

实验研究

冠心Ⅱ号及新冠心Ⅱ号对小鼠
腹腔渗出细胞 RNA 及蛋白质合成的影响

中医研究院西苑医院基础研究室生化组

倪祖梅 吕思武 张 洪 张静丽 汪 荣 王梦林

活血化瘀方药能治疗多种不同类别的疾病,但治疗原理至今未明。我们设想这一类药物有可能是通过对各类细胞的某些基本功能的调节和控制而发挥其作用的。这种调节和控制可以在代谢方面,也可以是更基础的即基因表达方面。为探讨药物对后者的影响,我们以离体小鼠腹腔渗出细胞(活化及非活化)为材料,初步观察了冠心Ⅱ号(下简称冠Ⅱ)及新冠心Ⅱ号(下简称新冠Ⅱ)水提液对 RNA 及蛋白质合成的影响。

材料及方法

冠Ⅱ方(川芎、赤芍、丹参、红花及降香各1份)、新冠Ⅱ方(川芎、赤芍、丹参、红花各1份,羌活2份)水提酒沉分别制成水提液,每毫升提取液含生药2克,加入0.4%吐温80为助溶剂。并即以此浓度的吐温80生理盐水为对照液。

^3H -5-尿嘧啶核苷酸(以下简称 ^3H -Urd),比强度2毫居里/毫克分子,放射浓度1毫居里/毫升。 ^{14}C -1-L-亮氨酸比强度15毫居里/毫克分子,放射浓度204微居里/毫升,上海原子核所出品。放线菌素D(以下简称放D)200微克/安瓿,上海第八制药厂出品。环己亚胺,标准品,进口分装。

活化腹腔渗出细胞之获取:取体重14~30克小鼠,雌雄兼用,每日腹腔注射0.2%糖原1次,每次2毫升,共3日。第4日于乙醚麻醉下,腹腔注入加有0.05%乳清蛋白水解物之Hank氏液5毫升,揉搓腹壁1分钟后,抽出该液,每毫升含 $5\sim 20\times 10^5$ 个细胞,约占巨噬细胞70~80%。将多只小鼠腹腔渗出细胞混合成库,用前述Hank氏液稀释至含有 5×10^5 个/毫升之细胞悬液。混匀后分装于离心管中,每管1毫升。

用活化小鼠腹腔渗出细胞为材料,试管内加入 ^3H -Urd及/或 ^{14}C -1-L-亮氨酸,将这批试管分为对照、冠Ⅱ、新冠Ⅱ、放D、放D加冠Ⅱ、放D加新冠Ⅱ、环己亚胺、环己亚胺加冠Ⅱ、环己亚胺加新冠Ⅱ等9

个组,在37℃温浴内保温0.5、1、3、6小时后,提取RNA及蛋白质,消化后测参入RNA及蛋白质内的 ^3H 及 ^{14}C 放射性。加入放D的剂量亦分为小剂量(0.04微克/管)及大剂量(5微克/管)两种,每一个样品作三个重复管。

非活化腹腔渗出细胞之获取:同样规格小鼠,不注射糖原,用上法取得腹腔游离细胞为非活化细胞。

用非活化小鼠腹腔渗出细胞为材料,置于各组试管内,分别加入 ^3H -Urd 1微居里/50微升,将这批试管分为对照、冠Ⅱ、新冠Ⅱ、放D、放D加冠Ⅱ、放D加新冠Ⅱ等6个组。每组10管,分别加入对照液、药液和放D。37℃温育3小时后,提取大分子RNA,消化后,测参入RNA之 ^3H -Urd的放射性。以上试验共作两批,一批中放D组为小剂量(0.04微克/管),另一批中放D组为大剂量(5微克/管)。

细胞内RNA和蛋白质的提取:将上述培养完毕的各管细胞置冰浴内10分钟终止反应,低温离心1500g,10分钟。倾去上清液,用冰冷的Hank氏液洗涤1次,再用冰冷的5%三氯醋酸提取标记前物及各种小分子量寡核苷酸,同时沉淀核酸和蛋白质。低温离心3000g,10分钟,弃去上清液,用pH7.4磷酸缓冲液洗1次,在沉渣中加入10%过氯酸0.5毫升,置80℃温浴内消化1~2小时后,加入闪烁液,计数放射性。

