

(9): 1831-1840.

[14] 朱红梅, 张凤兰, 肖志成, 等. 淀粉样前体蛋白在神经发生中的作用与阿尔茨海默病关系的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(12): 74-79, 81.

[15] 张 丽, 赵丽红, 张 兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进成体大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(5): 550-553, 564.

[16] Maruszak A, Pilarski A, Murphy T, *et al.* Hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease: is there a role for dietary modulation? [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 38(1): 11-38.

[17] Pluta R, Bogucka-Kocka A, Ułamek-Kozioł M, *et al.* Neurogenesis and neuroprotection in postischemic brain neurodegeneration with Alzheimer phenotype: is there a role for curcumin? [J]. *Folia Neuropathol*, 2015, 53(2): 89-99.

[18] Borchelt D R, Ratovitski T, van Lare J, *et al.* Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins [J]. *Neuron*, 1997, 19(4): 939-945.

[19] Holcomb L, Gordon M N, McGowan E, *et al.* Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(1): 97-100.

[20] Ho C, Hsu Y C, Lei C C, *et al.* Curcumin rescues diabetic renal fibrosis by targeting superoxide-mediated Wnt signaling pathways[J]. *Am J Med Sci*, 2016, 351(3): 286-295.

[21] Hirota Y, Sawada M, Huang S H, *et al.* Roles of Wnt signaling in the neurogenic niche of the adult mouse ventricular-subventricular zone[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1-2): 222-230.

[22] Nishiya N. Screening for chemical suppressors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2017, 137(2): 133-136.

[23] Chen X M, Zhou B H, Yan T T, *et al.* Peroxynitrite enhances self-renewal, proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through activating HIF-1 α and Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 158-167.

佐太、 β -HgS、 HgCl_2 对 PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达影响的比较

耿卢婧^{1,2,3}, 李 岑^{1,3}, 夏政华^{1,2,3}, 杜玉枝^{1,3}, 魏立新^{1,3*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省藏药药理学和安全性评价重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: **目的** 比较佐太、 β -HgS、 HgCl_2 对 PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达的影响。**方法** MTT 法测定 3 种药物对细胞活性的影响, 实时荧光定量 PCR 法检测 *Bax*、*Bak*、*Bcl2*、*Fas*、*FasL* 表达。**结果** 0.250 g/L 佐太作用 2 h 后细胞活性下降约 10%, 等量 β -HgS 使其下降 12% 左右, 而含汞量只有佐太 1/10 的 HgCl_2 却导致其下降约 70%; 佐太降低 *Bax*、*Bak*、*Bcl-2*、*FasL* 表达, β -HgS 降低 *Bax*、*Bak*、*Fas*、*FasL* 表达, HgCl_2 降低 *Bcl-2* 表达而增加 *Fas*、*FasL* 表达。**结论** 佐太、 β -HgS 对 PC12 细胞的毒性远小于 HgCl_2 , 两者可能对细胞中线粒体凋亡通路的激活有抑制作用, 而 HgCl_2 可能通过激活死亡受体通路诱导细胞凋亡。

关键词: 佐太; β -HgS; 氯化汞; PC12 细胞; 凋亡相关基因

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)03-0543-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.03.012

Effect comparison of Zuotai, β -HgS and HgCl_2 on PC12 cell activity and apoptosis-related gene expressions

收稿日期: 2018-02-27
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81374063); 青海省重点实验室发展专项 (2017-ZJ-Y08); 青海省青年科学基金 (2016-ZJ-919Q); 中国科学院“西部之光”重点项目 (Y529021211); 中国科学院国际合作局对外合作重点项目资助 (153631KYSB20160004)
作者简介: 耿卢婧 (1987—), 女, 博士生, 从事民族药毒理学研究。Tel: (0971) 6143765, E-mail: glj01215@163.com
*** 通信作者:** 魏立新 (1967—), 男, 博士, 研究员, 从事民族药药理学与毒理学研究。Tel: (0971) 6143668, E-mail: lxwei@nwipb.cas.cn

GENG Lu-jing^{1,2,3}, LI Cen^{1,3}, XIA Zheng-hua^{1,2,3}, DU Yu-zhi^{1,3}, WEI Li-xin^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Evaluation, Xining 810008, China)

