

3-甲基胆蒎对斑马鱼组织病理效应的初步研究

杨 蓉¹, 聂芳红², 孔庆波³, 谢英明¹, 林红英¹, 陈进军¹

(1. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

3. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁 沈阳 110034)

摘 要: 分别用 25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g/L}$ 的 3-甲基胆蒎 (3-MC) 对斑马鱼进行水浴染毒, 于第 7 天和第 14 天采集各染毒组和对照组活鱼的肝、鳃、心、肠和肾, 进行病理组织学检查。结果发现, 一定剂量的 3-MC 能导致肝细胞变性, 胞浆内出现脂肪滴, 严重时肝细胞坏死解体, 界限模糊; 心肌细胞萎缩坏死; 肠粘膜上皮细胞纹状缘不整齐, 有的脱落; 鳃丝结构异常, 鳃小片表面粗糙, 上皮细胞不完整; 肾小管上皮细胞肿胀, 细胞界限不清, 管腔内均质红染。供试斑马鱼的病理组织变化与 3-MC 的作用剂量和作用时间存在一定的关系。

关键词: 3-甲基胆蒎; 毒性; 病理组织学; 斑马鱼

中图分类号: R994.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2008)04-0091-04

Preliminary Studies on Histopathological Changes in Zebrafish Exposure to 3-Methylcholanthrene

YANG Rong¹, NIE Fang-hong², KONG Qing-bo³, XIE Ying-ming¹, LIN Hong-ying¹, CHEN Jin-jun¹

(1. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. School of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. Dept. of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China)

Abstract: A range of zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to 3-methylcholanthrene (3-MC) by water pollution at the doses of 25 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$ and 400 $\mu\text{g/L}$, respectively. On the 7th day and 14th day of exposure to 3-MC, the liver, gill, heart, intestine and kidney of the fish were collected to observe histopathological changes. It was found that the hepatocytes were denaturalized with fat drops in the cellular plasma and even showed necroses or disaggregation and obscure cellular borderlines, that there were atrophies and necroses in cardiac cells, that the villuses of the enteric epithelia were out of order and even fallen off, that the secondary lamella of the gill became coarse and some of the epithelia were lost, and that the epithelia of the renal tubules were swollen and the cellular borderlines were not clear, with even red dye in some tubules. It was also found that there were, to some extent, dose-effect and time-effect relationships between the histopathological changes and 3-MC.

Key words: 3-methylcholanthrene, toxicity, histopathology, zebrafish (*Danio rerio*)

3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene, 3-MC) 属于二噁英类化合物(dioxin-like compounds, DLCs)

的范畴, 其分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}$, 由五个环组成, 为黄色多核结晶体, 不溶于水, 可溶于苯, 是细胞色素

收稿日期: 2008-05-8

基金项目: 广东省自然科学基金项目“几种 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的生化毒理学机理研究”(05011789); 广东省国际合作项目“斑马鱼生物学标志 CYP1A 在 DLCs 环境污染监测中的应用研究”(2007B050200023)

第一作者: 杨蓉 (1981-), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为高效无公害饲料。

通讯作者: 陈进军 (1967-), 博士, 教授, 研究方向为动物毒理学。E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

P4501A的诱导剂,并经CYP1A代谢为活性中间物而致癌^[1]。斑马鱼(*Danio rerio*)属于辐鳍亚纲(Actinopterygii)鲤科(Cyprinidae)短担尼鱼属(*Danio*)的一种硬骨鱼,鱼体型纤细,体侧具有像斑马一样的暗蓝与银色相间的条纹,成鱼体长3~4 cm,有的可达5 cm^[2]。斑马鱼在pH中性,水温25~31℃之间即能正常发育,因其个体小、胚体透明、繁殖快、饲养廉价等特点,在国际上被普遍用为标准实验鱼^[3,4]。本研究用3-MC对斑马鱼进行水浴染毒,观察其病理组织学变化,找出敏感器官,为探讨3-MC的毒性机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, 3-MC)为SUPELCO公司产品,二甲基亚砜(DMSO)为分析纯,购自广东光华化学厂有限公司。

斑马鱼(*Danio rerio*),购自湛江市水族市场,健康无病,体长2.8~3.5 cm,体重0.3~0.4 g,在水族箱适应性饲养1周后用于实验。养殖用水为自然曝气2 d的自来水,温控制在25~28℃之间,饲料为斑马鱼专用饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 斑马鱼分组 将斑马鱼随机分成6个组,第1组为对照组,第2至第6组为实验组。每组16尾鱼,雌雄各半。

1.2.2 染毒 根据急性毒性试验情况,用终浓度不超过体积分数0.1%的DMSO将3-MC助溶,然后按25、50、100、200和400 μg/L的浓度分别对第2、3、4、5和6组斑马鱼进行水浴染毒。

1.2.3 组织切片的制备 石蜡制片按常规制作。在染毒的第7天和第14天,分别取活鱼的心、肝、肠、鳃、肾,置于Bouin氏液中固定,用流水冲洗,经过各级乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚5 μm),苏木精-伊红(HE)染色,贴片,固封。

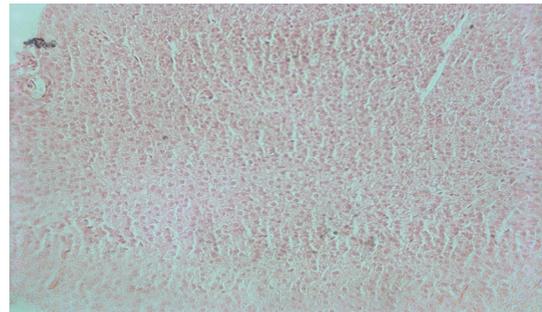
1.2.4 显微病理观察 将所制备的切片在E200型Nikon ECLIPSE生物显微镜下观察并拍照,读片。

2 结果

2.1 肝脏的病理组织学变化

对照组的肝细胞呈多角形,形状变化不大,胞质均匀、清晰,细胞界限清楚,细胞核圆球形或不

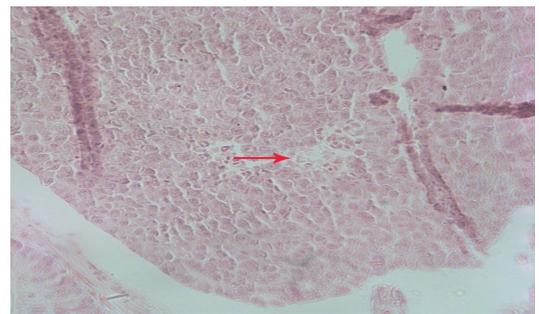
规则形,位于中央,核内有一个或两个核仁,也有少数肝细胞含有二个或三个细胞核。细胞间的窦状隙明显,肝细胞排列成明显的索状结构。在染毒第7天,肝组织中可见有少量炎性细胞浸润,肝细胞变性;而高剂量组中,肝细胞坏死,肝窦隙扩张,坏死的肝细胞解体,细胞界限不清(图1、图2)。第14天的组织切片中,肝细胞坏死增多,同时胞浆内出现了小泡性的脂滴(图3)。



肝细胞广泛性轻度颗粒变性

图1 染毒7d后的肝脏(25 μg/L, HE)

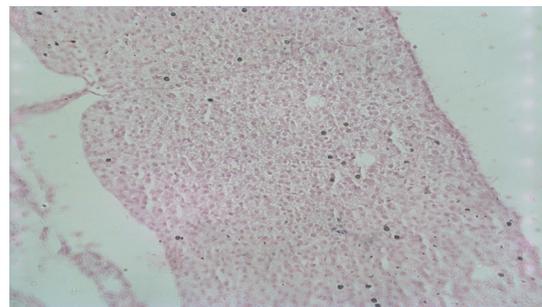
Fig.1 The liver exposed to 3-MC for 7 days



坏死的肝细胞界限模糊,溶解,细胞解体

图2 染毒7d后的肝脏(400 μg/L, HE)

Fig.2 The liver exposed to 3-MC for 7 days



肝细胞肿大,胞浆内出现大量微细颗粒

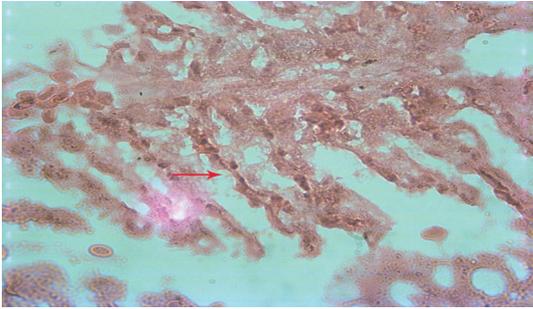
图3 染毒14d后的肝脏(25 μg/L, HE)

Fig.3 The liver exposed to 3-MC for 14 days

2.2 鳃的病理组织学变化

对照组鳃丝结构清晰,鳃小片外表面呼吸上皮细胞结构完整、表面平滑舒展。染毒第7天后,各实验组斑马鱼的鳃丝结构异常,模糊不清,高剂量

组中可见少量炎性细胞浸润, 鳃小片表面呼吸上皮细胞不完整, 表面不平滑舒展。第 14 天染毒组中, 有的表皮细胞断失, 柱细胞异形, 鳃小片上皮细胞坏死脱落, 柱细胞原有结构消失 (图 4)。



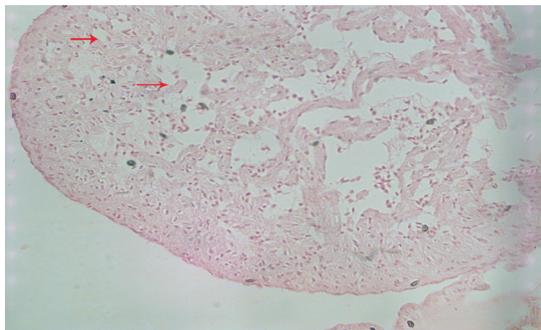
鳃丝结构模糊不清, 鳃小片上皮细胞坏死脱落

图 4 染毒 14d 后的鳃(400 $\mu\text{g/L}$, HE)

Fig.4 The gill exposed to 3-MC for 14 days

2.3 心脏的病理组织学变化

对照组心肌细胞清晰, 细胞核居中。第 7 天染毒组中, 心肌细胞有不同程度的变性、萎缩、坏死, 第 14 天染毒组中, 心肌细胞出现空泡, 坏死处心肌肌浆溶解, 出现大量炎性细胞聚积 (图 5)。



心肌纤维断裂, 大片萎缩, 坏死, 肌浆溶解或消失

图 5 染毒 14d 后的心脏(400 $\mu\text{g/L}$, HE)

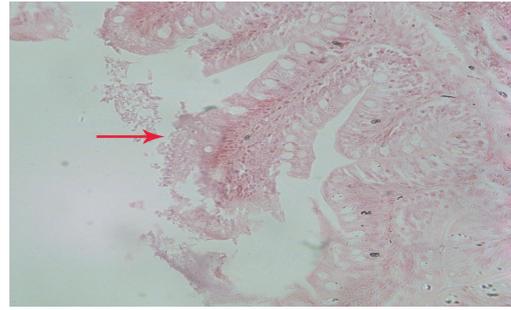
Fig.5 The heart exposed to 3-MC for 14 days

2.4 肠的病理组织学变化

对照组斑马鱼肠上皮为单层柱状细胞, 游离端具排列整齐的纹状缘, 细胞间夹有数量较多的杯状细胞。第 7 天染毒组中, 肠绒毛上皮细胞不同程度的变性、坏死, 脱落。第 14 天染毒组中, 杯状细胞增多, 肠绒毛上皮细胞坏死, 脱落, 纹状缘消失 (图 6)。

2.5 肾脏的病理组织学变化

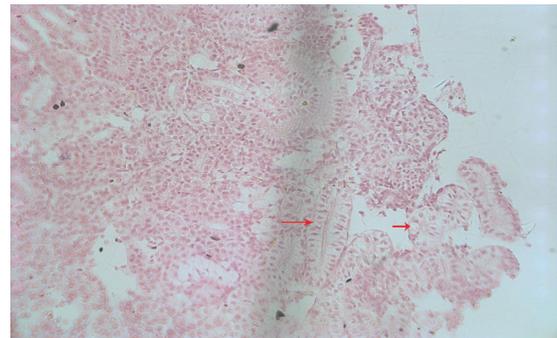
在染毒后第 7 天, 随剂量的增加, 肾小管上皮细胞出现肿胀, 细胞界限不清, 有的管腔中有均质红染; 第 14 天染毒组中, 肾小管上皮细胞出现空泡样变和脂滴, 有的肾小管上皮细胞坏死, 管腔变窄或不规则 (图 7)。



肠绒毛上皮细胞变性、坏死、脱落

图 6 染毒 14d 后的肠(400 $\mu\text{g/L}$, HE)

Fig.6 The intestine exposed to 3-MC for 14 days



肾小管上皮细胞肿胀, 管腔变窄, 个别管腔红染

图 7 染毒 14d 后的肾脏(400 $\mu\text{g/L}$, HE)

Fig.6 The kidney exposed to 3-MC for 14 days

3 讨论

3-MC 具有较强的毒性作用, 是一种环境化学致癌物, 经呼吸或饮食进入体内, 具有强亲脂性及难降解性, 不仅在水体沉积物中积累, 而且可以随食物链营养级的提高而被富集放大。3-MC 进入体内后与芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)结合, 诱导与毒物代谢有关的细胞色素 P450 1A(cytochrome P4501A, CYP1A)的基因表达及蛋白质的合成, 进而引起一系列毒性反应^[5-9]。

Norrgrent 和 Engwall 用 PCBs 对虹鳟鱼幼鱼进行注射后取肝脏进行超微结构观察, 发现肝细胞核萎缩, 脂滴增多, 线粒体的内嵴脱落, 肝脏呈现明显的病变状态^[10,11]。Zodrow 等将 2,3,7,8-四氯二苯对二噁英按 70 ng/g 给斑马鱼腹腔注射 1 次, 5 d 后, 发现肝细胞肥大, 有脂肪沉积; 腮片细胞肥大, 有脂肪沉积^[12]。

经水质接触染毒更加接近化学物污染鱼体的自然情景, 可以避免因注射化学物而对鱼体造成捕捉应激, 并使染毒更加方便。本实验首次对经水质接触染毒而暴露于 3-MC 的斑马鱼制作组织切片, 初步观察了 3-MC 对斑马鱼各器官的影响, 发现

3-MC 可广泛引起斑马鱼组织器官的变化,其中以肝脏、鳃和心脏的病变最为明显。肝脏主要表现为肝细胞变性,随着时间的延长,以坏死为主,其中有炎细胞浸润,泡浆内脂肪滴增多;3-MC 在鳃部所引发的毒性表现为鳃部有大量的污物,鳃丝结构异常,鳃丝外层上皮细胞受损,这说明3-MC 严重地影响了鱼类的呼吸机能,引发呼吸障碍;3-MC 对斑马鱼的心脏毒性表现在心肌细胞变性、萎缩,出现脂肪滴,严重时坏死,说明斑马鱼的心血管系统对3-MC 也有较高的敏感性。另外,随着3-MC 浓度的增大,作用时间的延长,斑马鱼器官的病变更加明显,对机体器官的损伤越严重。

参 考 文 献

- [1] 吴中亮. 毒理学辞典[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005:135.
- [2] 李洁斐, 李卫华. 斑马鱼及其在环境毒理学中的应用[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(5): 460-463.
- [3] Vitozzi L, De A G. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish[J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19: 167-204.
- [4] Ensenbach U, Nagel R. Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1995, 30:151-157.
- [5] Lee C J, Janine R H, Vivien K F T, et al. Regulation of constitutive mouse hepatic cytochromes P450 and growth hormone signaling components by 3-methylcholanthrene[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34:1530-1538.
- [6] Riddick D S, Huang Y, Harper P A, et al. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, a comparative anatomy induction of CYP1A1[J]. *J Biol Chem* 1994, 269: 12118-12128.
- [7] Waxman D J, Ko A, Walsh C. Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 11937-11947.
- [8] Jones E J, Riddick D S. Regulation of constitutive rat hepatic cytochromes P450 by 3-methylcholanthrene[J]. *Xenobiotica*, 1996, 26: 995-1012.
- [9] Reisdorph R, Lindahl R. Constitutive and 3-methylcholanthrene-induced rat ALDH3A1 expression is mediated by multiple xenobiotic response elements[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 386-393.
- [10] Norrgren L, Andersson T, Biork M. Liver morphology and cytochrome p450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos[J]. *Aquat Toxicol*, 1993, 2: 307-316.
- [11] Engwall M, Brunstrom B, Brewer A, et al. Cytochrome P4501A induction by a coplanar PCB, a PAH mixture, and PCB-contaminated sediment extracts following microinjection of rainbow trout sac-fry[J]. *Aquat Toxicol*, 1994, 30: 311-324.
- [12] Zodrow J M, Stegeman J J, Tanguay R L. Histological analysis of acute toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)in zebrafish[J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 66(1): 25-38.

TCDD 对斑马鱼脂质过氧化作用的初步研究

刘连平¹, 聂芳红², 孔庆波³, 林红英¹, 谢英明¹, 杨蓉¹, 陈进军¹

(1. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;
3. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 将150条斑马鱼随机等分为5组: 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英 (TCDD) 4个染毒组 (染毒剂量分别为0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.4 μg/L和 0.8 μg/L) 和空白对照组, 水质接触染毒5 d后, 采用分光光度法测定其肝组织中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的活力, 研究TCDD对斑马鱼的脂质过氧化作用。结果发现, TCDD各剂量染毒组MDA含量均有所增加, 其中0.2 μg/L组差异显著 ($P < 0.05$), 0.4 μg/L和0.8 μg/L剂量组差异极显著 ($P < 0.01$); 各染毒组SOD活性均有所下降, 其中0.2 μg/L、0.4 μg/L和0.8 μg/L剂量组差异极显著 ($P < 0.01$); 各染毒组GST活力均降低且差异极显著 ($P < 0.01$)。一定剂量的TCDD能引起MDA含量增加, 使SOD和GST活力降低, 对斑马鱼具有脂质过氧化作用。

关键词: 斑马鱼; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽-S-转移酶; 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英

中图分类号: X503.225

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2008)01-0081-04

Studies on Lipid Peroxidation of TCDD in Zebrafish

LIU Lian-ping¹, NIE Fang-hong², KONG Qing-bo³, LIN Hong-ying¹, XIE Ying-ming¹,
YANG Rong¹, CHEN Jin-jun¹

(1. *Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;*
2. *School of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;*
3. *Dept. of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China*)

Abstract: To study the lipid peroxidation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish, 150 zebrafish were randomly and equally divided into 5 groups: four test groups were exposed to TCDD at 0.1 μg/L, 0.2 μg/L, 0.4 μg/L, 0.8 μg/L, respectively in addition to one control group. Five days after the animals were exposed to the polluted water with different doses of TCDD, respectively, the level of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathionetransferase (GST) in liver of zebrafish were determined by means of spectrophotometry. It was found that the MDA level showed some increasing tendency in which 0.2 μg/L of TCDD exposure group was different ($P < 0.05$) and 0.4 μg/L and 0.8 μg/L of TCDD exposure groups were significantly different from the control group ($P < 0.01$), that SOD activity showed decreasing tendency and 0.2 μg/L, 0.4 μg/L and 0.8 μg/L of TCDD exposure groups were significantly different from control group ($P < 0.01$), and that GST activity in all TCDD treated groups showed significantly difference from the control group ($P < 0.01$). It was

收稿日期: 2007-08-10

基金项目: 广东省自然科学基金项目“几种 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的生化毒理学机理研究”(05011789); 广东省国际合作项目“斑马鱼生物学标志 CYP1A 在 DLCs 环境污染监测中的应用研究”(2007B050200023); 广东海洋大学 SCI 刊源作者基金项目

第一作者: 刘连平 (1983—), 男, 在读研究生, 研究方向为高效无公害饲料。

通讯作者: 陈进军 (1967—), 博士, 教授, 研究方向为动物毒理学。E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

concluded that TCDD at certain doses caused hepatic lipid peroxidation in zebrafish by induction of MDA increase and SOD and GST inactivation.

Key words: zebrafish; malondialdehyde; superoxide dismutase; glutathionetransferase; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)是迄今研究最多、最典型和毒性最强的二噁英类化合物(Dioxin-like compounds, DLCs)^[1-3]。研究发现,TCDD具有高残留性、高生物浓集和高生物毒性,能够诱导生物体肝细胞损害、胸腺萎缩、血液循环系统障碍等,引发育畸形、胚胎毒性、生殖毒性、致癌性等毒性反应^[4-6]。但利用斑马鱼研究TCDD对机体的脂质过氧化作用尚未见报道。本实验用TCDD对斑马鱼进行水质接触染毒,研究其对斑马鱼肝脏丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活力的影响,探讨TCDD是否通过引起斑马鱼的脂质过氧化作用,使机体产生过多自由基,导致氧化应激而发挥其毒性作用。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂与amp;仪器

TCDD(纯度99%):美国SUPELCO公司产品;

二甲基亚砷(DMSO):国产分析纯;

超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒:购自南京建成生物工程研究所;

722N型分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品。

1 mL、2 mL玻璃匀浆器:购自上海博通经贸有限公司。

1.2 实验动物处理与amp;分组

供试鱼购自广东省湛江市观赏鱼市场,经广东海洋大学水产学院鉴定为鲤科短担尼鱼属的斑马鱼(*Danio rerio*)。斑马鱼购回实验室后适应性饲养一周,鱼体健康,无自然死亡。实验用水为曝气除氯4 d的自来水,水温28℃左右,不断充气。取成年斑马鱼150条,体长4.0±0.5 cm,随机等分为5组:4个TCDD染毒组(染毒剂量分别

为0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.4 μg/L和0.8 μg/L)^[2]和溶剂对照组(曝气除氯4 d的自来水中按体积分数0.1%加入DMSO)。用终浓度不超过体积分数0.1%的DMSO将TCDD助溶后,再按不同剂量对各组斑马鱼进行水质接触染毒。

1.3 肝脏总MDA含量的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备体积分数1%的肝匀浆,肝匀浆中蛋白含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。取适量的肝匀浆,按试剂盒所述方法,用分光光度法在546 nm处测定吸光度,然后用如下公式计算肝脏总MDA含量:

$$\text{肝脏总MDA含量 (nmol/mg)} = (\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}) \div (\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度 (10 nmol/mL)} \div \text{蛋白含量 (mg/mL)}。$$

1.4 肝脏SOD活力的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备1%肝匀浆,肝匀浆中蛋白含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。取适量肝匀浆,按SOD活力测定试剂盒所述方法,用分光光度法在546 nm处测定吸光度,然后计算肝脏SOD活力。

根据SOD活力测定试剂盒定义,1 mg肝组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U),则SOD活力(U/mg) = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) ÷ 对照管吸光度 ÷ 50% × 反应液总体积(3.31 mL) ÷ 蛋白含量(mg/mL)。

1.5 肝脏GST活力的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备1%肝匀浆,肝匀浆中蛋白含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。取适量的肝匀浆,按GST活力测定试剂盒所述方法,用分光光度法在405 nm处测定吸光度,然后计算肝脏GST活力。

根据GST活力测定试剂盒的规定,1 mg肝组织蛋白,在37℃反应1 min扣除非酶促反应,使反应体系中GSH浓度降低1 μmol/L为一个酶活力单位(U),则组织中GST活力(U/mg) = (非

酶管吸光度-酶管吸光度)÷(标准管吸光度-测定管吸光度)×标准管浓度(20 μmol/L)×反应稀释倍数(6倍)÷反应时间(10 min)÷[取样量(0.1 mL)×蛋白含量(mg/mL)]。

1.6 统计学处理

数据用SPSS 11.5软件进行统计分析,结果以平均数±SD表示,采用单因素方差分析进行组间差异显著性比较。

2 结果

2.1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组MDA含量均有所增加,其中0.2 μg/L组差异显著($P<0.05$),0.4 μg/L和0.8 μg/L组差异极显著($P<0.01$)。

2.2 TCDD对斑马鱼肝脏SOD活力的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组SOD活力均有所下降,其中0.4 μg/L和0.8 μg/L组差异极显著($P<0.01$)。

2.3 TCDD对斑马鱼肝脏GST活力的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组GST活力均有所下降,且差异极显著($P<0.01$)。

表1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响
Tab. 1 The effects of TCDD on hepatic MDA, SOD and GST in zebrafish

TCDD /μg·L ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GST /U·mg ⁻¹
0	3.93±0.17	121.68±4.82	86.56±4.36
0.1	4.28±0.11	114.24±3.35	76.94±4.41**
0.2	4.64±0.13*	104.21±5.24**	72.86±4.50**
0.4	5.14±0.12**	97.17±5.55**	66.24±3.02**
0.8	5.41±0.07**	81.30±5.42**	59.02±4.63**

说明: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

3 讨论

由氧自由基产生的细胞毒性效应称为氧化应激。氧化应激实际上是促氧化与抗氧化之间的平衡失调,促氧化作用超过抗氧化作用,即当自由基的产生超过机体防御系统的清除能力,或机体防御体系受损而不能发挥正常功能时导致的细胞毒性效

应^[7]。自由基对所有的细胞成分,包括核酸、蛋白质及脂质等都有损害,过多的氧自由基就能引起机体的脂质过氧化作用。

MDA是机体脂质过氧化作用的产物,其含量的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[8];SOD、GST都是机体内的主要抗氧化酶,SOD的功能是把 O_2^- 歧化成 H_2O_2 和 O_2 ,是保护机体免受 O_2^- 毒性的重要抗氧化酶,维持细胞内适宜的氧自由基浓度,保护细胞免受活性氧对DNA等生物大分子的损伤;GST的功能是催化谷胱甘肽(GSH)与各种内源性和外源性亲电子化合物反应,生成无毒或毒性小的GSH硫结合物,它还能催化有机过氧化物还原成相应的醇。SOD、GST活力的高低间接反应了机体清除自由基的能力。斑马鱼在其胚胎发育早期,SOD就开始表达,囊胚期的SOD主要表达在卵裂球的细胞核中。在斑马鱼胚胎原肠期,SOD在各胚层胞浆与胞间质中有较强的表达;在体节分化的不同时期SOD在脊索、神经管、眼等形成中的器官的胞浆与胞质部位有不同程度的表达;在咽弓形成期,SOD在咽弓中表达微弱,在脑组织中表达较强;到孵化期,SOD在终末器官中的表达程度不尽相同,在脑中SOD在大脑区域的表达略强于间脑区域,在肌肉组织中的表达较微弱,在肠道中却有很强的表达。可见斑马鱼在胚胎早期发育过程中以SOD为代表的酶性抗氧化系统就开始逐步建立,维持胚胎组织器官细胞中的正常活性氧浓度,确保胚胎的正常发育^[5,9]。

TCDD能参与哺乳动物机体的脂质过氧化作用,能增加哺乳动物包括大鼠等机体 O_2^- 的产生,使脂质过氧化的中间产物如MDA等增加,引起抗氧化酶如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶等活力下降^[10]。本研究利用模式动物斑马鱼,首次发现TCDD能导致肝脏MDA含量增加,使SOD和GST活力下降。受试斑马鱼肝脏MDA含量增加,间接说明了斑马鱼机体细胞受到了自由基的攻击;受试斑马鱼肝脏SOD和GST活力下降,间接反应了机体清除自由基的能力降低;可见,TCDD一方面使机体降低了清除自由基的能力,另一方面又使机体细胞易于受到自由基的损伤,最终导致机体细胞的脂质过氧化作用。上述结果说明,TCDD的重要毒作用机制之一是,使斑马鱼机体细胞受到过多氧自由基的攻击,引起斑马鱼的脂质过氧化作用,从而造成相应的细胞毒性效应和损伤。

4 小 结

以一定剂量的 TCDD 对斑马鱼进行水浴染毒 5 d 后,能引起受试斑马鱼肝脏总 MDA 含量增加,使 SOD 和 GST 活力降低,对斑马鱼具有脂质过氧化作用,导致机体受到过多氧自由基的攻击,从而造成相应的细胞毒性效应和损伤。

参 考 文 献

- [1] Poland A, Kuntson J K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related haioegenated aromatic hydrocarbons of the mechanism of toxicity [J]. *Auun Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, 22: 517-541.
- [2] Carney S A, Peterson R E, Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/ aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66: 512-521.
- [3] 聂芳红, 刘连平, 陈进军, 等. 二噁英类化合物对斑马鱼CYP1A毒理作用的研究新进展 [J], *广东海洋大学学报*, 2007, 27(3): 123-128.
- [4] Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, et al. Role of Aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenxo-p-dioxin [J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 77: 109-116.
- [5] Henry T R, Spitsbergen J M, Hornung M W, et al. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 142: 56-68.
- [6] Wu Q, Ohsako S, Baba T, et al. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on preimplantation mouse embryos [J]. *Toxicology*, 2002, 174: 119-129.
- [7] 汤乃军, 刘云儒, 任大林. 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英对SD大鼠肝脏SOD、GST、MDA影响的实验研究[J]. *中国工业医学杂志*, 2003, 16(6): 335-337.
- [8] 陈 汉, 王慧君, 李学峰. 甲基苯丙胺对大鼠脑组织中NO、SOD和MDA的影响[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 16(2): 102-104.
- [9] 黄 勇. 斑马鱼早期胚胎发育及其超氧化物歧化酶时空表达特点研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [10] Kern P A, Fishman R B, Song W, et al. The effect of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver [J]. *Toxicology*, 2002, 171(2): 117-125.

二噁英类化合物对斑马鱼 CYP1A 毒理作用的研究新进展

聂芳红¹, 刘连平², 陈进军^{2*}, 林红英², 杨蓉², 谢英明²

(1. 广东海洋大学食品科技学院;

2. 广东海洋大学农业生物技术研究所 广东湛江, 524088)

关键词: CYP1A; 二噁英类化合物; 毒理学; 斑马鱼

中图分类号: X835

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2007)03-0123-06

二噁英类化合物 (dioxin-like compounds, DLCs) 包括多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 中的多氯代二苯对二噁英 (polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs)、多氯代二苯对呋喃 (polychlorinated dibenzofurans, PCDFs) 及卤代芳香化合物 (halogenated aromatic compounds, HACs) 中的多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 和多溴联苯醚 (polybromodiphenyl ethers, PBDEs), 其中最典型和毒性最强的物质为 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英 (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)。通过芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 介导, 诱导细胞色素 P450 1A (cytochrome P450 1A, CYP1A) 基因表达是 DLCs 最基本的毒性作用机制^[1-6]。斑马鱼胚胎发育机制与哺乳动物非常相似, 许多重要调控蛋白质的位置与时间也都与哺乳动物相似。受精卵单细胞在 48~72 h 后即发育成可觅食逃亡的鱼体。单细胞受精卵可施打 DNA、RNA 并密切追踪后续影响, 因此斑马鱼已成为研究癌症、器官发育、脊椎动物胚胎发育、神经发育、细胞凋亡的重要模式动物, 也是药物毒性的筛检、DLCs 的毒理机制研究的良好脊椎动物模型^[7-9]。

1 DLCs 的毒性作用

DLCs 进入体内的主要途径是污染的食品、饮

水、空气和饲料, 少量通过呼吸和皮肤进入人体内。由于 DLCs 可以在母体脂肪组织中蓄积, 泌乳时随乳汁排出, 所以可以随母乳进入婴儿体内。水生生物体内 PCDD/Fs 的累积作用是通过 3 种途径实现的, 包括通过鳃和表皮从水中的直接摄入 (生物富集)、水中悬浮颗粒的摄取 (吞入) 和污染食物的消耗 (生物放大)^[10-12]。

DLCs 中最具代表性的是 TCDD, 其主要来源于垃圾的不完全燃烧和工业排污等^[13]。TCDD 对猴、兔、豚鼠、大鼠和小鼠等哺乳类以及鸡的毒性研究较多, 能引起不同程度的心血管障碍^[14,15], 且这种毒性是以芳基烃受体 AhR 为媒介, 诱导 CYP1A^[16,17]。AhR 与 DLCs 有可逆转的高亲和力^[17]。AhR 介导的基因表达的作用过程可分为以下几个过程: DLCs 与 AhR 结合, 配体-受体复合物与 DNA 识别位点结合, 特异基因的转录及翻译, 表达蛋白发挥作用。DLCs 具有高残留性、高生物浓集和高生物毒性, TCDD 的毒性强弱与动物种属、品系及年龄有关, 豚鼠及幼龄动物较为敏感。动物急性毒性试验表明, 其 LD₅₀ (μg/kg) 为: 豚鼠 0.6, 大鼠 22~100, 小鼠 114~284, 兔 10~15, 鸡 25~50, 恒河猴 <70, 犬 30~300。DLCs 能够诱导肝细胞损害、胸腺萎缩、血液循环系统障碍、发育畸形、胚胎毒性、生殖毒性、致癌性等^[1-3,11-13]。

1.1 一般毒性

TCDD 是已知毒性最强的化合物之一, 其毒性

收稿日期: 2006-10-13

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (05011789); 广东海洋大学 SCI 刊源作者基金 (0412130)

第一作者: 聂芳红 (1969-), 女, 学历, 实验师, 研究方向为食品质量与安全。

通讯作者: 陈进军, 教授, E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn, Cell: 13828219598。

比氰化钾强 50~100 倍。慢性和亚慢性动物试验结果表明,它主要引起肝脏坏死、淋巴髓样变、氯痤疮、胸腺萎缩、体脂减少、体重减轻、血浆甲状腺激素水平下降和 CYP1A 活性升高等^[11-13]。

1.2 致癌毒性

一些 DLCs 是多位点致癌物。TCDD 可以诱发肝、肺、粘膜和皮肤癌,给大鼠每天 10 000~20 000 pg/kg 剂量,可以诱发 10%~20% 大鼠癌症发生。由此推之,如果人类每天接触 0.01 pg/kg 就会有致癌危险^[13]。

1.3 免疫毒性

TCDD 可以抑制小鼠 B 细胞活化,直接抑制激素免疫和细胞介导免疫,抑制抗体生成细胞、辅助性 T 细胞和 T 细胞等特异性作用的分子功能,降低机体对超抗原、微生物、寄生虫、病毒和肿瘤细胞的抵抗力。由于 TCDD 抑制免疫系统功能,引起机体对感染和癌细胞的抵抗力降低,其毒性类似于艾滋病毒,因此称为“化学艾滋病毒”或“艾滋毒”^[12,13]。

1.4 生殖毒性

DLCs 特别是 TCDD 能控制相关基因的表达和酶的活性,能降低动物繁殖功能^[11]。TCDD 通过抑制睾丸雄性激素分泌而影响男性生殖功能^[13]。还能引起妇女子宫内膜异位症^[18]。

1.5 致畸毒性

TCDD 在低于可引起任何母体毒性或胚胎毒性剂量时,就能引起动物肾盂积水,输尿管阻塞和腭裂等畸形,因此致畸可能是 DLCs 最敏感的毒性指标^[19]。

1.6 发育毒性

某些 DLCs 能影响胚胎或胎儿的多种器官的分化过程,并影响与细胞膜相关成分(如酶、受体、离子通道、膜表面蛋白等)的结构和功能,从而引起生长发育障碍。在发育早期染毒时,这种影响更为明显,例如在胚胎期或哺乳期染毒时,TCDD 半数致死量仅为成年动物的百分之一。在胚胎期或哺乳期以 0.064~0.16 μg/kg 的剂量染毒母体,雄性仔鼠发育到成年时可出现雌性化,雌性仔鼠黄体激素分泌水平也发生改变^[13]。