结 果

一、冠Ⅱ、新冠Ⅱ等及它们与阻断剂合并应用对 ^3H -Urd参入非活化细胞的影响:图1示,冠Ⅱ及新冠Ⅱ使 ^3H -Urd之参入RNA明显地升高,加入大剂量放D时 ^3H -Urd的参入与对照组相同。大剂量放D分别与冠Ⅱ及新冠Ⅱ合用时显示被药促进之参入数几乎完全被放D抑制,抑制部分分别占促进部分的95.6%及93.6%。图2示,加入小剂量放D时, ^3H -Urd的参入亦与对照组相同。冠Ⅱ及新冠Ⅱ均使 ^3H -

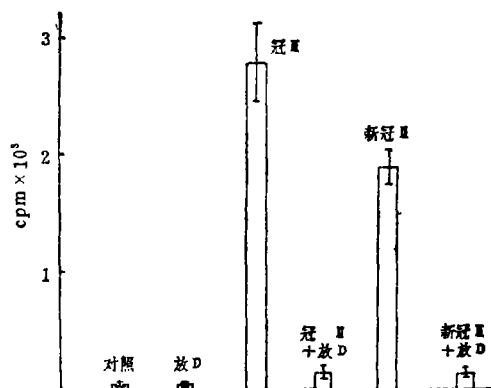


图1 冠Ⅱ、新冠Ⅱ及大剂量放D等对³H-Urd参入非活化细胞RNA的影响

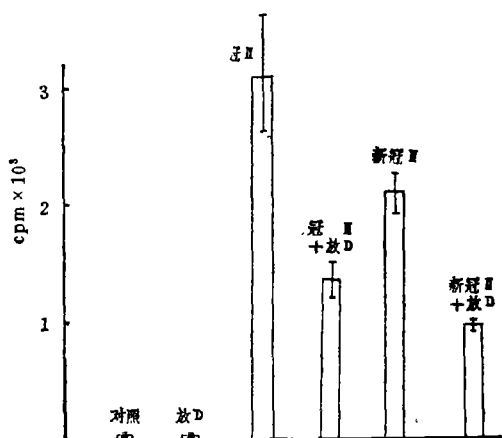


图2 冠Ⅱ、新冠Ⅱ及小剂量放D等对³H-Urd参入非活化细胞RNA的影响

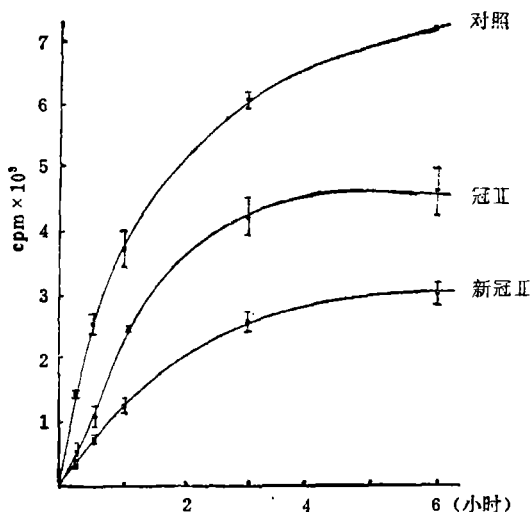


图3 冠Ⅱ及新冠Ⅱ对³H-Urd参入活化细胞RNA的影响

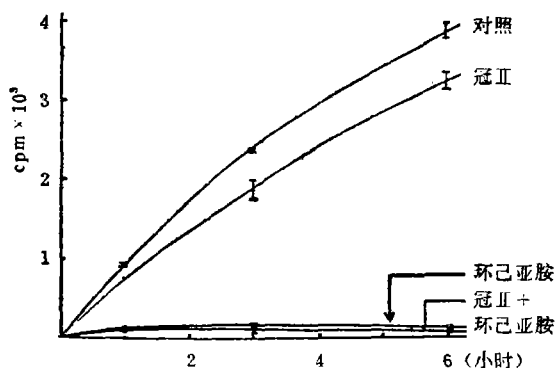


图4a 冠Ⅱ及环己亚胺对¹⁴C-1-L-亮氨酸参入活化细胞蛋白质的影响

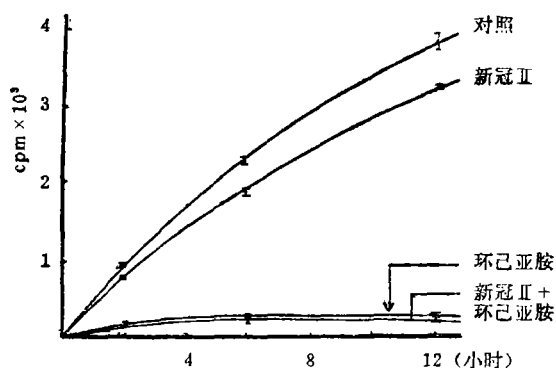


图4b 新冠Ⅱ及环己亚胺对¹⁴C-1-L-亮氨酸参入活化细胞蛋白质的影响

Urd参入增多，但当与小剂量放D同用时，药物的促进部分亦部分地为小剂量放D所抑制，抑制部分分别占促进部分的54.5%及56.6%。

二、冠Ⅱ、新冠Ⅱ等及它们与阻断剂合并应用对³H-Urd及/或¹⁴C-1-L-亮氨酸参入活化细胞的影响。

1. 冠Ⅱ及新冠Ⅱ对³H-Urd参入RNA的影响：图3示，在每个时间内二个用药组内参入的放射性均明显低于对照组，新冠Ⅱ的影响尤为明显。

2. 冠Ⅱ、新冠Ⅱ、环己亚胺及药物与阻断剂合用对¹⁴C-1-L-亮氨酸参入细胞蛋白质的影响：图4a、b示，冠Ⅱ及新冠Ⅱ均能抑制¹⁴C-1-L-亮氨酸参入蛋白质。环己亚胺、环己亚胺加新冠Ⅱ及环己亚胺加冠Ⅱ均较冠Ⅱ及新冠Ⅱ的抑制作用为强。

3. 冠Ⅱ、新冠Ⅱ等及它们与大剂量放D合用对³H-Urd与¹⁴C-1-L-亮氨酸参入活化细胞内的影响：图5a、b、c示，两种药物各自同时抑制了³H-Urd及

¹⁴C-1-L-亮氨酸参入RNA及蛋白质。大剂量放D与大剂量放D加新冠Ⅱ组一样，相当完全地抑制³H-Urd的参入RNA，它们对¹⁴C-1-L-亮氨酸参入蛋白质的抑制程度也是一样。

