

# 金欣口服液对呼吸道合胞病毒感染人胚肺成纤维细胞胞内钙离子的影响\*

★ 陈彩霞\*\* 汪受传 (南京中医药大学儿科研究所 南京 210029)

**摘要:**目的:探讨金欣口服液对呼吸道合胞病毒(RSV)感染细胞内的钙离子影响。方法:体外建立 RSV A 型 LONG 株攻击体外培养的人胚肺成纤维细胞模型,设正常细胞组、病毒组、空白血清组、利巴韦林组和金欣口服液组。采用激光共聚焦技术检测其对感染细胞不同时间点的胞内钙离子的变化。结果:RSV 感染 24 h 细胞内钙离子与正常细胞组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ),空白血清、利巴韦林、金欣口服液组和病毒组相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。RSV 感染 48、72 h 均高于细胞组( $P < 0.05$ );空白血清组 48 h 与病毒相比无差异( $P > 0.05$ ),72 h 低于病毒组( $P < 0.05$ );利巴韦林组和金欣口服液组 48、72 h 均低于病毒组,且有显著性差异( $P < 0.05$ )。金欣口服液组和利巴韦林组相比,48 h 有显著性差异( $P < 0.05$ ),但 72 h 无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论:金欣口服液可能抑制成纤维细胞的钙离子内流,这也许是金欣口服液抑制 RSV 感染细胞凋亡的一个因素。金欣口服液可作为早期抗 RSV 感染治疗药物。

**关键词:**金欣口服液;呼吸道合胞病毒;钙离子;成纤维细胞

**中图分类号:**R 285.5 **文献标识码:**A

金欣口服液处方是汪受传教授多年临床经验的结晶,由炙麻黄、苦杏仁、生石膏、黄芩、葶苈子、桑白皮、前胡、虎杖组成。前期的研究证实,金欣口服液可以抑制呼吸道合胞病毒(RSV)感染细胞增殖<sup>[1]</sup>。钙离子是细胞内重要的第二信使,对 DNA 修复、基因转录、核蛋白磷酸化和细胞凋亡等过程均有影响<sup>[2]</sup>。因此探讨金欣口服液对 RSV 感染细胞胞内钙离子的影响具有重要意义。本文采用激光共聚焦显微镜技术直观地观察金欣口服液处理 RSV 感染细胞不同时间点的细胞内钙离子变化。

## 1 材料

1.1 动物 大耳白兔 9 只,雌性,健康无病,体重 2.0 ~ 2.5 kg。由南京中医药大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK(苏)2005 ~ 2009)。

1.2 病毒 RSV A 亚型(Long 株),由广州博特生物工程有限责任公司提供。

1.3 细胞 人胚肺成纤维细胞(HELFL),由凯基生物有限公司中心提供。本实验采用第 5 ~ 30 代细胞。

1.4 药品与试剂 金欣口服液:由炙麻黄 50 g、苦杏仁 167 g、生石膏 133 g、黄芩 100 g、葶苈子 167 g、桑白皮 167 g、前胡 167 g、虎杖 200 g 组成,制备成 1000 ml 溶液,含生药 1.351

g/ml,由南京中医药大学植物药与新药开发研究中心制备和质控;利巴韦林颗粒(新博林);四川百利药业有限责任公司,批号 080335;细胞培养液:DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司),13.4 g/kg,先溶于少量双蒸水中,加 2.5 g  $\text{NaHCO}_3$  搅拌均匀,加双蒸水至 1 000 ml,调整 pH 值 7.2 ~ 7.4,除滤(单培);用前加 10% 新生牛血清(杭州四季青公司),配成细胞培养液(全培);细胞维持液:含 2% 新生牛血清 DMEM 液,余成分同细胞培养液;磷酸盐缓冲液(PBS): $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{KCl}$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.56 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1g,溶解于三蒸水中至 1 000 ml,分装,8 磅 15 min 高压蒸汽消毒灭菌,4 °C 保存;胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司);Hanks 平衡盐溶液(HBSS);HEPES 缓冲液:10 mmol/L HEPES、1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、137 mmol/L  $\text{NaCl}$ 、5 mmol/L  $\text{KCl}$ 、1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、0.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、5 mmol/L glucose、0.1% BSA、pH 7.4;Pluronic F127、Fluo 4-AM(上海同仁生化研究所);金欣口服液、利巴韦林含药血清及空白血清(制备方法见下文)。