2 斑马鱼的生物学特性

2.1 种属与形体特征

斑马鱼 (*Danio rerio* 或 *Brachydanio rerio*) 俗称蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼,属于辐鳍亚纲(Ac-

tinopterygii) 鲤科 (Cyprinidae) 短担尼鱼属 (*Danio* 或 *Brachydanio*) 的一种硬骨鱼^[7]。体型呈长纺锤形,尾部稍侧扁微尖,臀鳍较长,尾鳍呈叉形,体侧有像斑马一样的纵向条纹,成鱼体长 4~6cm。雄鱼的蓝色条纹偏黄,间以柠檬色条纹;雌鱼的蓝色条纹偏蓝而鲜艳,间以银灰色条纹,身体比雄鱼丰满粗壮,尤其性成熟雌体腹部膨大,各鳍均比雄鱼短小,雄鱼胸鳍略呈三角形,雌鱼的胸鳍略呈扇形;雄鱼的体长/体高大于雌鱼的体长/体高^[7,9]。

2.2 繁殖与饲养

斑马鱼是一种亚热带淡水鱼,适宜生长和繁殖温度在 25~31℃,最适水温 28.5℃,11 时就会出现死亡。对水质要求不高,以 pH 值 7~8 为宜。养殖所用自来水要充分曝气 1~2 d,可根据水质情况添加适量的海水晶盐,添加量为 60 g/m³。在合适的养殖条件下,斑马鱼的性成熟期一般为 3 个月左右。雌雄鱼的交配行为受光刺激,可以通过调控光周期或控制雌雄鱼的接触而控制产卵时间。一尾雌鱼一般每次可产卵 100~300 枚,每周可产卵一次。斑马鱼的胚胎发育很快,在 28.5℃ 培养条件下受精后约 40 min 完成第一次有丝分裂,之后大约每间隔 15 min 分裂一次;24 h 后,主要的组织器官原基已形成,各个脑室、眼睛、耳、血细胞、体节等均清楚可见,相当于 28 d 的人类胚胎^[7]。幼体发育时期最好加入少量的钙盐。斑马鱼为杂食性鱼类,人工饲养条件下幼体以蛋黄、轮虫、卤虫无节幼体为食,成体可以投喂线虫、红虫、水丝蚓,经过驯化也可摄食小颗粒人工配合饲料^[20]。

2.3 斑马鱼作为毒理学模式动物的优势

Streisinger 等(1981)在 *Nature* 上发表了斑马鱼的体外受精技术、单倍体诱导技术,建立了纯合品系,并介绍了斑马鱼的第一个自然突变体—golden^[21],这是斑马鱼成为模式动物新宠的开端。

斑马鱼胚胎和幼鱼对有害物质非常敏感,可用于测试化合物对生物体的毒性^[22]。与利用小鼠或大鼠进行的毒性实验相比,斑马鱼有多方面的优点:用药简单,只需将药物放入养殖胚胎的水中或快速注射;用药量很少;测试周期短,一般不超过 1 周;斑马鱼一次可排卵 100~300 个,单个卵子直径达 1mm,繁殖方便快捷,测试动物样本数可以很大,以确保统计学意义上的显著性;可以评估药物/毒物对许多组织器官的影响程度,如神经毒性、心血管毒性、肝毒性、肾毒性、胃肠毒性等^[7]。

由于有大量的斑马鱼突变体,又有较成熟的遗

传操作手段,因此斑马鱼不仅可以用来检测化合物的毒性,还可以阐明其毒性的分子机理,如 DLCs 是一类致畸、致癌、致突变的严重有害物质。研究表明,DLCs 对斑马鱼胚胎发育的毒性是由细胞中的芳烃受体 2 (ARH2) 和芳烃受体核转运因子 1 (ARNT1) 所介导的,DLC-ARH2-ARNT1 复合体结合在靶基因(可响应某些 DLCs 的基因)的启动子上,激活了靶基因的表达^[17,23]。

3 斑马鱼在毒理学研究中的应用

包括 DLCs 在内的化学污染物的广泛存在对动植物子孙后代的健康和安全构成严重威胁,对人类后代的影响,现在主要使用哺乳类动物进行试验。但是,现代的毒性评价需要快速、短时间、敏感度高和能够定量的简单评价体系,来取代费时、费力、高费用的毒性评价体系。至今,简易筛选化学物质的致畸形性,使用哺乳动物的胚胎培养、器官培养、细胞培养等体外试验体系和哺乳动物以外的鸡、蛙、鱼类等来试行,还没有确立成熟的方法。因此,把早期发育胚胎毒性的初期筛选作为目标,利用斑马鱼胚对母体无任何影响,对发育过程可直接观察,又全年多产卵、生长快、身体透明,作为胚胎发育模型有丰富的研究背景,特别是具有体积小等很多优点^[16]。近 40 年来,斑马鱼已被用于锌、镉、硒、汞等重金属以及苯酚、苯胺、环己胺等有机物^[24]及一些混合化合物的急、慢性毒性检测和重金属的生物累积效应的研究^[25],并被应用于一些 DLCs 的发育毒理学和生化分子毒理学研究^[26-28]。

3.1 在遗传和发育毒理学中的应用

斑马鱼已被应用于脊椎动物遗传发育毒理学的细胞和分子水平的研究,包括胚胎轴的决定、细胞谱系分析、基因转移、突变鉴别、中枢神经系统和周围神经系统的形成、肌肉发育以及基因表达的微分调节等^[29-31]。利用报告基因检测技术 DR-CALUX 研究发现,幼龄斑马鱼在水中暴露于阻然剂 DE-71(主要含五溴联苯醚)4 周,在心内膜和大血管上皮等部位的 CYP1A 蛋白被增量诱导表达^[32]。应用 Whole-Mount 原位杂交技术对斑马鱼胚胎发育中 L-plastin 基因表达进行检测,从而描述了特异性表达该基因的巨噬细胞的整个分化发育过程^[33]。利用免疫组化方法可对斑马鱼特定组织生长过程中细胞的增殖和死亡进行定量^[34,35]。由于胚胎透明,可视性强,再加上对斑马鱼生长发育过程的全面了解

以及各特定发育阶段时间表的准确建立,能方便地对胚胎发育的不同阶段进行操作,并进一步确定某种胚胎发育毒性是特定细胞基因的相对作用还是环境作用后的基因产物。

3.2 在环境毒理学中的应用

转基因斑马鱼能出色发出预警信号,是水质污染的活监测器。利用转基因斑马鱼的某些效应元件来显示其接触了特定毒物^[29]。芳香烃、亲电子物质、金属以及雌激素的效应元件都已被成功转入斑马鱼体内。在斑马鱼的细胞谱系中含带有报告基因的效应元件也已被研制成功^[30]。斑马鱼体内的这些效应元件一旦接触到水体中其敏感的化学物质就会被激活,从而相继激活与之相连的报告基因,使斑马鱼发出荧光。

3.3 在药物毒理学中的应用

斑马鱼可作为监测药物靶器官的有效模型。斑马鱼用于药物毒理方面的研究有着明显的优势:试验时间短(3~5 d);单剂量即可;使用的药物量小;使用的试验动物数能达到统计学意义;试验终点可量化;处理操作方便,对大量药物可作出快速评估^[31]。

4 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的诱导作用

4.1 斑马鱼 CYP1A 的属性

CYP1A 属于细胞色素 P450 超家族,哺乳动物的 CYP1A 包括 CYP1A1 与 CYP1A2。CYP1A1 广泛分布于肺、肾、胃肠道、皮肤、喉、胎盘、淋巴细胞及脑等肝外组织,参与烃类致癌物的代谢。CYP1A2 在肝组织中有特异性表达,参与许多前致癌物和前毒物的代谢活化^[7],生成亲电性很强的中间产物或终产物,与细胞内大分子物质如 DNA、RNA、蛋白质的亲核基团等发生相互作用^[4,36,37]。

斑马鱼不像哺乳动物,其 CYP1A 未分化为 CYP1A1 和 CYP1A2 两种亚型,只有一个 CYP1A 基因。哺乳动物的 CYP1A1 和 CYP1A2 来源于其祖先 CYP1A 基因,此 CYP1A 基因与斑马鱼 CYP1A 基因完全一致^[38]。CYP1A 基因还普遍存在于所检测的许多鱼类中。CYP1A 对污染物的特征反应是诱导,PAHs、PCBs 等都是 CYP1A 有效的诱导剂。因此 CYP1A 可以作为海洋哺乳动物和鱼类卤化芳香族碳氢化合物及其他相关化合物暴露和毒性可靠的生物学指标,以指示有机污染物的基因毒性效应。在对水生系统污染监测中,诱导鱼类

CYP1A1 基因已被认定为一种灵敏的早期预警的方法^[37]。

4.2 DLCs 通过诱导斑马鱼 CYP1A 表达发挥毒性作用

TCDD 对猴、兔、豚鼠、大鼠和小鼠等哺乳类以及鸡的毒性研究较多,在报道中都有不同程度的心血管障碍^[16,39,40],且这种毒性是以芳基羟受体 AhR 为媒介,诱导 CYP1A,而对斑马鱼的毒理学研究正在迅速加强。

4.2.1 EROD 酶能间接反映 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的影响

CYP1A 可通过作用于 7-乙氧基-异酚噻唑脱乙基酶(ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD),进而选择性地影响 7-乙氧基-异酚噻唑脱乙基反应^[41]。因此除了测定 CYP1A 蛋白质和 mRNA 水平之外,一种常用的检测 CYP1A 同工酶反应的方法是测定其催化活性。EROD 活性是通过测定反应产物 7-异酚噻唑的荧光反应获得的。EROD 活性是测定鱼体内细胞色素 P450 系统的诱导反应中一种最为敏感的生物学指标。CYP1A 蛋白质水平和 EROD 活性之间表现出较好的相关性,尽管某些化学物可能会抑制 EROD 的诱导作用或活性,但是这种干扰一般不会成为将 EROD 做为一种生物学标志的障碍^[41]。与 CYP1A 蛋白质和 mRNA 一起,CYP1A 的催化活性的诱导作用可以用于暴露评估并作为包括 PCDD/Fs 在内的痕量有机污染物可能产生的有害影响的早期预警信号^[10,42]。运用鱼体肝脏中的 EROD 活性作为生物学标志,来指示大连近海部分水域的多氯联苯类物质的污染状况。结果表明鱼体肝脏内的 EROD 活性可被 PCBs 诱导,导致活性异常增高,并与环境中特定污染物浓度之间存在着剂量-效应关系,所以 EROD 这个特性可用来评估海洋生态环境健康并作为预警指标,将 EROD 作为多氯联苯类环境污染的生物学指标是切实可行的^[18]。

4.2.2 DLCs 能够通过 AhR 途径高度诱导斑马鱼多器官组织的 CYP1A 的表达

斑马鱼多器官组织的 CYP1A 的表达包括肝脏、心室膜、心血管内皮等^[40]。AhR 是多种芳香族化合物为配体的转录因子,它是人和动物体内普遍存在的由配体结合激活的内源性转录因子,其外源性的配体几乎都是疏水性的芳香族化合物,包括多环芳烃和卤代芳烃及芳香胺类物质,如 TCDD、PCBs 等^[43]。AhR 与 DLC 结合可诱导与毒物代谢有关的 CYP1A 的表达。对斑马鱼胚进行 TCDD 水浴染毒,观察到心囊、头部、

躯干等不同程度的水肿以及头部畸形,同时对 CYP1A 抗体染色,发现染毒群在心脏、头部、体干的血管上皮有极强的阳性反应,而对照群没有发现任何染色阳性^[16]。将 TCDD 按 70ng/g 给斑马鱼腹腔注射一次,5d 后,肝细胞和鳃片细胞肥大,有脂肪沉积,同时发现,实验组斑马鱼的肝细胞、肾近曲小管、胃肠壁细胞中均可明显诱导产生 CYP1A,而对照组未测得 CYP1A 活性^[44]。可见 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的诱导与其毒性作用有密切联系,DLCs 通过对 CYP1A 的增量调节来发挥其毒性作用。

4.2.3 DLCs 的心血管毒性机制

试验表明,TCDD 心血管毒性的典型特征是引起供试斑马鱼各部位的水肿,血流的延缓和停滞等心血管障碍。且此毒性以 TCDD 的浓度为依存,首先出现后主静脉的血流延缓,而后是以心脏周围为的各部位水肿。可见斑马鱼的心血管系统对 TCDD 有高度的敏感性^[16]。TCDD 与 AhR 结合后,诱导 CYP1A,提供活性氧,进而引起血管壁上皮细胞凋亡^[14,15],从而导致心血管毒性,并且此毒性首先从心脏开始而后波及全身组织^[39]。但也观察到了末梢循环首先发生障碍,使用 CYP1A 抗体染色证明了 TCDD 对 CYP1A 的诱导。由此推论,TCDD 以 AhR 为媒介诱导 CYP1A,引起血管的氧化应力,致使血管的透过性增大,最后引起血流的延缓和水肿。可见 TCDD 引起斑马鱼的心血管障碍,提示了其 CYP1A 是相关联的。由此进一步说明,脊椎动物模型斑马鱼在发育毒性机制的阐明或环境毒性物质的评价上有着重要意义。

5 DLCs 通过调节斑马鱼 CYP1A 之外的蛋白酶而发挥毒性作用

必须指出,DLCs 通过调节斑马鱼 CYP1A 之外的蛋白酶而发挥毒性作用。Carney 等(2004)利用吗啉代寡核苷酸,阻断 TCDD 对斑马鱼 CYP1A 的诱导,抑制斑马鱼 CYP1A 表达,将斑马鱼进行 TCDD 水浴染毒,研究斑马鱼能否抵御 TCDD 的发育毒性,结果证实,吗啉代寡核苷酸有效地阻止了 TCDD 对斑马鱼 CYP1A 的表达并抑制了 CYP1A 酶活力,但供试斑马鱼仍表现出中毒迹象,包括下颌畸形、血流量减少、红细胞生成障碍等。因此认为 TCDD 除通过 AhR 途径诱导 CYP1A 来实现毒性效应外,还可能通过调节其他蛋白酶来发挥其毒性作用^[38]。对于其他 DLCs,其毒作用机理是否也是如此,尚需深入研究。另外,利用吗啉代寡核苷酸阻止

斑马鱼胚胎发育期 AhR2 和 CYP1A 蛋白的表达,进而研究多环芳烃与其中某些共平面多环芳烃的毒理机制,发现阻止 AhR2 蛋白表达能减少 β -萘黄酮和 β -萘黄酮共同对供试斑马鱼胎儿的心脏毒性;而阻止 CYP1A 蛋白表达能显著加强 β -萘黄酮单独暴露的毒性作用和 β -萘黄酮与 β -萘黄酮共同暴露的毒性作用。以上结果说明,虽然多环芳烃与其中某些共平面多环芳烃可能都是 AhR 的促进剂,但多环芳烃的胚胎发育毒性与某些共平面多环芳烃存在不同的机理^[6,45]。深入研究多环芳烃的毒性机制将为基于毒性机理的化学物危险度评价提供有效工具。

6 小结

DLCs 的毒理机制经过 20 多年的研究,至今已有一个大致的轮廓,但很多细节问题还没有完全研究清楚,包括基因表达产物如何发挥作用、蛋白激酶激活后如何导致毒性效应、AhR 存在于机体的意义亦即其生理作用和内源性配体等。这些问题是当前 DLCs 毒理机制研究的重点及热点。

CYP1A 的诱导及其酶表达是 AhR 介导的 DLCs 引起机体中毒的主要生物学标志。斑马鱼因其独特的生物学特性,为 DLCs 毒理机制的研究提供了很好的脊椎动物模式。通过研究 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的影响来揭示 DLCs 的毒理机制,是一个有效的途径。

参 考 文 献

- [1] Wu Q, Ohsako S, Baba T, et al. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on preimplantation mouse embryos [J]. *Toxicol*, 2002, 174: 119-129.
- [2] Poland A, Kuntson J K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons of the mechanism of toxicity [J]. *Aun Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, 22: 517-541.
- [3] Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, et al. Role of Aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77: 109-116.
- [4] Chen J J, Chen G S, Bunce N J. Inhibition of CYP 1A2 dependent-MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons [J]. *Environ Toxicol*, 2003, 18 (2): 115-119.
- [5] Incardona JP, Day HL, Collier TK, et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 217(3): 308-321.
- [6] Billiard SM, Timme-Laragy AR, Wassenberg DM, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 92 (2): 526-536.
- [7] 孙智慧, 贾顺姬, 孟安明. 斑马鱼: 在生命科学中畅游[J]. *生命科学*, 2006, 18(5): 431-436.
- [8] Adrian J H, Hiroki T, Warren H, et al. Review Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 86(1): 6-19.
- [9] Teraoka H, Dong W, Hiraga T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology [J]. *Congenital anomalies*, 2003, 43(2): 123-32.
- [10] 鲍剑冰, 唐翔宇. 水体中 PCDD/Fs 生物标示器的研究进展 [J]. *云南环境科学*, 2004, 23 (3): 1-7.
- [11] 成建华. 环境中的二噁英及其对健康的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 2000, 34(6): 365-368.
- [12] 刘泰民. 二噁英及其对人体的毒性和预防 [J]. *预防医学情报杂志*, 2000, 16(12): 121-122.
- [13] 杨永滨, 郑明辉, 刘征涛. 二噁英类毒理学研究新进展 [J]. *生态毒理学报*, 2006, 1(2): 106-111.
- [14] Cantrell SM, Joy Schlezinger J, Stegeman JJ, et al. Correlation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 148, 24-34.
- [15] Cantrell SM, Lutz LH, Tillitt DE, et al. Embryotoxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141: 23-34.
- [16] 董武, 魏强, 寺冈宏树, 等. 二噁英诱发斑马鱼初期胚的循环系统障碍 [J]. *中国实验动物学报*, 2002, 10(2): 69-72.
- [17] Perdew G H. Association of the Ah receptor with the 90kDa heat shock protein [J]. *Bio Chem*, 1988, 263: 13802-13805.
- [18] 霍传林, 王菊英, 韩庚辰, 等. 鱼体内 EROD 活性对多氯联苯类的指示作用 [J]. *海洋环境科学*, 2002, 21(1): 5-8.
- [19] Voelker D, Vess C, Tillmann M, et al. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae [J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 81(4): 355-364.
- [20] 刘伟成, 李明云. 斑马鱼及其人工繁殖 [J]. *水利渔业*, 2006, 26(1): 31, 39-40.
- [21] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291 (5813): 293-296.
- [22] Parng C. In vivo zebra fish assays for toxicity testing [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2005, 8(1): 100-106.
- [23] Carney SA, Prasad AL, Heideman W, et al. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, 76(1): 7-18.
- [24] Vitozzi L, De Angelis G. A critical review of comparative a-

- cute toxicity data on freshwater fish [J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19: 167-174.
- [25] Ensenbach U, Nagel R. Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1995, 30: 151-157.
- [26] Prasch AL, Teraoka H, Carney S C, et al. Aryl hydrocarbon receptor2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 76: 138-150.
- [27] Teraoka H, Dong W, Ogawa S, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: altered regional blood flow and impaired lower jaw development [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65: 192-199.
- [28] Cook P M, Robbins J A, Endicott D D, et al. Effects of aryl hydrocarbon receptor-mediated early life stage toxicity on lake trout populations in Lake Ontario during the 20th century [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37: 3864-3877.
- [29] Carvan M J, Dalton T P, Stuart G W et al. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 919: 133-147.
- [30] Carvan M J, Sonntag D M, Cmar C B, et al. Oxidative stress in zebrafish cells; Potential utility of transgenic zebrafish as a deployable sentinel for site hazard ranking [J]. *Sci Total Environ*, 2001, 274: 183-196.
- [31] Sumanas S, Lin S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation [J]. *ARGETS*, 2004, 3, (3): 121-123.
- [32] Kuiper R V, Murk A J, Leonards PE, et al. In vivo and in vitro Ah-receptor activation by commercial and fractionated pentabromodiphenylether using zebrafish (*Danio rerio*) and the DR-CALUX assay [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 79 (4): 366-375.
- [33] Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo [J]. *Development*, 1999, 126(17): 3735-3745.
- [34] Korfmeier K H. PCNA in the ovary of zebrafish [J]. *Acta Histochem*, 2002, 104: 73-76.
- [35] Cole L K, Ross L S. Apoptosis in the developing zebrafish embryo [J]. *Dev Biol*, 2001, 246: 123-142.
- [36] Miranda C L, Chung W G, Wang-Buhler J L, et al. Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated rainbow trout [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 80 (2): 101-108.
- [37] 魏艳,王克坚,杨明,等. 海水养殖真鲷肝 CYP1A 基因的克隆与表达[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(增刊): 190-193.
- [38] Carney S A, Peterson R E, Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/ aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66: 512-521. [39] Hornung M W, Spitsbergen J M, Peterson R E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Toxicol Sci*, 1999, 47: 40-51.
- [40] Antkiewicz D S, Burns C G, Carney SA. et al. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 84: 368-377.
- [41] Whyte J J, Jung R E, Schmitt C J, et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2000, (4): 347-570.
- [42] Finn R N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria [J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 81(4): 337-354.
- [43] Rowlands J C, Gustafsson J A. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1997, 27 (2): 109-34.
- [44] Zodrow J M, Stegeman J J, Tanguay RL. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 66(1): 25-38.
- [45] Evans B R, Karchner S I, Franks D G, et al. Duplicate aryl hydrocarbon receptor repressor genes (ahr1 and ahr2) in the zebrafish *Danio rerio*: structure, function, evolution, and AHR-dependent regulation in vivo [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 441(2): 151-67.

参考文献:

[1] 贾杏林,齐长明. 奶牛子宫内膜炎研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2005, 41 (2): 34 - 36
 [2] Jozef Nagy, Jaroslav Hajurka, Hanna Rozanska, et al Tetracycline residues in cow milk after intrauterine administration [J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2001, 45 (2): 367 - 371.
 [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 (第3版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 911.
 [4] 郑建华,吴春福,刘雯,等. 清音丸抗炎镇痛作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2002, 18 (6): 7 - 11.

[5] 何慧琴,丁淑华. 眼底一号方对小鼠毛细血管通透性的影响 [J]. 中医药通报, 2002 (2): 5152
 [6] 朱社敏,柴秀娟,匡荣. 复方大青叶合剂主要药效学研究 [J]. 中成药, 2004, 26 (11): 909 - 913.
 [7] 李灿东,王瑞同,杜建,等. 固表解毒合剂对大鼠棉球肉芽肿形成的影响 [J]. 福建中医学院学报, 2006, 16 (2): 25 - 27.
 [8] 姜巍. 清宫液号的抗炎机理及临床药效学研究 [D]. 兰州:中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 2005.
 [9] 刘钟杰,许剑琴. 中兽医学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002: 239.

改良地胆头注射液的试制及其质量检测

陈进军¹, 聂芳红², 刘勇¹, 林红英¹, 范焕芳¹, 黄秋滢¹, 张继东¹

(1. 广东海洋大学农学院动物医学系, 广东湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354 (2009) 02 - 0047 - 03

地胆头 (*Elephantopus scaber* L.) 又名苦地胆、地胆草、天芥菜、鸡骨粘 (《本草纲目》)、土公英、土紫胡、草鞋底等, 为菊科植物地胆草属。分布于我国东南至西南部各省, 尤其是广东、广西、福建等地多见, 生长于路边、林缘或者空旷草地上; 味苦性凉、药用全草^[1,2], 有清热解毒、凉血消肿等功效。现代医学研究表明, 地胆头含有甾醇以及菊糖、果糖、氨基酸和内酯等化学成分, 其主要有效成分为地胆头内酯。地胆草的重要化学成分是倍半萜内酯, 全草中分离到的倍半萜内酯成分有两种类型, 一是牻牛儿内酯型^[3,4], 包括地胆草内酯 (elephantopin)、去氧地胆草内酯 (deoxyelephantopin)、异去氧地胆草内酯 (isodeoxyelephantopin)、地胆草种内酯 (scaberpin) 和 11, 13 - 二氢去氧地胆草内酯 (11, 13 - dihydrodeoxyelephantopin); 二是愈创木内酯型^[5], 此类型目前仅从地胆草中分离出 3 种, 即去酰薊苦素 (deacylcyanaropicrin)、葡萄糖中美菊素 (glucozaluzain) C 和还阳参苷 (crepiside) E。本实验室试制地胆头注射液对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌均有明显的抑制作用^[6]。但引入微波 - 超声提取技术, 添加一定量的磺胺增效剂, 可能更有利于保留地胆头有效成分, 增加其抗菌效果。笔者等以 65% 乙醇为溶剂, 结合中草药提取纯化新技术超声 - 微波辅助提取, 添加一定量的磺胺增效剂, 制成改良地胆头注射液, 并对其质量和安全性进行了检查, 为改良地胆头注射液的临床效果研究奠定基础。

1 材料与方

收稿日期: 2008 - 10 - 30

项目来源: 广东省湛江市科技招标项目 (湛科 [2006] 94 号)

作者简介: 陈进军 (1967 -), 男, 教授, 博士, 主要从事中草药现代化及动物毒理学研究, E - mail: jjchen777@yahoo.com.cn

1.1 地胆头

2008 年 6 月采自广东湛江市麻章区, 经广东海洋大学农业生物研究所鉴定为菊科地胆草属多年生草本植物地胆草。全草阴干, 粉碎, 过 20 目筛, 收集地胆草粉末, 储藏于阴凉干燥处备用。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 无水乙醇、亚硫酸钠、碳酸氢钠、活性炭、乙醚、乙醇、氨水、氯仿、甲醇、注射用水、羧甲基纤维素钠、硅胶 G、磺基水杨酸、鞣酸试剂、醋酸、氯化钠、明胶、氯化钙, 均为国产分析纯试剂。注射用葡萄糖、生理盐水、普通肉汤培养基、普通琼脂培养基, 购自广东利泰药业有限公司, 批号: 2007060816, 金黄色葡萄球菌购自中国兽医药品监察所。

1.2.2 仪器 数显电热培养箱: HPX - 9272ME, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 电热恒温水槽: SSW, 上海博讯实业有限公司; 500 μL 的微量移液器: W KY, 上海求精生化试剂仪器有限公司; 电子分析天平: A Y120, 日本岛津电子科技有限公司; 三用紫外分析仪: W FH - 20S; 离心机及离心管: IDL80 - 2B, 上海安亭科学仪器厂制造; 手提式压力蒸汽灭菌器: YXQ - SG46 - 280A, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 微波炉: LGWD700 (MG - 5061T), 天津乐金电子电器有限公司; 双频数控超声波清洗器: KQ - 300VDE 型, 昆山市超声仪器有限公司; 数显不锈钢鼓风干燥箱: GZX - 9240 MBE, 上海博讯实业有限公司; 净化工作台: SSW - CT - 2F, 上海跃进医疗器械厂。

1.3 试验动物

健康家兔 3 只, 体重 1.5 - 2.5 kg, 购于广东医学院实验动物中心。试验前一周购买, 使其适应试验环境。

1.4 地胆头的加工

采集地胆头全草 3 - 5 kg, 用水洗涤除去沙粒、泥土等杂

质(此过程最大限度不损伤地胆草的根、茎、叶),阴干,并置鼓风干燥箱中50℃辅助干燥,粉碎过20目筛,装入密闭的塑料袋中4℃冷藏备用。分别于采集后、粉碎前、粉碎后称重,计算地胆草的失水率和收粉率。

1.5 地胆头原液的制备

取地胆头粉末300g,加入65%乙醇至3000mL浸泡12h,每隔2h用玻璃棒搅拌5min,超声(240W,30℃,28kHz)处理20min,微波处理2min(100mL/30s),后于60℃加热回流浸提4h,收集浸提液,将浸提液趁热过滤,收集滤渣重复上述操作,合并滤液,调pH值至8,3000r/min离心5min,取上清液,于通风橱内60℃水浴加热浓缩为糖浆状,向浓缩液中加入适量的2%亚硫酸钠和2%碳酸氢钠溶液,然后按1%比例加入活性炭,搅拌,静置30min,3000r/min离心5min,过滤得上清液,用乙醚萃取3次,60℃水浴加热挥去乙醚,4℃冷藏6h,过滤,如此重复2次,然后调pH值至8,浓缩至原液体积的1/2。在上述制备过程中,按试管法监测提取液中的内酯、黄酮类化合物。

1.6 改良地胆头注射液的配制

按2.5%比例于地胆头原液加注射用葡萄糖粉,用双蒸水稀释至适当体积,65℃水浴上搅拌,放置30min,过滤。按20mg/mL加入甲氧苄啶(TMP),然后按总量的0.5%~1.0%加入吐温-80以增加主药的溶解度,调pH值至6.8,搅拌,静置30min,过滤,定容至适当体积,流通蒸气灭菌30min,无菌封装(每支5mL),即得改良地胆头注射液。

1.7 改良地胆头注射液质量检测

1.7.1 改良地胆头注射液的漏气检查 封装、灭菌后趁热放入洁净冷水中,如有漏气的安瓿即会充入冷水,药液颜色变淡、量增加,即可检出。

1.7.2 pH值检测 用精密pH值试纸测试改良地胆头注射液的pH值,应在6.0~8.0之间。

1.7.3 装量检测 取供试品注射液5支,开启时要注意避免损失,将内容物倾入经校正的干燥量筒中,倒立,让内容物倾净。读出每支内容物的装量,并求出平均装量值。应该符合平均装量比少于标示装量,每支装量不少于标示装量的93%;如有1支装量不符合规定,则另取5支复试,均应符合规定。

1.7.4 澄明度检测 在30W荧光灯下,以白色为背景,距20cm处观察有无异物。

1.7.5 杂质检测 蛋白质:取地胆头注射液1mL,加新配制的30%磺基水杨酸溶液1mL,混匀,放置5min,不得出现沉淀。注射液中如含有遇酸能产生沉淀的成分,可以改加鞣酸试剂1~2滴,不得出现浑浊和沉淀。鞣质:取注射液1mL,加入稀醋酸1滴,再加明胶氯化钠溶液4~5滴,不得出现浑浊或沉淀。草酸:取溶液型静脉注射液适量,用稀盐酸调节pH值至1~2,滤过,取滤液2mL,滤液调节pH值至5~6,加3%氯化钙溶液2~3滴,放置10min,不得出现浑浊或沉淀。

1.7.6 有效成分检测 黄酮类物质的监测:在试管中加

入1mL地胆头注射液,用无水乙醇稀释至适当体积,后在试管中加1~2滴三氯化铁溶液,观察颜色变化。地胆头内酯的监测:在试管中加入1mL地胆头注射液,将其加热,后趁热加入适量NaOH,边加边摇,观察颜色变化。薄层色谱法对地胆头内酯的监测:硅胶G薄板为载体,氯仿-甲醇-氨水(25:3:1)为展开剂,展开,取出,晾干后,于紫外灯(365nm)下检测。

1.7.7 溶血试验 取10mL试管6支,按表1配比量依次加入2%红细胞悬液和生理盐水,混匀后,于37℃恒温箱放置30min,然后分别加入不同量注射液(第6管为对照管),摇匀后置37℃恒温箱中。开始每隔15min观察1次,1h后,每隔1h观察1次,共观察4h。按文献^[6]方法判定是否出现溶血现象。

表1 改良地胆头注射液溶血性试验方法 /mL

试管号	1	2	3	4	5	6
注射液	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0
生理盐水	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5
2%红细胞混悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

1.7.8 热原检测 兔耳静脉注射药液,观察家兔体温变化情况,以判定供试品中所含热原是否符合规定。取健康家兔3只,实验前先测定其正常温度,在测定后15min内按1mL/kg自兔耳缘静脉缓慢注入一定量预热的注射液,后每隔1h测量体温1次,共测3次,以3次中体温最高的1次减去正常体温为体温升高值,若体温升高值均小于0.6℃,并且总升高小于1.4℃,则认为该供试品的热原符合规定。

1.7.9 无菌检测 试验前将所有仪器、普通肉汤和琼脂培养基分装,进行高压灭菌。试验时取注射液4支,加入0.9%无菌氯化钠溶液稀释至100mL,通过装有孔径为0.25μm的薄膜过滤器。然后把滤膜分为4等份,分别放在普通肉汤和普通琼脂培养基中,再取1份接种金黄色葡萄球菌接种作为对照组,在37℃的培养箱中培养24h后观察。

2 试验结果

2.1 封装、漏气检测

改良地胆头注射液的安瓿均无漏气现象,封装合格。

2.2 澄明度检测

在30W荧光灯下,以白色为背景,距20cm处观察到无异物,颜色成棕黄色,表明地胆头注射液清澈无杂质,澄明度较好。

2.3 装量检测

检查发现,5支改良地胆头注射液的平均装量为5.002mL,符合要求。

2.4 pH值检测

测得改良地胆头注射液的pH值为6.8,在6.0~8.0之间,符合要求。

2.5 有效成分检测

三氯化铁法变化呈黄色,说明地胆头注射液中含有黄酮类物质。热氢氧化钠法变化呈黄色,说明地胆头注射液中含有内酯类物质。薄层色谱法监测,可见薄板上呈现了4个淡



蓝色的斑点,判定其含有地胆头内酯。

2.6 杂质检测

30%磺基水杨酸法反应发现,地胆头注射液放置 5 min 后未出现浑浊,说明蛋白质检查为阴性。稀醋酸-明胶氯化钠溶液检查,未出现浑浊或沉淀,说明鞣质检查为阴性。稀盐酸-氯化钙溶液检查,未出现浑浊或沉淀,说明草酸检查为阴性。

2.7 热原检测

兔耳静脉注射药液,观察家兔体温变化情况,发现体温升高值均小于 0.6,并且总升高小于 1.4,故该注射液的热原符合规定。

2.8 无菌检测

琼脂扩散试验表明,改良地胆头注射液经 37℃ 培养 24 h 后,均无菌落生长,判为无菌。

2.9 溶血检测

溶血试验结果表明,改良地胆头注射液溶血试验检查合格。

3 讨论与分析

中药注射液是提取中草药有效成分并去除杂质部分制成的新剂型,提取其有效成分是最为重要的工序,传统的提取纯化方法所制备的药液已不能达到现今注射液的质量要求,一些新的分离提纯技术不断涌现,膜分离技术、吸附分离、酶反应技术、新型吸附澄清技术、超临界流体萃取技术、高速逆流色谱技术、强化浸取技术以及微波-超声波辅助提取技术等一些新技术正有淘汰传统的煎煮、浸渍、渗漉等工艺的趋势^[2,7]。

地胆头注射液在制备中针对关键的不同成分的理化性质和药理特性,制定出最佳的提取与纯化手段^[6]。本试验在地胆头化学成分、药理学、临床应用和地胆头注射液试制等的基础上,用 65%的乙醇对粉碎的地胆头充分浸泡,并利用超声-微波辅助提取,大大提高了有效成分地胆头内酯和黄酮类物质提取效率,经过萃取、过滤、活性炭处理等多个步骤进行纯化,制成改良地胆头注射液,经按规范进行质量分析,符合质量标准的中药注射液。另外,该改良地胆头注射液添加了磺胺增效剂 TMP,其体内抗菌效果尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1291-1292
- [2] 梁俏而, 阎知大. 地胆草属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医学·植物药分册, 2002, 17(1): 8-9.
- [3] Paul P B, Hon P M, Cao H, et al Sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber*[J]. *Phytochem*, 1997, 44(1): 113-117.
- [4] De Silva L B, Herath W, Jennings R C. A new sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*[J]. *Phytochem*, 1982, 21(5): 1173-1175.
- [5] Hisham A, Pieters L, Claeys M, et al Guaianolide glucosides from *Elephantopus scaber*[J]. *Planta Med*, 1992, 58: 474-475.
- [6] 陈进军, 邓秀章. 地胆头注射液的试制及安全性试验[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 24(6): 40-41.
- [7] 徐晓彬. 千里光抗菌有效部位药理作用的初步研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2007.

