

· 专题交流 ·

青蒿琥酯对中暑内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙浓度的影响

张培, 罗炳德*, 谭庆, 邹飞, 万为人, 郭进强

(第一军医大学高温医学研究室, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 建立高温诱导的内源性内毒素血症的动物模型, 研究青蒿琥酯对中暑内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙离子($[Ca^{2+}]_i$)浓度的影响。方法 昆明小鼠被随机分为常温组、高温组、青蒿琥酯+高温组[连续5 d按60 mg/(kg·d)腹腔注射给药。高温组和青蒿琥酯+高温组的小鼠均在干球温度(Tdb) $(35 \pm 0.5)^\circ C$ 、相对湿度(RH) $(65 \pm 5)\%$ 条件下热暴露2 h, 诱导其产生内毒素血症; 常温组在干球温度 $(25 \pm 0.5)^\circ C$ 、相对湿度 $(43 \pm 5)\%$ 条件下暴露2 h。之后立即分离各组腹腔巨噬细胞, 采用Fluo-3/AM负载及流式细胞仪检测细胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度。结果 常温组、高温组和青蒿琥酯+高温组的巨噬细胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度分别为 3.30 ± 0.34 、 14.26 ± 0.89 和 5.19 ± 0.21 ; 高温组较常温组巨噬细胞游离 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度显著增加($P < 0.01$), 青蒿琥酯+高温组虽高于常温组($P < 0.05$), 但明显低于高温组($P < 0.01$)。结论 高温诱导小鼠产生内毒素血症时, 腹腔巨噬细胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度升高明显, 青蒿琥酯则能显著降低细胞内的游离 $[Ca^{2+}]_i$ 水平, 这可能是其抗内毒素血症、降低机体对内毒素反应、保护细胞的机制之一。

关键词: 中暑; 内毒素血症; 游离钙; 青蒿琥酯

中图分类号: R135.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0096-03

Effects of artesunate on free calcium concentration in peritoneal macrophages of endotoxemia mice induced by hyperthermia

ZHANG Pei, LUO Bing-de, TAN Qing, ZOU Fei, WAN Wei-ren, GUO Jin-qiang

(Department of Thermal Environment Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Objective To investigate the effects of artesunate on free calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) concentration in peritoneal macrophages of endotoxemia murine model induced by hyperthermia. **Method** Kunming mice (6 weeks) were randomly divided into control group, hyperthermia group and artesunate+hyperthermia group [ip with artesunate by a dosage of 60 mg/(kg·d) for 5 days]. Endotoxemia was induced by two hours heat exposure, Tdb is $(35 \pm 0.5)^\circ C$ and RH is $(65 \pm 5)\%$, in hyperthermia group and artesunate+hyperthermia group. Control group was exposed two hours with Tdb $(25 \pm 0.5)^\circ C$ and RH $(43 \pm 5)\%$, and peritoneal macrophages of three groups were isolated immediately. Intracellular free $[Ca^{2+}]_i$ concentration was quantitated directly by a flow cytometer through fluorescent Ca^{2+} indicator Fluo-3/AM. **Result** The free $[Ca^{2+}]_i$ concentrations in peritoneal macrophages of control group, hyperthermia group and artesunate+hyperthermia group were 3.30 ± 0.34 , 14.26 ± 0.89 and 5.19 ± 0.21 respectively. Compared with control group, intracellular free $[Ca^{2+}]_i$ concentration of hyperthermia group was significantly increased ($P < 0.01$). Artesunate+hyperthermia group's free $[Ca^{2+}]_i$ concentration was higher than that of control group ($P < 0.05$), but markedly lower than that of hyperthermia group ($P < 0.01$). **Conclusion** Free $[Ca^{2+}]_i$ concentration in peritoneal macrophages of endotoxemia mouse model was strikingly increased induced by hyperthermia. However, artesunate can significantly reduce the level of intracellular free $[Ca^{2+}]_i$. It may be one of the mechanisms that artesunate can inhibit endotoxemia, reduce reaction of body to LPS and protect cells.