1.5 主要实验仪器 超净工作台(苏州净化设备厂),二氧化碳孵箱(Forma3111, USA),超低温冰箱(MDFU-281,日本 SANYO),倒置光学显微镜(OLYMPUS BX-50),激光共聚焦显微镜(TCS,德国)。

\* 基金项目:国家自然科学基金(30772822);霍英东教育基金(111042)

\*\* 作者简介:陈彩霞(1968 -),女,江苏人,副主任医师,博士,主要研究方向:小儿肺系疾病、心血管疾病。

## 2 方法

2.1 金欣口服液、利巴韦林含药血清及空白血清制备 将动物随机分为金欣口服液组、利巴韦林组、空白血清组,每组3只。按预实验结果给予金欣口服液 36 g/(kg·d)(相当于人临床等效剂量的4倍),分两次灌服,连续给药。利巴韦林高剂量组给予 31 mg/(kg·d),相当于人临床等效剂量 20 mg/(kg·d),空白血清组给等体积生理盐水。于3 d后,末次给药前12 h禁食不禁水,末次给药1 h后,清醒状态下行颈动脉分离插管采血,血液静置30 min后,2 000 r/min,离心15 min,将血清移入容器中,56 ℃水浴30 min灭活。在超净工作台上过滤器过滤,分装于1.5 ml Dorf管后,-70 ℃保存备用。

2.2 人胚肺成纤维细胞的培养 HELF细胞培养液选用高糖型DMEM加10%新生牛血清,生长状态良好的细胞每3~4 d可传代,0.25%胰酶消化,常温下约需2 min,以镜下观察细胞回缩变圆时停止消化,每次分3~4瓶,于37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱饱和湿度下培养。

2.3 呼吸道合胞病毒A亚型组织培养半数感染量(TCID<sub>50</sub>)的测定 用DMEM培养液10倍系列稀释病毒悬液,共8个浓度,接种于96孔板上;逐日观察病变;以最高稀释度不再出现新病变时为终点,计算TCID<sub>50</sub>;结果RSV TCID<sub>50</sub>为10<sup>-3.34</sup>。

2.4 金欣口服液、利巴韦林含药血清、空白血清对HELF细胞最大无毒浓度测定(CPE法观察) 各组合药血清稀释5个浓度,接种于96孔板上,每日观察细胞病变(CPE),测定不引起CPE的最高稀释度即最大无毒浓度。结果均为20%含药血清。

2.5 激光共聚焦显微镜技术检测金欣口服液对胞内钙离子的研究 常规方法进行细胞培养。分为金欣口服液组、利巴韦林组、空白血清组、病毒对照组、细胞对照组。细胞按1×10<sup>5</sup>/ml浓度接种24孔培养板,3 ml/孔。置37 ℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱培养。待细胞长至80%时,吸弃培养液,单培养2遍。加RSV100TCID<sub>50</sub>,250 μl/孔。细胞对照组加单培250 μl。37 ℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱吸附2 h,每隔15 min轻轻摇晃培养板一次,使病毒吸附均匀。吸弃病毒,单培养1遍。在各组分别加入20%的金欣口服液含药血清、利巴韦林含药血清、空白血清500 μl,细胞对照和病毒对照加入维持液500 μl。37 ℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱中继续培养。分别于24、48、72 h时,弃去原处理培养液,加入Fluo4-AM工作液100 μl,37 ℃孵育20 min。再分别加入500 μl含1%小牛血清的HBSS溶液,再孵育40 min。用500 μl HEPES缓冲液洗3次,然后用200 μl HEPES缓冲液重新悬浮细胞。再37 ℃孵育10 min。最后取一滴放在载物台上,激光共聚焦显微镜下扫描细胞内钙离子荧光强度,激发波长488 nm,发射波长526 nm。每孔选4个视野,以平均荧光强度变化反映细胞内游离钙离子浓度的相对水平。