宫康对山羊子宫内膜炎的药效试验

王 瑜^{1,2}, 苗小楼², 杨耀光², 苏 鹏², 潘 虎², 焦增华², 张兆旺¹

(1. 甘肃农业大学, 甘肃兰州 730070; 2 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)02-0049-02

子宫内膜炎是常见的母羊生殖系统疾病,也是导致母羊不孕的重要因素之一^[1-3]。母羊分娩过程中病原微生物通过产道侵入子宫,或由于配种、人工授精及人工助产过程中消毒不严,尤其是在发生难产时不正确的助产、胎衣不下、子宫脱出、阴道脱出、胎死腹中等,均易导致感染而引起子宫内膜炎。笔者等根据中兽医理论,研制出奶牛子宫内膜炎治疗药宫康,经临床试验和多个奶牛场推广应用证明,其对奶牛子宫内膜炎有显著疗效。为了扩大该药的应用范围,笔者等采集患子宫内膜炎山羊的子宫分泌物进行病原菌分离

和鉴定,以液体培养基倍比稀释法测定宫康对山羊子宫内膜炎主要病原菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC),并用宫康对患病山羊进行治疗,现将结果报告如下。

1 材料与方

1.1 试验动物

选自甘肃省临夏州农户散养的病羊 51只。

1.2 培养基

肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管(GYZ-15e)、麦康凯琼脂培养基:购自中国兽药监察所;营养肉汤、营养琼脂培养基:购自杭州微生物试剂厂;却浦曼琼脂、改良艾德华琼脂、血琼脂、血清肉汤培养基:按文献^[4,5]方法配制。

1.3 细菌学检查

1.3.1 病料采集 将病羊外阴部洗净消毒,用灭菌输精管插入子宫腔,注入生理盐水 10 mL,并立即回抽,将采集病料移入灭菌试管内,低温保存待检。

收稿日期: 2009-02-13

项目来源:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(项目编号:BRF060402);兰州市科技局农业攻关及产业化(项目编号:2008-1-179)

作者简介:王 瑜(1974-),男,在读硕士,助研,研究方向:兽药研究与开发。

狗舌草提取物的长期和蓄积毒性及特殊毒性研究

聂芳红^{1a}, 陈进军^{1b}, 王建华², 史志诚³

(1 广东海洋大学 a. 食品科技学院; b. 农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 3 西北大学 生态毒理研究所, 陕西 西安 710069)

[摘要] 【目的】对狗舌草体积分数 60% 乙醇提取物的毒理学安全性进行评价。【方法】利用 C57L-L 小鼠, 以生理盐水为阴性对照, 环磷酰胺为阳性对照, 进行狗舌草体积分数 60% 乙醇提取物的 90 d 长期毒性试验、30 d 蓄积试验。并采用小鼠骨髓微核试验、小鼠生殖机能试验和小鼠胎儿外观畸形检查, 对狗舌草体积分数 60% 乙醇提取物的长期毒性、蓄积毒性和特殊毒性进行评价。【结果】90 d 长期毒性试验未见供试小鼠临床表现、体重和病理变化异常, 30 d 蓄积试验未见供试小鼠死亡, 给药组与阴性对照组小鼠骨髓微核率无显著差异 ($P > 0.05$); 与阴性对照组相比, 用药后受孕鼠的受孕率、每窝活胎数、平均胎重、吸收胎数和死胎数均无明显变化 ($P > 0.05$), 供试小鼠胎儿未见明显的外观畸形 ($P > 0.05$)。【结论】狗舌草体积分数 60% 乙醇提取物无长期毒性, 无蓄积毒性, 无致突变性和致畸胎性。

[关键词] 狗舌草; 乙醇提取物; 长期毒性; 蓄积毒性; 特殊毒性; 小鼠

[中图分类号] R931.71; S859.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)02-0045-05

Studies on chronic toxicity, accumulation and special toxicities of extract from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub

NIE Fang-hong^{1a}, CHEN Jin-jun^{1b}, WANG Jian-hua², SHI Zhi-cheng³

(1 a. Food Sci-Tech College; b. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 2 College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 Institute of Ecotoxicology, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: 【Objective】The study is to assess the toxicological safety of 60% (V/V) alcoholic extract from *Tephrosia kirilowii* Turcz Holub. 【Method】With a negative control of normal saline and a positive control of cyclophosphamide, the chronic toxicity, accumulation and special toxicities were assessed by employing a range of C57L-L mice to conduct the tests of 90 day chronic toxicity, 30-day accumulation, bone-marrow micronucleus and reproduction ability as well as fetal malformation of the *T. kirilowii* extract. 【Result】There were no abnormalities in clinical exhibition, body weight and visible pathology in 90-day chronic toxicity test and no death in 30-day accumulation test. Being compared to the negative control group, the mouse bone-marrow micronucleus rate was not changed ($P > 0.05$) and there were no significant changes ($P > 0.05$) in numbers of live, absorbed and dead fetuses of the pregnant mice and no visible fetal malformation in the teratogenic test ($P > 0.05$). 【Conclusion】The *T. kirilowii* extract with 60% (V/V) ethanol did not cause chronic toxicity, accumulation, mutagenicity and teratogenicity.

Key words: *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub; ethanol extract; chronic toxicity; accumulation;

收稿日期] 2007-02-02

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(05011789); 广东省科技计划项目(2004B20201007)

[作者简介] 聂芳红(1969-), 女, 陕西杨凌人, 实验师, 主要从事食品质量与安全研究。

[通讯作者] 陈进军(1967-), 男, 宁夏中宁人, 教授, 博士, 主要从事动物药理和毒理学研究。E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

special toxicity; mouse

白血病是一种危害人类和动物健康的恶性肿瘤疾病。白血病细胞不仅能在造血组织中异常增生,而且与一般肿瘤细胞相似,还能广泛浸润全身各组织器官。许多白血病细胞往往和局部肿瘤细胞(如淋巴肉瘤、骨髓瘤)同时存在。抗癌手段如化学疗法、免疫疗法和放射疗法同样能抑制白血病细胞的增殖^[1-4]。目前,白血病的发病率有逐渐增高的趋势^[1,4]。

狗舌草(*Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub)在世界范围内广泛分布,其含有黄酮类化合物和双稠吡咯啉生物碱(pyrrrolizidine alkaloids, PAs)等^[5-10]。狗舌草除了具有抗溃疡作用之外,对白血病细胞、恶性网状细胞肉瘤及皮肤癌有较强的抑制作用^[5,11],但较大剂量的狗舌草长期作用于机体,对肝、肾等器官具有毒性作用^[7-9]。最近研究发现,狗舌草体积分数 60%乙醇提取物(以下略为“狗舌草提取物”)具有抗淋巴性白血病的效果^[12-14],对雌性小鼠腹腔注射的半数致死量(LD₅₀)为(791.22 ± 170.17) mg/kg^[15],但关于狗舌草提取物的长期和蓄积毒性及特殊毒性研究尚未见报道。本研究利用 C57L-L 小鼠,采用长期毒性试验、蓄积试验、小鼠骨髓微核试验、小鼠生殖机能试验及小鼠胎儿外观畸形检查,对狗舌草提取物的长期毒性、蓄积毒性和特殊毒性进行评价,旨在为系统地狗舌草提取物的毒理学安全性评价积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 普通级 C57L-L 小鼠 400 只,质量 18 ~ 22 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 环磷酰胺(Cyclophosphamide),江苏恒瑞医药股份有限公司产品,批号:0101082。

1.2 狗舌草提取物的制备

狗舌草于 2005-08 采自陕西省陇县关山牧场,经中国科学院西北植物研究所鉴定后,阴干粉碎,过孔径 0.45 mm 筛,贮存于干燥阴凉处备用。称取 100 g 狗舌草粉,用 1 000 mL 体积分数 60%乙醇 56 温浸 12 h,过滤。滤液先减压回收乙醇,再浓缩,加适量蒸馏水,静置于 4 过夜,滤去叶绿素等沉淀物,再浓缩,冰冻干燥成粉末,即成狗舌草提取物,已测得其对雌性小鼠腹腔注射的半数致死量(LD₅₀)为(791.22 ± 170.17) mg/kg^[15]。

1.3 狗舌草提取物的长期毒性试验

1.3.1 动物分组与药物处理 将 80 只雌性 C57L-L 小鼠随机等分为狗舌草提取物高剂量组、中剂量组、低剂量组和对照组 4 组。其中高剂量组、中剂量和低剂量组分别用 1/4 LD₅₀ (200 mg/kg)、1/6 LD₅₀ (133 mg/kg)、1/8 LD₅₀ (100 mg/kg) 狗舌草提取物进行腹腔注射,对照组用生理盐水进行腹腔注射,每日 1 次,连续注射 90 d。上述狗舌草提取物粉末均用适量生理盐水配成所需浓度的溶液,用直径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌。

1.3.2 检查内容 给药后定时观察并记录各组小鼠饮食、活动等表现,每周称量体重 1 次。至第 90 天试验结束,剖杀全部小鼠,进行眼观病理学检查,并采集肝脏、肺脏、心脏、肾脏和脾脏等进行病理组织学检查^[16]。

1.4 狗舌草提取物的蓄积试验

将 1/10 LD₅₀ (80 mg/kg) 狗舌草提取物每日给 20 只雌性 C57L-L 小鼠腹腔注射给药 1 次,连续注射 30 d,观察小鼠有无死亡。如果在试验期内小鼠无死亡,则表示狗舌草提取物无蓄积作用,否则记录小鼠半数死亡的累积给药总量(LD₅₀),用 LD₅₀ 除以狗舌草提取物的 LD₅₀,求出蓄积系数(K),根据 K 值判断狗舌草提取物有无蓄积性。

1.5 狗舌草提取物的致突变试验

采用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检验法测定^[17-19]。

1.5.1 动物分组与药物处理 将 100 只雌性 C57L-L 小鼠随机等分为狗舌草提取物高剂量组、中剂量组、低剂量组、阴性对照组和阳性对照组 5 组。狗舌草提取物高剂量组、中剂量和低剂量组分别用 1/4 LD₅₀ (200 mg/kg)、1/5 LD₅₀ (160 mg/kg)、1/10 LD₅₀ (80 mg/kg) 狗舌草提取物进行注射;阴性对照组用生理盐水进行注射;阳性对照组用 75 mg/kg 环磷酰胺进行注射。各组均采用一次尾静脉注射法给药,每只小鼠给药液 0.2 mL。

1.5.2 骨髓推片的制备、镜检和计数 参考文献[17-19]方法进行。比较各给药组与阴性对照组微核率的差异性。

1.6 狗舌草提取物的致畸胎性试验

1.6.1 动物分组与处理 取性成熟的 C57L-L 小鼠 200 只,按雌雄比为 1:1 随机等分为 5 组,每组 20 对。每天将已确定受孕雌性 C57L-L 小鼠随机分

入狗舌草提取物高剂量组、中剂量组、低剂量组和阴性对照组和阳性对照组。其中高剂量组、中剂量和低剂量组分别以 $1/4 LD_{50}$ (200 mg/kg)、 $1/20 LD_{50}$ (40 mg/kg)、 $1/100 LD_{50}$ (8 mg/kg) 狗舌草提取物进行腹腔注射,阴性对照组用生理盐水进行注射;阳性对照组用 30 mg/kg 环磷酰胺进行注射。确认各雌性 C57L-L 小鼠怀孕后,第 6 天开始按剂量腹腔注射给药,每天 1 次,持续到第 15 天^[20]。

1.6.2 怀孕检查和胎仔检查 怀孕检查采用阴道栓检查法,凡发现如白色蜡块状阴道栓,即确定为怀孕第“0”日。将雌性 C57L-L 小鼠受孕后第 19 天,即自然分娩前 1 d 处死,取出子宫,从左侧子宫角开始至右侧子宫角顶端,依此取出活产胎仔、死胎以及吸收胎,并进行记录。活产胎仔取出以后,先检查性别,逐只称重,并按窝计算平均胎仔体重,然后进行各部位的外观畸形肉眼检查。

1.6.3 结果评定方法 每个活产幼仔出现 1 种或 1 种以上畸形均作为 1 个畸胎。用下述 2 个公式计算畸胎出现率和母体畸胎出现率。同时计算各组雌鼠的受孕率及每窝平均胎仔体重等^[20]。

畸胎出现率/ % = 畸胎总数/

检查的活胎总数 $\times 100\%$, (1)

母体畸胎出现率/ % = 出现畸胎的孕鼠数/
妊娠母鼠总数 $\times 100\%$ 。(2)

2 结果与分析

2.1 狗舌草提取物的长期毒性试验结果

2.1.1 临床观察 90 d 药物处理期间各组小鼠均无死亡。狗舌草提取物高剂量组小鼠在给药初 1 h,有轻微的精神不振,以后一直无异常表现。狗舌草提取物中剂量组和低剂量组小鼠均一直表现正常。

2.1.2 体重变化 至试验期末,狗舌草提取物高剂量组小鼠的平均体重为 (27.18 ± 1.73) g,与中剂量组 (27.55 ± 2.01) g、低剂量组 (28.05 ± 1.97) g 和对照组小鼠 (27.96 ± 1.65) g 相比,均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.1.3 病理变化 各组小鼠剖杀检查未见眼观变化。病理组织学检查发现,狗舌草提取物高剂量组小鼠的肝脏中央静脉有轻微充血,肝索和静脉窦正常,肝细胞无肿大,胞浆内无空泡;肺脏肺泡大小匀称无充血无肿大,无炎性渗出物,肺泡壁细胞无坏死,肺泡隔无增厚或变薄,无萎缩,终末细支气管平滑肌正常无充血水肿;心脏无出血充血,无水肿,心肌纤维排列整齐无增粗或萎缩现象,心肌细胞核形

态正常,细胞内和肌纤维间隙无明显渗出物;肾脏肾小球结构和肾小管上皮细胞未见胞浆内陷;脾脏的脾小结大小与数量无明显变化。可见,狗舌草提取物长期毒性检查结果为阴性。

2.2 狗舌草提取物的蓄积试验结果

用 $1/10 LD_{50}$ 狗舌草提取物连续给药 30 d,未观察到供试小鼠死亡。故可判定狗舌草提取物无蓄积毒性。

2.3 狗舌草提取物的致突变试验结果

动物(如小鼠)骨髓细胞微核率的变化可作为检测受试物致突变性的有效方法^[17-19]。由表 1 可见,给药组与生理盐水阴性对照组微核率差异不显著 ($P > 0.05$),而阳性对照组(75 mg/kg 环磷酰胺)微核率与给药组和阴性对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检验结果 ($\bar{X} \pm SD, n = 20$)

Table 1 Bone-marrow micronucleus rate of the mice ($\bar{X} \pm SD, n = 20$)		
供试药物 Substance used	剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	微核率/% Micronucleus rate
狗舌草提取物 <i>T. kirilowii</i> extract	200	3.25 \pm 0.023
	160	0.250 \pm 0.018
	80	0.225 \pm 0.010
环磷酰胺 Cyclophosphamide	75	2.250 \pm 0.207 *
生理盐水 Physiological saline water	-	2.000 \pm 0.011

注: * 表示分别与给药组和阴性对照组相比,差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * means significant difference ($P < 0.01$) from the test groups administered with doses of *T. kirilowii* extract, and the negative group, respectively.

2.4 狗舌草提取物的致畸胎性试验结果

2.4.1 狗舌草提取物对小鼠生殖机能的影响 与生理盐水阴性对照组相比,通过腹腔注射连续给予 $1/4 LD_{50}$ 、 $1/20 LD_{50}$ 和 $1/100 LD_{50}$ 狗舌草提取物,受孕鼠的受孕率、每窝活胎数、平均胎儿重、吸收胎儿数和死胎数无显著差异。30 mg/kg 环磷酰胺使供试小鼠的受孕率和平均胎儿重显著降低 ($P < 0.05$),但对受孕鼠的每窝活胎数、吸收胎儿数和死胎数等无明显影响(表 2)。

2.4.2 狗舌草提取物对小鼠胎儿外观畸形的影响

用药后供试小鼠胎儿外观畸形检查结果见表 3。在狗舌草提取物各剂量组中,仅中剂量组 ($1/20 LD_{50}$) 小鼠中发现 1 例腹部有出血斑,其他组小鼠均未出现可辨的外观畸形。相反,环磷酰胺 (30 mg/kg) 阳性对照组有 6 窝 15 例活产胎仔出现了一定数量的脑突出,无耳,融合趾和或短尾,其畸胎出

现率和母体畸胎出现率分别达 11.72 % 和 42.86 % , 显著高于其他组(χ^2 检验, $P < 0.05$)。

表 2 狗舌草提取物对供试小鼠生殖机能的影响

Table 2 Influence of the *T. kirilowii* extract on reproductivity of the mice

处理 Treatment	剂量/ (mg · kg ⁻¹) Dose	交配母鼠数 Mated female mice	受孕母鼠数 Pregnant mice	受孕率/ % Pregnant rate	每窝活胎数 Live fetuses per litter	平均胎重/ g Average weight of fetus	吸收胎儿数 Fetuses absorbed	死胎数 Dead fetus
狗舌草提取物 <i>T. kirilowii</i> extract	200	20	18	90	9.1 ± 0.4	1.343 ± 0.10	0	0
	40	20	20	100	8.3 ± 0.5	1.401 ± 0.08	0	0
	8	20	20	100	9.4 ± 0.3	1.311 ± 0.12	0	0
环磷酰胺 Cyclophosphamide	30	20	14	70 *	9.1 ± 0.7	1.093 ± 0.22 *	0	0
生理盐水 Physiological saline water	-	20	20	100	8.9 ± 0.2	1.435 ± 0.07	0	0

注: *表示与其他组相比,差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: * means difference ($P < 0.05$) from other groups. The following table is same .

另外,至试验末期,狗舌草提取物高剂量组母鼠出现进食减少,皮毛干燥等轻度中毒表现;中剂量组和低剂量组母鼠中均未观察到中毒症状。生理盐水阴性对照组和环磷酰胺阳性对照组母鼠中均未出现

异常表现。除了环磷酰胺阳性对照组小鼠有致畸阳性变化外,其他给药组及阴性对照组小鼠均无眼观畸形变化,说明狗舌草提取物无致畸作用。

表 3 狗舌草提取物对供试小鼠致畸胎性的试验结果

Table 3 Tteratogenicity of the *T. kirilowii* extract on the mice

处理 Treatment	剂量/ (mg · kg ⁻¹) Dose	被检窝数 Litters checked	被检活胎数 Live fetuses checked	畸胎出现率/ % Abnormal fetus rate	母体畸胎出现率/ % Maternal abnormal fetus rate
狗舌草提取物 <i>T. kirilowii</i> extract	200	18	164	0	0
	40	20	168	0.59	5.00
	8	20	188	0	0
环磷酰胺 Cyclophosphamide	30	14	128	11.72 *	42.86 *
生理盐水 Physiological saline water	-	20	178	0	0

3 讨论

狗舌草 PAs 不仅可引起小鼠的巨肝细胞和肾小管上皮细胞胞浆内陷等病变,而且还可导致大鼠的肝细胞癌^[11,15]。本研究中狗舌草提取物的长期毒性试验结果显示,狗舌草提取物未能引起供试小鼠临床表现和体重的异常变化;病理组织学检查也未见巨肝细胞和肾小管上皮细胞胞浆内陷等病变。说明狗舌草提取物在试验剂量下,无明显的长期毒性。

特殊毒性试验包括致癌试验、生殖毒性试验和致突变试验。动物致癌试验周期长,大约需要约 3 年时间,而且耗资巨大,因此是否进行动物致癌试验,必须十分慎重。需要做动物致癌试验的前提。一是新药结构与已知致癌物质有关、代谢产物与已知致癌物质相似;二是在长期毒性试验中发现有细胞毒性作用或能导致某些脏器、组织和细胞异常显著活跃的新药;三是致突变试验结果为阳性的新药。换言之,凡不符合以上 3 条者,皆可以免做致癌试

验^[17,20]。本研究对狗舌草提取物的蓄积性、致突变性和致畸胎性等研究的结果显示,狗舌草提取物无蓄积毒性、致突变性和致畸胎性,对供试小鼠的生殖机能也无不良影响,因此无需进行致癌试验。

[参考文献]

- [1] 李连弟,鲁凤珠,张思维,等. 1990~1992年中国恶性肿瘤死亡流行分布情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,1996,18(6):403-407.
Li L D, Lu F Z, Zhang S W, et al. Investigation on epidemic situation of malignancy in China between 1990 and 1992 [J]. Chinese Journal of Oncology, 1996, 18(6):403-407. (in Chinese)
- [2] 天津市人民医院. 肿瘤病理诊断[M]. 天津:天津人民出版社, 1974:69-84.
Tianjin People's Hospital. Pathological diagnosis of tumours [M]. Tianjin: Tianjin People's Press, 1974:69-84. (in Chinese)
- [3] Bargmann C, Hung M C, Weinberg R A. The new oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein [J]. Nature, 1986, 319:226-230.
- [4] 陈进军,王建华,史志诚. 狗舌草提取物对 L1210 细胞的体外作用研究[J]. 中国农学通报,2003,19(6):29-32.
Chen J J, Wang J H, Shi Z C. Studies on actions of extract from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub to L1210 cell line in

- vitro[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2003, 19(6): 29-32. (in Chinese)
- [5] 王建华,王跃虎,司红丽.狗舌草生物碱成分分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(1):93-95.
Wang J H, Wang Y H, Si H L. Analysis on alkaloids from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2004, 32(1): 93-95. (in Chinese)
- [6] 司红丽,王建华,王跃虎.狗舌草总黄酮的提取及其毒性试验[J].畜牧与兽医,2003,35(7):9-10.
Si H L, Wang J H, Wang Y H. Extraction and toxicity of flavonoids from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2003, 35(7): 9-10. (in Chinese)
- [7] 陈进军,王建华.狗舌草中毒猪血液中吡咯代代谢物的测定[J].畜牧兽医学报,2002,33(1):45-47.
Chen J J, Wang J H. Determination of sulphur-conjugated pyrrolic metabolite in swine exposed to *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2002, 33(1): 45-47. (in Chinese)
- [8] 陈进军,王建华.早花期和盛花期狗舌草中双稠吡咯啉生物碱对大白鼠的毒性试验[J].中国兽医科技,1998,28(10):8-9.
Chen J J, Wang J H. Toxicity tests of pyrrolizidine alkaloids from early and flourishing *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub in rat [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1998, 28(10): 8-9. (in Chinese)
- [9] 陈进军,王建华,薛登民.猪狗舌草中毒的病理学研究[J].西北农业大学学报,1999,27(2):53-57.
Chen J J, Wang J H, Xue D M. Histopathology in swines exposed to *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub [J]. Journal of Northwest Agricultural University, 1999, 27(2): 53-57. (in Chinese)
- [10] Buckmaster G W. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in rats: protective effects of dietary cysteine [J]. Journal of Animal Science, 1976, 3(2): 464-473.
- [11] 司红丽,王建娜,王跃虎,等.狗舌草黄酮类化合物对3种肿瘤细胞的药物敏感试验[J].药物生物技术,2003,10(4):229-231.
Si H L, Wang J N, Wang Y H, et al. Study of flavonoids compound from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub on three tumor cells by the drug sensitive test [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2003, 10(4): 229-231. (in Chinese)
- [12] 陈进军,王建华.狗舌草提取物诱导L1210细胞的凋亡[J].畜牧兽医学报,2006,37(3):295-298.
Chen J J, Wang J H. Apoptosis of L1210 cell line induced by extract from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub *in vitro* [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2006, 37(3): 295-298. (in Chinese)
- [13] 陈进军,王建华.狗舌草提取物诱导淋巴细胞性白血病L1210细胞分化的研究[J].中国兽医科学,2005,35(11):892-894.
Chen J J, Wang J H. Study on *in vitro* differentiation of L1210 cells induced by extract from *Tephrosia kirilowii* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(11): 892-894. (in Chinese)
- [14] 陈进军,王建华.狗舌草提取物体内抗L1210白血病效果的研究[J].中国农学通报,2005,21(8):15-18.
Chen J J, Wang J H. Anti-leukemic effects of extract from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub *in vitro* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(8): 15-18. (in Chinese)
- [15] 陈进军,孔庆波,王建华,等.狗舌草抗淋巴性白血病有效部位的急性毒性[J].动物医学进展,2004,25(2):88-89.
Chen J J, Kong Q B, Wang J H, et al. Acute toxicity of anti-lympholeukemic extract from *Tephrosia kirilowii* (Turcz.) Holub [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2004, 25(2): 88-89. (in Chinese)
- [16] 邓源,于弘,李秀敏,等.滋阴补肾丸的毒理学研究[J].华北国防医药,2006,18(6):390-393.
Deng Y, Yu H, Li X M, et al. A toxicological study of Ziyinbushen pills [J]. Medical Journal of National Defending Forces in North China, 2006, 18(6): 390-393. (in Chinese)
- [17] 陈进军,聂芳红,林红英,等.千里光提取物的镇痛作用及致突变性分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(3):49-52,56.
Chen J J, Nie F H, Lin H Y, et al. Analgesic effect of *Senecio scandens* extract and its mutation test in mice [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2007, 35(3): 49-52, 56. (in Chinese)
- [18] 陈进军,于增杰,林红英,等.千里光提取物的小鼠骨髓微核试验[J].中兽医医药杂志,2007(1):20-22.
Chen J J, Yu Z J, Lin H Y, et al. Bone-marrow micronucleus test of extract from *Senecio scandens* Buch Ham in mice [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2007(1): 20-22. (in Chinese)
- [19] Ehling U H. Induction of specific-locus and dominant-lethal mutations by cyclophosphamide and combined cyclophosphamide-radiation treatment in male mice [J]. Mutation Research, 1988, 199(1): 21-33.
- [20] 肖希龙,沈建忠,赵少翰,等.爱多收对大鼠的生殖毒性研究[J].畜牧兽医学报,1995,26(4):334-339.
Xiao X L, Shen J Z, Zhao S H, et al. Study on the toxicity of Atonik to the reproduction of rats [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 1995, 26(4): 334-339. (in Chinese)



鸡肾型传染性支气管炎的 诊断和防制

陈修邓¹, 徐春厚², 陈进军², 邓洪文¹, 张洪韧¹, 许崇现¹

(1.广东省江门市动物防疫检疫站, 广东江门 529000; 2.广东海洋大学动医系, 广东湛江 524088;)

1 发病情况

广东省江门台山市某专业户于 2006 年 11 月份购进 1 日龄三黄鸡苗 10000 羽, 该养殖场采用山地散养, 在上批鸡出栏后间隔 1 个月, 鸡舍场地在空闲期用石灰水喷洒消毒后, 空置 10 天。该鸡场免疫程序: 5 日龄使用新支二联苗(新城疫 系+ 传支 H120)倍量点眼、滴鼻首免, 10 日龄传染性法氏囊疫苗饮水免疫, 15 日龄禽流感灭活苗肌肉注射, 30 日龄 IB 疫苗(H52) 饮水, 45 日龄肌注鸡新城疫 I 系疫苗。15 天开始发现有些雏鸡出现气喘、气管啰音、伸颈张口呼吸等呼吸道症状, 排白色粪

便, 病情来势较猛, 当天就有鸡死亡, 第二天后病情迅速扩大, 感染率 30%以上, 采食量大幅减少, 曾使用庆大霉素、链霉素治疗, 疫情没有明显控制, 仍有成批雏鸡死亡。整个病程先后持续 10 余天, 共死亡雏鸡 1520 羽, 死亡率约 15%。

2 临床症状

病雏鸡表现精神沉郁、怕冷、打堆、羽毛蓬松、采食量下降、伸颈、张口喘息、气管啰音和甩头, 个别出现犬坐姿势, 排白色粪便, 有时肛门周围粘满粪便, 饮欲增强, 迅速波及全群。

3 病理变化

稳定是预防呼吸系统疾病的首要任务。生产上有相当多的疾病是在应激因素直接或间接影响导致抵抗力下降的情况下发生的, 所以要特别强调保持禽舍内环境舒适和稳定的重要性。其中与呼吸道疾病有关的主要管理因素是: 温度、密度、湿度、通风透气情况、光照和声音等。温度骤变和密度过大会导致抵抗力下降, 湿度过大是球虫病和曲霉菌发生的最佳环境; 环境干燥则会继发大肠杆菌和支原体感染。通风不良, 环境中气体浓度过高对家禽呼吸道有明显的不良刺激作用。光照时间过长, 强度过高及无规律的光照和声音响动, 对禽群的应激影响很大, 容易造成禽群疲惫, 抵抗力下降, 啄癖发生率上升。养禽场的一些常规操作, 如抽样称重、采血、转舍、断喙、免疫接种等均对家禽有较大的刺激。因此将这些工作与日常饲养管理有机结合, 制定完善的计划, 提高责任心和技术熟练程度, 是减轻这类应激因素影响的关键。

3.2 重视并要搞好消毒工作, 尤其是禽喷雾消毒, 既可以杀灭隐藏于禽舍内环境以及家禽体表和呼吸到中的病原体, 又能沉降粉尘, 净化空气,

阻止病原体的扩散。生产中采用过氧乙酸带鸡消毒, 既可以环境消毒, 又可以对鸡舍中氨气进行中和而降低鸡舍中氨气的浓度, 效果良好。

3.3 良好的免疫接种可以保证鸡群免受各种病毒性传染病的困扰, 养殖场要根据本地区的家禽疾病流行的特点和抗体水平, 制定合理的免疫程序, 认真做好免疫接种。对于蛋鸡厂来说, 应定期将鸡蛋送样到指定化验部门进行新城疫和禽流感的监测, 以便随时监控重大疫病。

3.4 一旦发病, 选用合理的治疗药物很关键。泰乐菌素、强力霉素、氟本尼考、替米考星等抗生素对细菌性呼吸道疾病疗效比较好。强力霉素和氟苯尼考联合用药对嗜血杆菌效果尤为佳。一旦发生病毒性传染病, 一般无特效疗法, 为了减少损失可以用干扰素或白细胞介素结合中成抗病毒药联合治疗, 抗病毒药也有抗病毒谱, 盲目用药只会增加经济损失。同时需在饲料中拌广谱抗生素预防细菌继发感染。有些可以紧急免疫接种治疗, 如发生新城疫用新城疫油乳剂灭活苗紧急接种治疗, 联用禽用干扰素分边注射效果更好。



剖检病死或濒临死亡鸡,可见气管和鼻道有卡他性干酪样渗出物,黏膜水肿,个别气嚔浑浊,附有黄色干酪样分泌物,肾脏肿胀、苍白,输尿管和肾小管膨大充满白色尿酸盐而呈斑纹状,称“花斑肾”。组织学检查病死鸡的肾脏病变部为间质性肾炎,小管上皮发生颗粒变性、空泡变性及坏死,进而上皮细胞脱落。有的可见到大量嗜中性白细胞浸润,在髓质内小管的病变十分严重,也有的可见到局灶性坏死和小管上皮细胞的再生。

4 实验室诊断

4.1 细菌学检查

4.1.1 组织涂片镜检:以无菌操作采取心血、气管、支气管的渗出物以及肾脏涂片,分别经革兰氏、美蓝、姬姆萨染色后镜检,均未观察到细菌。

4.1.2 细菌培养:取病死鸡的气管、支气管渗出物以及肾脏,以无菌操作接种于普通琼脂培养基、鲜血琼脂培养基和普通肉汤中,经 37℃ 恒温培养 24 小时,未见可疑菌落生长。

4.2 病毒学检查

4.2.1 病料的采集与处理:从典型病例中无菌采取鸡肾脏,用匀浆管将肾脏磨细,用灭菌生理盐水作 1:5 稀释,稀释液经 2000 转/分钟离心 10 分钟,弃沉淀物,取上清液经 0.22 微米细菌滤器过滤,将滤液中加入青、链霉素各 2000 微克/毫升,置 4℃ 冰箱中 4~6 小时后,用于接种鸡胚进行病毒分离。

4.2.2 病毒的分离:取处理好的病料滤液接种 5 枚 10 日龄鸡胚尿囊腔(0.2 毫升/胚),继续孵化至 72 小时,弃去 24 小时内死亡的胚,活胚置 4℃ 冰箱中过夜,吸取尿囊液(第一代),同时观察鸡胚的变化。将第一代尿囊液再接种 10 日龄非免疫鸡胚,继续传代,盲传 5 代后进行检测,出现胚死亡或胚体矮小化且不凝集鸡红细胞的现象,表明病料中含有 IBV。收集死胚胚液以及存活鸡胚尿囊液,以 -30℃ 保存备用。

4.2.3 人工感染鸡试验:取 20 羽 10 日龄健康三黄鸡,分成两组。试验组每羽滴鼻接种分离毒株第五代鸡胚尿囊液(0.2 毫升/羽),对照组每羽滴鼻接种正常鸡胚尿囊液(0.2 毫升/羽)。连续观察 14 天,结果试验组 10 羽鸡于接种后 4 天陆续开始出现不同程度的精神沉郁,呼吸道症状,拉白色稀粪;第 8 天死亡 7 羽,剖检见气管分泌物增多,肾

肿大并有多量尿酸盐沉积,剩下 3 羽耐过,但生长缓慢。对照组 10 羽鸡则未出现异常症状。

4.2.4 干扰试验:取 10 枚 10 日龄的正常鸡胚,分成两组,其中一组接种收集存活的鸡胚尿囊液 0.1 毫升作为试验,另一组不接种作为对照,10 天后二组通过尿囊腔接种 0.1 毫升 ND- VB 株(系苗)的胚液,接种后继续孵化,经 48 小时,取鸡胚置 4℃ 冰箱中冷冻,然后逐组逐只测定 HI 效价,试验组有 6 只鸡胚尿囊液 HI 滴度在 1:20 以下,而对照组的鸡胚液的 HI 滴度均在 1:40 以上,说明 IBV 对 NDV 产生了明显的干扰作用。据此可作出对传染性支气管炎病毒的初步鉴定。

5 防治

5.1 药物治疗 本病目前尚无特效疗法,笔者选用林可霉素、速百治、泰乐菌素混合 1 毫升/只肌肉注射;配合使用洛美清音、肾肿解毒药;还使用清瘟散、板蓝根、穿心莲等中药治疗本病收到良好的效果。而在选用药物治疗时避免使用对肾脏毒害大的一些药物,如磺胺类、庆大霉素、卡那霉素等。

5.2 加强饲养管理 病鸡隔离,注意保暖、通风换气和进行鸡舍带鸡消毒,添加维生素 B、维生素 C;给予复方口服补液盐或碳酸氢盐补充钾、钠损失,有利于消除肾脏炎症;饲料中蛋白质含量不能过高,以免尿酸生成过多,造成代谢受阻而产生沉积。