Key words: Heat stroke; Endotoxemia; Free $[Ca^{2+}]_i$; Artesunate

近年来有研究发现, 青蒿琥酯在对抗外源性内毒素血症、降低内毒素引起的细胞因子对机体的危害方面有着很好的效果, 对细胞的保护作用也十分明显^[1-3]。本实验室参考过去建立动物模型的方法^[4], 建立高温诱导中暑内毒素血症的动物

模型, 观察青蒿琥酯对小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

注射用青蒿琥酯为桂林南药股份有限公司产品, 钙离子荧光指示剂Fluo-3/AM为Molecular Probes公司产品, 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)为Sigma公司产品(由吉泰公司提供), RPMI-1640培养基购自GIBCO公司。主要实验仪器包

收稿日期: 2004-07-01; 修回日期: 2004-08-31

基金项目: 军队“十五”指令性课题(01L051)

作者简介: 张培(1979-), 女, 陕西渭南人, 在读硕士研究生。

* 通讯作者, E-mail: gw@fimmu.com

括FACSscan流式细胞仪(Elite, Coulter Corporation, USA), 第一军医大学中心实验室提供第一军医大学人工热气候模拟舱, 沈阳龙腾电子有限公司的电子天平、台式离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型的建立 昆明小鼠, 雌雄不限, 6周龄, 体重20~30g, SPF级, 购于第一军医大学实验动物中心, 随机分为常温组、高温组和青蒿琥酯+高温组, 每组4只。青蒿琥酯+高温组小鼠连续5d按60mg/(kg·d)腹腔注射给药, 第5天给药后30min与高温组小鼠同时进入人工热气候模拟舱, 在干球温度(Tdb)(35±0.5)℃、相对湿度(RH)(65±5)%条件下热暴露2h, 诱导其产生内源性内毒素血症; 常温组在Tdb(25±0.5)℃、RH(43±5)%条件下暴露2h, 之后立即分离各组小鼠的腹腔巨噬细胞。

1.2.2 青蒿琥酯的配制 注射用青蒿琥酯60mg用1ml NaHCO₃溶解, 再用9ml生理盐水将其稀释到终浓度为6mg/ml, 按小鼠体重给药。

1.2.3 腹腔巨噬细胞的分离 小鼠摘眼球处死, 于75%乙醇液中浸泡数秒后, 固定于手术操作台, 腹腔注射冰冷的含10U/ml肝素的RPMI-1640培养液5ml, 轻揉1min后收集腹腔灌洗液, 1000r/min离心10min, 沉淀以PBS洗2次, 2%台盼蓝检查细胞活性, 瑞氏染色鉴定细胞纯度皆>95%, 调整细胞浓度1×10⁶~2×10⁶/ml, 用99μl的PBS重悬细胞, 混匀后转移至1.5ml EP管内。

1.2.4 Fluo-3/AM 的负载及荧光测定 50μg Fluo-3/AM 用无

水DMSO配成0.5mmol/L储备液, 染色时在99μl的PBS细胞悬液中加入1μl的储备液, 使其终浓度为5μmol/L, 室温下避光孵育1h, PBS 1ml漂洗离心2次, 去除游离之Fluo-3/AM, 最后加PBS 500μl上机检测样品的荧光强度。每份标本收验5000个细胞, 采用激光波长为530nm。

1.3 统计学处理

文中数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.0统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用LSD法。

2 结果

2.1 各组巨噬细胞中游离钙离子荧光强度和流式细胞仪检测结果

常温组、高温组和青蒿琥酯+高温组巨噬细胞的荧光强度检测结果见图1(分别是A、B、C)。Y轴表示细胞数目, X轴代表所测的荧光量, 用信道数表示, 均有1024个信道(刻度0~1024)。信道数的多少反映细胞受激光照射后发出荧光的强弱, 间接反映所测物质的量, 即通过所测荧光强度值, 可间接反映细胞内[Ca²⁺]_i浓度。

