

实验研究

黄精多糖对脂肪组织分泌的生物活性物质 致肝细胞 HepG₂ 分泌 CRP 的影响*

吴燊荣¹, 李友元², 王小清², 王秀华², 唐汉权², 黄志凌², 肖 洒³

(1 中南大学湘雅医学院附属海口医院心内科, 海口 570208; 2 中南大学湘雅二院老年病科, 长沙 410011; 3 海南省海口市中医药学校, 海口 570208)

【摘要】 目的: 观察黄精多糖对脂肪组织分泌的生物活性物质致肝细胞 HepG₂ 分泌 CRP 的影响。方法: 取脂肪组织培养液刺激肝细胞 HepG₂ 培养液, 观察基础状态及黄精多糖对 C-反应蛋白(CRP)分泌的影响。结果: 内脏及皮下脂肪培养液均可刺激肝细胞 HepG₂ 产生 CRP, 且腹腔内脂肪培养液刺激 HepG₂ 合成 CRP $[(3.84 \pm 0.92) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 强于皮下脂肪 $[(2.45 \pm 0.75) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, P < 0.01]$ 。黄精多糖可抑制肝细胞 HepG₂ 分泌 CRP, 对皮下及腹腔脂肪培养液所产生的刺激作用分别抑制达 45.8% 和 66.7%。结论: 脂肪组织分泌的生物活性物质可刺激肝细胞 HepG₂ 分泌 CRP, 提示脂肪组织可通过 CRP 致动脉粥样硬化形成。黄精多糖可抑制 CRP 分泌, 具有抗动脉粥样硬化作用。

【关键词】 C-反应蛋白; 黄精多糖; 组织培养; 细胞培养

【中图分类号】 R972.5; R541.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-3734(2004)06-0502-03

The effect of polygona-polysaccharose on CRP release stimulated by HepG₂

WU Shen-rong¹, LI You-yuan², WANG Xiao-qing², WANG Xiu-hua²,
TANG Han-quan², HUANG Zhi-ling², XIAO Sa³

(1 Department of Cardiology, The Affiliated Haikou Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China; 2 Department of Geriatrics, The Second Affiliated Hospital of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410011, China; 3 Department of Internal Medicine, Traditional Chinese Medicine School of Haikou City, Haikou 570208, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effect of biological substances from adipose tissue on HepG₂ and the mechanism of anti-atherosclerosis by polygona-polysaccharose. **Methods:** HepG₂ cells were cultured in adipose tissue culture media to investigate the status of C-reactive protein (CRP) release under basic condition and co-existence with polygona-polysaccharose. **Results:** The culture media of both omental and subcutaneous adipose tissue stimulated the HepG₂ to produce CRP. The level of CRP stimulated by omental adipose tissue culture media was higher than that by subcutaneous adipose culture media, i. e., $[(3.84 \pm 0.92) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ vs } (2.45 \pm 0.75) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}, P < 0.01]$. Polygona-polysaccharose suppressed the HepG₂ to release CRP, whose inhibition rate in omental and subcutaneous adipose culture media was 66.7% and 45.8%, respectively. **Conclusion:** The biological substances produced from adipose tissue could stimulate the HepG₂ cells to release CRP, which suggests that the adipose tissue may cause atherosclerosis by impact of CRP. Since polygona-polysaccharose may inhibit the CRP release, it demonstrates an effect of anti-atherosclerosis.

* 基金项目: 海南省自然科学基金资助重点项目 (No. 30223)

[Key words] C-reactive protein(CRP); polygona-polysaccharose; tissue culture; cell culture

炎症在心血管疾病的发病机制中起重要的作用^[1]。体内某些炎症标志物被认为是心血管疾病的危险因素,其中尤以 C-反应蛋白(CRP)特别引人注目。大量流行病学研究表明 CRP 是动脉粥样硬化和冠心病的重要危险因素。稳定型和不稳定型心绞痛患者高水平 CRP 可能引起冠脉事件的发生。

在细胞因子作用下,肝细胞 HepG₂ 合成 CRP^[2]。肝功能正常时,CRP 合成水平主要决定于细胞因子的水平。本研究表明:不同部位脂肪组织产生炎症因子等生物活性物质有差别,它们对肝脏产生 CRP 影响如何,值得进一步研究。万凤英等^[3]临床研究表明:黄精多糖能防止动脉粥样硬化,但其机制尚不完全清楚。基于上述分析,本研究将脂肪组织培养液直接作用于肝细胞 HepG₂,分析其产生 CRP 的情况,并将黄精多糖作用于 HepG₂,观察 CRP 的变化。