KEY WORDS: Zuotai; β -HgS; HgCl_2 ; PC12 cells; apoptosis-related genes

藏医药是藏族人民在上千年生活实践中逐步形成并不断发展的传统医药学,是我国特有的重要医药资源^[1],藏药中大量使用矿物药,是我国医药体系中使用最多的^[2]。佐太是藏语“仁青欧曲佐珠钦木”的简称,藏医认为它是珍宝类藏药的核心配伍成分,配合其他药物使用具有减毒增效作用,其炮制过程严格且复杂,主要原料为水银、硫磺、八金灰、八矿灰等^[3],被认为是藏药中重金属的主要来源,其安全性一直是人们关注的焦点。

Zhao 等^[4]对 4 份不同产地佐太进行 X 射线光电子能谱分析(XPS)和 X 射线衍射(XRD)研究,发现其中汞均以硫化汞(HgS)形式存在;李岑等^[5]对不同产地 9 批佐太中汞的赋存形态进行分析,验证了上述结论,并通过 XRD 指纹谱图发现样品之间的相似性均大于 99.58%;夏振江等^[6]用硫氰酸盐容量法测定青海、四川、甘肃、西藏产 13 批佐太中 HgS 含量,测得其在 52.84%~56.23% 范围内,平均 54.5%。由此可知,不同产地、批次佐太中成分组成和 HgS 含量稳定性较高。

佐太主要成分为立方晶系硫化汞(β - HgS)^[7-8],这与朱砂(α - HgS 含量 $\geq 98\%$)相似,具有镇定安神、抗惊厥、抗抑郁等作用^[9-10],推测 β - HgS 可能是其活性成分,但由于人们在生活中往往是“谈汞色变”,故其药用安全性备受质疑。 HgS 是目前传统药物中唯一仍然可以口服的汞化合物形式,其毒性远小于常见的汞化合物氯化汞(HgCl_2)和甲基汞(MeHg),涉及急性毒性^[11]、慢性毒性^[12]、肝毒性^[13]、肾毒性^[14]、神经毒性^[15]等各方面。汞的化学存在形式是 HgS 或含 HgS 的传统药物与 HgCl_2 、 MeHg 存在差别的决定性因素^[16-17],但不同化学形态的汞在毒理、药理活性方面差异的分子机制仍不清楚。

根据目前报道可知,佐太可能靶器官为神经系统,故本实验选择类神经细胞——大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12,对佐太可能的神经细胞毒性进行探索。同时,在前期研究基础上采用噻唑蓝(MTT)法检测大剂量佐太、 β - HgS 、 HgCl_2 对 PC12 细胞活性的影响,并通过实时荧光定量 PCR

对凋亡相关基因($Bcl-2$ 、 Bax 、 Bak 、 Fas 、 $FasL$)表达进行分析,讨论三者作用差异。

1 材料

1.1 仪器 HF-90 二氧化碳(CO_2)培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);BCM-1300 生物洁净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司);多功能酶标仪(珀金埃尔默企业管理上海有限公司);ETC811 基因扩增仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司);3K15 离心机(Sigma 中国有限公司);Viia™7 实时荧光定量 PCR 仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.2 试药 佐太购自西藏自治区藏药公司。 β - HgS 购自美国 Alfa Aesar 公司,含量不低于 98%; HgCl_2 (分析纯)购自贵州省铜仁化学试剂厂,含量不低于 98%。

1.3 细胞与主要试剂 PC12 细胞由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100 $\times$), (美国 Gibco 公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);MTT (美国 Sigma 公司);TRIzol (美国 Ambion 公司);逆转录、荧光定量试剂盒(大连 Takara 公司)。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养 取对数生长期 PC12 细胞,胰酶消化后收集细胞,用含 10% 胎牛血清和 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100 $\times$) 的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔板(接种量 0.1 mL/孔)或 6 孔板(接种量 3 mL/孔)。在 37 $^\circ\text{C}$ CO_2 培养箱中培养至细胞铺满板底的 70%~80% 时给药。

2.2 分组及给药 细胞随机分为对照组、佐太组(0.250 g/L,含汞 0.116 g/L)、 β - HgS 组(0.135 g/L,含汞 0.116 g/L)、 HgCl_2 组(0.015 7 g/L,含汞 0.011 6 g/L),为了排除细胞增殖的影响,药物孵育时间为 2 h。其中,佐太组中药物颗粒的尺度大多在 100~600 nm 之间,甚至还有部分颗粒小于 100 nm^[8,18],参考其他金属纳米药物的毒理学研究