由图形比较可以看出, 高温组的荧光强度的峰值位置明显较常温对照组的右移, 即信道数增大, 说明荧光强度增大, 提示游离[Ca²⁺]_i浓度高; 而青蒿琥酯+高温组荧光强度的峰值位置则较高温组明显左移, 即信道数减小, 荧光强度明显降低, 表明细胞内的游离[Ca²⁺]_i浓度降低; 青蒿琥酯+高温组与常温组相比, 峰值稍右移, 说明[Ca²⁺]_i相对常温组还是升高的, 但升高幅度小于高温组。

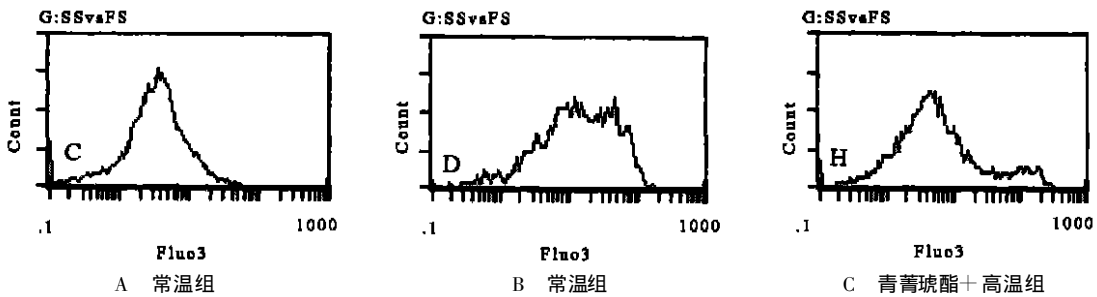


图1 各组巨噬细胞内[Ca²⁺]_i荧光强度检测结果

2.2 各组小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度

表1结果显示, 高温组细胞内游离[Ca²⁺]_i荧光强度(反映细胞内Ca²⁺浓度)明显高于常温组(P<0.01), 青蒿琥酯+高温组细胞内游离[Ca²⁺]_i荧光强度高于常温组(P<0.05), 但明显低于高温组(P<0.01)。

表1 各组小鼠腹腔巨噬细胞内游离[Ca²⁺]_i浓度 (荧光指数, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	[Ca ²⁺] _i 浓度
常温组	4	3.30 ± 0.34
高温组	4	14.26 ± 0.89**
青蒿琥酯+高温组	5	5.19 ± 0.21*#

与常温组比较 *P<0.05, **P<0.01; #与高温组比较 P<0.01

3 讨论

Ca²⁺是生物细胞内信号转导中的第二信使, 对细胞功能

的调节具有重要的作用。正常情况下, 细胞内[Ca²⁺]_i维持在稳定的水平。当机体受到各种有害刺激时, 如中暑、烧伤、休克等, 会导致细胞内的[Ca²⁺]_i浓度显著升高, 使线粒体氧化-磷酸化解偶联, ATP合成不足, 能量代谢发生障碍; 同时, Ca²⁺作为第二信使, 会传递外界刺激信号, 启动基因转录, 促使细胞分泌大量的炎症细胞因子, 加重机体的损伤^[5-7]。

本实验结果显示, 高温组小鼠腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度是明显升高的, 说明内毒素刺激机体后, 会导致胞外Ca²⁺大量进入胞内, 使胞内游离钙离子浓度升高, 造成机体的严重损伤。而应用青蒿琥酯后, 虽然细胞内游离钙离子浓度有所升高, 但和高温组相比, 这个升高幅度是轻微的, 细胞内钙离子浓度是已经大大降低了, 这有助于维护细胞的生理状态, 阻断机体能量代谢的恶性循环, 减少炎症细胞因子分泌, 减少机体各方面损伤。因此, 青蒿琥酯能够降低中

暑内毒素血症时腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度, 达到保护细胞的目的。

参考文献:

- [1] 谭余庆, 赵一, 林启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24 (3): 166-171.
- [2] 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的炎症因子合成抑制作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8 (5): 262-265.
- [3] 梁爱华, 薛宝云, 李春英, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的一氧化氮合成的抑制作用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 770-774.
- [4] 罗炳德, 万为人, 闫文生, 等. 动物受热致死过程中内毒素血症的

研究 [J]. Chinese J Ind Med, 1998, 11 (3): 140-143.