5.3 紧急疫苗接种 疫区其他鸡应立即选用相应血清型的多价油乳剂灭活苗做紧急接种。

6 小结与讨论

6.1 通过临床症状、病理变化、实验室检查、干扰试验等可诊断为鸡肾性传染性支气管炎。但鸡传染性支气管炎存在多种血清型,关于引起本次病例的毒株型尚待进一步探讨和研究。

6.2 针对该地区流行的是肾型传支,在选用疫苗方面,应该值得注意。笔者给予商品肉鸡的参考免疫程序:5 日龄时使用城疫 系倍量点眼;7 日龄,采用 H120 滴鼻,同时可用 IB 多价油苗 1 头份注射;10 日龄法氏囊饮水;15 日龄禽流感灭活苗肌肉注射;30 日龄采用 H120 滴鼻,同时用 IB 多价油苗 1 头份注射;45 日龄肌注鸡新城疫 I 系疫苗。有资料证明,在生产过程中,单用灭活苗进



蛋鸡传染性喉气管炎的诊治

吴建峰¹, 王涛², 李敏²

(1. 石家庄市牧工商开发总公司原种猪场, 河北石家庄 050100;

2. 石家庄九通药业, 河北石家庄 050036)

2007年4~6月份期间河北馆陶县多个乡镇的鸡群暴发了典型的传染性喉气管炎, 以成年鸡群多发, 青年鸡次之, 雏鸡较少发生。成年鸡和青年鸡症状典型, 雏鸡症状较轻。此次发病传播很迅速, 尤其是养殖密度大的村, 发病率在80%~100%, 死亡率2%~15%甚至更高, 病程7~20天不等。

1 临床症状 发病初期仅个别鸡表现结膜炎(流泪、眼角聚集气泡、上下眼睑肿胀, 有的粘连)和轻微的喘鸣声和甩头。发病3~4天以后流泪、眼睑肿胀的增多而且出现闭眼、伸颈、张口喘息鸡只。严重的鸡不时伸颈用力甩头发发出响亮的喘鸣声, 直至甩出条状的血性分泌物。治疗不当的鸡群后期采食量不足正常的50%, 产蛋率从80%~95%降至10%~30%不等。病鸡排黄白绿稀粪。

2 剖检 喉头、气管黏膜水肿、出血, 喉头堵塞黄色或黄白色或带血的酪状分泌物, 气管内有大量的黏稠的血性分泌物, 后期死亡鸡只大都有卵黄性腹膜炎。

3 诊断 根据流行病学、临床症状、病理解剖综合诊断为传染性喉气管炎。

4 治疗 根据疾病特点和本人多年临床经验确定以下治疗方案:

4.1 紧急接种 最好用进口苗, 成年鸡2羽份/只, 青年鸡1羽份/只, 涂肛。接种24小时以后使用药物治疗。

4.2 药物治疗 蟾酥呼毒清, 800只成年蛋鸡

行免疫, 只能产生低于50%的保护率, 灭活苗和弱毒苗交叉使用可产生90%~100%的保护。

6.3 鸡传染性支气管炎不断有新的变异株产生, 其中弱毒苗有可能成为IBV突变的主体和重组变异的供体; 新的变异株的不断出现, 使得对鸡IB的免疫预防难上加难。为预防新的变异株的产生, 人们正研究用重组DNA表达蛋白进行免疫, 因为利用重组DNA免疫既防止了疫苗毒的感染,

每天一瓶, 喷喉, 连用5天; 祛痰灵, 每袋对水150千克, 饮水, 连用5天; 慢呼舒克, 500只成年蛋鸡每天一瓶, 饮水, 连用5天。

4.3 辅助治疗 补充营养, 坚持消毒, 保持鸡舍空气清洁, 通风良好。

以上药物均为石家庄九通药业生产。蟾酥呼毒清: 主要成分蟾酥、冰片、聚肌孢等; 祛痰灵: 主要成分碘化钾、溴己新、氯化铵等; 慢呼舒克: 主要成分泰乐菌素、麻黄素等。

5 回访

5.1 在发病初期(仅个别鸡出现临床症状时), 采取以上措施后5天, 病情得以控制, 再经4~5天时间, 鸡群状况恢复到发病前水平, 在恢复期间一般不再出现死亡, 采食量、产蛋率稍降, 但恢复很快。

5.2 在发病中后期(大群出现临床症状时), 紧急接种后第二天甚至当天出现死亡, 第五天死亡达高峰, 第6~7天开始减少, 第八天时大群临床症状明显减轻, 采食量逐渐增加, 产蛋率也随之回升, 再经约5天时间鸡群恢复到发病前水平。在整个治疗过程中死亡率在5%~10%之间不等。

5.3 在实际治疗过程中, 有的鸡群发病后因畜主担心紧急接种引起病情加重和出现死亡, 而选择直接药物治疗。但其效果不理想, 病情难以控制, 病程长达20天以上而且死亡率不低于13%; 采食量、产蛋率下降严重, 发病15天后开始非常

又可预防由于疫苗毒的重组而产生新的血清型IBV。

6.4 IBV弱毒苗可用于气雾、滴鼻、点眼、饮水免疫, 各种免疫方式产生的免疫效果各异。笔者建议采用饮水免疫时, 添加2%脱脂奶粉进行传染性支气管炎弱毒疫苗免疫, 有利于加强疫苗的免疫效果。

中图分类号: S 853.74:R 284.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-4696(2010)01-0107-04

苦地胆内酯类化合物的制备及其体外抑菌效果研究

刘勇¹, 聂芳红², 林红英¹, 陈进军^{1*}, 马驿¹, 巨向红¹

(1. 广东海洋大学 动物医学系, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 为探讨中药苦地胆有效成分苦地胆内酯的抗菌效果, 用浓度为 800 mL/L 的乙醇溶液进行热回流浸提, 制备苦地胆内酯的粗提物, 经硅胶柱层析分离、纯化, 再结晶, 制得苦地胆内酯类化合物, 用薄层层析法进行苦地胆内酯检测与鉴定, 并进行了苦地胆内酯类化合物的体外抑菌试验。结果显示, 当浓度为 2.0 mg/mL 时, 苦地胆内酯类化合物对巴氏杆菌、蜡状芽孢杆菌具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 对金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌和鸡大肠杆菌呈现极明显的抑制作用 ($P < 0.01$); 浓度分别为 50、10 mg/mL 时, 苦地胆内酯类化合物对 5 种供试菌均有极明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。苦地胆内酯类化合物对供试金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、巴氏杆菌、鸡大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别为 0.313、0.313、0.156、0.625 mg/mL 和 1.25 mg/mL; 对蜡状芽孢杆菌的最小杀菌浓度为 2.5 mg/mL, 对其他 4 种供试菌的最小杀菌浓度均为 0.625 mg/mL。表明, 苦地胆内酯类化合物具有很好的体外抗菌效果。

关键词: 苦地胆内酯; 提取纯化; 薄层层析; 体外抑菌作用

Preparation of lactonic extract from *Elephantopus scaber* and its antibacterial effects in vitro

LIU Yong¹, NIE Fang-hong², LIN Hong-ying¹, CHEN Jin-jun¹, MA Yi¹, JU Xiang-hong¹

(1. Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To investigate the antibacterial effects of lactones from *Elephantopus scaber*, a well-known Chinese herbal medicine, ku-di-dan, the crude extracts from *E. scaber* were prepared with 800 mL/L ethanol and followed by purification with silica gel column chromatography and crystallization. The purified extract of lactones from *E. scaber* (PEL ES) was checked and identified by thin layer chromatography and its antibacterial effect *in vitro* was observed. 2.0 mg/mL of PEL ES inhibited the growth of *Pasteurella multocida* (PM) and *Bacillus cereus* (BC) ($P < 0.05$), and significantly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (SA), *Salmonella enteritidis* (SE), and *Escherichia coli* in chicken (CC) ($P < 0.01$), respectively. PEL ES at 5 mg/mL and 10 mg/mL significantly inhibited ($P < 0.01$) the growth of all the five strains of bacteria ($P < 0.01$) and the minimum inhibitory concentration (MIC) of PEL ES was 0.313 mg/mL against SA and SE and 0.156 mg/mL against PM, 0.625 mg/mL against CC, and 1.25 mg/mL against BC. The minimum bactericidal concentration (MBC) of PEL ES against BC was 2.5 mg/mL while the MBC against the other four bacteria was 0.625 mg/mL. The result showed that PEL ES from ku-di-dan had significant antibacterial effects.

Key words: lactones from *E. scaber*; purification; thin layer chromatography; antibacterial effect *in vitro*

苦地胆 (*Elephantopus scaber*) 为菊科地胆草属多年生草本植物, 分布于我国南方各省, 尤以广东、广西和福建多见, 是我国华南地区, 尤其港台地区的

一味常用民间草药。因苦地胆具有清热、凉血、利湿的功效, 民间广泛用其治疗感冒、百日咳、黄疸、咽喉炎、眼结膜炎、肾炎肿、湿疹、虫蛇咬伤等症^[1-3]。现

收稿日期: 2009-07-08; 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 湛江科技攻关计划项目 (湛科[2006]94 号); 广东省科技攻关计划重点引导项目 (2004B20201007)

作者简介: 刘勇 (1985-), 男, 江西遂川人, 硕士生。* 通讯作者, Tel: 0759-2383246, E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

代医学研究表明,苦地胆含有甾醇,以及菊糖、果糖、氨基酸和内酯等化学成分,其主要有效成分为苦地胆内酯^[4]。中草药及其有效成分在防治畜禽细菌性或病毒性疾病方面具有广阔前景。然而传统研究中使用的大部分中草药提取物均是粗制品,其有效成分含量常随季节和地理环境的不同而改变,而且化学成分复杂,究竟是何种成分起作用还不甚清楚^[5]。为进一步明确中药苦地胆的有效成分及苦地胆内酯的抗菌效果,笔者采用硅胶柱层析法对苦地胆内酯粗提物进行了纯化,制作出了苦地胆内酯类化合物纯品并对其进行了体外抗菌试验。

1 材料与方法

1.1 苦地胆

于 2008 年 6 月采自广东省湛江市湖光岩东,经广东海洋大学农学院植物分类学副教授吴钊鉴定为苦地胆正品。阴干、粉碎、过孔径 0.833 mm 筛,置密闭塑料袋保存于 4℃ 冰箱备用。

1.2 菌株

肠炎沙门氏菌、鸡大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌,均由本校兽医微生物实验室提供。

1.3 主要器材和试剂

多孔电热恒温水槽:501A 型,上海实验仪器厂生产;电热恒温干燥箱:GZX-9030MBE 型,上海博讯医疗设备厂生产;旋转蒸发器:RE-5220 型,上海亚荣生化仪器厂生产;硅胶 G:青岛海洋化工厂生产,其他试剂均为国产分析纯。

1.4 苦地胆内酯化合物的提取

参照文献^[6-7]的方法,称取干燥苦地胆全草粉末 2 kg,按料液比 1:7 加入 800 mL/L 乙醇,于热回流装置内 60℃ 回流 5 h,过滤;滤渣再按料液比 1:5 加入 800 mL/L 乙醇热回流 4 h,过滤,合并 2 次滤液,在 60℃ 多孔电热恒温水槽中蒸发掉乙醇和部分水分。将浓缩液用 1/3 体积的石油醚反复萃取 3 次后用 1/3 体积乙酸乙酯充分萃取多次。取乙酸乙酯萃取液旋转蒸发浓缩至适当体积,用 1 g/L NaHCO₃ 水溶液洗涤 3 次后用蒸馏水洗至中性,收集乙酸乙酯相,置于 4℃ 冰箱过夜,趁冷过滤,滤液挥干溶剂得苦地胆内酯粗提物。

1.5 苦地胆内酯的纯化与检测

将苦地胆内酯粗提物用少量乙酸乙酯溶解,湿法上样于硅胶层析柱上端,先用石油醚-乙酸乙酯混合物,然后用乙酸乙酯-甲醇混合物梯度洗脱,异羟肟酸铁反应定性合并,旋转蒸发回收溶剂,丙酮溶剂

结晶,得纯化的苦地胆内酯类化合物。利用内酯类化合物在异羟肟酸铁试剂喷雾显色的黄绿色背景下呈蓝紫色斑点的特性,用硅胶 G 薄层层析检测鉴定^[7-10]。

1.6 苦地胆内酯纯化物的体外抑菌试验

1.6.1 供试液的制备 精确称取苦地胆内酯类化合物 1.0 g,加少量无水乙醇,再加入含 3 g/L 吐温-80 的蒸馏水至 20 mL,随后配成 50 mg/mL、10 mg/mL、2 mg/mL 的高、中、低 3 种浓度供试液。并采用巴氏消毒法(62℃ 30 min)进行灭菌。

1.6.2 菌悬液的制备 分别从保存菌种的培养基斜面上将供试菌接种于营养琼脂培养基上,于 37℃ 培养 24 h,反复活化 3 次,然后分别将第三代的菌种接到含有 100 mL 营养肉汤培养基的三角瓶中振荡培养(摇速 130 r/min),37℃ 培养 18~24 h 后取出,采用平板菌落计数法检测其菌悬液浓度,然后将其稀释至 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ CFU/mL,放入冰箱保存备用。

1.6.3 培养基的制备 营养肉汤、营养琼脂按常规方法制备,煮沸溶解后 121℃ 高压灭菌备用。

1.6.4 苦地胆内酯纯化物药物敏感性测定 在每个培养皿(90 mm)中倒入 20~25 mL 已融化并冷却至 45℃ 的营养琼脂培养基,厚度约为 4 mm,待凝固后,加入 0.1 mL 配制好的菌悬液,用灭菌涂布棒均匀地将菌液涂布,用直径为 6 mm 的无菌打孔器均匀打孔,每板 5 孔,酒精灯封闭孔底,将 3 种不同浓度的供试液加于孔中,以满而不溢为宜并做好标记,另一孔加含 3 g/L 吐温-80 无菌水作为对照。置于 37℃ 下培养 24 h,测量抑菌圈直径大小,每种供试菌进行 3 次重复。利用 SPSS11.5 统计分析软件将所测抑菌圈数据分别与空白对照组进行 *t* 检验。

1.6.5 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 采用试管 2 倍稀释法测定,取无菌试管 10 支,各加 1 mL 营养肉汤;以无菌操作吸取 10 mg/mL 供试液 1 mL 于第 1 管中,混匀后吸取 1 mL 入第 2 管中,依次倍比稀释至第 9 管,混匀后自第 9 管弃去 1 mL。此时,管中药液含量比依次为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 和 1:512,第 10 管为不加药物对照;各管均加入供试菌液 0.05 mL,混匀后于 37℃ 培养 24 h,以肉眼观察药物最低浓度管中无细菌生长者为该试验药物 MIC。将上述未见生长细菌的各管中的肉汤接种于营养琼脂平板上,做好标记,37℃ 培养 16~18 h,以仍无细菌生长的管内药物浓度记为该药的 MBC。

2 结果

2.1 苦地胆内酯的 TLC 检测鉴定

用展开剂石油醚-氯仿-乙醚(体积比 3 : 5 : 2) 混合物能很好地将苦地胆内酯类化合物通过硅胶 G 薄板层析法加以分离,经异羟肟酸铁试剂(内酯类化合物专属显色剂)喷雾显色和碘熏蒸显色,经柱层析纯化后的苦地胆内酯类化合物出现 3 个蓝紫色斑点(见图 1), R_f 值分别为 0.16、0.33 和 0.64。

2.2 苦地胆内酯的体外抑菌效果

由表 1 可见,高、中浓度的苦地胆内酯类化合物对 5 种供试细菌的抑菌作用均极为明显 ($P < 0.01$);低浓度的苦地胆内酯类化合物对巴氏杆菌、蜡状芽孢杆菌作用明显 ($P < 0.05$),对其他 3 种供试菌呈现极明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。

MIC、MBC 测定结果见表 2(- : 无菌生长, + : 菌体生长弱, #: 菌体生长较强, ## : 菌体生长很强)、

表 3。由表 2 可知,苦地胆内酯类化合物对供试金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、巴氏杆菌、鸡大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌的 MIC 分别为 0.313、0.313、0.156、0.625 和 1.25 mg/mL。由表 3 可知,苦地胆内酯类化合物对蜡状芽孢杆菌的 MBC 为 2.5 mg/mL, 对其余 4 种供试菌的 MBC 均为 0.625 mg/mL。

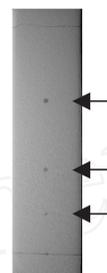


图 1 地胆草内酯类化合物的薄层色谱

Fig. 1 Thin layer chromatography of the lactonic extract from *Elephantopus scaber*

表 1 3 种不同浓度苦地胆内酯类化合物的抑菌圈直径(mm)

Table 1 Diameters of inhibitory bacterial zone of three different concentration of the lactonic extract from *Elephantopus scaber*

药品浓度/ (mg · mL ⁻¹) PELES	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enteritidis</i> (SE)	巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i> (PM)	鸡大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> in chicken(CC)	蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> (BC)
50	24.38 ± 0.24 **	18.83 ± 0.23 **	16.94 ± 0.50 **	15.12 ± 0.16 **	13.31 ± 0.32 **
10	20.92 ± 0.78 **	15.74 ± 0.47 **	12.89 ± 0.60 **	12.06 ± 0.28 **	10.25 ± 0.08 **
2	12.67 ± 0.34 **	11.91 ± 0.33 **	8.18 ± 0.55 *	9.99 ± 0.29 **	6.95 ± 0.23 *

* *:与对照组差异极显著 ($P < 0.01$); * :与对照组差异显著 ($P < 0.05$)

* *:Extremely significant difference compared with the control group ($P < 0.01$); * :Significant difference compared with the control group ($P < 0.05$)

表 2 苦地胆内酯类化合物的 MIC 测定结果

Table 2 Results of the minimum inhibitory concentration of the lactonic extract from *E. scaber*

细菌 Bacteria	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	阴性对照 Negative control
SA	-	-	-	-	-	+	+	##	##	##
SE	-	-	-	-	-	+	+	##	##	##
PM	-	-	-	-	-	-	+	##	##	##
CC	-	-	-	-	+	##	##	##	##	##
BC	-	-	-	+	+	##	##	##	##	##

表 3 苦地胆内酯类化合物对 5 种细菌的 MIC 和 MBC

Table 3 The MIC and MBC of the lactonic extract from *E. scaber* against the five bacteria respectively mg/mL

指标 Indexes	SA	SE	PM	CC	BC
MIC	0.313	0.313	0.156	0.625	1.250
MBC	0.625	0.625	0.625	0.625	2.500

3 讨论

苦地胆化学成分复杂,本研究以内酯成分为目标,尽量除去其他成分。通过薄层层析法对柱层析前后苦地胆内酯粗提物和纯化物进行检测比较,采用异羟肟酸铁试剂(内酯类化合物专属显色剂)喷雾

显色和碘(有机物通用显色剂)熏蒸显色,发现柱层析前都出现 4 个显色斑点,柱层析后只有 3 个,说明有一个内酯成分在进行纯化时丢失,需要改进洗脱条件和监测手段。用碘熏蒸显色除有 4 个显色斑点外,在展开前沿还有 1 条显色带,说明在进行柱层析前苦地胆内酯粗提物中除含有 4 个内酯成分外还含有其他化合物,但在柱层析后仅看到 3 个清晰的斑点,说明经柱层析除掉了大量非内酯化合物,通过结晶,析出了晶体;结合文献[6-7]分析,可判定最终得到的苦地胆内酯已得到纯化。

常规研究中所用中药提取物多为粗制品,其活性成分复杂、扩散速度不一、颜色深,影响试验结果

判断,无法确定是何种成分在起作用。本试验针对苦地胆内酯类活性成分进行提取,得到粗提物后,再采用硅胶 G 柱层析法对其进行纯化,得到苦地胆内酯纯化物,较好地解决了上述问题。在供试液的制备过程中,先用少量无水乙醇溶解,并在蒸馏水中加入了 3 g/L 的吐温-80 让苦地胆内酯充分溶解,利于扩散;对照组则在无菌水中加入了同样少量的无水乙醇和 3 g/L 吐温-80,结果表明这种处理对细菌的生长没有影响。

采用适宜的巴氏消毒法对苦地胆内酯类化合物进行灭菌,避免了高温高压对内酯成分的破坏。在研究中,曾采用过微孔滤膜除菌法进行除菌,发现所得苦地胆内酯类化合物滤液的抑菌效果逊于采用巴氏消毒法灭菌的抑菌效果,其可能原因是在进行过滤除菌时,有一部分内酯成分残留在滤膜上而降低了药液的浓度。

传统中药研究中的抑菌效果判定借用抗生素抑菌的评判标准,而国际权威期刊著文认为,只要抑菌圈直径大于 6.0 mm 就可以说明该提取物对供试细菌具有抑菌作用,大于 8.0 mm 即为高度敏感^[11-12]。本试验结果显示,苦地胆内酯化合物抑菌圈仅为 (6.95 ± 0.23) mm 时,与对照组相比,就表现差异显著 ($P < 0.05$),抑菌圈为 (9.99 ± 0.29) mm 时,则差异极显著 ($P < 0.01$)。另外,本研究所选用的供试菌既有革兰阳性菌、革兰阴性菌,又有带芽孢杆菌,可见苦地胆内酯类化合物抗菌谱较广。这可能是中药苦地胆抗菌消炎的药理机制之一。在目前畜禽混合感染性疾病频频发生的情况下,苦地胆广谱抗菌有效成分——地胆内酯化合物可作为抗菌消炎药物加以深入研究与开发^[13],这在一定程度上有利于代替抗生素和化学抗菌药,有利于克服西药的固有弊端。但作为苦地胆的主要抗菌有效成分,苦地胆内酯类化合物的抑菌机理尚待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海人民出版社, 1977:1291,1301.
Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Medicine: Volume 1* [M]. Shanghai: Shanghai People's Press, 1977: 1291, 1301. (in Chinese)
- [2] 曹晖,陈文,毕培曦. 地胆草属药用植物的研究概述[J]. 国外医学:中医中药分册,1998,20(2):11-15.
CAO Hui, CHEN Wen, BI Pei-xi. Research of medicinal plants of *Elephantopus scaber* [J]. *Foreign Medical Sciences: Fascicule of TCM*, 1998, 20(2): 11-15. (in Chinese)
- [3] CAO H, BUT P P, SHAW P C. Authentication of the Chinese drug "kur-di-dan" and its substitutes using random primed polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 1996, 31(7): 543-553.
- [4] 梁侨丽, 闵知大. 地胆草属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医药:植物药分册, 2002, 17(1): 8-10.
LIANG Qiao-li, MIN Zhi-da. The chemical composition and pharmacological activity of *Elephantopus scaber* plants [J]. *World Phytomedicines*, 2002, 17(1): 8-10. (in Chinese)
- [5] 傅文栋. 中草药及其有效成分体外抗菌抗病毒研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(5): 66-67.
FU Wen-dong. Research of the medicinal herb and antibacterial anti-virus effects of the active compositions of the medicinal herb [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2006, 25(5): 66-67. (in Chinese)
- [6] 梁侨丽. 地胆草的化学成分研究及其倍半萜内酯的结构修饰[D]. 北京:中国药科大学, 2002:12-64.
LIANG Qiao-li. Research of chemical composition and the structure modification of sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber* Linn [D]. Beijing: China Pharmaceutical University, 2002: 12-64. (in Chinese)
- [7] 董新荣, 吴国生. 银杏内酯的提取纯化与分离[J]. 湖北化工, 2001, 18(4): 27-28.
DONG Xin-rong, WU Guo-sheng. Extraction, purification and isolation of ginkgolide [J]. *Hubei Chemical Industry*, 2001, 18(4): 27-28. (in Chinese)
- [8] 吴学军, 谢能咏, 刘勇. 薄层层析法分离六种氨基酸[J]. 江汉大学学报, 1999, 16(6): 11-13.
WU Xue-jun, XIE Neng-yong, LIU Yong. Separation of six amino acids by the thin layer chromatography [J]. *Journal of Jiangnan University*, 1999, 16(6): 11-13. (in Chinese)
- [9] 腾祥金, 杨丹, 孟腾. 薄层层析法分析甜叶菊糖苷[J]. 中国糖料, 2007, 30(4): 24-25.
TENG Xiang-jin, YANG Dan, MENG Teng. The analyse of *Stevia rebaudiana* glycosides by the thin layer chromatography [J]. *Sugar Crops of China*, 2007, 30(4): 24-25. (in Chinese)
- [10] 吕长淮. 薄层色谱法在药物分析中的应用[J]. 西部药学, 2006, 3(5): 274-276.
LÜ Chang-huai. Application of the thin layer chromatography in pharmaceutical analysis [J]. *Chinese Journal of Western Medicine*, 2006, 3(5): 274-276. (in Chinese)
- [11] RAMZI A A M, ULRIKE L. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(4): 177-181.
- [12] OLIVERIRA D F, PEREIRA A C, FIGUEIREDO H C P, et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region [J]. *Fitoterapia*, 2007, 78(2): 142-145.
- [13] 何国昌, 董玲婉, 阮肖平, 等. 地胆草全草提取物抗菌抗炎作用的试验研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(3): 191-192.
HE Guo-chang, DONG Ling-wan, RUAN Xiao-ping, et al. Study of antibacterial anti-inflammatory effects of extract from *Elephantopus scaber* Linn [J]. *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology*, 2008, 15(3): 191-192. (in Chinese)

(责任编辑 张文举)

两种转移因子对犬外周血 T 细胞亚群的影响

孔庆波^{1,3}, 陈进军², 陈德坤³, 张彦明³

(1. 中国刑事警察学院警犬技术系, 沈阳 110034; 2. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 湛江 524088;

3. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要:按标准方法分别提取制备了猪和犬的转移因子, 选择杂种牧羊犬为试验犬, 用流式细胞术检测了试验犬注射猪、犬转移因子前和注射后不同时间 T 细胞亚群的变化情况。结果表明, 同种、异种转移因子均可提高试验犬外周血淋巴细胞数量; CD4/CD8 比值变化分析结果证明, 外周血增加的淋巴细胞主要为 CD4⁺ T 细胞; 试验犬注射同种、异种转移因子后 20 d 内, CD4⁺ T 细胞持续增加; 同种转移因子促进试验犬外周血 CD4⁺ T 细胞上升的作用强于异种转移因子。

关键词:转移因子; 流式细胞术; 犬外周血; T 细胞亚群

中图分类号: S829.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2007)07-0056-04

T 淋巴细胞不仅作为效应细胞直接在抗感染中发挥清除靶细胞的作用, 还是调节机体免疫反应类型和免疫反应强度的关键细胞。研究结果表明, 人和动物外周血 T 细胞主要分为 CD4⁺ 亚群、CD8⁺ 亚群, 其表型均为 CD3⁺。CD4⁺ T 细胞亚群又称辅助细胞诱导亚群, 它使机体针对不同抗原的免疫应答反应朝着定向类型发展, 达到完全清除病原体的目的; CD8⁺ T 细胞亚群主要为细胞毒性 T 细胞亚群, 通过细胞毒作用, 清除体内的病毒感染细胞、细胞内寄生菌感染的细胞和肿瘤细胞。

正常机体内 CD4⁺ T 细胞数量高于 CD8⁺ T 细胞, 二者的比值保持在较为稳定的平衡状态。但不同物种的个体 CD4⁺ T 细胞与 CD8⁺ T 细胞比值(简称 CD4/CD8)也会不同(金扩世等, 2004)。机体被病原体感染、免疫调节剂等均会导致 CD4/CD8 比值发生变化(Ponce 等, 2003; Marcelo 等, 2002; Tipold 等, 2001)。CD4/CD8 比值降低通常意味着机体免疫功能下降, CD4/CD8 比值上升, 通常提示机体免疫功能升高。因此, 当前医学临床通过测定 CD4/CD8 的比值来评价临床治疗效果或者疾病的预后。

在动物免疫功能研究中, 关于犬 T 细胞亚群方面的研究报告很少, 且主要集中在关于犬 T 细胞亚群表面 CD4、CD8 和 CD3 分子的单抗研究方面, 而有

关转移因子(transfer factor, TF)对犬 T 细胞亚群影响的研究尚未见报道。本研究就 2 种 TF 对犬外周血 T 细胞亚群的影响进行了动态探讨, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 3~6 月龄健康杂种牧羊犬 24 头, 购于陕西杨凌某养犬场。

1.1.2 试剂 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司产品), 肝素(华美生物工程公司产品), RPMI1640 培养基(HyClone 公司产品), 犊牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司产品), 苕盼蓝(上海公私合营新中化学厂产品), FITC 标记的小鼠抗人 IgG1(COULTER 公司产品), FITC 标记的大鼠抗犬 IgG1(UsBiological 公司产品), FITC 标记的大鼠抗犬 IgG2(UsBiological 公司产品)。

1.1.3 溶液的配制 1640 培养液: 用三蒸水 1000 ml 溶解 1 袋 RPMI1640, 电磁搅拌至完全溶解, 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.2~7.4, 过滤除菌。不完全 1640 培养液: 按 RPMI1640 培养基上的配制说明配制。完全 1640 培养液: 在不完全 1640 培养液的基础上加 10% 灭活犊牛血清, 无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液(金伯泉等, 2002), 112 灭菌 15 min, 调 pH 至 7.2~7.4。

流式洗液: DPBS ×1 (900 ml), FCS (50 ml, 终浓度 5%), 4% NaN₃ (50 ml, 终浓度 0.2%)。DPBS (×10, 贮存液): NaCl (80 g), KCl (2 g), Na₂HPO₄ (11.5 g), KH₂PO₄ (2 g), 加蒸馏水至 1000 ml, 临用时用蒸馏水 1:10 稀释。固定液: DPBS ×1 (1000 ml), 葡萄糖 (20 g), 甲醛 (10 ml), NaN₃ (0.2 g, 终浓

收稿日期: 2006-12-11

作者简介: 孔庆波(1969-), 男, 辽宁人, 副教授, 博士, 主要从事犬病科研与教学工作。

通讯作者: 张彦明(1956-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学方面研究。

基金项目: 公安部科技局基金项目(20045829501)。

度 0.02%)。以上溶液均置 4℃ 保存备用。

绵羊血清用流式洗液稀释 20 倍,分装于青霉素小瓶中,每瓶 0.5 ml, - 20℃ 保存备用。

1.1.4 主要仪器设备 LD4-2A 型离心机(北京医用离心机厂制造), ELITE 型流式细胞仪(Coulter 公司产品), SX-18 型显微镜(江南公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将试验犬随机分成 2 组,1 组肌肉注射猪 TF,另 1 组肌肉注射犬 TF,每只犬 4 ml, 1 次/d,连续注射 3 d 后开始采集肝素抗凝血样。注射猪 TF 组分别于第 0、2、4、8、15 和 18 d 及注射犬 TF 组分别于第 0、2、3、7、9 和 18 d 从犬前肢头静脉处采抗凝血,用于测定 T 细胞亚群。2 组犬均在注射 TF 第 0、1、3、5、10 和 15 d 从犬前肢头静脉处采集抗凝血,用于计数淋巴细胞。

1.2.2 直接标记法测定 T 细胞亚群 采取犬静脉血约 3 ml,肝素抗凝。与等量无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液混匀后,小心叠加于等体积淋巴细胞分离液上, 2000 r/min 离心 20 min。吸取淋巴细胞,用流式洗液洗 1~2 次,每次 1000 r/min 离心 10 min。苔盼蓝染色计数,保证活细胞数 95% 以上。调节细胞数量,准确使用 200 μl 体积的流式洗液制成细胞悬液后细胞浓度为 5 × 10⁶/ml ~ 1 × 10⁷/ml。将细胞分装到 4 个已编号的离心管中,每管 50 μl。然后每管加入 10 μl 已制备的 1:20 稀释的绵羊血清,室温下作用 10 min,以封闭细胞表面的 Fc 受体。再向 1 号管中准确加入阴性对照单抗 10 μl,向 2 号、3 号、4 号管中分别准确加入抗 CD3、CD4、CD8 单克隆抗体各 10 μl,4 作用 30 min。作用完毕后用流式洗液洗 2 次,流式洗液用量每管 2 ml,离心 1000 r/min,每次 5 min。振荡细胞,使细胞在残留洗液中形成均匀的细胞悬液。每管加 300 μl 固定液固定。固定完成后进行流式细胞术检测。

1.2.3 淋巴细胞数测定 无菌采犬外周血,肝素抗凝。用等量的无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液稀释后,小心叠加于等体积的淋巴细胞分离液上,2000 r/min 离心 20 min,吸取淋巴细胞层。用无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液洗 3 次,每次 1000 r/min 离心 10 min。最后 1 次离心结束后,弃去上清,用无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液悬浮细胞。用与所采血等体积的含 10% 犊牛血清的完全 1640 培养液制成细胞悬液。取 0.1 ml 细胞,加 0.5 ml 完全 1640 培养液,再加 0.4 ml 1% 苔盼蓝(即使细胞稀释 10 倍)染色后计数。

淋巴细胞数 = 10(细胞稀释倍数) × 10⁴ × 4 个

大方格中的细胞数/4

2 结果

2.1 注射 TF 后犬的 T 细胞数测定结果 注射猪、犬 TF 后犬淋巴细胞的数量在检测时间内均明显升高,且呈持续升高的特点(表 1、图 1)。试验结果表明,猪和犬 TF 都有提高犬外周血淋巴细胞数量的作用。但猪 TF 提高犬外周血淋巴细胞数量的作用明显优于犬 TF。

表 1 注射猪或犬 TF 后犬外周血 T 淋巴细胞数量变化测定结果

不同种 TF	注射猪或犬 TF 后不同时间犬外周血 T 细胞数量变化(× 10 ⁶ 个/ml)					
	0 d	1 d	3 d	5 d	10 d	15 d
CS-TF	5	6	9.9	10	14	16
TF-P	10	12	13	14	16	18

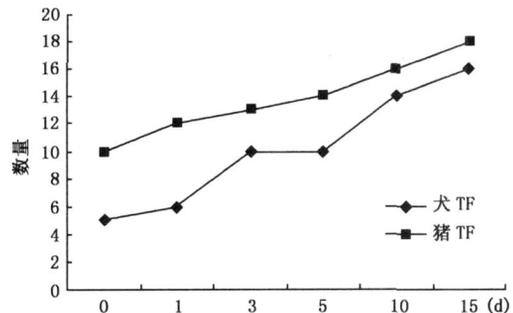


图 1 注射猪或犬 TF 后犬外周血 T 细胞数量变化测定结果

2.2 注射 TF 后犬的 T 细胞亚群测定结果

2.2.1 注射猪 TF 后犬的 T 细胞亚群变化测定结果 试验结果表明,异种 TF 能够使犬外周血 T 细胞数量在一定时间内持续升高,并且主要表现为 CD4⁺ T 细胞亚群数量的升高,CD8⁺ 亚群的 T 细胞受异种 TF 的影响不大(表 2、图 2)。CD4/CD8 比值在犬注射猪 TF 后的第 8 d 开始急剧升高,提示异种 TF 发挥作用所需要的时间可能较长(图 4)。