方法,采用悬浮液给药^[19-20];β-HgS 组剂量为佐太组等汞量,同样采用悬浮液给药;由于 HgCl₂ 细胞毒性较大,为了保证足够细胞数量进行后续实验,该组含汞量为佐太组的 1/10。

2.3 细胞活性检测^[21] 将接种于 96 孔板中的细胞随机分组,每组 10 个复孔,按上述条件进行药物孵育。孵育结束后,每孔加入 5 mg/mL MTT (0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制, pH 7.2~7.4) 10 μL,继续培养 4 h,每孔加入三联液 (含 10% SDS、5% 异丁醇、10 mmol/L 盐酸) 150 μL,在 37 ℃ CO₂ 培养箱中静置过夜,于 570 nm 波长处测定光密度 (OD) 值。计算细胞增殖率 (给药组 OD 值/对照组 OD 值×100%)。

2.4 HE 染色 在 6 孔板中制备细胞爬片,按上述条件接种细胞并给药孵育,孵育结束后,取出细胞爬片, PBS (0.1 mol/L, pH 7.2~7.4) 漂洗 3 次, 95% 乙醇固定 20 min, 苏木素染色 10 min, 自来水冲洗分色 10 min, 伊红染色 30 s, 乙醇梯度脱水后中性树脂封片,光学显微镜进行细胞形态观察。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 按上述条件将 6 孔板中的细胞随机分组,并进行给药处理。药物孵育结束后,弃去培养液,每孔加入 1 mL TRIzol,按

照说明书操作提取细胞总 RNA,测定它在 260、280 nm 波长处的吸光度及总 RNA 浓度,根据 2 个波长处吸光度的比值 (1.9<OD₂₆₀/OD₂₈₀<2.0) 和琼脂糖凝胶电泳结果评价总 RNA 质量,调整符合要求的总 RNA 样品质量浓度至 500 ng/μL,应用逆转录试剂盒中的随机引物,按操作指南反转录合成 cDNA,体系见表 1,条件为 37 ℃ 反应 15 min, 85 ℃ 灭活 5 s。利用内参引物 β-actin 及凋亡相关基因 *Bax*、*Bak*、*Bcl-2*、*Fas*、*FasL* 的引物对 cDNA 进行扩增,检测药物作用后基因的表达情况,引物序列见表 2,实验体系见表 3,PCR 实验条件见表 4。重复 2 次,每次 3 批,将 2 次结果合并后进行分析。

表 1 逆转录反应体系

Tab. 1 Reverse transcription reaction systems

试剂	使用体积/μL
5×Prime Script Buffer(for Real Time)	10
Prime Script RT Enzyme Mix I	2.5
Oligo dT Primer(50 μmol/L)	2.5
Random 6 mer(100 μmol/L)	2.5
总 RNA	5
RNase Free dH ₂ O	27.5
总体积	50

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 2 qRT-PCR primer sequences

基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')	Genbank 编号
β-actin	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTTGAAGGTCCTCAAA	生工生物工程(上海)股份有限公司,编号 B661201
Bak	AGCTTGCTCTCATCGGAGAC	AATAGGCTGGAGGCGATCTT	NM_053812.1
Bax	GGAGACACCTGAGCTGACCT	CTGCAGCTCCATGTGTTGT	NM_017059.2
Bcl-2	TGCAGAGATGTCCAGTCAGC	CAAAGAAGGCCACAATCCTC	NM_016993.1
Fas	GGAGGAGTACACGGACAGGA	CTTTGCACCTGCACCTTGGTA	NM_139194.2
FasL	CCACCTCCATCACCCTACC	ATATCACCCGGTAGCCACAGC	NM_012908.1

用非参数检验 Kruskal-Wallis H test 进行分析,并采用 Mann Whitney U test 进行成对分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 4 实时荧光定量 PCR 反应条件

Tab. 4 qRT-PCR reaction conditions

步骤	反应温度/℃	反应时间/s	循环数/次
第 1 阶段	95	30	1
	95	5	40
第 2 阶段	60	31	
	95	15	
第 3 阶段	60	60	1
	95	15	

3 结果

3.1 细胞活性 图 1 显示,佐太组、β-HgS 组、HgCl₂ 组 (每组 3 次实验) 细胞活性趋势一致,重

表 3 实时荧光定量 PCR 反应体系

Tab. 3 qRT-PCR systems

试剂	使用量/μL
SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	5
正向引物 (10 μmol/L)	0.4
反向引物 (10 μmol/L)	0.4
ROX Reference Dye II (50 ×)	0.2
cDNA	1
dH ₂ O(灭菌蒸馏水)	3
总体积	10