对象和方法

1 对象

选择中南大学湘雅二院外科行择期胆囊结石及肾结石手术的住院患者 30 例,其中男性 18 例,女性 12 例,胆囊结石者 8 例,肾结石者 22 例,平均年龄(46.9 ± 10.3)岁(范围为 32 ~ 62 岁),体重指数(BMI,体重/身高²)为(22.05 ± 2.62)kg·m⁻²(范围为 16.77 ~ 27.24kg·m⁻²)。排除标准:① 高血压病。② 急性感染。③ 自身免疫性疾病。④ 慢性肾功能不全。⑤ 恶性肿瘤疾病。

2 方法

2.1 脂肪组织的培养及培养液的提取 脂肪组织块在清除皮肤和血管后,剪成数块,大小约 100mg,称重,冷磷酸缓冲溶液(PBS)清洗 3 次后,分别置于 EP 管内剪碎。按 100mg 脂肪组织加 1mL 培养基比例置于培养板内,培养基为 DMEM/F₁₂,其中含有 10% 热灭活小牛血清、青霉素(200μg·mL⁻¹)、链霉素(50μg·mL⁻¹)、庆大霉素(200μg·mL⁻¹)。

2.2 肝细胞 HepG₂ 的培养 肝细胞 HepG₂ 购自中南大学湘雅医学院细胞培养中心。细胞复苏后,均匀传代于 24 孔板,加入含 10% 小牛血清的 DMEM/F₁₂ 培养基,同时分别加入脂肪组织培养上清液 200μL 及 10⁻⁶mol·L⁻¹ 黄精多糖(由中南大学湘雅二院临床药学研究室提供),置于 5% CO₂, 37℃ 培

养箱内,培养 24h,待细胞融合达 80% 后,吸取上清液,置于 -70℃ 冰箱保存待测。

2.3 肝细胞培养液 CRP 检测 采用夹心酶联免疫吸附法测定,灵敏度为 0.3ng·mL⁻¹,批内和批间差异均 < 10%。

3 统计学处理

应用 SPSS 8.0 统计软件包进行统计分析,各指标以均数 ± 标准差表示,组间比较采用 One way ANOVA 检验,采用双侧 P < 0.05 为统计学显著性差异。

结 果

不同部位脂肪组织培养液均可刺激 HepG₂ 分泌 CRP;腹腔内脂肪培养液引起 HepG₂ 分泌 CRP 高于腹部皮下脂肪培养液。黄精多糖干预后,腹腔内脂肪培养液及皮下脂肪培养液刺激 HepG₂ 分泌的 CRP 浓度分别下降 66.7% 和 45.8%。见表 1。

表 1 黄精多糖对不同部位脂肪组织培养液刺激 HepG₂ 分泌 CRP 的影响

Tab 1 The effect of polygona-polysaccharose on CRP release stimulated by HepG₂ ng·mL⁻¹

分 组	例数	CRP 浓度/ng·mL ⁻¹	
		基础分泌	黄精多糖干预后
皮下脂肪培养液 + HepG ₂ + DMEM/F ₁₂	30	2.45 ± 0.75	1.35 ± 0.24 ^b
内脏脂肪培养液 + HepG ₂ + DMEM/F ₁₂	30	3.84 ± 0.92 ^a	1.28 ± 0.37 ^c
基础培养液(DMEM/F ₁₂) + HepG ₂		< 0.3	< 0.3

与皮下脂肪培养液刺激组比较, a: P < 0.01; 与相应组基础分泌值比较, b, c: P < 0.01

讨 论

Jean 等^[4]研究发现,脂肪组织不仅是能量储存器官,而且是重要的内分泌器官,可以产生多种生物活性物质,包括纤溶酶原激活剂抑制物-1(PAI-1)、转化生长因子 β(TGF-β)、组织因子(TF)、补体因子(CF)、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6 和 IL-8 等。本研究表明:不同部位脂肪组织培养液均可刺激 HepG₂ 分泌 CRP,腹腔内脂肪组织培养液引起 HepG₂ 分泌 CRP 高于腹部皮下脂肪组织。脂肪组织的生物活性物质致肝脏 HepG₂ 分泌 CRP 的作用机制尚不明确,可能存在多种途径,但细胞因子的作用可能起主要作用。Raynes 等^[5,6]在人和小鼠的研究中发现, TNF-α 和 IL-6 是 CRP 的主要调节物,体内研究也发现 CRP 浓度增高直接受 IL-6 水平的影响。Fried 等^[7]通过对一组肥胖患者研究发现,其皮下脂肪组织分泌 IL-6 足以引起生物学效应。Smith 等^[8]研究也发现 CRP 的合成受多种复杂的细胞因子网络