表 2 注射猪 TF 后 T 细胞亚群变化测定结果

T 细胞亚群	注射猪 TF 后不同时间 T 细胞亚群变化(%)					
	0 d	2 d	4 d	8 d	15 d	18 d
CD3	37.0	52.3	53.4	56.1	65.9	66.9
CD4	23.1	27.4	28.5	34.8	43.5	40.8
CD8	13.9	15.8	16.9	17.0	17.3	19.0
CD4/CD8	1.68	1.73	1.77	2.05	2.51	2.15

2.2.2 注射犬 TF 后犬的 T 细胞亚群变化测定结果 试验结果表明,同种 TF 对 T 细胞的影响方面具有和异种 TF 相类似的免疫学效应。所不同的是,同种 TF 在一定时间内能够引起更多的 CD4⁺ T 细胞到外周血中。另外,同种 TF 在促进 CD4⁺

T 细胞增殖方面作用更迅速,需要的时间更短(表 3、图 3)。CD4/ CD8 比值在犬注射同种 TF 后的第 2~7 d 持续升高(图 4)。据此认为,同种 TF 对 T 细胞的免疫学活性要优于异种 TF。

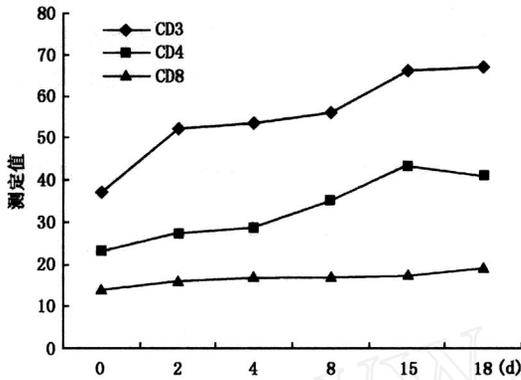


图 2 注射猪 TF 后 T 细胞亚群变化测定结果

表 3 注射犬 TF 后 T 细胞亚群变化测定结果

T 细胞亚群	注射犬 TF 后不同时间 T 细胞亚群变化 (%)					
	0 d	2 d	4 d	8 d	15 d	18 d
CD3	33.3	51.0	48.8	54.6	58.6	67.1
CD4	20.7	33.0	38.1	38.8	45.1	42.4
CD8	10.4	10.8	11.2	10.4	12.6	13.1
CD4/ CD8	1.99	3.06	3.40	3.73	3.58	3.24

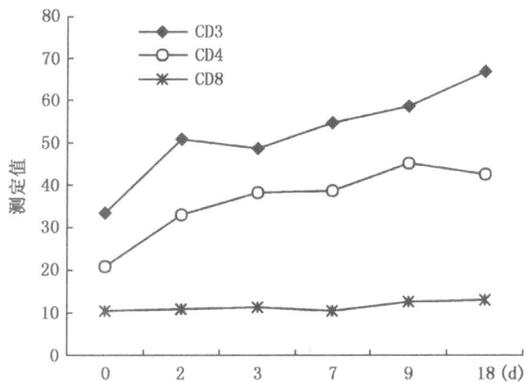


图 3 注射犬 TF 后 T 细胞亚群变化测定结果

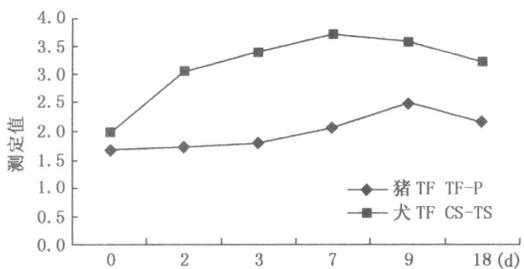


图 4 注射猪、犬 TF 后 CD4/ CD8 比值的测定结果

3 讨论

3.1 犬 T 细胞的多样性决定了 T 细胞的多效性 对 T 细胞多样性的认识,以及探讨影响 T 细胞多样

性的因素是人们了解机体免疫反应复杂性的基础。本试验中,犬注射 TF 后外周血淋巴细胞数量不断升高,结合同时期对 T 细胞、T 细胞亚群的检测结果,以及 TF 作用的特点分析,我们认为外周血淋巴细胞数量的变化主要由 T 细胞数量上升引起,在外周血增多的 T 细胞中,CD4 + T 细胞所占的增幅最大。

3.2 犬 CD4 + 亚群和 CD8 + 亚群以一定比例构成 T 细胞 Byrne 等(2000)认为正常成年犬的 CD4/ CD8 的比值为 1.87,这和本试验注射 TF 前测得的正常犬的 CD4/ CD8 比值结果很接近(注射猪 TF 的犬为 1.68,注射犬 TF 的犬为 1.99)。Martin 等(2001)、Greeley 等(1996)和 Toman 等(2002)认为不同品种犬的 CD4/ CD8 比值有一定差异,并且随动物年龄的增加而降低。由于机体处在多变的周围环境,因此在机体受到环境因子刺激后,外周血 T 细胞亚群也会发生变化,从而使机体免疫功能发生改变。周祥吉等(2003)研究结果发现,高温高湿组犬伤后 1 h 淋巴细胞 CD4 + 亚群表达水平短暂升高,随后下降,10 h 后明显降低;CD8 + 亚群 4 h 后表达水平显著增高,相应导致 CD4/ CD8 比值 8 h 后持续降低,它反映了枪伤导致机体免疫功能先升高,然后逐步下降的过程。热习服能够增加犬 CD4 + 的表达值,抑制 CD8 + 大量表达,表明热习服能减轻这些不利因素造成的损害,提高机体耐受力。本试验结果发现,TF 同样能造成犬外周血 T 细胞 CD4 + 亚群和 CD8 + 亚群数量以及 2 个亚群数量比值的变化,并且这种变化是朝着有利于改善犬免疫功能的方面发展。

3.3 TF 作为免疫增强剂给予供试犬后对 T 细胞亚群的影响 在本研究中,无论注射猪还是犬 TF,均会导致犬血液中 T 细胞 CD4/ CD8 比值升高,并且同种 TF 对 CD4/ CD8 比值的影响明显强于异种 TF。这一结果说明同种 TF 的作用优于异种 TF,并且 TF 的作用可以打破物种之间的界限,这和 TF 在其他动物该方面研究所获得的结果相一致(苏铭等,2004;倪金平,2002)。CD4 + T 细胞在机体免疫反应中主要发挥免疫调节作用,通过其免疫调控作用使机体免疫反应保持在适当水平,达到清除病原体维护自身稳定的作用。TF 在犬临床传染病应用中显示,TF 能充分增强犬抗病原体感染的作用。结合本试验结果认为,TF 对机体免疫功能的免疫增强作用,主要是通过调节血液中辅助性 CD4 + T 细胞数量和 T 细胞 CD4/ CD8 比值来实现全面调节犬免疫系统功能的作用。

3.4 供试犬注射 TF 后外周血中 T 细胞数量呈现持续升高 TF 引发外周血中 T 细胞数量呈现持续升高的现象是通过何种机制实现的呢? TF 究竟是加快了中枢免疫器官中 T 细胞的成熟速度,还是加速了外周免疫器官中 T 细胞的分化增殖能力?根据 TF 具有促进外周血成熟 T 细胞增殖效应的研究结果,推测至少在短期内 TF 是通过促进外周血 T 细胞增殖这一途径来发挥作用的。

3.5 TF 主要促进 CD4 + T 细胞亚群增殖,而对 CD8 + 亚群影响不大的原因分析 现代免疫学已经取得的研究结果表明,MHC-_I、MHC-_{II} 类分子是影响成熟 T 细胞不同亚群增殖分化的主要因素,其中 MHC-_I 类分子只表达在树突状细胞、巨嗜细胞和 B 细胞这类专职性抗原递呈细胞表面,并且其表达为调节性表达。任何能够促进 MHC-_I 类分子在细胞表面表达的因素都有利于 CD4 + T 细胞亚群的分化增殖和转化为效应 T 细胞。TF 是否也是经该途径发挥作用有待进一步的研究。

4 小结

本研究首次发现同种和异种 TF 都能提高犬外周血淋巴细胞数量,而且通过对 CD4/CD8 比值变化分析证实,外周血增加的淋巴细胞中主要为 CD4 + T 细胞。首次发现犬注射同种或异种 TF 后,在 20 d 内 CD4 + T 细胞呈现持续增加的规律。

证明同种 TF 促进犬外周血 CD4 + T 细胞上升的作用优于异种 TF。

参 考 文 献

1 苏铭,姜士兴,杨志刚. 转移因子对复发性生殖器疱疹患者 T 细

胞亚群改变的调节效应[J]. 河北医学, 2004, 10(7): 582 ~ 585.

- 2 周祥吉,裴国献,魏宽海,等. 高温高湿环境下犬肢体火器伤后细胞免疫学变化[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(4): 297 ~ 299.
- 3 金扩世,夏志平,金宁一,等. 免疫增强 TMFN 剂对犬外周血 CD4/CD8 比值的影响[J]. 动物医学进展, 2004, 25(4): 96 ~ 97.
- 4 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术(第一版)[M]. 西安:第四军医大学出版社, 2002.
- 5 倪金平. 转移因子对复感患儿 T 细胞亚群的影响[J]. 济宁医学院学报, 2002, 25(2): 53 ~ 54.
- 6 Byrne K M. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 73: 167 ~ 182.
- 7 Greeley E H. The influence of age on the canine immune system [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 55: 1 ~ 10.
- 8 Marcelo V, Caliani, MartadeLanaRosangela A F C, et al. Immunohisto-chemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy[J]. Virchows Arch, 2002, 441: 69 ~ 76.
- 9 Martin F, Lenka L. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs a flow cytometric study[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2001, 82: 23 ~ 27.
- 10 Ponce F, Magnol J P, Blavier A, et al. Clinical morphological and immunological study of 13 cases of canine lymphoblastic lymphoma: comparison with the human entity [J]. Comp Clin Pathol, 2003, 12: 75 ~ 83.
- 11 Tipold A, Vandeveld M, Wittek R. Partial protection and intrathecal invasion of CD8 + T cell in acute canine distemper virus infection[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 83(3): 189 ~ 203.
- 12 Toman M, Faldyna M, Knotigova P, et al. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 87(3 ~ 4): 321 ~ 326.

Effects of Two Transfer Factors on T-Lymphocytic Subgroups in Canine Peripheral Blood

KONG Qing-bo^{1,3}, CHEN Jir-jun², CHEN De-kun³, ZHANG Yan-ming³

(1. Dept of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China;

2. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The requisite swine transfer factor (TF) and canine TF were prepared by relative standards, respectively and were muscularly injected to a range of hybrid shepherd dogs to determine the changes of T-lymphocytic subgroups in different time by flow cytometry. The results were as follows: With regard to enhancement of the number of lymphocyte in canine peripheral blood of homogeneous TF or heterogeneous TF, the increased were mainly CD4 + T-cells, according to the analysis of the ratio of CD4/CD8. CD4 + T-cells had increased for 20 days since the employed dogs were injected with homogeneous TF or heterogeneous TF, respectively. And the enhance effect of homogeneous TF was better than that of heterogeneous TF.

Key words: transfer factor; flow cytometry; canine peripheral blood; T-lymphocytic subgroup

千里光抗菌有效部位化学成分及其急性毒性研究

李 华¹, 聂芳红², 陈进东³, 何盛昱³, 于增杰¹, 林红英¹, 陈进军¹

(1. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院; 3. 宁夏煤炭石嘴山中心医院)

摘要: 用 60%乙醇作溶剂制备千里光抗菌有效部位冻干粉(即千里光 60%乙醇提取物), 分析其化学成分, 并用改良寇氏法测定其对小鼠腹腔注射的急性半数致死量(LD₅₀)。结果发现, 千里光 60%乙醇提取物含有生物碱、黄酮类化合物, 但不含双稠吡咯啉生物碱; 测得千里光 60%乙醇提取物对小鼠腹腔注射的 LD₅₀为 2 206 mg/kg, 95%可信限为 1 867 - 2 607 mg/kg。表明千里光 60%乙醇提取物属低毒性物质, 并可保留千里光的有效成分生物碱和黄酮类化合物而排除其中的双稠吡咯啉生物碱, 进一步提高了千里光的安全性。

关键词: 千里光提取物; 化学成分; 半数致死量; 小鼠

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354(2008)01 - 0007 - 03

千里光又名千里及、眼明草、九里明、千里明等, 为菊科植物千里光(*Senecio scandens* Buch - Ham.)的地上部分或全草, 生于山坡、路旁, 广泛分布于广东及全国各地。千里光具有清热解毒、杀虫、明目等功效, 是一种临床疗效显著、毒副作用小的广谱抗菌中草药^[1-3]。千里光 60%乙醇提取物为千里光抗菌有效部位^[4], 但对该抗菌有效部位的化学成分分析和急性毒性研究尚未见报道。本研究以千里光全草植物化学预试为基础, 制备千里光抗菌有效部位即千里光 60%乙醇提取物并分析其化学成分, 测定其对小鼠的急性半数致死量, 为丰富千里光抗菌有效部位的药效学和毒理学资料提供试验依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2007 - 08 - 15

基金项目: 广东省科技攻关计划重点引导项目(2004B20201007); 湛江科技攻关计划项目(湛科[2006]94号)

作者简介: 李华(1980 -), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 高效无公害饲料。陈进军教授为通讯作者, E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

1.1 千里光

于 2007年 5月采自广东省湛江市郊区, 经广东海洋大学农业生物研究所鉴定为菊科千里光属多年生草本植物千里光(*Senecio scandens* Buch - Ham.)。将千里光全草阴干, 粉碎, 储藏于阴凉干燥处备用。

1.2 试剂与仪器

碘化钾、碘化汞钾、硅钨酸、苦味酸、3, 5 - 二硝基苯甲酸、磷钼酸、醋酸镁、三氯化铁、白明胶、茛三酮、硝酸银、镁粉、层析用硅胶 G等, 均为国产分析纯试剂。Ehrlich试剂: 将 0.5 g对 - 二甲氨基苯甲醛溶解在 25 mL含 0.35 mL高氯酸的无水乙醇中(新鲜配制)。KQ - 100B型超声波机(昆山市超声仪器有限公司), LG - WD700(MG - 5061T)型微波炉(天津乐金电子电器有限公司), RE - 52C型旋转蒸发器(义乌市英峪予华仪器厂), BENCHTOP型冷冻干燥机(德国 Virtis公司), WFH - 203型三用紫外分析仪(温州市孚华分析仪器厂)。

1.3 动物及其饲养管理

普通级昆明系小鼠, 体重 18 - 22 g, 雌雄兼用, 由广东医

[10] 廖娟, 杜青, 张英. 吡喹酮美辛生物黏附微囊药物动力学及体内相关性研究[J]. 河北医科大学学报, 2005, 26(1): 33 - 35.

[11] Lundberg B B. A submicron lipid emulsion coated with amphipathic polyethylene glycol for parenteral administration of paclitaxel (taxol) [J]. Int J Pharm, 1997, 49(1): 16 - 21.

Study on the pharmacokinetics of avermectins microcapsule in rabbits

YIJin - e, YUAN Hui, TU Di

(College of Animal Medicine, HNAU, Changsha Hunan 410128, China)

Abstract: The experiment was conducted in 10 healthy rabbits to investigate the pharmacokinetics of avermectins microcapsules. Avermectins microcapsules suspensions were given to the rabbits subcutaneously at the dose of 1.0 mg/kg, avermectins injection (0.2 mg/kg, s.c.) was given in the experiment for comparison. Then plasma concentrations of avermectin were determined by HPLC with UV detection at 245 nm. Pharmacokinetic parameters were calculated by 3P87 program using the obtained data. The results were as follows: Avermectins microcapsule injection: $t_{1/2k}$ = 21.72 h; $t_{1/2}$ = 56.65 h; $t_{1/2}$ = 239.43 h; t_{max} = 63.06 h; C_{max} = 34.30 ng/mL; AUC = 11 573.88 ng/mL · h. Avermectins injection: $t_{1/2k}$ = 7.38 h; $t_{1/2}$ = 14.59 h; $t_{1/2}$ = 32.84 h; t_{max} = 19.78 h; C_{max} = 20.88 ng/mL; AUC = 1 482.03 ng/mL · h. It is concluded that avermectins give a slow absorption and elimination, long half - life and high bioavailability after it was made into microcapsule.

Key words: avermectins; microcapsule; pharmacokinetics; rabbits

学院试验动物中心提供(合格证号:粤监 2007A029)。雌雄分笼饲养,室温 24 - 28 ℃,相对湿度 60% ~ 80%,每日光照 12 h,无对流风。饲料为广东医学院实验动物中心提供的小鼠全价颗粒料,自由采食、饮水,每天更换 1 次饮水,隔天更换 1 次垫料。饲养观察 1 周后用于试验。

1.4 千里光全草植物化学预试

将千里光全草粉末过 20 目筛,按文献^[3,4]所述方法,制备预试液,采用试管分顶提取预试法和圆形纸层析预试法进行。

1.5 千里光 60%乙醇提取物的制备

取过 20 目筛的千里光全草粉末 250 g,装入烧瓶,按 10 倍量加入体积分数 60%乙醇,浸泡 24 h 后超声处理 20 min,再按 100 mL/30 s 进行微波处理,过滤,得滤液。在残渣中加入 8 倍量的体积分数 60%乙醇,按前述方法重复处理 1 次。合并 2 次滤液,旋转蒸发,浓缩至不含乙醇。浓缩液用乙醚萃取 3 次,取下层液体,置于 4 ℃冰箱 12 h 后,乘冷过滤,滤液用洁净的青霉素瓶按每瓶 2 mL 分装,冷冻干燥成粉末,即得千里光 60%乙醇提取物冻干粉。用重量法计算提取率。

1.6 千里光 60%乙醇提取物中主要成分检测

千里光 60%乙醇提取物中生物碱检查采用试管法,进行碘化碘钾反应、苦味酸反应和硅钨酸反应^[1]。黄酮类化合物采用圆形纸层析法,以 1%三氯化铝溶液喷洒,在紫外灯下观察,如果出现黄绿色荧光条带,则为黄酮类化合物阳性^[4]。

千里光 60%乙醇提取物中双稠吡咯啉生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PA s)的检测采用薄板层析法进行。用适量甲醇将少量千里光 60%乙醇提取物溶解、点样,展开剂为氯仿-甲醇-氨水(85:14:2),用 Ehrlich 试剂喷雾显色,观察。如有淡紫色或紫褐色斑点,则为 PA s 阳性^[1]。

1.7 千里光 60%乙醇提取物的急性毒性试验

1.7.1 预试验 将供试小鼠分为 5 组,每组 4 只,雌雄兼用,以粗筛所得 16 590 mg/kg 为最高剂量,腹腔注射千里光 60%乙醇提取物,剂量组比为 3:1(表 1)。连续观察 7 d,确定零致死剂量(Dn)和最高致死剂量(Dm)^[5]。

1.7.2 正式试验 将供试小鼠分为 6 组,每组 10 只,雌雄兼用。按表 1 于早晨 8:30 腹腔注射给予千里光 60%乙醇提取物,给药体积为 0.2 mL/10 g 体重。给药后观察 4 h,以后每天上、下午各 1 次,观察 7 d,记录供试小鼠临床表现,并按表 2 记录各组小鼠的死亡数和死亡率,按改良寇氏法求出急性 LD₅₀及其 95%可信限^[5]。

2 结果

2.1 千里光全草化学成分预试结果

采用试管分顶提取预试法和圆形纸层析预试法进行千里光全草化学成分预试,其结果显示,千里光全草含有生物碱、黄酮类物质和酚性成分、强心甙、鞣质、氨基酸等,不含氰甙、皂甙、多肽与蛋白质、萜醌类。

2.2 千里光 60%乙醇提取物得率

千里光 60%乙醇提取物冻干粉重 36.58 g,提取率为 14.63%。

2.3 千里光 60%乙醇提取物中主要成分检测结果

试管法检查总生物碱发现,碘化碘钾反应阳性(+),苦

味酸反应阴性(-),硅钨酸反应阳性(+),结果为生物碱阳性。在紫外灯下观察,出现明显的黄绿色荧光条带,说明含有黄酮类化合物。经薄板层析法检查,未出现淡紫色或紫褐色斑点,即在千里光 60%乙醇提取物中未检出 PA s。

2.4 千里光 60%乙醇提取物的急性毒性试验结果

2.4.1 供试小鼠的临床表现 各剂量组供试小鼠给予千里光 60%乙醇提取物后不久出现程度不同的活动减少或倦卧不动,少数兴奋不安,以后表现基本正常。部分小鼠死前抽搐、麻痹或共济失调,少数有眼球突出和扭体,浅表血管充血、皮肤紫绀,小鼠睾丸色泽暗。

2.4.2 急性 LD₅₀预试结果 由表 1 可知,Dn 为 614 mg/kg, Dm 为 5 530 mg/kg。在 Dn 和 Dm 范围内将正式试验确定为 6 个剂量组,组间比为 1:0.65,由高剂量依次递减 5 530 mg/kg, 3 568 mg/kg, 2 302 mg/kg, 1 485 mg/kg, 958 mg/kg 和 618 mg/kg, 作为 LD₅₀正式试验的剂量,结果见表 2。

表 1 千里光 60%乙醇提取物急性 LD₅₀预试方法和结果

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	动物数 /只	死亡数 /只
1	205	4	0
2	614	4	0
3	1 843	4	2
4	5 530	4	4
5	16 590	4	4

表 2 千里光 60%乙醇提取物的急性 LD₅₀正式试验结果

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	剂量对数 (X)	动物数 /只	死亡数 /只	P	P ²
1	618	2.79	10	0	0.0	0.00
2	958	2.98	10	0	0.0	0.00
3	1 485	3.17	10	1	0.1	0.01
4	2 302	3.36	10	5	0.5	0.25
5	3 568	3.55	10	10	1.0	1.00
6	5 530	3.74	10	10	1.0	1.00

根据表 2 数据,求得 LD₅₀为 2 206 mg/kg, LD₅₀的 95%可信限为 1 867 - 2 607 mg/kg。

3 讨论

3.1 千里光的有效成分

植物化学成分预试结果表明,千里光全草含有生物碱、酚性成分、黄酮类物质、强心甙、鞣质、氨基酸等物质,不含氰甙、皂甙、多肽与蛋白质、萜醌类。据报道,黄酮类化合物是千里光的有效成分,生物碱可能也是其有效成分之一^[4]。本研究中生物碱、黄酮类化合物等主要化学成分的预试结果与文献报道^[3,4]一致,为判定生物碱和黄酮类物质为千里光的主要有效成分提供了证据。

3.2 千里光 60%乙醇提取物主要化学成分分析

黄酮类物质和生物碱为千里光的主要有效成分。黄酮类物质的适宜乙醇提取体积分数为 60% ~ 70%, pH 值为 8; 生物碱适宜的乙醇提取体积分数为 95%, pH 值为 3 - 5^[6]。据此,本研究利用 60%乙醇作为溶剂,制备千里光抗菌有效部位,千里光 60%乙醇提取物的提取率达 14.63%。采用经典方法对千里光 60%乙醇提取物中黄酮类物质和生物碱进行检测,发现在提取过程的几个关键环节中,黄酮类物质和生物碱的检测结果越来越明显。

人参总皂苷及其衍生物对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响

郭志廷¹, 韦旭斌², 梁剑平¹, 刘宇¹, 罗晓琴¹

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 农业部新兽药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050; 2. 吉林大学畜牧兽医学院)

摘要: 探讨人参总皂苷及其衍生物对小鼠腹腔巨噬细胞免疫活性的影响。采用中性红试验和 MTT法分别测定总皂苷及其衍生物对巨噬细胞吞噬中性红作用及其代谢功能的影响。结果显示, 总皂苷及其衍生物浓度在试验范围内对小鼠巨噬细胞吞噬中性红及其代谢功能均有不同程度的促进作用, 而衍生物的促进作用更强, 且对巨噬细胞的细胞毒性明显降低。提示衍生物对巨噬细胞的免疫活性优于总皂苷。

关键词: 人参总皂苷; 衍生物; 巨噬细胞; 分子修饰

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354(2008)01 - 0009 - 03

人参皂苷是人参主要的有效成分之一, 大量研究表明,

其具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、延缓衰老、美容和提高机体免疫力等功效^[1,2]。纵观国内外文献, 几乎所有对人参皂苷的研究均停留在原药的基础上, 对于其分子结构的化学修饰及修饰前后的生物学活性有何变化报道甚少。为了获得生物学活性更强、毒性更低的皂苷类衍生物, 笔者等对人参总皂苷进行了硫酸化修饰。前期试验证实, 人参总皂苷及其衍

收稿日期: 2007 - 10 - 12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471272)

作者简介: 郭志廷 (1979 -), 男, 硕士研究生, 主要从事临床兽医中药研究。

此外, 有些 PA_s是有毒生物碱^[7]。本研究采用对 PA_s检测特异性强的 Ehrlich试剂, 利用薄板层析法对千里光 60%乙醇提取物中 PA_s进行了检测 (该法对 PA_s检测的灵敏度为 0.5 μg^[8]), 结果发现, 千里光 60%乙醇提取物中含有生物碱, 但未检出 PA_s, 可见进行千里光 60%乙醇提取物的精制, 可以排除千里光中的 PA_s。

3.3 千里光 60%乙醇提取物的急性毒性评价

根据世界卫生组织化合物急性毒性分级, 以小鼠为试验动物, LD₅₀在 501 - 5 000 mg/kg之间的化学物属于低毒物质。本研究测得千里光 60%乙醇提取物对小鼠腹腔注射的 LD₅₀为 2 206 mg/kg, 加之千里光 60%乙醇提取物中未检出 PA_s, 可见千里光 60%乙醇提取物属低毒物质, 并可以排除千里光中的 PA_s, 进一步提高千里光的安全性。

参考文献:

- [1] 浙江省千里光协作组. 千里光抗菌作用的实验研究和临床疗效观察 [J]. 中华医学杂志, 1973(10): 55 - 59.

- [2] 许振. 植物药剂对主要病菌药效比较观察 [J]. 农报, 1947, 1(6): 17.

- [3] 陈进军, 王建华, 耿果霞, 等. 千里光的化学成分鉴定及体外抗菌试验 [J]. 动物医学进展, 1999, 20(4): 35 - 37.

- [4] 徐晓彬, 林红英, 冯羽裳, 等. 千里光植物化学预试及抗菌有效部位化学成分检查 [J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(3): 10 - 13.

- [5] 孙敬方. 动物实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 359 - 363.

- [6] 陈进军, 王建华, 周景明. 改良千里光注射液的体内外抗菌作用及安全性 [J]. 中国兽医学报, 2002, 21(6): 608 - 609.

- [7] 吴斌, 吴立军. 千里光属植物的化学成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2003(2): 97 - 100.

- [8] Molyneux R J, Gardner D R, James L F, et al. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 967: 57 - 74.

Analysis on the chemical compositions of antibacterial extract from *Senecio scandens* Buch - Ham. and tests on its acute toxicity

LI Hua, YU Zeng - jie, LIN Hong - ying, CHEN Jin - jun

(Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088, China)

Abstract: The freeze - dried powder of antibacterial extract from *Senecio scandens* Buch - Ham. was prepared using 60% alcohol as the solvent. The main chemical compositions of the extract was analyzed, and the acute medium lethal dose (LD₅₀) intraperitoneally injected to mice of the extract was conducted with the modified Kaber's method. The results showed that the extract contained alkaloids and flavones but not pyrrolizidine alkaloids (PA_s), and that the LD₅₀ of the extract intraperitoneally injected to mice was 2 206 mg/kg, with the 95% confidence limit of 1 867 - 2 607 mg/kg. It was indicated that the extract was in lower toxicity and contained effective parts of alkaloids and flavones but got rid of PA_s from *S. scandens*, which enhanced the herb's safety.

Key words: Extract from *Senecio scandens* Buch - Ham.; chemical composition; medium lethal dose; mouse

千里光提取物的小鼠骨髓微核试验

陈进军,于增杰,林红英,徐晓彬

(广东海洋大学农业生物技术研究所,广东湛江 524088)

摘要: 制备了千里光 70%乙醇提取物冻干粉,用昆明种雌雄性小鼠进行了该提取物的微核试验。结果发现,在雌性小鼠,中、高剂量的千里光 70%乙醇提取物能够引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高,而低剂量(130.9 mg/kg)千里光 70%乙醇提取物不能引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高;在雄性小鼠,高剂量(1309.0 mg/kg)千里光 70%乙醇提取物能够引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高,而低、中剂量的千里光 70%乙醇提取物不能引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高;而且小鼠骨髓细胞微核发生率与千里光 70%乙醇提取物具有剂量依赖性。说明千里光 70%乙醇提取物仅在较高剂量时能够对小白鼠产生致突变作用。

关键词: 千里光提取物;微核试验;致突变作用;小鼠

中图分类号: S853.75

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2007)01-0020-03

20

调查研究

千里光 (*Senecio scandens* Buch - Ham.) 系多年生蔓性草本植物,为菊科 (*Compositae*) 千里光属植物,在我国广泛分布于陕西、江苏、浙江、安徽、江西、湖南、四川、贵州、云南、广东和广西等地,各地多自产自销。千里光在我国作为中草药应用始载于唐代《本草拾遗》,异名有千里及、九里光、九里明和一扫光等数十个。1977年版《中国药典》(一部)和《贵州省中药材质量标准》(1988年版)记载了千里光的功效:“清热解毒,明目,止痒。用于风热感冒,目赤肿痛,泄泻痢疾,皮肤湿疹,疥疮”。《中药大辞典》也将千里光收入其中,其功能主治为:“清热,解毒,杀虫,明目。治各种急性炎症性疾病,风火赤眼,目翳,伤寒,菌痢等”^[1]。

关于千里光的毒性,很早就有记载,《本草拾遗》称其:“味苦,平,小毒”。而《本草图经》云:“味苦甘,寒,无毒”。由此可见,历史上对其毒性的认识不一。现代研究发现,千里光全草含有大量毛茛萘(flavoxanthin)、菊黄素(chrysanthemaxanthin)及少量β-胡萝卜素;还含生物碱、挥发油、黄酮苷、鞣质、酚类^[2]。据英国 MHRA 称,千里光属的各类植物均含有不饱和吡咯里西啶类生物碱(pyrolizidine alkaloids, PA s),对肝脏造成严重损害,引起人类肝小静脉闭塞症。不饱和吡咯里西啶类生物碱对动物也显现致癌性,诱导有机体突变和生殖毒性^[3]。陈进军等利用 TLC法,用 PA s特异性强的 Ehrlich试剂对千里光全草及其抗菌有效部位(即 70%乙醇提取物)中 PA s进行检测发现,千里光全草含有生物碱和 PA s。进一步对千里光抗菌有效部位中总生物碱和 PA s进行研究,结果未检出 PA s。可见进行千里光抗菌有效部位筛选和精制,可以清除其中的 PA s,提高千里光抗菌有效部位的安全性^[4]。但是千里光 70%提取物是否具有致突变性,

尚未见报道。笔者等采用小鼠骨髓微核试验^[5],研究了千里光 70%乙醇提取物的致突变作用,以丰富千里光抗菌有效部位的毒理学资料。

1 材料与与方法

1.1 千里光及其 70%乙醇提取物的制备

千里光于 8 月份采于广东省湛江市麻章区,由广东海洋大学农业生物技术研究所鉴定。将千里光阴干、粉碎后,过 20 目筛,称取 50 g,用 70%乙醇 500 ml 浸泡过夜,超声波萃取 1 h,85℃ 水浴回流 2 h,过滤,将滤液热浓缩至 50 ml,用乙醚萃取 3 次脱色素等杂质,分装于干净的青霉素瓶中,冷冻干燥成粉末,用石蜡封口后 4℃ 保存备用。

1.2 试验动物

昆明种小白鼠 100 只,雌雄兼有,体重(25 ± 2) g,购于广西医科大学实验动物中心,合格证号:桂 SCX - 2003,饲养观察 1 周后用于试验。试验动物的饲养环境温度控制在 25 - 28℃,湿度为 60% - 80%,室内无对流风,饲料为广东医学院实验动物中心提供的小鼠全价颗粒料,自由采食、饮水,每天更换饮水 1 次,隔天更换 1 次垫料。

1.3 试验器材

冷冻干燥机(德国 Virtis 公司,型号: BENCHTOP),旋转蒸发器(上海沪西仪器厂,型号 RE - 52),超声波振荡仪(宁波新芝仪器研究所,型号: SB - 5200),PHS - 3C 型数字酸度计(杭州梵隆仪器有限公司,型号: PHS - 3C),高压蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,型号: YXQ - SG46 - 280S),带油镜头显微镜,细胞计数器。

1.4 试剂

乙醇(分析醇),甲醇(分析纯),甘油(分析纯),小牛血清(长春宝泰克生物制剂公司),环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司产品),生理盐水。吉姆萨储备液,取吉姆萨染料 1 g,甘油 66 ml,甲醇 60 ml。先将染料置于研钵内,加入少量甘油混合研细,再分次加入剩余的甘油继续研磨,然后转移置烧杯内,加入少量甘油混合研细,于 60

收稿日期: 2006 - 09 - 20

基金项目: 广东省科技攻关计划重点引导项目(2004B20201007); 广东省湛江市科技攻关计划项目(湛科[2006]65号)

作者简介: 陈进军(1967 -),男,博士,副教授,硕士研究生导师,国家公派加拿大 Guelph 大学访问学者,主要从事植物药药理学和毒理学研究。E - mail: jjchen777@yahoo.com.cn

静置 2 h,冷却后加入甲醇,混和静置 2周,过滤于棕色瓶内,存放于阴凉处。临用时用 pH 6.4的磷酸盐缓冲液配成 10%的应用液。

1.5 试验方法

将昆明种小白鼠 50只,随机分为 5组,每组 10只,雌雄各半。组为阴性对照组,、组分别给予不同剂量的千里光 70%乙醇提取物,组为阳性对照组。其中阴性对照组给予生理盐水(SW),阳性对照组给予环磷酰胺(cyclophosphamide, CP) 40 mg/kg,千里光 70%乙醇提取物的 3个剂量分别为 1/3 LD₅₀、1/10 LD₅₀和 1/30 LD₅₀(已测得千里光 70%乙醇提取物的 LD₅₀为 3 927 mg/kg),腹腔注射,连续 2次,间隔 24 h。在第 2次给予供试物后 6 h,将各组小鼠脱颈椎处死,分别取其两侧股骨制骨髓涂片,将干燥的涂片置于甲醇液中固定 5-10 min,取出晾干,固定好的涂片用 1 10吉姆萨-磷酸盐缓冲液(pH 6.4)染色 20 min,染色后的涂片放入二甲苯中透明 6 min,取出后立即滴加中性树胶,覆以盖玻片后平置,采用双盲法阅片。每张盖玻片计数 1 000个嗜多染红细胞(polychromatic Erythrocyte, PCE),并计数含微核的嗜多染红细胞数,微核率按下式计算,并以千分率表示:

嗜多染红细胞微核率(‰) = (含微核的嗜多染红细胞数 / 嗜多染红细胞总数) × 1 000

用 t检验比较各组供试小鼠微核率的差异^[5-7]。

2 结果

各剂量组药物对小鼠微核率的影响结果见表 1。

表 1 千里光 70%提取物对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

组别	剂量 /mg kg ⁻¹	动物数 /只		PCE数 /个		微核数 /个		微核率 /‰	
		雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
SW		5	5	5 000	5 000	28	23	5.6 ± 0.8 ^C	4.6 ± 0.5 ^B
130.9	5	5	5	5 000	5 000	32	34	6.4 ± 0.8 ^{aC}	6.8 ± 0.3 ^{aB}
392.7	5	5	5	5 000	5 000	84	38	16.8 ± 3.2 ^{ba}	7.6 ± 0.9 ^{aA}
1 309.0	5	5	5	5 000	5 000	95	82	19.0 ± 4.6 ^{ba}	16.4 ± 3.1 ^{aA}
40(CP)	5	5	5	5 000	5 000	109	68	21.8 ± 5.8 ^c	13.6 ± 2.8 ^b

注: a、b和 c分别表示供试提取物不同剂量组与阴性对照组比较,差异不显著(P > 0.05),差异显著(0.01 < P < 0.05)和差异极显著(P < 0.01); A、B和 C分别表示供试提取物不同剂量组与阳性对照组比较,差异不显著(P > 0.05),差异显著(0.01 < P < 0.05)和差异极显著(P < 0.01)。

由表 1可知,阳性对照物(第 组)小鼠的骨髓嗜多染红细胞微核率最高,阴性对照物(第 组)最低。在雌性小鼠试验中,第 组分别与阴性对照组(第 组)和千里光 70%乙醇提取物低剂量组(第 组)相比较,小鼠骨髓细胞微核率差异均极显著(P < 0.01, P < 0.01);第 组和第 组小鼠骨髓细胞微核率分别和第 组比较,均差异显著(0.01 < P < 0.05),分别

为第 组的 3.0倍和 3.4倍;第 组小鼠骨髓细胞微核率与第 组相比,差异不显著(P > 0.05)。在雄性小鼠试验中,第 组分别与第 组和第 组相比较,小鼠骨髓细胞微核率均差异显著(0.01 < P < 0.05, 0.01 < P < 0.05);第 组与第 组相比,小鼠骨髓细胞微核率差异极显著(P < 0.01),是第 组的 3.6倍;但第 组和第 组分别与第 组相比,小鼠骨髓细胞微核率差异不显著(P > 0.05, P > 0.05)。

综上所述,在雌性小鼠,中、高剂量的千里光 70%乙醇提取物能够引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高,而低剂量(130.9 mg/kg)则不能引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高;在雄性小鼠,高剂量(1 309.0 mg/kg)千里光 70%乙醇提取物能够引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高,而低、中剂量则不能引起小鼠骨髓细胞微核发生率升高;而且小鼠骨髓细胞微核发生率对千里光 70%乙醇提取物具有剂量依赖性。

3 讨论

本研究采用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验,对千里光 70%乙醇提取物的致突变作用进行了评价。研究结果表明,在雌雄兼有小白鼠,1 309.0 mg/kg的千里光 70%乙醇提取物能够引起小鼠骨髓细胞微核率显著升高,130.9 mg/kg的千里光 70%乙醇提取物不能引起小鼠骨髓细胞微核率升高。而 392.7 mg/kg的千里光 70%乙醇提取物能够引起雌性小鼠骨髓细胞微核率升高,但不能使雄性小鼠骨髓细胞微核率升高。因此可以说,130.9 mg/kg及其以下剂量的千里光 70%乙醇提取物不能引起小鼠骨髓细胞微核率升高,不具有致突变作用。而 392.7 mg/kg的千里光 70%乙醇提取物对雌性小鼠具有致突变作用,但对雄性小鼠却无致突变作用。

参考文献:

- [1] 程刚,夏东胜,李馨龄,等. 千里光的安全性研究现状及其对策探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(7): 569-571, 606
- [2] 陈进军,王建华,耿果霞,等. 千里光化学成分鉴定及体外抗菌试验[J]. 动物医学进展, 1999, 20(4): 35-37.
- [3] 梁爱华,叶祖光. 千里光属植物的毒性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 93-97.
- [4] 徐晓彬,林红英,冯羽裳,等. 千里光植物化学预试及抗菌有效部位化学成分检查[J]. 中兽医医药杂志, 2006, (6): 49-52.
- [5] 曹佳,林真,余争平. 微核试验原理方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京:医学科学出版社, 2000, 56-64.
- [6] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京:中国农业出版社, 2002, 227-234.
- [7] 俞渭江. 生物统计附实验设计[M]. 北京:农业出版社, 1980, 29-80.