2.6 统计学处理 数据采用SPSS11.5软件进行统计学处理,结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间两两比较采用单因素方差分析, $P > 0.05$ ,无统计学意义。 $P < 0.05$ ,有统计学意义。

## 3 结果

见表1~3。

表1 各组RSV感染24 h细胞内钙离子的变化( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

钙离子	
细胞组	1.693 ± 0.218
病毒组	1.54 ± 0.187*
空白组	1.68 ± 0.184
利巴韦林组	1.51 ± 0.171
金欣组	1.62 ± 0.171 <sup>▲▲</sup> ®

注:病毒组 vs 细胞对照组, \* $P > 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 病毒组,  $\Delta P > 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 空白血清组,  $\blacktriangle P > 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 利巴韦林含药血清组,  $@ P > 0.05$ 。

表2 各组RSV感染48 h细胞内钙离子的变化( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

钙离子	
细胞组	3.356 ± 1.123
病毒组	5.159 ± 1.018*
空白组	4.486 ± 0.330
利巴韦林组	3.722 ± 0.454
金欣组	2.703 ± 1.410 <sup>▲▲</sup> ®

注:病毒组 vs 细胞对照组, \* $P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 病毒组,  $\Delta P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 空白血清组,  $\blacktriangle P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 利巴韦林含药血清组,  $@ P < 0.05$ 。

表3 各组RSV感染72 h细胞内钙离子的变化( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

钙离子	
细胞组	2.502 ± 0.421
病毒组	5.193 ± 0.794*
空白组	4.205 ± 0.252
利巴韦林组	3.242 ± 0.482
金欣组	2.875 ± 0.399 <sup>▲▲</sup> ®

注:病毒组 vs 细胞对照组, \* $P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 病毒组,  $\Delta P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 空白血清组,  $\blacktriangle P < 0.05$ ;金欣口服液含药血清 vs 利巴韦林含药血清组,  $@ P > 0.05$ 。

## 4 讨论

钙离子通道是一种极为常见的信号通路,钙离子的细胞效应包括促进细胞粘附与胞间通讯、改变酶活性、调节细胞膜的通透性、控制细胞分裂和影响细胞代谢等多方面,浓度较高时可以激活钙离子/镁离子依赖的内源性核算内切酶,导致细胞DNA断裂,进而细胞凋亡。因此,钙离子和细胞凋亡之间的关系是相互影响的,可能互为因果。对于受刺激时胞内游离钙水平的准确认知,将有助于确定钙离子细胞凋亡的作用机制。目前关于钙离子与细胞凋亡的研究倾向于钙离子升高可能是细胞凋亡机制的最后共通道的一环<sup>[3]</sup>。以往有许多的实验技术观察细胞内的钙离子水平,但由于受到仪器、钙指示剂性质及限时分解等因素的限制,影响了测量的精确性与敏感性。共聚焦显微镜具有实时显示、空间分辨率好的特点,使定量测定胞液中钙离子浓度,研究应激、生长因子刺激后的细胞变化称为现实。FLUO-4/AM为一新型的高度特异性钙离子荧光指示剂,它的亲和力更强,可避免细胞自身的荧光干扰,可以灵敏地反映细胞内游离钙离子浓度的变化,其荧光强度与游离钙离子浓度成正比,是第四代新型长波荧光指示剂。因此,FLUO-4/AM负载的成纤维细胞

# 苦参碱对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的抑制作用研究

★ 张力 李海英 吴式琇 吴建波 韩义香 (温州医学院附属第一医院 温州 325000)