的作用,它可能是 1 种或多种细胞因子的作用,甚至伴有激素的作用。再者,CRP 不仅是炎症反应的标志物,它还可调节巨噬细胞摄取低密度脂蛋白(LDL)^[9],刺激单核细胞释放 IL-1b,IL-6,TNF- α 等炎症因子^[10],诱导内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)及血管内皮黏附分子-1(VCAM-1)^[11],从而促进动脉内血栓形成和动脉粥样硬化的形成。

本研究表明,黄精多糖具有抑制脂肪组织培养液致肝细胞 HepG₂ 产生 CRP 的作用,但其作用机制尚未完全明了。Zelvyte 等^[12] 研究表明:肝细胞内有过氧化酶增殖体激活受体 γ (PPAR γ)和核因子 κ B(NF κ B)的表达,提示可能是激活 PPAR γ 和下调 NF κ B 途径引起 CRP 分泌减少。本课题前期研究表明,黄精多糖具有降低实验性高脂血症家兔的血脂水平和抑制动脉内膜泡沫细胞形成的作用^[13]。

综上所述,黄精多糖抗动脉粥样硬化的机制可能有:① 抑制肝细胞 HepG₂ 产生 CRP。② 直接降低实验性高脂血症动物模型的血脂,同时抑制动脉内膜泡沫细胞的形成。随着研究进一步深入,黄精多糖的开发利用前景将十分广阔。

[作者简介] 吴荣荣(1946-),男,教授,主任医师,主要研究方向:心血管病、老年病临床研究。联系电话:(0898) 66189628,E-mail:wsr6188@yahoo.com.cn。

[参 考 文 献]

- [1] Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 1995, 91(11):2844-2850.
- [2] Bastard JP, Jardel C, Delattre J, et al. Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects[J]. *Circulation*, 1999, 99(16):2221-2222.
- [3] 万凤英,颜元贵.对中药黄精历史炮制沿革的探讨[J].时珍国

- 药研究,1996,7(1):46-48.
- [4] Jean PB, Claude J, Eric B, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(9):3338-3342.
- [5] Raynes J, Eagling S, McAdam K. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cell:differential regulation of serum amyloid A(SSA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6[J]. *Clin Exp Immunol*, 1991, 83(10):488-491.
- [6] Ghezzi P, Sipe JD. Dexamethasone modulation of LPS, IL-1, and TNF stimulated serum amyloid A synthesis in mice[J]. *Lymphokine Res*, 1988, 7(2):157-166.
- [7] Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(3):847-850.
- [8] Smith JW, McDonald TL. Production of serum amyloid A and C-reactive protein by HepG₂ cells stimulated with combinations of cytokines or monocyte conditioned media: the effects of prednisolone[J]. *Clin Exp Immunol*, 1992, 90(6):293-299.
- [9] Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2001, 103(5):1194-1197.
- [10] Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein[J]. *Cytokine*, 1992, 4(5):361-368.
- [11] Pasceri V, Chang J, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs[J]. *Circulation*, 2001, 103(10):2531-2534.
- [12] Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, et al. Modulation of inflammatory mediators and PPAR γ and NF κ B expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes *in vitro* [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 45(2):147-154.
- [13] 吴荣荣,李友元,肖洒,黄精多糖调脂作用的实验研究[J].中国新药杂志,2003,12(2):108-110.

(收稿日期:2004-04-26)

¹⁵³钐-乙二胺四亚甲基磷酸的止痛和抗癌骨侵袭、骨溶解作用

付招娣,陈晓光,施波,李燕,雷小红,夏丽娟,韩锐

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所,北京 100050)

[摘要] 目的:研究¹⁵³钐-乙二胺四亚甲基磷酸(¹⁵³Sm-EDTMP)对动物疼痛的抑制和抗 Walker 256 癌的骨侵袭、骨溶解作用。方法:采用经典的物理和化学刺激致痛模型,观察给药后小鼠对热板刺激的痛阈、大鼠对光辐射刺激的甩尾阈以及化学物质刺激腹腔后的扭体反应,运用 X 光骨骼照片和胫骨病理切片,观察¹⁵³Sm-EDTMP 对 Walker 256 癌荷瘤大鼠的骨侵袭和骨溶解的影响。结果:¹⁵³Sm-EDTMP 静脉注射后 2h 已发挥止痛作用,尤以对光、热刺激后痛阈提高更明显,可持续 2~4 周。但其止痛强度和持续时间与注射剂量无明显相关。给药可抑制 Walker 256 癌的骨侵袭、骨溶解,74 及 148MBq·kg⁻¹ 剂量组荷瘤大鼠遭受骨侵袭、骨溶解的胫骨数减少近一半。结