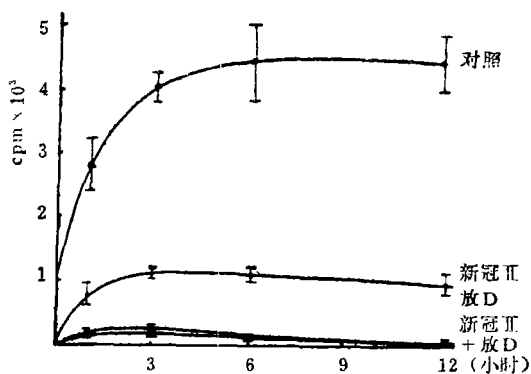


图 5a 新冠 II 及大剂量放 D 对 ^3H -Urd 参入活化细胞的影响

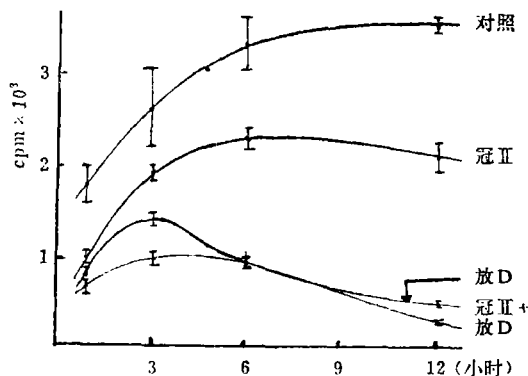


图 6a 新冠 II 及小剂量放 D 对 ^3H -Urd 参入活化细胞 RNA 的影响

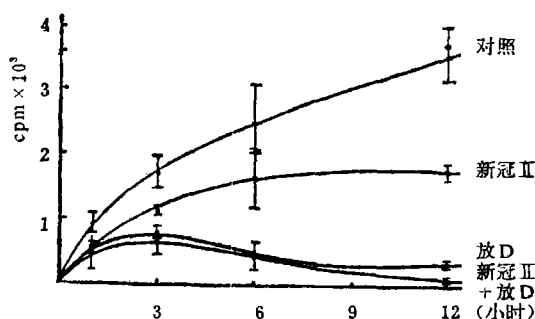


图 5b 新冠 II 及大剂量放 D 对 ^{14}C -1-L-亮氨酸参入活化细胞的影响

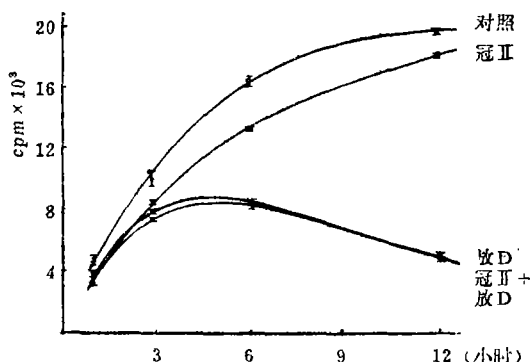


图 6b 新冠 II 及小剂量放 D 对 ^{14}C -1-L-亮氨酸参入活化细胞蛋白质内的影响

亮氨酸参入蛋白质的抑制作用则与单独加入放 D 时完全一样。

讨 论

在活细胞中基因的表达并不是在任何时候都全部地或随机地进行着，而是在一定的阶段需要什么样的蛋白质就进行该类蛋白质的基因转录及翻译，这主要是取决于基因的调控系统的作用。由于任何蛋白质的基因的活化及表达均将表现于 RNA 及蛋白质的新合成 (de novo)，而新冠 II 对许多疾病均有疗效，故我们推测它们必然是影响着体内多种细胞功能的消长，故而必然会出现各种酶的合成增减而表现于 RNA 及蛋白质的新合成。

同样剂量新冠 II 及新冠 II 对非活化腹腔渗出细胞之 RNA 合成有促进作用，对活化细胞 RNA 之合成则相反地有抑制作用。这是复方提取液表现出来的一种双向作用。中药复方对整体及器官水平的双向作用国内已屡有报道，本实验则出现于细胞水平。双向作用之机理有待进一步研究。

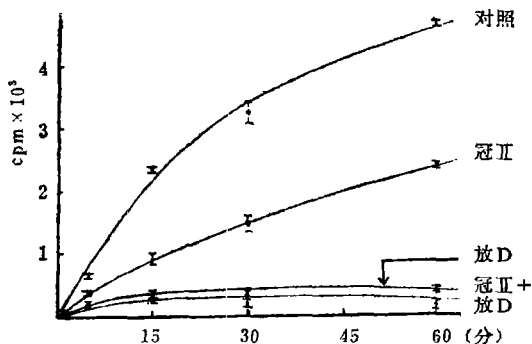