Bone - marrow micronucleus test of extract from *Senecio scandens* Buch - Ham. in mice

CHEN Jin - jun, YU Zeng - jie, LN Hong - ying, XU Xiao - bin

(Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088, China)

Abstract: Frozen - vacuum - dried powder of extract from *Senecio scandens* Buch - Ham. with 70% of ethanol solution was prepared and a range of female and male Kunming mice were employed to conduct the bone - marrow micronucleus test. It was found that extract from *S. scandens* Buch - Ham. could increase the micronucleus rate in the female mice at both medium and high doses, but had no effect at low dose (130.9 mg/kg); that the extract could increase the micronucleus rate in male mice at high dose (1309.0 mg/kg), but had no effect at both low and medium doses, and that the micronucleus rate relied on the dose of the extract. Those results indicated that only higher dose of the extract from *S. scandens* can cause mutation in mice.

Key words: Extract from *Senecio scandens* Buch - ham.; bone - marrow micronucleus test; mutation; mice

临 · 床 · 集 · 锦

止嗽汤加减治疗家畜外感久咳

外感久咳为临床常见病症,多由上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎等引起。近年来,笔者自拟止嗽汤治疗家畜外感久咳 50例,治愈 45例,好转 3例,总有效率为 96%。疗效满意,报道如下。

1 症状

临床表现为咳嗽迁延不止,干性或湿性咳嗽,听诊两肺呼吸音粗厉,或伴有散在的干、湿啰音,诱咳呈阳性,舌质红、舌底黄、苔薄白,脉弦浮。

2 治疗

止嗽汤:紫菀、百部各 40 g,荆芥、白前、桔梗、蝉蜕、僵蚕、白芍、丝瓜络各 30 g,甘草 15 g。偏风寒者加紫苏叶 25 g;风热者加金银花 45 g;湿性咳嗽加苦杏仁 25 g;干性咳嗽加川贝母 30 g。1剂/天,一般 2 - 3剂,研末开水冲泡,胃管投服。

3 病例

2000年 12月 3日,患马咳嗽已 40余天,他医按感冒治疗后其它症状消失,唯咳嗽未见好转。症见:精神沉郁,双侧肺泡呼吸音粗厉,支气管呼吸音增强,诱咳阳性,呈湿性咳嗽,耳、鼻、四肢末端发凉,舌红、苔薄白,脉弦浮。治用止嗽汤加紫苏叶 25 g,苦杏仁 25 g,研末,开水冲调,胃管一次投服,2剂后症状大减,继服 1剂咳止病愈。

4 体会

外感咳嗽、久咳不愈,其病因多为外感表邪除而未尽,导致痰气郁结,肺失宣肃,引发咳嗽迁延不愈。治以疏风宣肺、止咳化痰为主。方中紫菀、百部止咳化痰,外感咳嗽不论新久,皆可取效;荆芥疏风解表,使表邪去而肺气宣,咳嗽宁;白前、桔梗、甘草宣肺利气,止咳消痰;蝉蜕轻升开宣肺窍;僵蚕祛风解痉,清热利咽,两药相伍,对痉挛性咳嗽和干咳有卓效;久咳伤阴,久病入络,故用白芍养阴血而除肺燥;丝瓜络通肺络和血脉,化痰顺气。诸药合用,有宣肺疏解、养阴和营、解痉止咳、降气化痰、利咽止痒之效,用于外感久咳,具有

止咳效果好、无毒副作用等优点。

(青海省平安县草原站 810600 李得庆;
乐都县蒲台乡兽医站 赵元灏)

自拟拔毒散治疗家畜湿疹、无名肿毒

近几年来,笔者采用自制拔毒散治疗家畜湿疹 26例(马 2例,山羊 11例,猪 10例,牛 3例);无名肿毒 11例(牛 6例,马 3例,羊 2例),均收到满意的效果。

1 药物配制

雄黄、枯矾各等份,共为细末,过筛即成。

2 治疗方法

2.1 如患部流出黄色液体者,可将药粉撒布,直至表面无渗出液,结痂后,再用纯芝麻油将药粉调成糊状涂擦。

2.2 若患部表面有干痂者,可先将干燥的痂皮除去,再撒布药粉。

2.3 无名肿毒患畜,用食醋将药粉调成糊状涂抹患处,药物干后,再用食醋浸润,2 - 3次/天,隔天换药一次,直到痊愈。

3 病例

例 1 2000年 6月,崇礼乡马庄村 10组马某的一头母牛,右下颌骨后侧有一个直径约 12 cm 的肿块,触之有热痛感,患牛食欲减少,反刍少而无力。遂用拔毒散 120 g,食醋 205 ml,将药粉调成糊状涂于患处,每天浸润食醋 3次,6天后治愈。

例 2 2001年 8月,东岸张胡庄村胡某的一只山羊,头部、胸部、肘后等患部均流出黄色液体,部分有结痂。他医按疥癣治疗多次不见效果,遂用拔毒散治疗,4次治愈。

4 体会

雄黄具有清热解毒、止痒的作用,枯矾能收敛、渗湿,二者配合有明显疗效。该药物配制方便,价格低廉,使用方法简单易行。

(河南省上蔡县动检站 463800 付泰 贾保生;
上蔡县畜牧站 胡红伟 邱玉环)

千里光提取物的镇痛作用及致突变性分析*

陈进军^a, 聂芳红^b, 林红英^a, 于增杰^a, 梁志烽^a, 徐晓彬^a, 李 华^a

(广东海洋大学 a 农业生物技术研究所, b 食品科技学院, 广东 湛江 524088)

[摘 要] 将千里光全草粉用体积分数 70% 乙醇浸泡, 经超声波-微波处理, 用乙醚萃取脱色, 冷冻真空干燥, 制备千里光提取物冻干粉(SCE)。以对乙酰氨基酚为对照, 采用醋酸扭体法和热板法研究不同剂量 SCE 的镇痛作用; 采用骨髓微核试验研究不同剂量 SCE 的致突变作用。结果发现, 122.72 mg/kg SCE 具有显著的镇痛作用, 而 130.90 mg/kg SCE 对雌雄小白鼠均不具有致突变作用。说明 122.72~130.90 mg/kg SCE 能同时满足无致突变作用和显著镇痛作用的双重条件。

[关键词] 千里光提取物; 镇痛作用; 微核试验; 致突变作用; 小鼠

[中图分类号] S853.75

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0049-04

Analgesic effect of *Senecio scandens* extract and its mutation test in mice

CHEN Jin-jun^a, NIE Fang-hong^b, LIN Hong-ying^a,
YU Zeng-jie^a, LIANG Zhi-feng^a, XU Xiao-bin^a, LI Hua^a

(a Institute of Agricultural Biotechnology, b Food Science and Technology College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract By marinating ground whole *Senecio scandens* Buch-Ham with 70% (V/V) of ethanol solution, treating it with ultrasonic microwave, and decoloring it with ether, then drying it with frozen vacuum, thus the frozen-vacuum-dried powder of *S. scandens* extract (SCE) was prepared. The analgesic effects of SCE were conducted with the hot-plate test and acetic acid writhing method with a reference of acetaminophen, respectively. And the bone-marrow micronucleus test was conducted to assess the mutagenic effect of SCE. The results showed that SCE at 122.72 mg/kg significantly exerted analgesic effects, while 130.90 mg/kg of SCE did not cause mutagenic effect neither in male nor in female mice. The results above indicated that SCE at 122.72 mg/kg to 130.90 mg/kg can at the same time meet two requirements of performing significant analgesic effects and no mutagenic effect in mice.

Key words: *Senecio scandens* Buch-Ham. extract; analgesic effect; bone-marrow micronucleus test; mutation; mouse

千里光(*Senecio scandens* Buch-Ham.)为菊科千里光属多年生草本植物,是一种清热解毒的中草药^[1],但千里光镇痛作用的研究尚未见报道。另据英国药品与健康管理局(MHRA)报道,千里光属植物含有双稠吡咯啉生物碱(Pyrrolizidine Alkaloids, PA s),会造成肝脏损伤,PA s 对试验动物显现致癌

性、致突变和生殖毒性^[2]。《本草拾遗》称千里光“味苦,平,小毒”,而《本草图经》云“味苦甘,寒,无毒”^[1-2]。陈进军等^[3]检测发现,千里光全草含有生物碱和 PA s,但千里光体积分数 70% 乙醇提取物中未检出 PA s。可见对千里光的毒性认识还不统一。此外,对千里光体积分数 70% 乙醇提取物是否具有致

* [收稿日期] 2006-09-04

[基金项目] 广东省科技攻关计划重点引导项目(2004B20201007); 湛江科技攻关计划项目(湛科[2006]94号)

[作者简介] 陈进军(1967-),男,宁夏中卫人,教授,博士,硕士生导师,主要从事中草药药理学和毒理学研究。

E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

突变性, 尚未见报道。

本试验通过醋酸扭体法和热板法研究了千里光体积分数 70% 乙醇提取物(SCE)对小鼠的镇痛作用, 并利用小鼠骨髓微核试验, 研究了 SCE 的致突变作用, 以期研究千里光中药镇痛剂的制备提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 千里光 千里光于 2006-05 采自广东省湛江市麻章区, 由广东海洋大学农业生物技术研究所鉴定。阴干, 粉碎, 贮存于干燥阴凉处备用。

1.1.2 试剂 无水乙醇、甲醇、乙醚、醋酸、甘油均为国产分析纯; 注射用对乙酰氨基酚(Acetaminophen, A T M P), 苏州长征-欣凯制药有限公司产品; 小牛血清, 长春宝泰克生物制剂公司产品; 注射用环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP), 江苏恒瑞医药股份有限公司产品; 吉姆萨储备液(临用时用 pH 6.4 的 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液配成体积分数 10% 应用液)。

1.1.3 主要仪器 洁净工作台(型号: SW-CJ-2F), 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 微波炉(型号: WD700W), 天津 LG 公司; 超声波振荡仪(型号: SB-5200), 宁波新芝仪器研究所; 冷冻干燥机(型号: BENCHTOP), 德国 Virtis 公司; 旋转蒸发器(型号: RE-52), 上海沪西仪器厂; 数字酸度计(型号: PHS-3C), 杭州梵隆仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌器(型号: YXQ-SG46-280S), 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 带油镜头生物显微镜, 细胞计数器。

1.1.4 供试动物 昆明种小白鼠, 雌雄兼有, 质量(25±2) g, 购自广东医学院实验动物中心, 动物合格证号: 粤监 2005A 024。雌雄分笼饲养, 室温 22~25℃, 相对湿度 60%~80%, 每日光照 12 h, 无对风流。饲料为广东医学院实验动物中心提供的小鼠全价颗粒料, 自由采食、饮水, 每日更换 1 次饮水, 隔天更换 1 次垫料。饲养观察 1 周后用于试验。

1.2 方法

1.2.1 千里光体积分数 70% 乙醇提取物的制备 将 200 g 千里光全草粉(过孔径 1.00 mm 筛), 用 2 000 mL 体积分数 70% 乙醇浸泡 1 h, 超声(频率: 26 kHz, 每次超声 2 min, 工作间歇: 0.2 s)处理 1 h, 720 W 微波处理 3 min, 取出后再浸泡 24 h, 负压过滤, 加 50 mL 无水乙醇再过滤 1 次, 合并 2 次滤液, 调 pH 至 8.0, 过滤, 滤液调 pH 至 6.0, 旋转蒸发回

收乙醇, 加入 1/3 体积的乙醚萃取 3 次, 置于 4℃ 冷藏 6 h, 取出过滤, 滤液在 -30℃ 预冻 12 h, 再冰冻干燥得千里光体积分数 70% 乙醇提取物冻干粉(SCE), 用生理盐水配成适当浓度的溶液备用。测得 SCE 的 LD₅₀ 为 3 927 mg/kg。

1.2.2 醋酸致小白鼠腹痛扭体试验 取健康昆明种雌性小白鼠 15 只, 随机等分为 5 组: 1 组, 每只小白鼠腹腔注射 490.88 mg/kg SCE; 2 组, 每只小白鼠腹腔注射 245.44 mg/kg SCE; 3 组, 每只小白鼠腹腔注射 122.72 mg/kg SCE; 4 组, 每只小白鼠腹腔注射 0.5 mL 生理盐水(Physiological Saline Water, PSW); 5 组, 每只小白鼠腹腔注射 250 mg/kg 对乙酰氨基酚(A T M P)。前 3 组均为试验组, 后 2 组分别为阴性对照组和阳性对照组。完成上述注射步骤 1 h 后, 每只供试小白鼠腹腔注射 0.5 mL 体积分数 0.6% 的醋酸致痛。不同组小白鼠的注射由多人同时进行, 同时记录各组小白鼠 15 min 内的扭体次数^[4], 并用 *t* 检验进行差异显著性分析。

1.2.3 小白鼠热板法致痛试验 调恒温水浴器温度至 55~56℃, 将一块铁板置于恒温水浴上, 预热 10 min。然后对昆明种小白鼠(雌雄兼有)进行痛阈值筛选(以 5~30 s 内舔足者为及格, 跳跃者弃之不用), 挑选表现及格的 30 只小白鼠随机分成 5 组: 1 组, 每只小白鼠腹腔注射 490.88 mg/kg SCE; 2 组, 每只小白鼠腹腔注射 245.44 mg/kg SCE; 3 组, 每只小白鼠腹腔注射 122.72 mg/kg SCE; 4 组, 每只小白鼠腹腔注射 0.5 mL 生理盐水(PSW); 5 组, 每只小白鼠腹腔注射 250 mg/kg 对乙酰氨基酚(A T M P)。前 3 组均为试验组, 后 2 组分别为阴性对照组和阳性对照组。分别在给药前及给药后 30 和 60 min 测定各组小白鼠的痛阈值。痛阈值为小白鼠从被放到铁板上到其第 1 次舔其后足的时间^[5]。

1.2.4 小白鼠骨髓微核试验 将昆明种小白鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。1 组, 每只小白鼠腹腔注射 130.90 mg/kg SCE; 2 组, 每只小白鼠腹腔注射 392.70 mg/kg SCE; 3 组, 每只小白鼠腹腔注射 1 309.00 mg/kg SCE; 4 组, 每只小白鼠腹腔注射 0.5 mL 生理盐水(PSW); 5 组, 每只小白鼠腹腔注射 40 mg/kg 环磷酰胺(CP)。前 3 组均为试验组, 后 2 组分别为阴性对照组和阳性对照组。每组小白鼠连续腹腔注射 2 次, 每次间隔 24 h, 在第 2 次给药后 6 h, 将各组小白鼠脱颈处死, 分别取其两侧股骨制骨髓涂片, 将干燥的涂片置于甲醇液中固定 5~10 min, 取出晾干, 固定好的涂片用 1~10

吉姆萨-磷酸盐缓冲液(pH 6.4)染色 20 min, 染色后的涂片放入二甲苯中透明 6 min, 取出后立即滴加中性树胶, 覆以盖玻片后平置, 采用双盲法阅片。每张盖玻片计数 1 000 个嗜多染红细胞(Polychromatic Erythrocyte, PCE), 并计数含微核的嗜多染红细胞数。嗜多染红细胞微核率的计算公式为: 嗜多染红细胞微核率/% = (含微核的嗜多染红细胞数/嗜多染红细胞总数) × 100%^[6-7]。用 *t* 检验比较各组供试小鼠微核率的差异。

2 结果与分析

2.1 SCE 对醋酸致小白鼠腹痛扭体次数的影响

由表 1 可见, 当 SCE 剂量为 490, 88, 245, 44, 122, 72 mg/kg 时, 供试小白鼠的扭体次数分别为 23.67 ± 5.59, 28.00 ± 5.16 和 32.67 ± 9.75, 与阴性对照组(85.67 ± 20.81)相比, 差异均达极显著水平($P < 0.01$); 与阳性对照组(22.67 ± 19.33)相比无显著差异($P > 0.05$)。说明 SCE 的镇痛效果与对乙酰氨基酚相当, SCE 对醋酸致痛有明显的抑制作用, 且 SCE 剂量越高, 其镇痛作用越明显。在试验中还观察到, SCE 较高剂量组小白鼠扭体出现的时间明显比其处理组小白鼠迟, 说明 SCE 不但能减少小鼠的扭体次数, 还能推迟疼痛感出现的时间。

表 1 SCE 对醋酸致小白鼠腹痛扭体次数的影响

Table 1 Influence of SCE on writhing number of used mice induced by acetic acid

组别 Group	扭体次数 Writhing number
1	23.67 ± 5.59*
2	28.00 ± 5.16*
3	32.67 ± 9.75*
4	85.67 ± 14.81
5	22.67 ± 4.33*

注: 数据后标 * 者表示与阴性对照组相比差异达极显著水平($P < 0.01$)。

Note: * means significant difference ($P < 0.01$) from the negative control

2.2 SCE 对热板法致痛小白鼠痛阈值的影响

由表 2 可见, 与给药前相比, 给药 30 min 后试验组小白鼠的痛阈值均有所增加, 但差异均不显著($P > 0.05$), 对乙酰氨基酚组小白鼠的痛阈值显著增加($P < 0.05$)。说明给予 SCE 30 min 后, 其镇痛作用尚不明显, 而此时对乙酰氨基酚已表现出较明显的镇痛作用。给药 60 min 后, 对乙酰氨基酚组小白鼠的痛阈值较给药前显著增加($P < 0.05$), 试验组小白鼠的痛阈值与给药前相比均极显著增加

($P < 0.01$), 且显著高于对乙酰氨基酚组($P < 0.05$), 说明 SCE 需要较长代谢时间才能对小白鼠热板刺激发挥明显的镇痛作用, 且此时 SCE 的镇痛作用强于对乙酰氨基酚。

表 2 SCE 对热板法致痛小白鼠痛阈值的影响

Table 2 Influence of SCE on pain threshold of used mice caused by hot plate

组别 Group	给药前 Before treatment	给药后 After treatment	
		30 min	60 min
1	5.76 ± 3.91	6.27 ± 1.92	12.38 ± 5.5*
2	4.68 ± 1.67	8.03 ± 2.90	13.78 ± 5.84*
3	5.12 ± 1.75	7.78 ± 2.26	12.33 ± 4.87*
4	4.87 ± 1.18	4.63 ± 1.08	12.51 ± 3.08*
5	4.79 ± 1.31	7.50 ± 2.48**	9.46 ± 2.50**

注: 数据后标 ** 者表示与给药前相比差异达显著水平($P < 0.05$), 标 * 者表示与给药前相比差异达极显著水平($P < 0.01$); 标 者表示与对乙酰氨基酚组相比差异达显著水平($P < 0.05$)。

Note: ** means significant difference ($P < 0.05$) and * means significant difference ($P < 0.01$) of the pain thresholds from those before treatment, respectively. 者 means significant difference ($P < 0.05$) of the pain thresholds from those treated with A.T.M.P.

2.3 SCE 对小白鼠嗜多染红细胞微核率的影响

由表 3 可见, 阳性对照组(5 组)雌性小白鼠的骨髓嗜多染红细胞微核率最高, 阴性对照组(4 组)雄性小白鼠的骨髓嗜多染红细胞微核率最低。在雌性小白鼠中, 阴性对照组和 SCE 低剂量组(1 组)小白鼠骨髓细胞微核率与阳性对照组相比, 差异均达极显著水平($P < 0.01$); 2 组和 3 组的小白鼠骨髓细胞微核率与阴性对照组相比, 差异分别达显著($P < 0.05$)和极显著水平($P < 0.01$); 1 组小白鼠骨髓细胞微核率与阴性对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。可见在雌性小白鼠中, 中、高剂量的 SCE 能引起小白鼠骨髓细胞微核率升高, 而低剂量(130, 90 mg/kg) SCE 不能引起小白鼠骨髓细胞微核率显著升高。

由表 3 还可见, 在雄性小白鼠中, 阴性对照组和 1 组小鼠骨髓细胞微核率与阳性对照组相比差异均显著($P < 0.05$); 3 组小鼠骨髓细胞微核率与阴性对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 但 1 组和 2 组小鼠骨髓细胞微核率与阴性对照组相比差异均不显著($P > 0.05$)。由此可见, 在雄性小白鼠中, 高剂量(1 309, 00 mg/kg) SCE 能使小鼠骨髓细胞微核发生率升高, 而低、中剂量的 SCE 不能引起小鼠骨髓细胞微核率升高。

表 3 SCE 对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

Table 3 Influence of SCE on mouse bone marrow micronucleus rate

组别 Group	PCE 数 Number of PCE		微核数 Number of micronucleus		微核率/% Micronucleus rate	
	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male
1	5 000	5 000	32	34	0.64 ± 0.08*	0.68 ± 0.13**
2	5 000	5 000	84	38	1.68 ± 0.32 [▽]	0.76 ± 0.19
3	5 000	5 000	95	82	1.90 ± 0.46	1.64 ± 0.31
4	5 000	5 000	28	23	0.57 ± 0.08*	0.47 ± 0.15**
5	5 000	5 000	109	68	2.18 ± 0.58	1.36 ± 0.27

注: 数据后标**者表示与阳性对照组相比差异显著($P < 0.05$), 标*者表示与阳性对照组相比差异极显著($P < 0.01$); 数据后标[▽]者表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$), 标[▽]者表示与阴性对照组相比差异极显著($P < 0.01$).

Note: ** means significant difference ($P < 0.05$) and * means significant difference ($P < 0.01$) from the positive control, respectively; [▽] means significant difference ($P < 0.05$) and [▽] means significant difference ($P < 0.01$) from the negative control, respectively.

3 讨论与结论

3.1 正确认识中药来源的镇痛药物

疼痛是许多疾病的共有症状, 需用镇痛药物治疗。在 24 大类化学药品中, 年产量过万吨的有 5 个产品, 其中解热镇痛药占 3 个, 分别为对乙酰氨基酚(扑热息痛)、阿司匹林和安乃近^[6]。化学镇痛药物的毒副作用大, 易产生抗药性, 而天然药物在这方面有无可比拟的优势; 纯化合物新药开发周期长、费用高、难度大, 使植物提取物镇痛药的开发成为新的选择。因此, 应当发挥我国在中医药和天然植物资源上的优势, 大力开发天然植物提取物作为镇痛药物, 丰富镇痛药物的种类, 或作为某些毒副作用大的化学镇痛药物替代品。目前, 已进行了乳香没药提取物、冷水七活性部位和资木瓜乙醇提取物等中药提取物的镇痛作用研究, 均取得了可喜的成果^[4-5, 8-9], 但有关千里草提取物的镇痛作用及致突变作用还未见报道。此外, 对中药镇痛有效部位的标准化、药理学及其毒性评价方面尚需进行深入研究。

3.2 SCE 对小白鼠的镇痛作用

本试验采用扭体法和热板法, 研究了 SCE 的镇痛作用。扭体法是将一定容积和浓度的化学刺激药物(如体积分数 0.6% 醋酸)注入小鼠腹腔内, 刺激脏层和壁层腹膜, 引起深部较大面积较长时间的炎性疼痛, 致使小鼠出现腹部内凹, 躯干与后肢伸张、臀部高起等反应^[4, 10]。热板法是将一块铁板在 55~56℃ 预热 10 min, 将表现及格的小鼠放在上面, 记录其痛阈值^[5, 11]。热板法为物理性刺激法, 小鼠的足部受热板刺激而产生疼痛时, 就产生添足的特殊反应。可见其是研究药物镇痛作用性质完全不同的两种方法。

本研究结果表明, SCE 对于化学性刺激(体积

分数 0.6% 醋酸)引起的疼痛具有明显的镇痛作用, 能够延缓疼痛的发生。对于物理性刺激(热板法)引起的疼痛, SCE 需要较长代谢时间才发挥明显的镇痛作用, 此时 SCE 的镇痛作用较对乙酰氨基酚强。SCE 镇痛作用的机制尚不清楚, 可进一步对其痛阈及疼痛级别进行研究。

3.3 SCE 对小白鼠的致突变作用

小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验主要是对染色体结构完整性的改变进行评估, 能检测化学物是否破坏细胞染色体的完整性和正常分离, 能否引起致突变作用^[6-7]。本研究利用小白鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验对 SCE 的致突变作用进行了评价。结果表明, 在雌雄兼有小白鼠中, 130.00 mg/kg 的 SCE 能引起小白鼠骨髓细胞微核率显著升高, 130.90 mg/kg SCE 不能引起小白鼠骨髓细胞微核率显著升高。而 392.70 mg/kg SCE 能引起雌性小白鼠骨髓细胞微核率显著升高, 但不能使雄性小白鼠骨髓细胞微核率升高。可见, 392.70 mg/kg SCE 对雌性小白鼠具有致突变作用, 但对雄性小白鼠无致突变作用, 而 130.90 mg/kg 及其以下剂量的 SCE 对雌雄小白鼠均不具致突变作用。

本研究中, 扭体法和热板法研究表明, 低剂量(1/32 LD₅₀, 122.72 mg/kg)的 SCE 即具有显著的镇痛作用; 小鼠骨髓微核试验表明, 130.90 mg/kg 的 SCE 对雌雄小鼠均不具致突变作用。可见, 122.72~130.90 mg/kg 的 SCE 既有无致突变作用又有显著的镇痛作用。

[参考文献]

- [1] 吴斌, 吴立军. 千里光属植物的化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(2): 97-98

(下转第 56 页)

性病变,判断预后有重要的临床应用及推广价值,所以目前 ER α 在乳腺方面的研究多侧重于对乳腺癌的监测,而对正常乳腺发育过程中 ER α 的含量变化研究较少^[8]。Saji 等^[9]用免疫组化法对大鼠乳腺中 ER α 和 ER β 的表达水平进行了研究,结果发现初情期前乳腺中表达 ER α 的细胞约占 40%,共同表达 2 种受体的细胞约占 25%;妊娠期,多数细胞表达 ER β ,少数细胞表达 ER α ,共同表达 2 种受体的细胞极少;泌乳期,主要是共同表达 2 种受体的细胞;断奶后,表达 ER α 的细胞较少,共同表达 2 种受体的细胞极少。本研究结果发现,妊娠期和泌乳期大鼠乳腺中 ER α 表达水平均低于处女期,且差异显著 ($P < 0.05$);整个妊娠过程中,以妊娠 12 d 最高;泌乳期随着时间的延长,ER α 的表达水平增加,但差异不显著 ($P > 0.05$),与 Saji 报道基本一致。提示 ER α 可能参与了乳腺细胞的发育和凋亡。

β actin 是一种细胞质肌动蛋白,与一些管家基因一样在物种内持续恒量表达,常用作相对定量 PCR 的内参照。相对定量 PCR 是通过终点检测法进行的,即 PCR 达到平台期后,用目的基因与内参照的灰度比值作为目的基因的相对量。为了更精确的检测乳腺发育过程中 ER α 的变化,下一步的研究工作将应用实时荧光定量 PCR 方法检测 ER α 在乳腺组织的表达。

[参考文献]

- [1] Stumpf W E, Sar M, Aumuller G. The heart a target organ for estradiol[J]. Science, 1977, 196(4287): 319-321.
- [2] Kuiper J, Enmark E, Pelto H M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 5925-5930.
- [3] Enmark E, Pelto H M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor β gene structure, chromosomal localization, and expression pattern[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: 4258-4265.
- [4] 曹廷兵,叶治家,巩燕,等.一种快速鉴定 RNA 质量的方法[J].第三军医大学学报,2002,24(8):992-993.
- [5] Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000, 5: 211-225.
- [6] Chen C L, Weiss N S, Newcomb P, et al. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer[J]. JAMA, 2002, 287: 734-741.
- [7] Russo J, Daniel M, Hu Y F, et al. Breast differentiation and its implication in cancer prevention[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 931-936.
- [8] 李宣海,巫向前,倪语星.肿瘤标志物的检测与临床[M].第1版.北京:人民卫生出版社,1997:135-137.
- [9] Saji S H, Jensen E V, Stefan N, et al. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland[J]. PNAS, 2000, 97(1): 337-342.

(上接第 52 页)

- [2] 梁爱华,叶祖光.千里光属植物的毒性研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(2):93-97.
- [3] 陈进军,赵生才,林红英,等.九里明抗菌镇痛有效部位中 PAs 的研究[J].中国农学通报,2006,12(6):117-121.
- [4] 郑杭生,冯年平,陈佳,等.乳香没药的提取工艺及其提取物的镇痛作用[J].中成药,2004,26(11):956-958.
- [5] 赵晓亚,向明,张勇慧,等.冷水七活性部位镇痛抗炎作用的研究[J].医药导报,2005,24(1):10-12.
- [6] 曹佳,林真,余争平.微核试验原理方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M].北京:医学科学出版社,2000:56-64.
- [7] Li Y, Dunipace A J, Stookey G K. Lack of genotoxic effects of fluoride in the mouse bone marrow micronucleus test[J]. Journal of Dental Research, 1987, 66(11): 1687-1690.
- [8] 柳蔚,杨兴海,钱金萍.资木瓜乙醇提取物对小鼠的镇痛作用[J].实用医学进修杂志,2004,32(4):252-254.
- [9] 祁乃喜,卢金福,冯有龙,等.荆芥酯类提取物对小鼠的镇痛作用[J].南京中医药大学学报,2004,20(4):229-230.
- [10] Shelcunova E V, Bespalov A Y. Effects of meprobamate on estrogen-dependent acute tolerance to the morphine analgesia in female rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 535(3): 78-85.
- [11] Nishiyama T. Analgesic effects of intracerebrally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail pick test and the formalin test in rats[J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2006, 50(2): 28-33.