- [5] Yasuda S, Sugira S, Yamashita H, et al. Unloaded shortening increases peak of Ca^{2+} transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285 (2): 470-475.
- [6] White DJ, Maass DL, Sanders B, et al. Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after bum trauma [J]. Crit Care Med, 2002, 30 (1): 14-22.
- [7] Tombal B, Denmeade SR, Isaacs TJ. Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of $[Ca^{2+}]_i$ in individual cells undergoing apoptosis [J]. Cell Calcium, 1999, 25 (1): 19-28.

青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬功能的影响

谭庆, 罗炳德*, 张培, 周爱军, 杨光, 李文

(第一军医大学高温医学研究室, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 研究青蒿琥酯 (AR) 对高温内毒素 (LPS) 复合因素下巨噬细胞吞噬功能的影响。方法 采用体外培养的巨噬细胞系 RAW264.7 细胞, 分成空白对照组、AR 组、LPS 组及 AR+LPS 组, 分别于 37 °C 和 40 °C, 含 95% O₂、5% CO₂ 条件下培养 1、2、3、4 h 后, 台盼蓝染色计数细胞存活数, 吞噬中性红实验检测巨噬细胞的吞噬功能。结果 经不同条件处理 3 h 后各组细胞存活数无差异, 均大于 95%; 高温内毒素复合因素使巨噬细胞的吞噬功能明显降低, 青蒿琥酯亦使巨噬细胞的吞噬功能下降, 但青蒿琥酯加内毒素组的吞噬功能明显强于单纯内毒素组。结论 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下的巨噬细胞的吞噬功能有增强作用。

关键词: 高温; 内毒素; 巨噬细胞; 吞噬功能; 青蒿琥酯

中图分类号: R135.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0098-03

Experimental study of artesunate on phagocytosis of macrophage with compound influence of hyperthermia and lipopolysaccharide

TAN Qing, LUO Bing-de, ZHANG Pei, ZHOU Ai-jun, YANG Guang, LI Wen

(Department of High Temperature Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou, 510515, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of artesunate (AR) on phagocytosis of macrophage with compound influence of hyperthermia and lipopolysaccharide (LPS). **Method** A macrophage cell line RAW264.7 was employed in an in vitro experiment and cells were divided into blank control group, AR group, LPS group and AR+LPS group. Cells were incubated for 1, 2, 3 and 4 hours at 37 °C or 40 °C with 5% CO₂, respectively, and stained with trypan blue for counting of survival cells and neutral red absorption test was used to observe phagocytosis function of macrophages. **Result** No significant difference in survival rate (more than 95%) of macrophages was observed in all the groups 3 h after different treatments. Phagocytosis of macrophages decreased significantly by AR and under compound influence of hyperthermia and LPS, but phagocytosis in cells treated with both AR and LPS was significantly stronger than that in those treated with LPS only. **Conclusion** AR could evidently enhance phagocytosis of macrophages under compound influence of hyperthermia and LPS.

Key words: Hyperthermia; Lipopolysaccharide; Macrophage; Phagocytosis; Artesunate

Shapiro 及 Gathiram 等研究表明, 内毒素在中暑的发病过程中起着不可忽视的作用。研究表明青蒿衍生物青蒿琥酯对

抗外源性内毒素血症、降低内毒素引起的细胞因子对机体的危害方面有着很好的效果^[1,2], 对细胞的保护作用也十分明显^[3]。本实验旨在研究高温及内毒素复合因素条件下青蒿琥酯对巨噬细胞吞噬功能的影响, 以期探讨青蒿琥酯抗中暑内毒素血症的机制。

1 材料与与方法

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2004-11-25

作者简介: 谭庆 (1976-), 男, 在读硕士研究生。

*: 通讯作者, 研究员, 博士生导师, 主要从事实验性中暑 LPS

血症及其对策的研究。