图 5c 新冠 II 及大剂量放 D 对 ^3H -Urd 参入活化细胞的影响

4. 新冠 II 及其与小剂量放 D 合用对 ^3H -Urd 及 ^{14}C -1-L-亮氨酸参入活化细胞的影响：图 6 a、b 示，新冠 II 对二种标记物同时参入 RNA 及蛋白质均有抑制作用，小剂量放 D 抑制作用较新冠 II 为强，但抑制作用并不完全。小剂量放 D 及新冠 II 合用对 ^3H -Urd 参入 RNA 之抑制似比单独加入放 D 时略强，其对 ^{14}C -1-L-

在非活化细胞中为药物所促进的 RNA 合成部分可为作用在转录水平的放 D 所抑制^(1,2), 说明这种促进 RNA 合成的作用部位在转录水平。小剂量放 D (0.04 微克/毫升) 只能抑制 rRNA 的转录^(3,4), 当与冠 II 及新冠 II 同时给予时约有一半的 RNA 合成受抑制。大剂量放 D (5 微克/毫升) 可全部抑制转录^(3,4), 当与冠 II 及新冠 II 合用时被促进的 RNA 又被抑制掉 93.6~95.6%, 表示 mRNA 与 rRNA 的合成均被抑制。由此可推论冠 II 及新冠 II 对非活化细胞不仅促进其 rRNA 并且也促进其 mRNA 的合成。

一般而言, 细胞内 RNA 的构分 tRNA 占 10~12%, mRNA 只占 1~2%, 其余大部分均为 rRNA。在细胞对刺激生长的激素起反应时, 最灵敏、快速及大量合成的也是 rRNA。我们是用 TCA 沉淀 RNA 的, 同时也把小分子的 tRNA 溶入上清液而弃去, 故沉淀内主要含 mRNA 及 rRNA。然而为冠 II 及新冠 II 促进的新合成的 rRNA 却只占总量的 54.8~56.5%, 故可以认为相对地该二药物是更大量地促进 mRNA 的新合成的。