兽医药理学教学中引入病例讨论的实践与体会

广东海洋大学动物医学系 马 驿 彭金菊 陈进军 张继东 安守文 曾令军

[摘 要]通过病例讨论将兽医药理学的理论知识与临床实际紧密联系,可以促进学生的学习兴趣,增加学习的主动性,提高教学效果,也有助于培养学生逻辑推理能力、分析问题与解决问题的能力、团队合作精神、语言表达能力等多方面的综合素质。本文探讨了兽医药理学教学中引入病例讨论的方法、效果及体会。

[关键词]病例讨论 兽医药理学 教学

兽医药理学是动物医学专业的重要专业基础课之一,也是基础兽医学与临床兽医学的桥梁课程。兽医药理学教学内容的特点是“五多一难”,即药物多、药名多、作用多、用途多、不良反应多,记忆起来难。传统的教学模式重教轻学,倾向于老师在课堂上主动地传授知识和技能,老师是主角,学生被动地吸纳知识和学习技能,学生是配角,忽视了学生的自主性和思维动机的激发,更谈不上发展学生的创新思维,也没有理想的教学效果^[1]。另外,讲授内容以教材为主,缺少临床实例,学生对所学知识的应用缺乏感性认识,难以将所学兽医药理知识与临床实际相结合,只是被动记忆大量的理论知识,不仅学习难度大,而且很难达到“学以致用”的教学目的。因此,在兽医药理学教学改革中,必须更新观念,改革教学方法,激发学生的学习兴趣和积极性。我们考虑从病案讨论入手,使基础与临床联系起来,提高学生的学习兴趣和积极性。病例讨论式教学法是将具体病例引入药理教学中,由教师举出病例,提出问题,学生分析思考,解决问题。这种教学方式是以提高学生理论联系实际的能力,培养学生科学思维和独立获取知识的能力为目的。

1. 课前准备

1.1 收集病例

因为兽医药理学教学面对的学生临床接触少,只有一些基础理论知识,为了让学生能够针对病例提出合理的用药方案,分析药物的药理作用和作用机制,教师必须寻找症状典型、诊断明确、可针对性用药的病例。这样学生才会针对病例提出合理用药,讲出药物作用机理,复习生理、病理知识以及初步了解诊断学、内科、外科学等知识。例如,我们选择了一例具有典型有机磷中毒症状的病猪,有各种 M 样、N 样反应,通过这一病例我们可以复习外周神经系统药物和特效解毒药这两章的药理知识,同时我们又选用了泻下药、利尿药、抗微生物药以及抗寄生虫药物的四个较为典型病案,通过这些病案使学生在实际应用中所学的各个章节的兽医药理学知识。病例均为教师在临床实践中接触的实际病例。

1.2 修改和完善病例

选取病例后,教师对病例进行分析整理,涉及临床诊断、检查的内容简洁明了地标明,重点突出兽医药理学的知识,分析病例是否典型,是否能与药理学知识紧密联系,探讨最佳用药方案、药物应用的注意事项等。并邀请临床兽医学的老师讲解与病例相关的临床知识,通过临床兽医学老师的讲解和大家的讨论,了解当前临床用药的具体情况。

1.3 病例分析的准备

病例分析前教师必须做好充足的准备,因为学生在讨论中可能会提出各种各样的问题,因此要仔细阅读兽医药理学教材以及药理学的参考资料,了解兽医药理学的最新动态,还要阅读相关的家畜生理学、兽医药理学、家畜临床诊断学、家畜内科学资料等等,有了充分的准备,才能胜任此教学任务。

2. 病案讨论

有了充分的课前准备,教师能很好地掌握病案讨论的节奏,使学生在讨论中增加知识、开拓视野、融会贯通。因此,不同的讨论可采取不同的方式。例如“有机磷中毒”这个病例典型,让学生观察病猪有哪些临床症状,学生很容易提出用药方案,但是作为教师就应该多提出几个为什么,如:为什么有机磷中毒时会有这些症状?这些症状是激动或阻断哪种受体所引起的?应用什么药物来解救?阿托品是针对 M 样症状而言,而我们又为什么要用它?用了阿托品、解磷定后病猪症状缓解,是否就立即停药呢?为什么要用解磷定?用药途径如何?假如发现有阿托品中毒,能否用新斯的明解救?等等,使学生从讨论中掌握药理学知识。这个病案讨论采用教师提问引导的方式,学生也很有兴趣地积极参与。还有几个病案相对来说涉及面广,用药多,学生参与积极性也很高,因此可以放手让学生们自行讨论、辩论,而后进行总结。例如“泻下药”的病案,让学生先事前准备,然后分组讨论,并提出用药方案,然后分析方案的优劣,在相互辩论中,找出最佳用药方案和病例中应抓住的重点。老师在这个讨论中仅总结发言,或把某些未讨论到的问题提出来。“抗寄生虫药物”的病案中则采用学生事前准备资料自己主持,老师只作为

听众的方式,几乎不提出问题或发表看法。但这种方式学生们不很活跃,或许今后这种方式可以采用每人提出自己的查资料心得,最后讨论。而“抗微生物药物”的病案讨论,由于涉及的药物较多,学生讨论非常激烈,每个人选的药物可能都不一样,因此在讨论中我们是复习了整个抗微生物药物一章,最终根据病情轻重缓急选出几种药物,使学生明确了合理选用抗微生物药的重要性。这个讨论学生参与积极,也认为收获颇多。

3. 病案讨论的试教学

在兽医药理学教学中引入病案讨论从 2007 年开始试行,在两年的试行中我们总结经验,对病案进行修改,学生们普遍反应良好,认为这样能开拓视野,使自己的思维更为活跃以及更好应用药理知识,针对学生的反应,我们更坚定了对病案讨论教学的信心。

4. 效果评价

病案讨论后我们对学生进行了问卷调查,100%的学生表示对此方法赞同,学生的支持坚定了我们教改的信心。同时,学生也提出了一些不如意的地方,这对于今后的教学很有帮助。经过两年来的病案讨论,我们在兽医药理学教学中积累了一定的经验,能使掌握更多的知识,又使他们在讨论中学会交际,学会实际应用药物。创新教育强调以学生为主体,注重激发学生的学习热情,让学生主动参与教学过程,并在自主学习中培养独立思考和创造能力。培养具有创新能力的人才,是我们的目的,也是病案讨论带给我们的体会。

5. 课后思考

在兽医药理学教学中引入病例分析有以下优点:①增加了学生学习的主动性。这种方法是理论知识与临床实际紧密联系的有效手段,尤其对于学习基础课的学生而言,较早地接触临床知识,既可以激发他们的学习兴趣,增加学习的主动性,又增加了学习的实用性^[2]。②提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。这种教学方法将基础理论与临床问题联系,学生会主动去探索他们所要学习的知识,并且应用这些知识去解决问题。③提高学生语言表达能力。通过激烈的讨论,学生能够逐渐克服腼腆、不敢发言等弱点,提高自信心,提高语言组织能力。④促进教师队伍综合素质的提高。教师应充分认识到学生主动参与教学的重要性,教师除了熟练掌握与教学有关的药理学及相关学科的知识外,还要努力使自己具备一定的组织能力,并积极主动地改善教学方法,尽量诱导学生对该学科的兴趣和积极性,教学过程中注重给予学生参与教学的机会,并合理应用各种方法强化学生对知识的理解和掌握,另一方面应具有敏锐的思维分析能力和演绎推理能力,才能很好地完成教学任务。

在实施过程中,我们也发现了一些问题,如果班级人数过多,很难为所有同学提供发言机会。药理学与临床病案相结合的讨论要求授课教师具有较高素质,既要精通药理专业知识,又要熟悉临床学科知识,才能引导学生搞好以临床治疗用药的机理作用机制为重点的讨论,对缺乏临床经验的专业基础课老师会有一定的难度^[3]。

在兽医药理学教学中引入病例分析,通过“设问激疑、感知素材、讨论辨析、归纳整理、巩固、开拓”等教学程序,不断激发学生对于兽医药理学的认知需要,并不断满足这种需要,使学生感受获得知识的快乐,体味成功的喜悦,这种喜悦的多次体验就促使产生稳定的学习兴趣。学生对兽医药理学的稳定兴趣,又会反作用于教师,激励教师进一步发挥主导作用。学生乐学,教师乐教,增强了教学效果,提高了教学效率,使兽医药理学教学走向良性循环。

参考文献

- [1]张玉仙,王文利,赵庶史等.浅谈《兽医药理学》教学改革与实践.科技信息,2006,11:89-90.
- [2]胡功政.《兽医药理学》课程教学改革的研究.郑州牧业工程高等专科学校学报,2001,21(3):222-223.
- [3]李继昌.兽医药理学的教学改革实践与思考.东北农业大学学报(社会科学版),2004,2(3):103-105.

作者简介:马驿(1976-),男,湖南岳阳人,博士,主要从事兽医药理学与毒理学的教学与科研工作。

猪犬脾 TF的提取及理化性质和 部分生物学特性测定

孔庆波^{1,4}, 陈进军², 常建军³, 陈德坤⁴, 张彦明⁴

(1. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁沈阳 110034; 2. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东湛江 524088;

3. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810003; 4. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

[收稿日期] 2006-12-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2007)05-0005-05 [中图分类号] S859.797

[摘要] 用常规转移因子提取方法提取了猪、犬脾转移因子,并对猪、犬脾转移因子的澄明度、pH值、蛋白质、紫外光谱、转移因子含量、DNA含量、核酸含量、氨基酸等理化性质进行了测定和分析,同时对猪、犬脾转移因子进行了无菌检验、热原检验、安全性试验、过敏试验、抗原性检验等生物学特性检验和试验,对提取的猪、犬脾转移因子活性进行了分析。结果表明,用本方法制得的猪犬脾转移因子含有DNA、核苷酸等,具有和牛、羊、鸡等脾转移因子相似的理化性质,无菌,无热原,无毒性,无致敏性,无抗原性,且 $A_{260nm}/280nm$ 值也达到了较高的指标,说明该制品已达到国内外同类制品的水平。按照OD值计算活性单位的方法,可计算出本试验制备的转移因子每mL约为2个活性单位,可供试验和临床使用。

[关键词] 转移因子;提取;理化性质;生物学特性

The Extraction of Swine and Canine Spleen Transfer Factors and the Determination of Their Physical and Chemical Properties and Biological Characteristics

KONG Qing-bo^{1,4}, CHEN Jin-jun², CHANG Jian-jun³, CHEN De-kun⁴, ZHANG Yan-ming⁴

(1. Department of Police Dog Technology of Criminal Police College of China, Shenyang, Liaoning 110034;

2. Institute of Agricultural Biotechnology of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088;

3. College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810003;

4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100; China)

Abstract: Swine and canine spleen transfer factors (TFs) had been extracted by a general extracting method. And then based on the relational methods, the physical and chemical properties of two kinds of TFs—limpidity degree, pH, protein, ultraviolet spectrum, TF content, DNA content, nucleic acid content and amino acid varieties were determined and analyzed. At the same time, the biological characteristics of two kinds of TFs were also tested and examined according to relational rules including the asepsis test, the pyrogen test, the security examination, the hypipersusceptibility examination and the antigen test. Finally, the activity of two kinds of TFs were determined and

基金项目:公安部科技局基金项目(20045829501)

作者简介:孔庆波(1969年~),男,辽宁沈阳人,博士,副教授,主要从事犬病的科研与教学工作。E-mail: kqb111717@163.com

通讯作者:张彦明

analyzed. The results showed that the extracted swine and canine spleen TFs in our laboratory contained DNA, nucleotide acid and so on, their physical and chemical properties were similar to that of cattle TF, sheep TF, chicken TF and other animal TFs, and no bacteria, no pyrogen, avirulence, no hypersusceptibility and no antigenicity, and $A_{260nm/280nm}$ value was also rather high index. Those results conformed with the reports on other animals TFs in China or other countries. According to OD value, the prepared TFs activity are about 2 units per mL and useful for experiment and clinic.

Key words: transfer factor; extraction; physical and chemical properties; biological characteristics

转移因子 (transfer factor, TF)是从淋巴细胞中提取的一类低分子肽与核苷酸复合物。该物质作为一种特定的淋巴因子具有传递免疫信息、激发免疫细胞活性、调节和增强机体特异性和非特异性细胞免疫功能,同时有促进 B 细胞的抗体分泌作用,又可诱导机体产生干扰素等生物活性物质。它能将供体的细胞免疫功能特异地转移给受体,这种效应无严格的种属特异性^[1,2];它能转移多种抗原的细胞免疫,包括真菌、细菌、病毒、寄生虫、组织相容性抗原和肿瘤抗原的细胞免疫,是一种新型免疫增强剂^[3]。受体接受 TF 后,很快 (2~24 h) 产生效应,并可持续数月甚至一年。它的研究和应用对于目前用抗菌素或免疫球蛋白无法控制的某些细胞内感染的病毒性、细菌性、真菌性疾病和寄生虫病的防治,将开辟新的治疗途径,对某些免疫缺陷病的防治具有广阔的应用前景。

目前,非特异性 TF 已大量用于人医临床,实践证明,该制剂对人体安全无毒,无药残,口服或注射同样有免疫活性。近年来,我国已陆续开展了对畜禽 TF 的研究和应用,先后试制了猪、羊、马、兔、牛以及犬的非特异性 TF 和特异性 TF^[4],在畜禽疾病的防治上已取得了可喜的成绩。本试验研究的内容为猪脾 TF (TF-P) 和犬脾 TF (CS-TF) 的制备及其理化性质和部分生物学特性测定的比较,旨在为其在犬病临床应用提供理论依据和实践材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 脾脏,成年健康猪、犬的新鲜脾脏;精密 pH 试纸, pH 范围 5.4~7.0;透析袋, DM-27 型,截留分子量 6 000~10 000,购自上海展新贸易有限公司。

1.1.2 试验动物 家兔, 13 只, 体重为 1.5~2.5 kg/只, 健康雄性兔, 购自西北农林科技大学兽医院;豚鼠, 10 只, 体重为 300~400 g/只, 一级 DHP 品系健康豚鼠, 购自西北农林科技大学试验动物中

心;小鼠, 10 只, 体重约 20 g/只, 一级昆明种健康小鼠, 购自西北农林科技大学试验动物中心。

1.1.3 主要试剂 25% 磺基水杨酸;二喹啉甲酸 (BCA);二苯胺等。

1.1.4 主要仪器设备 绞肉机; JJ-2 (2003-61) 型高速组织匀浆机;摇床和低温离心机;氨基酸自动分析仪, 835-50 型, 日本日立公司产品;紫外分光光度计, 7520 型, 上海第三分析仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 猪犬脾 TF 的提取方法 取成年健康猪的新鲜脾脏, 除去脂肪、被膜、结缔组织。以绞肉机绞碎后置高速组织匀浆机中匀浆。方法为加入 400 g 经过处理的脾, 400 mL 蒸馏水, 12 000 r/min 高速匀浆 20 min。匀浆后的糊状物装瓶置 -20 冷冻, 待完全冻实后置 37 摇床上解冻, 完全融化后再次冷冻, 如此反复冻融 6 次。于 4 以 10 000 r/min 离心 30 min。收取离心后上清液进行透析。透析袋外为等量的灭菌生理盐水, 4 透析 48 h, 取透析外液即为试验用猪 TF 提取液。过滤除菌, 分装于 10 mL 灭菌棕色玻璃瓶中, 置 -20 保存。

1.2.2 猪犬脾 TF 提取液理化性质分析

1.2.2.1 澄明度 肉眼直接观察法。

1.2.2.2 pH 值 用精密 pH 试纸测定。

1.2.2.3 蛋白质测定^[5] 取少量透析外液用 25% 磺基水杨酸检测, 观察有无白色浑浊物出现。

1.2.2.4 紫外吸收光谱 透析外液用紫外分光光度计在 210~300 nm 扫描。

1.2.2.5 TF 含量 用二喹啉甲酸 (BCA) 检测法^[6]。

1.2.2.6 DNA 含量 用二苯胺法测定。

1.2.2.7 核酸含量 用比色法测 TF 总磷和有机磷 (定磷试验), 计算其核苷酸含量。

1.2.2.8 氨基酸组分测定 用氨基酸自动分析仪测定, 并换算成百分比含量。

1.2.3 猪犬脾 TF 提取液生物学特性 无菌检验、



热源检验、安全性试验及过敏试验均按《中国生物制品规程》^[7]要求进行。

1.2.3.1 无菌检验 接种于普通肉汤、血液琼脂斜面、普通琼脂斜面、厌气肉肝汤, 37℃ 培养 7 d, 观察有无细菌等微生物生长。

1.2.3.2 热原检验 取家兔 9 只, 平均分为 3 组, 测其正常体温后 15 min 内耳静脉缓缓注入温热至约 38℃ 的 TF 样品, 剂量按家兔体重每千克注射 3 mL, 然后, 每隔 1 h 测 1 次体温, 共测 3 次, 观察并判断结果。

1.2.3.3 安全性试验 取小鼠 10 只, 随机等分为 2 组。第 1 组腹腔注射待检 TF 液 5 mL/只; 第 2 组腹腔注射等量的生理盐水作对照。观察 7 d, 全部剖杀, 检查各组织脏器情况。

1.2.3.4 过敏试验 取豚鼠 10 只, 隔日腹腔注射供试品 0.5 mL, 连续 3 次; 然后再分成 2 小组, 每组 3 只, 分别于第 1 次注射后 14 d 及 21 d 静脉注射供试品 0.5 mL, 注射后 15 min 内观察并判断结果, 另 4 只做对照组。

1.2.3.5 抗原性检验^[8] 将供试 TF 提取液与等量不完全弗氏佐剂混合, 制成油包水乳剂, 皮下注射 4 只家兔, 1 mL/只, 每周注射 1 次, 共 4 次。于末次注射 1 周后采血, 分离血清, 做双向琼脂扩散电泳, 观察有无抗体产生。

1.2.4 猪犬脾 TF 活性分析 采用白细胞黏附抑制试验^[7]。

2 结果

2.1 理化性质

2.1.1 性状 猪、犬脾的 TF 提取物均为透明、淡黄色、有特殊腥味的液体; 猪脾的 TF 提取物 pH 为 6.5, 犬脾的 TF 提取物 pH 为 6.7。

2.1.2 化学分析 猪、犬脾的 TF 提取物用 25% 磺基水杨酸检测蛋白反应, 未见白色浑浊, 说明猪、犬脾的 TF 提取物中不含大分子蛋白质。

2.1.3 紫外吸收光谱 猪脾的 TF 提取物吸收曲线见图 1, 犬脾的 TF 提取物吸收曲线见图 2。计算猪脾 TF 提取液的 $A_{260nm}/A_{280nm} = 3.028/1.250 = 2.42$, 犬脾 TF 提取液的 $A_{260nm}/A_{280nm} = 2.857/1.100 = 2.60$, 比值 >2 为合格产品质量控制标准^[7]。按照 OD 值计算活性单位的方法, 可计算出本试验制备的 TF 提取物每 mL 约为 2 个活性单位。

2.1.4 透析液有关成分含量 TF 提取物中, 猪 TF

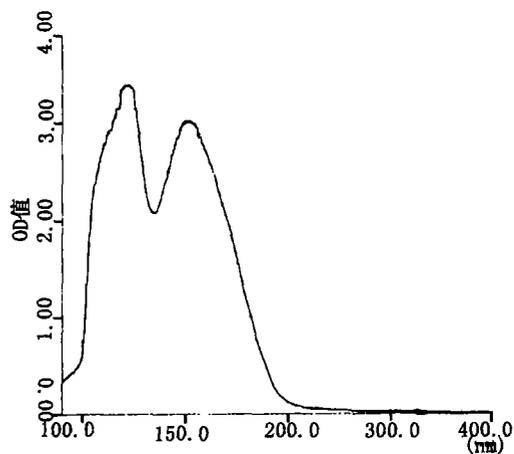


图 1 TF-P 的紫外吸收曲线

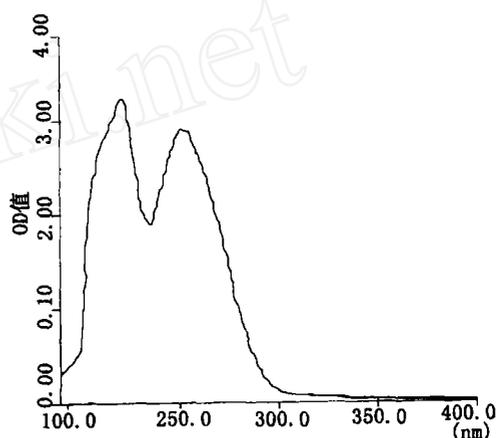


图 2 CS-TF 的紫外吸收曲线

含量为 1.21 mg/mL, DNA 含量为 82.8 μ g/mL, 核苷酸含量为 332.1 μ g/mL; 犬 TF 含量为 1.54 mg/mL, DNA 含量为 504.8 μ g/mL, 核苷酸含量为 302.3 μ g/mL。

2.1.5 氨基酸组分测定结果 猪脾的 TF 提取物中测定出 17 种氨基酸, 犬脾的 TF 提取物中测定出 15 种氨基酸, 换算成相对百分比含量见表 1 和表 2。

2.2 生物学特性检验

2.2.1 无菌检验 猪、犬脾的 TF 提取物接种于普通肉汤、血琼脂斜面、普通琼脂斜面、厌气肉肝汤, 37℃ 培养观察 7 d, 均无细菌等微生物生长。

2.2.2 安全试验 用猪、犬脾的 TF 提取物注射小鼠后, 其精神、食欲和活动状况均正常, 无一例死亡。剖检, 内部脏器无异常变化, 证明 TF 无毒性反应。

2.2.3 过敏试验 10 只豚鼠第 14 天及第 21 天腹腔注射 0.5 mg/mL TF 提取物后, 15 min 内观察未见连续干咳呼吸困难, 虚脱等明显病理症状及死亡等现象。

表 1 猪脾 TF 提取物中 17 种氨基酸百分含量

氨基酸	含量 / %	氨基酸	含量 / %
天门冬氨酸 Asp	9.61	蛋氨酸 Met	1.92
苏氨酸 Thr	1.23	异亮氨酸 Ile	3.74
丝氨酸 Ser	5.12	缬氨酸 Leu	7.14
谷氨酸 Glu	16.02	酪氨酸 Tyr	3.24
脯氨酸 Pro	4.43	苯丙氨酸 Phe	4.62
甘氨酸 Gly	9.08	赖氨酸 Lys	8.02
丙氨酸 Ala	9.54	组氨酸 Arg	3.24
胱氨酸 Cys	1.15	精氨酸 His	3.24
缬氨酸 Val	5.35		

表 2 犬脾 TF 提取物中 15 种氨基酸成分比含量

氨基酸	含量 / %	氨基酸	含量 / %
天门冬氨酸 Asp	13.12	异亮氨酸 Ile	4.51
苏氨酸 Thr	6.88	亮氨酸 Leu	9.43
丝氨酸 Ser	9.41	酪氨酸 Tyr	4.42
谷氨酸 Glu	26.03	苯丙氨酸 Phe	6.41
脯氨酸 Pro	6.13	赖氨酸 Lys	9.14
甘氨酸 Gly	12.31	组氨酸 His	4.45
丙氨酸 Ala	9.27	精氨酸 Arg	8.31
缬氨酸 Val	6.68		

2.2.4 热原试验 注射猪、犬脾的 TF 提取物的家兔体温变化不大,符合规程要求。

2.2.5 抗原性检验 检测结果呈阴性,家兔体内无抗体产生。

2.3 活性分析 猪脾 TF 提取物未黏附白细胞抑制指数 (NAI) 为 30%,犬脾 TF 提取物 NAI 为 35%,NAI (%) 20%,判定为活性合格^[9]。

3 讨论

3.1 猪、犬脾 TF 的提取 TF 的生物活性与供体的细胞免疫水平密切相关。制备非特异性 TF 应选用成年或细胞免疫功能正常或较强的畜禽作供体;而制备特异性 TF,应选择对该病原易感,经免疫后,对该抗原试验呈阳性反应的个体作为供体。本试验以猪、犬的健康脾脏组织为原料,经匀浆、冻融、透析可获得粗制 TF,制备方法简单,不需要特殊设备。此方法亦可适用于其他畜禽 TF 的提取,此为广泛研究与生产畜禽 TF 提供了便利条件。

另外,李学良等^[10]报道,动物 TF 的制备采用超滤法比透析法可使制剂总氮、核苷酸及核苷酸类物质的含量提高数倍,多肽含量多达 1 mg/mL,并能有效地克服透析法不能将有关成分完全透析出来的缺点,但制备过程较复杂,需要特殊设备。制备过程中,至关重要的问题是所有容器、用具、工作

场所均须严格无菌操作;新鲜脾脏不经冰冻亦可,但有的包膜不易剥离。空气中暴露时间过久,可能增加污染的机会。若制备口服液,在生产工艺上不能省去除菌过滤,否则会影响产品保质期。关于冻融操作,有的文献指出,需在 -20 反复冻融 10 次,而康钦树的改进方法^[11]利用普通冰箱冰冻层(可调节至 -5~-10),反复冻融 2~3 次,约经 36~48 h,亦可达到破碎淋巴细胞的目的,不需特殊的低温设备。

用本方法制得的猪、犬 TF 是成分复杂的混合物,含有 DNA、核苷酸等,具有和牛、羊、鸡等脾 TF 相似的理化性质^[12-13],无菌,无热原,无毒性,无致敏性,无抗原性,并且 $A_{260nm/280nm}$ 值也达到了较高的指标,与国内外其他 TF 的报道资料相符,说明该制品已达到国内外同类制品的水平^[8]。

3.2 猪、犬 TF 活性的测定方法 本试验猪、犬 TF 活性测定采用白细胞黏附法,同淋巴细胞 E 玫瑰花环试验法相比,可在当天得出测活结果^[14]。此方法简便易行,检验步骤简单易操作,检测时间迅速,便于工艺研究中大量样品分析。

3.3 剂量单位的确定 关于 TF 的剂量单位,由于缺乏恰当的动物模型及体外活性的测定方法,因此,目前多以白细胞数量来表示,即以 4×10^8 个白细胞的透析物为一个 TF 单位^[12]。但是,此方法计数麻烦,而且准确性差。特别是在以脾脏、淋巴结或扁桃腺等组织为原料时,在捣碎组织的同时会有很多白细胞遭到破坏,这样,要想准确计数就更为困难。故本试验以脾脏的重量来表示剂量单位,即 1 g 脾组织的透析物为 1 个 TF 单位(如按照 OD 值计算活性单位的方法,本试验 TF 提取物每 mL 约为 2 个活性单位),这种计量方法已经为众多学者所采用。

3.4 猪、犬 TF 的应用 TF 为一种免疫活性物质,具有活化淋巴细胞的作用,TF 作为 T 辅助细胞的分裂源,能促使 T 细胞释放更多的淋巴因子,以维持 T 细胞的生长,促进 T 细胞分裂,从而增加 T 细胞、T 辅助细胞和 T 抑制细胞的数量,加强了受体特异性细胞的免疫功能^[15]。此外,有人还发现 TF 对提高受体抗体水平亦有显著作用,即对受体细胞免疫和体液免疫具有双重作用,这为将 TF 应用于临床,尤其是犬细小病毒病、犬瘟热、犬传染性肝炎、犬冠状病毒感染等病毒性传染病的预防及治疗提供了依据^[16]。1987 年 Wilson 用特定的抗原免疫

牛,用牛乳制取特异性免疫调节剂,用以防治犬、猪和鸡的传染病,已取得美国农业部的许可。但另据报道,TF具有相对的种属特异性^[17],理论上讲特异性TF在犬病的治疗和防制方面较使用其他TF更为有效,至于对犬应用后效果如何,尚待进一步研究探讨。本试验所提取的猪、犬脾TF,作为治疗和预防犬病毒性传染病的一种新型生物制剂,其临床效果有待进一步证实。

参考文献:

- [1] 霍保来. 转移因子的研究进展 [M]. 北京:中国科学技术出版社, 1990.
- [2] 洪超明. TF的特性及免疫调节 [J]. 国外医学:生物制品分册, 1982, 5 (5): 196 - 198.
- [3] 朱其太. 转移因子及其在动物疾病防治中的应用 [J]. 中国兽医科技, 1992, 22 (1): 4 - 6.
- [4] 刘润珍,李世雄,姜力,等. 毛皮动物转移因子的研究与应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 1996, 3: 4 - 6.
- [5] 胡坚. 动物饲养学实验 [M]. 长春:吉林科技出版社, 1993.
- [6] 王家政,范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京:科学技术出版社, 2000; 51 - 54.
- [7] 卫生部生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 95版 [M]. 北京:人民出版社, 1996.
- [8] 金鑫,鲁承,李春洙. 猪脾转移因子的提取与特性鉴定 [J]. 延边农学院学报, 1996, 18 (2): 79 - 81.
- [9] 郑志勇. 猪脾转移因子成分分析及活性测定 [J]. 山西农业科学, 2003, 31 (4): 87 - 89.
- [10] 李学良,刘素珍. 动物转移因子的研究与临床应用 [J]. 中国兽医科技, 1995, 22 (10): 22 - 23.
- [11] 康钦树. 转移因子的制备法 [J]. 重庆医药, 1986, 2: 20 - 22.
- [12] 李文学,李海峰,李明哲,等. 犬脾脏转移因子的提取与鉴定 [J]. 延边大学农学学报, 2000, 22 (2): 122 - 126.
- [13] 佟世德,蒋忠军. 不同动物脾转移因子的成分分析 [J]. 中国兽医科技, 1995, 25 (9): 6 - 8.
- [14] 郑志勇. 猪脾转移因子成分分析及活性测定 [J]. 山西农业科学, 2003, 31 (4): 87 - 89.
- [15] 全炳昭,叶俊华. 犬转移因子等对淋巴细胞转化的影响 [J]. 中国兽医科技, 1994, 24 (8): 21 - 22.
- [16] 金炳昭. 犬脾脏摘除术及其转移因子的制备 [J]. 中国兽医科技, 1994 (7): 21 - 23.
- [17] 杜念兴. 兽医免疫学 [M]. 上海:科学技术出版社, 1985.

农业部积极组织科研攻关高致病性蓝耳病灭活疫苗正式投入生产

2006年夏季以来,我国部分地区陆续发生猪高致病性蓝耳病疫情,给养猪业造成严重损失。农业部多次召开会议进行专题研究,积极开展各项防控工作。组织有关单位加强高致病性蓝耳病灭活疫苗研究,及时落实研究经费,整合生产、科研方面力量,组织联合攻关。目前,经部属有关单位努力,新型高致病性蓝耳病灭活疫苗研制成功,4月29日通过农业部组织的专家审评,5月11日正式投产。

新型高致病性蓝耳病灭活疫苗是由中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所联合研制,利用流行的高致病性蓝耳病变异毒株做为种毒,经种毒筛选、中间试制、临床和扩大临床实验等一系列试验,证实对高致病性蓝耳病病毒有良好免疫效果,免疫保护率超过80%。该疫苗克服了国外同类病毒疫苗价格高、病毒易返强、效果不确实等问题。农业部兽药评审委员会专家认为,该疫苗安全有效、质量可控。该疫苗的投入使用,将对防控高致病性蓝耳病,保护养猪业健康发展发挥重要作用。

农业部根据评审委员会意见,积极组织新型高致病性蓝耳病灭活疫苗生产,目前安排6家兽用疫苗生产企业紧急生产,预计月底前投入使用。

(摘自:中国农业信息网 <http://www.agri.gov.cn> 2007 - 05 - 14)

猪转移因子对犬中性粒细胞数量和活性的影响

孔庆波^{1,4}, 陈进军², 常建军³, 张彦明⁴, 陈德坤⁴

(1. 中国刑事警察学院警犬技术系, 沈阳 110034; 2. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 湛江 524088;

3. 青海大学农牧学院, 西宁 810003; 4. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要:按标准方法提取制备了猪的转移因子(transfer factor, TF),用吞噬杀伤试验 MTT 法检测了供试杂种牧羊犬肌肉注射猪 TF 后外周血中性粒细胞吞噬杀伤活性的变化。试验摸索出 MTT 法测定犬外周血中性粒细胞吞噬杀伤大肠杆菌的最佳条件为:中性粒细胞浓度 1.3×10^6 个/ml、大肠杆菌浓度 6×10^5 个/ml 时,大肠杆菌和中性粒细胞混合培养 2 h,加入 MTT 后继续培养 4 h。体外试验结果表明,猪 TF 浓度在 0.052~1.56 mg/ml 范围内,能够明显促进中性粒细胞吞噬杀菌作用,当猪 TF 浓度为 1.56 mg/ml 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最大。体内试验结果表明,注射猪 TF 后第 2 d,外周血中性粒细胞数量最高,中性粒细胞吞噬杀菌能力最强。

关键词:猪转移因子; MTT 法; 中性粒细胞

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2008)01-0047-05

中性粒细胞为机体天然免疫系统的主要效应细胞,是机体抵御感染性病原体的第一道防线。它们可以迅速穿越毛细血管到达感染部位,发挥其吞噬清除异物、杀菌和细胞毒作用,因而在抗真菌、细菌和病毒感染中具有非常重要的地位(高贵民等, 2006)。中性粒细胞本身的寿命很短,外周血中性粒细胞更新代谢速度较快,多种免疫增强剂和多种细胞因子均能通过调节外周血中性粒细胞数量和活性来发挥其免疫效应(王国江等, 2004)。因此测定机体中中性粒细胞的数量变化,以及中性粒细胞对病原体的吞噬和杀伤能力,对于弄清免疫调节剂的作用机制,评估免疫增强剂的效果具有重要意义。

国外有关犬中性粒细胞功能的研究多集中在患病犬中性粒细胞化学发光活性、趋化性和数量变化(Antonino, 1992),未见转移因子(transfer factor, TF)影响犬外周血中性粒细胞吞噬杀菌活性方面的报道;国内关于 TF 对外周血中性粒细胞吞噬活性影响的报道多集中在小鼠、猪等方面(陈德坤等, 2001),未见关于 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响的报道。作者对此进行了研究,以期探讨猪 TF 作为免疫增强剂的作用机制,并为其应用于犬病防治的临床实践提供理论和试验依据,现将研究结果报告如下。

收稿日期: 2007-07-23

作者简介: 孔庆波(1969-),男,辽宁人,博士后,副教授,主要从事犬病研究和教学工作。

通讯作者: 陈德坤(1964-),男,陕西人,博士,教授,主要从事动物免疫学研究。

基金项目: 公安部科技局基金项目(20045829501)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 3~5 月龄健康杂种牧羊犬 24 头,购于陕西杨凌某养犬场。

1.1.2 试剂 转移因子,按西北农林科技大学免疫实验室建立的制作程序制备,冻干后 -20℃ 保存备用。RPMF1640 培养基(HyClone 公司),淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司),犊牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)(上海绿鸟科技发展有限公司),二甲基亚砷(DMSO)(AMResco 公司),台盼蓝(上海公私合营新中化学厂),肝素(华美生物工程公司),分析纯 NaHCO_3 (河南焦作市化工三厂),分析纯丙酮酸钠(河南焦作市化工三厂),Hepes(北方同正公司),2-巯基乙醇(2-Me)(北方同正公司),青霉素(哈药集团制药总厂),链霉素(大连美罗达药厂),明胶(青岛医疗器械站)。

1.1.3 溶液 1640 培养液:用三蒸水 1000 ml 溶解 1 袋 RPMF1640,电磁搅拌至完全溶解,1 mol/L HCl 调 pH 至 7.2~7.4,过滤除菌。完全 1640 培养液:取不完全 1640 培养液,按照 10% 的比例加灭活犊牛血清(FCS),混匀后即为完全 1640 培养液。无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hanks 液:按照金伯泉(2002)的方法配制,112℃ 灭菌 15 min,调 pH 至 7.2~7.4。Hepes 缓冲液:用三蒸水配成 1 mol/L 的溶液,过滤除菌。丙酮酸钠溶液:用三蒸水配成 0.1 mol/L 的溶液,过滤除菌。二巯基乙醇:配制成 5×10^{-3} mol/L 溶液,过滤除菌。双抗溶液:配成 10000 U/ml 的

溶液后应用。NaHCO₃ 溶液:配成 7.5% 的溶液, 115 灭菌 15 min。MTT 应用液:平衡盐溶液溶解(本试验用无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液)成 5 mg/ml 的浓度,过滤除菌。台盼蓝:配成 1% 的染液,1000 r/min 离心 10 min,取上清并过滤。Tris-NH₄Cl 缓冲液:用 Tris 和 NH₄Cl 配制为 pH7.2 的缓冲溶液。以上溶液均保存在 4℃ 冰箱。

1.1.4 主要仪器设备 96 孔聚乙烯塑料板(Costar 公司产品),LD4-2A 型离心机(北京医用离心机厂),二氧化碳培养箱(CE 公司),Model 550 酶标仪(BIO-RAD 公司),XS-18 型显微镜(江南公司),紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 猪 TF 的配制 将所制备的猪 TF 用完全 RPMF1640 溶解,调 pH 至 7.2~7.4,过滤除菌。将 TF 配制为 0.052、0.26、0.78、1.56 和 5 mg/ml 5 个不同的浓度。