**摘要:**目的:观察苦参碱对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响。方法:采用倒置显微镜观察苦参碱对鼻咽癌 CNE2 细胞形态的影响;采用 CCK-8 法检测苦参碱对鼻咽癌 CNE2 细胞生长的影响。结果:苦参碱处理后 CNE2 细胞形态发生改变,细胞皱缩,变小变圆,空泡明显。苦参碱能抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖。在实验浓度范围内,随着剂量的增加,抑制作用更加明显;同一剂量下,72 h 内药物作用时间越长,抑制作用越明显。结论:苦参碱能够抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖。

**关键词:**苦参碱;鼻咽癌细胞;增殖

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

## An Experimental Study of the Inhibiting Effect of matrine on Human nasopharyngeal carcinoma cells line CNE2 Proliferation

ZHANG Li, LI Hai-ying, WU Shi-xiu, WU Jian-bo, HAN Yi-xiang

The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000

**Abstract:** Objective: To study the effect of matrine on human nasopharyngeal carcinoma cell Line CNE2 Proliferation. Methods: Morphological changes of matrine on CNE2 cells were observed by light microscope. Proliferation of matrine on CNE2 cells was measured by CCK-8 colorimetric assay after treated by various concentrations of matrine. Results: Morphological changes of matrine on CNE2 cells: cell shrinkage, cell size reduction and turn round, cytoplasmic vacuolar changes. Matrine at a concentration between 0.5 mg/ml and 2.0 mg/ml inhibited the proliferation of CNE2 cells in dose - dependent manner. From 0h to 72 h, matrine with same concen-

荧光图像较为清晰,强弱变化鲜明,能够较准确地反映细胞内游离钙的变化过程<sup>[4]</sup>。

RSV 感染 24 h 分别用空白血清或含利巴韦林血清或含金欣口服液血清干预,病毒组和细胞组相比,金欣组和病毒组、空白血清组或含利巴韦林血清组相比,胞内钙离子均无显著性变化。RSV 感染 48、72 h 后病毒组显著性增加,显示胞内钙离子超载,可激活钙离子依赖性蛋白酶和蛋白激酶、合成酶、核酸内切酶、自由基生成酶、磷脂酶 A<sub>2</sub> 等,这些方面的协同作用促进了细胞凋亡<sup>[3]</sup>;但此时金欣口服液和病毒组、空白血清组相比,胞内钙离子减少,显示药物作用;和利巴韦林组相比,48 h 胞内钙离子有所减少,72 h 无明显变化,提示金欣口服液对 RSV 攻击后 HELF 细胞的保护作用比利巴韦林好,但不能说明体外抗 RSV 的作用比利巴韦林好。金欣口服液可能抑制成纤维细胞的钙离子内流,这也许是金欣口服液抑制 RSV 感染细胞凋亡的一个因素,因此可以抑制感染细胞增殖,同时提示金欣口服液可作为早期抗 RSV 感染治疗药物。鉴于成纤维细胞表面有 L 和 T 型钙通道(主要是 L 型钙通道)<sup>[5]</sup>,推测金欣口服液含药血清中可能有钙离子拮抗剂的成分,因此进一步研究金欣口服液含药血

清的抗 RSV 的物质基础很有必要,甚至可以从中发现或开发抗 RSV 的中药有效成分。

### 参考文献

- [1] 廖辉,汪受传,徐建亚,等.金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒粘附、膜融合影响的实验研究[J].南京中医药大学学报,2008,8(1):3-4.
- [2] Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulose cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway [J]. Endocrinology, 2000, 141 ( 11 ): 4209.
- [3] 敖琳,曹佳.细胞凋亡中钙离子稳态失调机制的研究进展[J].国外医学分子生物学分册,2001,23(2):106.
- [4] 程飏,付小兵,盛志勇,等.丝裂原活化蛋白激酶通路对成纤维细胞内游离钙的影响[J].解放军医学杂志,2002,27(5):380-383.
- [5] 李谨,蒋春梅,徐艳,等.硝苯地平对牙龈成纤维细胞内钙离子含量影响的激光共聚焦显微观察[J].口腔医学研究,2006,22(5):495-497.

(收稿日期:2009-02-24)