在活化细胞中高浓度放 D 及它与冠 II、新冠 II 的迭加效应一样, 二者都相当完全地抑制了 RNA 的合成。低浓度放 D 的抑制作用则不很完全, 而且它和冠 II 的迭加效应对 RNA 合成的抑制也相仿, 因此冠 II 对活

化细胞内 RNA 新合成的抑制作用主要是在 rRNA。当加入冠 II 及新冠 II 时, 活化细胞内不仅 RNA 合成抑制, 蛋白质的合成也同时受到抑制, 可见这二种药物影响了细胞内某些基因的转录及翻译。

小 结

冠 II 及新冠 II 提取液可以促进非活化小鼠腹腔细胞 RNA 合成, 抑制活化细胞的 RNA 合成及蛋白质的合成。

这二种药与不同剂量的 RNA 合成抑制剂放线菌素 D 合用的结果说明, 它们促进非活化细胞 RNA 合成的作用主要在转录水平, 不但促进 rRNA, 更大量地促进 mRNA 的合成; 它们抑制活化细胞 RNA 的合成主要地是抑制其中 rRNA 的合成。

本工作承中国科学院生物物理所六室及农业科学院原子能利用研究所三室提供液体闪烁计数条件, 特此致谢。

参 考 文 献

- (1) Yankovsky SA, et al: Proc Natl Acad Sci US 48: 1466, 1962.
- (2) Brown DD, et al: Science 160:272, 1968.
- (3) Chamtreune H, et al: Prog Nucl Acid Res Mol Biol 7:173, 1976.
- (4) Lockard RE, et al: Biochem and Biophys Commun 37:203, 1969.

黄 芪 赤 风 汤 治 疗 咀 嚼 肌 胀 痛

江苏省南通市第二人民医院 陈 伯 涛

黄芪赤风汤, 出自《医林改错》, 以黄芪为主, 佐以防风、赤芍, 益气通滞, 原主治瘫痪、诸疮诸病。有人用治病症, 有一定疗效。王清任氏自注云: “此方治诸病皆效者, 能使周身之气通而不滞, 血活而不瘀, 气通血活, 何患疾病不除?” 作者借用本方治疗咀嚼肌胀痛, 取得了较好效果, 兹简介一例。

倪××, 男, 33岁, 工人。患者右颊咀嚼时阵发性胀痛, 右面颊肌前缘处有压痛, 8|垂直阻生颊错位, 颊粘膜齿创压迹。入院后住口腔科病房, 经服中西药物、封闭、8|拔除, 疗效不显, 同侧颞颌关节张口闭口撮片无显著异常。遂给予大活络丸、维生素 C、维生素 B₁、外贴关节止痛膏于穴位上, 嘱出院门诊随访。其后又经内、外、针灸、理疗、磁疗、红外线等科室门诊治疗, 均无显著效果。旋经其他病员介绍, 始于 1981 年 3 月 6 日来中医科就诊。主诉, 右咀嚼肌前缘咀嚼时胀痛近年, 咬

牙时疼痛加剧, 嚼食受限, 舌下痛, 食思无味。脉弦略紧, 舌苔薄白稍腻、质淡红、边有齿印。先曾用阳和汤、加味芍药甘草汤等均不见效。窃思久痛入络, 气血痹阻不通, 不通则痛, 乃予黄芪赤风汤补气活血通络法。处方: 生黄芪 60 克, 京赤芍 6 克, 防风 6 克, 全当归 10 克, 制乳没各 6 克。

5 剂之后, 右咀嚼肌前缘咀嚼时胀痛及咬牙时疼痛即见好转, 嚼食亦较爽利, 苔脉如前, 原方生黄芪改 90 克。再 5 剂而病愈十之六, 口颊张开、启闭自如, 仅用力咀嚼时稍有痛感。效不更方。方用: 生黄芪 125 克, 赤白芍各 9 克, 青防风 7 克, 全当归 10 克, 制乳没各 7 克, 广陈皮 7 克。接服 5 剂, 其效大著, 病愈十之九, 口舌舒展、张口自如, 咀嚼时右颊处胀痛已无, 上午俨如常人, 惟午后有意识地用力咀嚼时略有隐痛而已。原方续进 5 剂而病遂愈。