1.2.2 大肠杆菌菌液的制备 大肠杆菌菌种由西北农林科技大学动物科技学院微生物实验室提供。菌种经增菌培养后,用生理盐水制成不同浓度的菌悬液(严华等,2003),浓度分别为 3×10^5 、 6×10^5 、 9×10^5 、 3×10^6 和 6×10^6 个/ml。

1.2.3 犬中性粒细胞悬液的制备 未注射猪 TF 之前,在犬前肢静脉血管处,无菌采取外周血,肝素抗凝,加入等量 3% 明胶液体,吹打均匀,37℃ 温箱静置 30~45 min,吸取上清,小心叠加于等体积的淋巴细胞分离液上,2000 r/min 离心 20 min,弃掉淋巴细胞层及上清,用 Tris-NH₄Cl 裂解红细胞,再用含 5% FCS 的无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液洗涤 3 次,每次 1000 r/min 离心 10 min,最后 1 次离心完毕后,弃上清,用完全 1640 培养液悬浮细胞,取 0.1 ml 细胞悬液用台盼蓝染色计数细胞(吴雄文等,2002; Mosmann,1983),细胞活力在 95% 以上。用完全 RPMF1640 将中性粒细胞分别调至 6.7×10^4 、 1.3×10^5 、 6.7×10^5 和 1.3×10^6 个/ml。

1.2.4 中性粒细胞杀菌活性最优测定条件的选择

按照正交试验,设计中性粒细胞、大肠杆菌 2 个因素,中性粒细胞悬液设 4 个浓度水平,大肠杆菌设 6 个浓度水平。试验设 3 个组别,试验组:中性粒细胞+大肠杆菌;对照组:中性粒细胞;空白组:加入完全 RPMF1640。每个样品各设 3 个重复孔,每孔均为 200 μl。中性粒细胞加入量为 100 μl,大肠杆菌加入量为 50 μl,不足的用完全 RPMF1640 补足。利用 MTT 法进行测定,选出各因素的最佳浓度水平,用

于测定猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响。测出 OD 值后,计算出刺激指数(stimulate index,SI),用 SI 表示结果,公式如下:

$$SI = (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{试验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})$$

1.2.5 猪 TF 体外对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响的测定 在试验因素最优组合确定的情况下,加入猪 TF,研究不同浓度的猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响,找出猪 TF 的最佳刺激量。猪 TF 设 0.052、0.26、0.78、1.56 和 5 mg/ml 共 5 个浓度。试验共设 3 个组别,试验组:中性粒细胞+大肠杆菌+转移因子;对照组:中性粒细胞+大肠杆菌;空白组:加入完全 RPMF1640 200 μl。每个样品设 3 个重复孔,每孔总量 200 μl。细胞加入量为 100 μl,大肠杆菌和 TF 加入量均为 50 μl,不足的用完全 RPMF1640 补足。结果用 SI 表示。

1.2.6 猪 TF 体内(犬注射猪 TF 后)对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响的测定 猪 TF 设 0.052、0.26、0.78、1.56 和 5 mg/ml 共 5 个注射浓度,每个注射浓度对每头犬肌肉注射 4 ml,注射猪 TF 后每天采血,犬中性粒细胞悬液的制备同 1.2.3。试验共设 3 个组别,试验组:注射猪 TF 后犬中性粒细胞+大肠杆菌;对照组:未注射猪 TF 犬中性粒细胞+大肠杆菌;空白组:加入完全 RPMF1640 200 μl。每个样品设 3 个重复孔,每孔总量 200 μl。细胞加入量为 100 μl,大肠杆菌和完全 RPMF1640 加入量均为 50 μl,不足的用完全 RPMF1640 补足。结果用 SI 表示。

1.2.7 统计分析 用统计软件 SPSS 分析试验数据,刺激指数均用 $\bar{X} \pm s$ 表示。数据使用 Excel 2000 和 SPSS (Version11.0) 统计软件处理,以单因素方差分析(One-way ANOVA) 进行统计,数据以均值 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异显著。统计分析前,用 Kolmogorov-Smirnov 对数据进行正态分布检验。经检验,原始数据符合正态分布。

2 结果

2.1 试验因素最优组合的确定 不同细胞浓度下犬外周血中性粒细胞杀菌活性的正交试验结果,用 SI 值表示。由表 1 可见,当细胞浓度为 1.3×10^6 个/ml,大肠杆菌的浓度为 6×10^5 个/ml 时,SI 值最大,即中性粒细胞在该浓度组合下杀菌活性最好,并且通过 t 检验,在该浓度下中性粒细胞的杀菌活性是显著的($P < 0.05$),所以在体内外试验中均采用该浓度组合。

表1 不同细胞浓度对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响

大肠杆菌浓度 (个/ml)	嗜中性粒细胞浓度 (个/ml)			
	6.7×10^4	1.3×10^5	6.7×10^5	1.3×10^6
6×10^6	1.361 ± 0.169 ^{ab}	1.223 ± 0.241 ^{ab}	1.219 ± 0.206 ^b	1.354 ± 0.156 ^b
3×10^6	1.352 ± 0.170 ^{ab}	1.169 ± 0.281 ^c	1.306 ± 0.318 ^{ab}	1.324 ± 0.273 ^b
9×10^5	1.231 ± 0.021 ^c	1.128 ± 0.311 ^b	1.239 ± 0.221 ^b	1.442 ± 0.318 ^a
6×10^5	1.414 ± 0.136 ^a	1.283 ± 0.076 ^a	1.296 ± 0.144 ^{ab}	1.470 ± 0.298 ^a
3×10^5	1.317 ± 0.235 ^b	1.174 ± 0.195 ^c	1.363 ± 0.229 ^a	1.330 ± 0.257 ^b

注：同列数据肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 猪 TF 影响杀菌活性的最佳浓度选择 由图 1 可见,当猪 TF 浓度为 1.56 mg/ml 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最大,所以该猪 TF 浓度为最理想的浓度。当猪 TF 浓度为 5 mg/ml 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最小,而在 0.052 ~ 1.56 mg/ml 这个浓度范围内,猪 TF 促中性粒细胞杀菌的效果均比较明显,所以在后来的试验中放弃 5 mg/ml 不用。

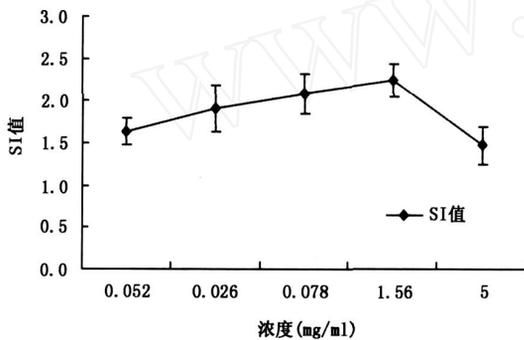


图1 不同浓度猪 TF 对外周血中性粒细胞杀菌活性的影响

2.3 注射最佳浓度猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响 图 2 显示,在注射猪 TF 后的第 2 d 中性粒细胞的单独杀菌活性最好,以后则呈现逐渐下降的趋势。

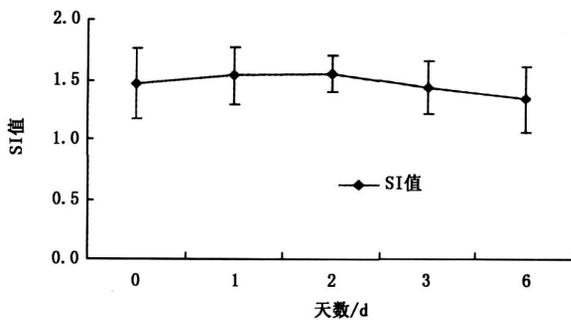


图2 犬外周血中性粒细胞单独杀菌活性的测定

2.4 注射不同浓度猪 TF 在不同时间对犬中性粒细胞杀菌活性的影响 表 2 显示,在注射猪 TF 后第 2 d,SI 值最高,说明此时猪 TF 对犬外周血中性

粒细胞的杀菌活性影响最大,而在以后的几天内 SI 值则呈逐渐下降的趋势,该趋势与中性粒细胞单独吞噬杀菌的变化趋势相一致。当猪 TF 的浓度为 1.56 mg/ml 时,对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响普遍大于其他浓度猪 TF 对中性粒细胞杀菌活性的影响,充分验证了 1.56 mg/ml 为促进犬外周血中性粒细胞杀菌活性的最佳浓度。

2.5 注射最佳浓度猪 TF 在不同时间对犬外周血中性粒细胞数量的影响 表 3 显示,在注射猪 TF 后的第 2 d 中性粒细胞数量达到最大值,该结果与中性粒细胞单独作用、猪 TF 协同中性粒细胞作用的最佳杀菌活性时间相一致。由此可见,猪 TF 对犬外周血中性粒细胞的最佳作用时间是在注射后的第 2 d。

3 讨论

3.1 中性粒细胞也是 TF 的靶细胞之一 中性粒细胞主要通过其吞噬作用、分泌具有杀伤活性的活性颗粒、细胞毒作用等方式发挥其杀菌溶菌效应 (Barbior, 1984)。机体外周血中的中性粒细胞通常以静息态形式存在,吞噬异物或受到促炎因子刺激后中性粒细胞被激活,发生一系列形态学或生物化学变化,其生物学功能随之增强 (方先勇等, 2002; 潘连德等, 2000)。

本研究结果表明,TF 不仅能够增强犬中性粒细胞的杀菌活性,还能增加犬外周血中性粒细胞的数量,通过这两点来达到改善犬天然免疫功能的效应;在中性粒细胞培养系统中加入 TF 后,中性粒细胞杀菌活性明显得到增强,这表明 TF 可直接作用于中性粒细胞而提高其杀菌活性,据此认为,TF 作为免疫因子发挥其作用时的靶细胞不仅仅限于 T 淋巴细胞,中性粒细胞也应是 TF 的靶细胞,这与陈德坤等 (2001) 的相关研究一致,是否还有其它的免疫细胞也是 TF 的靶细胞还有待于进一步研究。本研究首次报道了 TF 对犬外周血中性粒细胞吞噬杀菌活性的影响。猪 TF 是通过增强犬中性粒细胞的杀菌活性和增加犬外周血中性粒细胞的数量来达到改善犬天然免疫功能的效应。

表2 不同浓度猪 TF 在不同时间对中性粒细胞杀菌活性的影响

猪 TF 剂量(mg/ml)	注射猪 TF 后不同时间的 SI 值				
	0 d	1 d	2 d	3 d	6 d
1.56	2.244 ±0.218	2.284 ±0.153	2.834 ±0.192	1.621 ±0.311	2.015 ±0.268
0.78	2.095 ±0.227	2.007 ±0.290	2.517 ±0.168	2.017 ±0.210	1.876 ±0.179
0.26	1.907 ±0.281	1.927 ±0.233	2.566 ±0.234	1.774 ±0.159	1.601 ±0.110
0.052	1.635 ±0.127	1.592 ±0.205	2.378 ±0.171	1.459 ±0.257	1.358 ±0.215

表3 注射猪 TF 后的不同时间犬外周血中性粒细胞的数量

注射猪 TF 的不同时间(d)	0	1	2	3	6
中性粒细胞数量(10^6 个/ml)	4	10	11.3	9.3	5.3

3.2 TF 导致中性粒细胞数量变化原因的推测 中性粒细胞在骨髓中历经约 14 d 的时间发育成熟,经血液循环被储存在脾脏中。通常情况下外周血中的中性粒细胞数量保持稳定水平,由于中性粒细胞的半衰期只有 4~10 h,因此脾脏作为中性粒细胞的储存库不断释放成熟中性粒细胞到外周血以维持中性粒细胞的更新。炎症状态下或受免疫增强剂的刺激,外周血中性粒细胞数量升高,机体抗病原微生物侵袭的能力增强(成勇钢等,2006;闻平等,2001,2003)。

本研究结果显示,在注射 TF 后的第 2 d 中性粒细胞数量达到峰值,然而中性粒细胞在中枢免疫器官成熟后释放到外周血中需要 2 周的时间,所以中性粒细胞数量的增多不是由该原因引起的,由此推测短期内中性粒细胞数量的增多是由作为中性粒细胞储存库的脾脏不断的向外周血释放所引起的。

3.3 MTT 法能较全面地反映中性粒细胞抗感染能力 在本试验所采用 MTT 法测定中性粒细胞杀菌活性的系统中,只有活的大肠杆菌能够利用 MTT,大肠杆菌的数量越多所利用的 MTT 就越多,反之,被中性粒细胞杀死和吞噬的大肠杆菌越多,MTT 能被利用的就越少,据此认为本试验所测定的是中性粒细胞的吞噬和杀菌活性,而不仅仅是中性粒细胞的吞噬功能,这是本法在测定中性粒细胞免疫活性时优于常规吞噬试验的关键所在,因此 MTT 法更能较为全面地反映中性粒细胞的抗细菌感染能力(赵修春等,2004;孙白彬等,2004;俞晔珩等,2005)。在研究中还发现,单独加入中性粒细胞的试验孔 OD 值要高于中性粒细胞和细菌共同作用孔的 OD 值。据此推测,中性粒细胞也能够利用 MTT,另外,中性粒细胞吞噬杀灭大肠杆菌导致中性粒细胞和大肠杆菌共同作用孔中的大肠杆菌数量减少,而活化的中性粒细胞利用 MTT 的能力不如静息态的中性粒细胞,从而使得该孔 OD 值降低。事实是否如此,有待进一步的试验证实。

本研究摸索出了用 MTT 法测定犬外周血中性粒细胞吞噬杀伤大肠杆菌的较佳条件。当中性粒细胞浓度为 1.3×10^6 个/ml,大肠杆菌的浓度为 6×10^5 个/ml 时,大肠杆菌和中性粒细胞混合培养 2 h,加入 MTT 后继续培养 4 h,测定试验结果,能够灵敏反映出中性粒细胞吞噬杀伤大肠杆菌的效果。本试验进一步证明此法更能较为全面的反映中性粒细胞的抗细菌感染能力,在测定中性粒细胞免疫活性时优于常规的吞噬试验。

3.4 猪 TF 临床应用的最佳剂量 体外试验结果表明,在 0.052~1.56 mg/ml 这个浓度范围内,猪 TF 均有明显促进中性粒细胞吞噬杀菌作用,当 TF 浓度为 1.56 mg/ml 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最大;体内试验结果表明,注射猪 TF 后第 2 d,外周血中性粒细胞数量最高,与此时中性粒细胞体外吞噬杀菌能力最强相符。本研究结果为确定猪 TF 临床应用的最佳剂量提供了依据。

目前在犬病临床广泛应用的增强免疫功能的制品是特异性高免血清、干扰素、胸腺肽等,但由于这些药品大部分具有严格的种属特异性,加之目前犬药品市场比较混乱,价格高,质量难以保证,以及在临床应用中受到产品原料的来源和成本的限制。因此必须选用一种安全可靠、价廉高效,又具有广泛性免疫增强作用的免疫增强剂。鉴于猪血源材料充足,以及猪脾脏、淋巴结等淋巴细胞生成和贮存器官作为肉食动物屠宰业的副产品,易于获取,且价格低廉,对此物质中的成分作为新型免疫增强剂进行开发研制,对临床防治犬病毒性传染病将会起到重要作用。

参 考 文 献

- 1 王国江,顾军,张海清. 青蒿琥酯对中性粒细胞趋化的影响[J]. 中国皮肤性病杂志,2004,18(7):391~393,411.
- 2 严华,朱永泽主编. 医学形态实验教程(第一版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2003,201~260.
- 3 吴雄文,梁智辉主编. 实用免疫学实验技术(第一版)[M]. 湖北:科学技术出版社,2002,125~160.
- 4 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学实验技术(第一版)[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002,102~114.
- 5 闻平,黄锡全. 孕激素对外周血中性粒细胞杀念珠菌作用的影响

- [J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11(6): 40~41.
- 6 闻平, 王蓉芳. 阿奇霉素对健康成人外周血中性粒细胞功能的影响[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003, 3(1): 36~37.
- 7 俞晔珩, 朱文胜, 王晓川. 流式细胞仪测定成人与儿童中性粒细胞功能[J]. 复旦学报(医学版), 2005, 32(1): 101~104.
- 8 高贵民, 吴健民. 嗜酸性粒细胞活化趋化因子与支气管哮喘的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(2): 93~96.
- 9 Antonino M. Correlation between CD11b/CD18 and increase of aggregability of granulocytes in coronary artery disease [J]. Springer Science Business Media B V, Formely Kluwer Academic Publishers B V, 1992, 5(2): 315~323.
- 10 Barbior B M. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction [J]. Blood, 1984, 64: 950.
- 11 Mosmann T J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Immun Method, 1983, 65(1): 55.

Effects of Swine Transfer Factor on Number and Bactericidal Activity of Neutrophilic Granulocytes from Canines in Vitro

KONG Qing-bo^{1,4}, CHEN Jin-jun², CHANG Jian-jun³, ZHANG Yan-ming⁴, CHEN De-kun⁴

(1. Dept of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China;

2. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810003, China;

4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The requisite swine transfer factor (TF) was prepared by relative standards and was intramuscularly injected to a range of hybrid shepherd dogs to determine the number and bactericidal activity of neutrophilic granulocyte in canine peripheral blood by phagocytosis MTT. And the best condition for MTT to be applied into determining the ability of phagocytosis of neutrophilic granulocyte against *Escherichia coli* in canine peripheral blood were explored as 1.3×10^6 cells/ml of neutrophilic granulocytes and 6×10^5 units/ml had been mixed and incubated together for 2 hours followed by adding MTT and incubating for another 4 hours. The results of experiments *in vitro* showed that swine TF at 0.052~1.56 mg/ml markedly promoted the phagocytosis of neutrophilic granulocyte against *E. coli*, with the strongest effect to the phagocytosis of neutrophilic granulocyte against *E. coli* at 1.56 mg/ml; The number of neutrophilic granulocytes in canine peripheral blood climbed to the summit and the effect of phagocytosis of neutrophilic granulocyte against *E. coli* was the strongest on the 2nd day after the dogs were intramuscularly injected with swine TF.

Key words: swine transfer factor; MTT assay; neutrophilic granulocytes

饲喂不同淀粉来源开食料对犊牛(饲料消耗、体增重、骨骼生长和血液代谢产物)的影响

M. A. Khan 等著 栾绍宇摘译 卜登攀校

摘要: 为了研究饲喂不同淀粉来源开食料对犊牛的影响, 试验分 4 组, 每组 16 头, 分别采用大麦淀粉、玉米淀粉、燕麦淀粉和小麦淀粉。开食料采用颗粒料, 其中包含 25% 的淀粉, 试验期为 12 周。分别在断奶前(1~49 日龄)和断奶后(50~84 日龄)测定饲料消耗、营养摄入量、体增重、骨骼生长和一些血液指标。整个试验周期内开食料平均采食量由低到高依次为: 玉米淀粉组、小麦淀粉组、大麦淀粉组和燕麦淀粉组。断奶前, 饲喂玉米淀粉组和小麦淀粉组犊牛消耗的粗饲料比其它两组多。断奶后, 饲喂玉米淀粉组犊牛粗饲料的采食量最高, 小麦淀粉组、大麦淀粉组和燕麦淀粉组次之。干物质、粗蛋白质、淀粉和中性洗涤剂纤维的摄入量根据固体饲料采食量计算。出生、断奶和断奶后(84 日龄)分别测量体重、前脊高、后脊高、胸围、腹围和体长, 出

生时和断奶时各组犊牛间这些数据差异均不显著, 但饲喂玉米淀粉组犊牛体重和体尺均高于其它组。整个试验期的平均日增重、总干物质采食量、饲料利用率从大到小依次为: 玉米淀粉组、小麦淀粉组、大麦淀粉组和燕麦淀粉组。血糖、血中尿素氮、甘油三酯、胆固醇和肌酸酐都随着日龄的增大而减小。与饲喂小麦淀粉组、大麦淀粉组和燕麦淀粉组的犊牛相比, 玉米淀粉组犊牛在第 8、10、12 周血糖低而尿素氮浓度高。燕麦淀粉组的腹泻率比其它组的高。添加淀粉的开食料对犊牛的呼吸、体温和日常表现没有影响。综上所述, 饲喂添加玉米淀粉犊牛开食料的采食量高于其它 3 组。

关键词: 淀粉; 犊牛开食料; 生长

(原载: J Dairy Sci, 2007, 90: 5259~5268)

猪转移因子影响犬外周血中性粒细胞 杀菌活性的最佳浓度选择

孔庆波^{1,3}, 陈进军², 陈德坤³, 张彦明³

(1. 中国刑事警察学院 警犬技术系, 辽宁 沈阳 110034; 2. 广东海洋大学 农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 3. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

中图分类号: S858.292

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2008)01-0086-03

在机体的天然免疫系统中, 中性粒细胞为主要的效应细胞, 它是机体抵御感染性病原体的第一道防线, 可以迅速穿越机体生理屏障到达局部组织。中性粒细胞的主要功能为吞噬、清除异物, 杀菌和细胞毒作用, 因此, 中性粒细胞在抗真菌、细菌、病毒感染中的地位非常重要。中性粒细胞本身的寿命很短, 因而外周血的中性粒细胞更新代谢速度比较快, 免疫增强剂和多种细胞因子均能通过调节外周血中的中性粒细胞数量和活性来发挥其免疫效应。

本试验欲摸索出测定犬外周血中性粒细胞吞噬、杀伤大肠杆菌的最佳条件及猪转移因子(transfer factor, TF)影响犬外周血中性粒细胞杀菌活性的最佳浓度, 以期进一步深入研究 TF 对犬中性粒细胞数量和活性的影响, 现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 3~5 月龄健康杂种牧羊犬 24 只, 购于陕西杨凌某养犬场。

1.1.2 试验试剂 转移因子, 按西北农林科技大学免疫实验室建立的制作程序制备, 冻干后 -20℃ 保存, 备用; RPMI-1640 培养基, HyClone 公司产品; 淋巴细胞分离液, 上海恒信化学试剂有限公司产品; 犊牛血清, 中美合资兰州民海生物工程有限公司产品; 四甲基偶氮唑蓝(MTT), 上海绿鸟科技发展有限公司产品; 二甲亚砜(DMSO), aMResco 公司产品; 台盼蓝, 上海公私合营新中化学厂产品; 肝素, 华美生物工程公司产品; NaHCO₃、丙酮酸钠(分析纯), 河南焦作市化工三厂产品; HEPES、2-巯基乙醇(2-Me), 北方同正公司产品; 青霉素, 哈药集团制药总厂产品; 链霉素, 大连美罗达药厂产品; 明胶, 青岛医疗器械站产品。

1.1.3 主要溶液的配制 1640 培养液: 用三蒸水 1 000 mL 溶解 1 袋 RPMI-1640, 电磁搅拌至完全溶解, 1 mol/L HCl 调 pH 值至 7.2~7.4, 过滤除菌。

完全 1640 培养液: 取不完全 1640 培养液, 按照 10% 的比例加灭活犊牛血清(FCS), 混匀后即为完全 1640 培养液。

无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液: 参照文献[1] 配制, 112℃ 灭菌 15 min, 调 pH 值至 7.2~7.4。

HEPES 缓冲液: 用三蒸水配成 1 mol/L 的溶液, 过滤除菌。

丙酮酸钠溶液: 用三蒸水配成 0.1 mol/L 的溶液, 过滤除菌。

二巯基乙醇: 配成 5 × 10⁻³ mol/L 溶液, 过滤除菌。

双抗溶液: 配成 1 万 IU/mL 的溶液后应用。

NaHCO₃ 溶液: 配成 7.5% 的溶液, 115℃ 灭菌 15 min。

MTT 应用液: 平衡盐溶液溶解(本试验用无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液)成 5 mg/mL, 过滤除菌。

台盼蓝: 配成 1% 的染液, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液并过滤。

Tris-NH₄Cl 缓冲液: 用 Tris 和 NH₄Cl 配成 pH 值为 7.2 的缓冲溶液。

以上溶液均保存在 4℃ 冰箱中备用。

1.1.4 主要仪器 96 孔聚乙烯塑料板, Costar 公司产品; 1~10 μL、50~100 μL 微量加样器, Finnpiette 公司产品; LD4-2A 型离心机, 北京医用离心机厂产品; CO₂ 培养箱, CE 公司产品; Model 550 酶标仪, BIO-RAD 公司产品; XS-18 型显微镜, 江南公司产品; 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 猪 TF 的配制 采用西北农林科技大学免疫实验室建立的方法制备, 冷冻干燥, -20℃ 保存, 备用。使用时准确称量, 用完全 RPMI-1640 溶解, 调 pH 值至 7.2~7.4, 滤过除菌。将 TF 配制为 0.052,

收稿日期: 2006-12-08

基金项目: 公安部科技局资助项目(20045829501)

作者简介: 孔庆波(1969-), 男, 副教授, 博士。

0.26, 0.78, 1.56, 5 mg/mL 5个不同的浓度。

1.2.2 大肠杆菌菌液的制备 大肠杆菌菌种由西北农林科技大学动物科技学院微生物实验室提供。菌种经增菌培养后,用生理盐水制成不同浓度的菌悬液,浓度分别为 3×10^5 , 6×10^5 , 9×10^5 , 3×10^6 , 6×10^6 个/mL 5个不同的浓度。

1.2.3 犬中性粒细胞悬液的制备 在犬前肢静脉血管处,无菌取外周血,肝素抗凝;加入等量3%明胶液体,吹打均匀,37℃温箱静置30~45 min;吸取上清液,小心滴加于等体积的淋巴细胞分离液上,2000 r/min离心20 min,弃掉淋巴细胞层及上清液;用 Tris - NH₄Cl 裂解红细胞,再用含5% FCS 的无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 液洗涤3次,每次1000 r/min 离心10 min,最后一次离心完毕后,弃上清液;用完全1640培养液悬浮细胞,取0.1 mL 细胞悬液用台盼蓝染色计数细胞,细胞活力在95%以上。用完全 RPMI - 1640 将中性粒细胞分别调成 6.7×10^4 , 1.3×10^5 , 6.7×10^5 , 1.3×10^6 个/mL 4个不同浓度。

1.2.4 犬外周血中性粒细胞杀菌活性的最优条件选择 按照正交试验,设计中性粒细胞和大肠杆菌2个因素。中性粒细胞悬液设4个浓度水平;大肠杆菌设6个浓度水平;试验设3个组别,试验组(中性粒细胞+大肠杆菌)、对照组(中性粒细胞)、空白组(完全 RPMI - 1640)。每个样品各设3个重复孔,每孔均为200 μL。中性粒细胞加入量为100 μg,大肠杆菌加入量为50 μg,不足的用完全 RPMI - 1640 补足。试验结果用 MTT 法测定,选出各因素的最佳浓度水平,供测定猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响试验使用。测出 OD 值后,计算出刺激指数(SI),公式为 $SI = (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{试验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})$ 。

1.2.5 猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响的测定 在试验因素最优组合确定的情况下,加入猪 TF,研究不同浓度的猪 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响,寻求猪 TF 的最佳刺激量。猪 TF 共设0.052, 0.26, 0.78, 1.56, 5 mg/mL 5个浓度。试验共设3个组别,试验组为中性粒细胞+大肠杆菌+TF;对照组为中性粒细胞+大肠杆菌;空白组为完全 RPMI - 1640 200 μL。每个样品设3个重复孔,每孔总量200 μL。细胞加入量为100 μL,大肠杆菌和 TF 加入量均为50 μL,不足的用完全 RPMI - 1640 补足。结果用 SI 表示。

1.2.6 统计分析 用统计软件分析每次的试验数据,刺激指数均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 试验因素最优组合的确定(见表1)

表1 不同浓度细胞对犬外周血中性粒细胞杀菌活性的影响

大肠杆菌浓度 (个·mL ⁻¹)	6.7×10^4 个/mL	1.3×10^5 个/mL	6.7×10^5 个/mL	1.3×10^6 个/mL
6×10^6	1.361 ± 0.169	1.223 ± 0.241	1.219 ± 0.206	1.354 ± 0.156
3×10^6	1.352 ± 0.170	1.169 ± 0.281	1.306 ± 0.318	1.324 ± 0.273
9×10^5	1.231 ± 0.021	1.128 ± 0.311	1.239 ± 0.221	1.442 ± 0.318
6×10^5	1.414 ± 0.136	1.283 ± 0.076	1.296 ± 0.144	1.470 ± 0.298
3×10^5	1.317 ± 0.235	1.174 ± 0.195	1.363 ± 0.229	1.330 ± 0.257

由表1可知,当细胞浓度为 1.3×10^6 个/mL,大肠杆菌浓度为 6×10^5 个/mL 时,SI 值最大,即中性粒细胞在该浓度组合下杀菌活性最好,并且通过 t 检验,在该浓度下中性粒细胞的杀菌活性是显著的,因此在体内外试验中均采用该浓度组合。

2.2 猪 TF 影响杀菌活性的最佳浓度选择

在最佳细胞浓度与大肠杆菌浓度的组合下,进行猪 TF 促进中性粒细胞杀菌活性的最佳浓度选择的体外试验,见表2。

表2 不同浓度的猪 TF 对外周血中性粒细胞杀菌活性的影响

项目	0.052 mg/mL	0.260 mg/mL	0.780 mg/mL	1.56 mg/mL	5.000 mg/mL
SI 值	1.635 ± 0.159	1.907 ± 0.266	2.085 ± 0.234	2.244 ± 0.197	1.473 ± 0.218

由表2可知,当猪 TF 浓度为1.56 mg/mL 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最大,是最理想的猪 TF 浓度;当猪 TF 浓度为5 mg/mL 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最小;而在0.052~1.56 mg/mL 这个浓度范围内,猪 TF 促中性粒细胞杀菌的效果均比较明显。

3 讨论

(1) 中性粒细胞作为机体免疫应答中的功能执行单位,主要通过其吞噬作用、分泌具有杀伤作用的活性颗粒及细胞毒作用等方式发挥其杀菌及溶菌效应。机体外周血中性粒细胞通常以静息态形式存在,吞噬异物或者受到促炎因子刺激后中性粒细胞被激活,发生一系列形态学或生物化学变化,其生物学功能随之增强。国外有关犬中性粒细胞功能的研究多集中在患病犬中性粒细胞化学发光活性、趋化性和数量变化方面,未见关于 TF 影响犬外周血中性粒细胞吞噬、杀菌活性方面的任何报道。国内关于 TF 对外周血中性粒细胞吞噬活性影响的报道多集中在小鼠、猪等动物上,也未见到关于 TF 对犬外周血中性粒细胞杀菌活性影响方面的报道。

(2) 本试验结果表明,在中性粒细胞培养系统中加入 TF 后,中性粒细胞杀菌活性明显得到增强,这

表明 TF 可直接作用于中性粒细胞提高其杀菌活性,据此认为,TF 作为免疫因子发挥其作用时的靶细胞不仅仅局限于 T 淋巴细胞,中性粒细胞也是 TF 的靶细胞,是否还有其他免疫细胞有待于进一步研究。

(3) 在 MTT 法测定的中性粒细胞杀菌活性的系统中,只有活的大肠杆菌能够利用 MTT,大肠杆菌的数量越多所利用的 MTT 就越多;反之,被中性粒细胞杀死和吞噬的大肠杆菌越多,MTT 能被利用的就越少。据此认为本试验所测定的是中性粒细胞的吞噬和杀菌活性,而不仅仅是中性粒细胞的吞噬功能,这是本法在测定中性粒细胞免疫活性时优于常规吞噬试验的关键所在。因此,MTT 法更能全面地反映中性粒细胞的抗细菌感染能力。

4 小结

本研究首次报道了 TF 对犬外周血中性粒细胞吞噬、杀菌活性的影响。研究结果证明,TF 是通过增

强犬中性粒细胞的杀菌活性来改善犬天然免疫功能效应的。试验摸索出了用 MTT 法测定犬外周血中性粒细胞吞噬、杀伤大肠杆菌的最佳条件。当细胞浓度为 1.3×10^6 个/mL,大肠杆菌浓度为 6×10^5 个/mL 时,大肠杆菌和中性粒细胞混合培养 2 h,加入 MTT 后继续培养 4 h,测定试验结果,能够灵敏反映出中性粒细胞吞噬、杀伤大肠杆菌的效果。因为 MTT 法能全面地反映中性粒细胞的抗细菌感染能力,所以在测定中性粒细胞免疫活性时优于常规的吞噬试验。而且体外试验研究结果表明,在 0.052 ~ 1.56 mg/mL 这个浓度范围内,猪 TF 均有明显促进中性粒细胞吞噬、杀菌作用,当 TF 浓度为 1.56 mg/mL 时,对中性粒细胞杀菌活性的影响最大。

参考文献:

- [1] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002. (011)

肤螨灭对犬蠕形螨皮肤病分离 细菌的体外抑菌效果观察

杨 军¹, 左之才¹, 朱兆合², 邓俊良¹, 李洪波¹, 刘 涛¹, 黄颖婕¹

(1. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川宜宾佳宝宠物医院, 四川 宜宾 645000)

中图分类号: S853.7

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2008)01-0088-02

近年来,由于宠物业的兴起,宠物犬的数量增多,犬只的接触机会也随之增多,由接触引起的传染性皮肤病,特别是蠕形螨病呈上升趋势。在兽医临床上,因其防治效果受各种因素的影响,难以彻底治愈,所以复发率高。试验根据传统的中兽医理论,结合现代中药药理学研究成果,选用具有杀虫、抗菌消炎和抗过敏作用的中药进行多次配伍与临床疗效验证,最后组方成治疗犬皮肤病的纯复方中药制剂——肤螨灭。为了进一步了解该药对犬蠕形螨皮肤病继发感染细菌的抑菌效果,试验对从 16 例病犬中分离所得的 3 株继发感染细菌进行了药敏试验及最小抑菌浓度(MIC)试验,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试药物:肤螨灭(四川农业大学临床兽医系内

科诊断教研组研制);硫酸庆大霉素注射液(秦皇岛市北戴河兽药有限责任公司,批号 20050106);青霉素(天津太脱拉动物保健品厂,批号 20050519);盐酸林可霉素注射液(福建省三爱药业股份有限公司,批号 200501);甲硝唑注射液(石家庄四药有限公司,批号 200501);盐酸环丙沙星注射液(拜耳医药保健有限公司,批号 200601)。

供试动物:四川农业大学门诊确诊为蠕形螨继发感染细菌的病犬(排除 1 周内使用过抗生素的病犬),共 16 例。

供试细菌:病犬的皮肤病变部位分离出的细菌。

主要仪器及试剂:隔水式电热恒温培养箱[产品注册号为沪药管械(准)字 2001 第 2410140 号];微量加样枪(10 ~ 100 μ L, 100 ~ 1000 μ L);平皿(直径 9 cm)、牛肉浸膏(由国药集团化学试剂有限公司生产,批号 F20040607);蛋白胨(由成都市华西生化制品厂生产,批号 20050119);氯化钠(由成都市石羊化学制剂厂生产,批号 20050224);营养琼脂(由杭州微生物试剂有限公司生产,批号 20040520)等。

1.2 方法

收稿日期:2007-01-06

基金项目:四川农业大学动物科技学院青年基金项目(DKY0502)

作者简介:杨 军(1982-),男,硕士研究生。

通讯作者:左之才(1974-),男,讲师,硕士。