤光发生较慢，室温下萤光达最强要60分钟，而沸水浴上加热2分钟，即可达最大，加热后在室温萤光可稳定60分钟。因而我们利用E、NE萤光形成的快、慢不同和加热后消退和增强的区别，将E在反应后立即测萤光强度，而后再在沸水浴中加热2分钟，使E萤光消退（约70%以上），而NA萤光最强时测定之，这样将可排除E对NE的萤光干扰。

最近Head⑦报告儿茶酚胺的测定，用0.2%w/vVit C.和1%v/v T.G.A(Thioglycallic Acid)作稳定剂，用VitC.稳定剂时E、NE等混合物可产生典型的荧光图，但用T.G.A.时，则可消除E的荧光，仅使NE产生一稳定萤光，如此分测，将更加准确可靠，此方法我们尚在摸索。

4．试剂空白和非氧化空白对照，其荧光强度皆显示出很低的值。如每次测定样品荧光强度时，皆用S＝3.4，此时对照管测不出荧光值，只有将放大系统S＝10，才出现很低峰值。

5.回收率：根据上述分离提取的程序，代入公式计算其回收率（表2），总回收率平均在60—80%，

表2　肾上腺组织内儿茶酚胺测定的回收率

组别 \ 平均回收率		肾上腺素（E）平均回收率±标准差（S.D）	去甲肾上腺素（NE）平均回收率±标准差（S.D）
氢溴酸苦甘草碱组	大剂量(25mg/kg)	67.6±18%	61.7±19.8%
	小剂量(10mg/kg)	73.6±21.5%	66.7±15%
生理盐水对照组		76.2±19%	74.3±15%
利血平药物组		62.7±17%	62.3±19%
利血平盐水对照组		81.1±29.5%	78.8±13%

小　结

通过本实验证明，氢溴酸苦甘草碱的平喘作用与肾上腺髓质释放儿茶酚胺无直接关系，虽较长期服药（灌胃一月），不论其小剂量(10mg/kg/日)或大剂量(25mg/kg/日)，均对肾上腺嗜铬细胞内儿茶酚胺含量无明显影响。然而用利血平作为阳性对照药仅肌注一周，测其肾上腺内儿茶酚胺含量与对照组相比，明显下降，差异显著($P<0.05$以上)。故用此测定方法再次证实，利血平有促使肾上腺髓质内儿茶酚胺释放耗竭之效。

组织内儿茶酚胺的测定方法，经以上实验证明，该方法简便、迅速、可靠，但由于E和NE萤光强度的稳定性易受多种因素的干扰，组间误差较大，为更好地排除干扰，缩小误差，尚待进一步探索改进。

参考文献

(1) 医学科研资料：第三军医大学，(3) 17—23，1975

(2) 苦甘草及苦甘草碱甲的药理作用：第三军医大学学报　2:5—15,1979。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

两相Q热立克次体在鸡胚细胞中繁殖的初步研究

训练部微生物学教研室　谢佩蓉　朱红阳

Q热立克次体在原代或传代单层细胞上生长繁殖的研究已有不少报导①—⑦，由于采用的细胞株与检查方法的不同，不同相的Q热立克次体在不同细胞或同种细胞内的繁殖量及最早发现立克次体的时间不尽一致。国内对Q热立克次体在细胞培养中的繁殖动态研究不多，特别是Ⅰ相Q热立克次体尚未见报导。由于自人体或动物体初分离之Q热立克次体均属Ⅰ相，为探讨组织培养方法应用于Q热立克次体的实验检查及疫苗制备的可能性，有必要对Ⅰ相Q热立克次体在组织培养细胞中的繁殖情况进行研究观察。本文就Ⅰ相及Ⅱ相Q热立克次体在鸡胚纤维母细胞中的生长繁殖特点，以及应用离心吸附和感染细胞计数法于Q热立克次体的培养与检查，一并加以报告。

材料及方法

一、毒种

Q热立克次体Henzerling株，本室鸡胚卵黄囊及小白鼠腹腔交替传代10次；九里株鸡胚传代42次，经血清学及三胜黄试验测定分别为第Ⅰ相及第Ⅱ相。试验前取冰冻保存的强度感染的鸡胚卵黄囊，称重后置组织研磨器研磨，加维持液(2%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Eagl、液）⑧制成10%悬液，经每分钟2000转离心沉淀10分钟，吸取中层悬液，再以维持液稀释成10^{-2}备用。

二、细胞培养

取9～10日令鸡胚，按常规法经胰酶消化后之细胞悬液用四层纱布过滤后，用生长液稀释计数，以每毫升100万细胞数接种至盖片培养（盖片大小18mm×6mm，水平位置放于瓶底）每瓶1毫升，然后直立装入铝制饭盒内，置37℃孵育箱48小时，细胞长成单层，备用。

三、培养基

生长液：5%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Hanks液，每毫升加青霉素100单位，链霉素100微克。用7%$NaHCO_3$调pH至7.6。

维持液：2%小牛血清0.25%乳白蛋白水解物Eagle液，用7%$NaHCO_3$调pH至7.6未加抗菌素。

四、细胞的感染与立克次体的检查

取已长成单层的细胞培养瓶，吸去生长液，用Hanks液洗涤1次，加入10^{-2}立克次体悬液1毫升，于国产LXJ Ⅱ型号水平式离心机室温下以每分钟2000转离心10分钟，然后吸去立克次体悬液，用Hanks液洗涤1

※　※　※

(3) 氢溴酸苦甘草硷治疗86例喘息型慢支炎临床疗效的观察，第三军医大学附三院气管炎防治组，1978，9(内部资料)

(4) Hagen, P et al:J Pharmacal130:9,1960

(5) Westerink, B.H.C et al:J.Neurochem. 27: 692—706,1977,

(6) Miller.F.P.et al:Bioch em.pharmacol. 19:435,1970

(7) Head.R. J. et al:The Anst. J.of Exp. Biol. & Med. Scien.55(2):213,1977.

(8) Viktora, J. K. at al:Analytical. Biochem. 23:513—528,1968.

(9) Methods of Biochemical analysis 1971, 9—13—45,

(10) Chang. C. C.: Int.J. Neuropharmacol, 3:643—649,1964.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net