2.6 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理,置信区间 95%,采用 Kolmogorov-Smirnov test 检验数据分布情况,对于呈正态分布且 $n\geq 10$ 的数据进行方差分析,并采用 Tukey test 或 Dunnett's T3 test 进行成对比较;对于非正态分布或 $n<10$ 的数据采

复性较好，均显著低于对照组 ($P<0.05$)。另外，佐太、 β -HgS 细胞毒性远小于 $HgCl_2$ ，两者作用 2 h 后细胞活性下降 10% 左右，而 $HgCl_2$ 的含汞量只有两者 1/10，却导致其下降 70%，表明佐太、 $HgCl_2$ 在细胞毒性方面的差异与其在肝毒性、肾毒性、发育毒性方面一致^[13,22-23]。

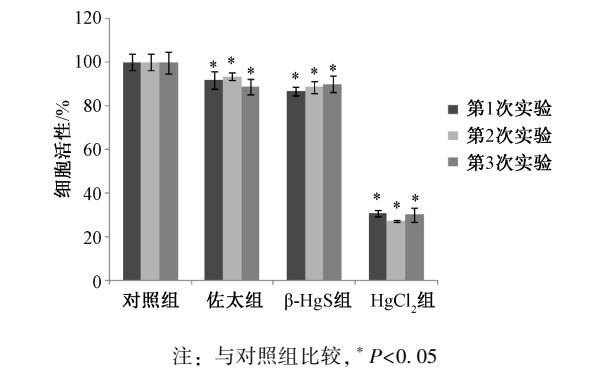


图 1 佐太、 β -HgS、 $HgCl_2$ 对细胞活性的影响
Fig. 1 Effects of Zuotai, β -HgS and $HgCl_2$ on cell viability

3.2 细胞形态 图 2 显示，对照组细胞呈不规则多边形或梭型；佐太组细胞膜边缘粗糙，出现絮状物质，表明佐太对细胞膜的完整性产生一定破坏； β -HgS 组细胞质部分体积变大，但细胞结构仍保持完整，推测 β -HgS 可能引起细胞渗透压失衡； $HgCl_2$ 组细胞膜几乎完全被裂解，细胞核凝集，与 $HgCl_2$ 引起 Kidney OK 细胞凋亡时的形态特征一致^[24]。由此可知， $HgCl_2$ 对细胞形态的影响远高于佐太和 β -HgS，与“3.1”项下结果一致。

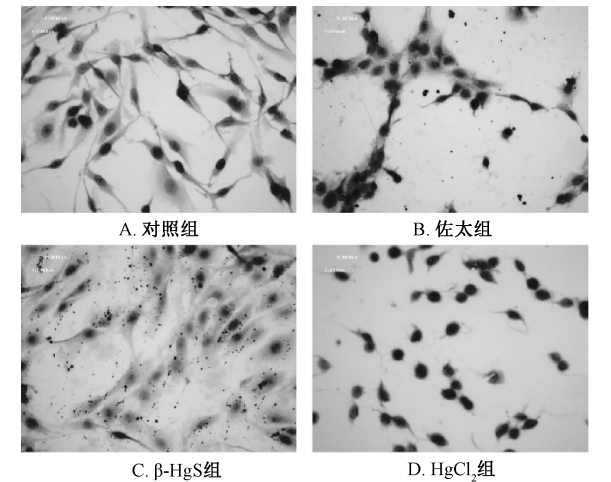


图 2 各组细胞 HE 染色 ($\times 400$)
Fig. 2 HE staining of cells in various groups ($\times 400$)

3.3 线粒体相关凋亡基因 本实验选择 *Bcl-2*、*Bax*、*Bak* 检测药物对线粒体凋亡通路的影响。*Bcl-2* 家族的蛋白通过控制线粒体膜透性调节细胞

凋亡^[25]，其中 *Bcl-2* 是第一个被确认具有抑制作用的基因，其高表达能阻止多种凋亡诱导因素（如电离辐射、化学药物等）所引发的细胞凋亡；*Bax*、*Bcl-2* 具有大约 1/5 的同源性，但两者相互拮抗，具有促进细胞凋亡的作用^[26]；*Bak* 与 *Bcl-2* 的同源性为 25%，但与 *Bax* 一样也具有促细胞凋亡的作用^[27]。

图 3 显示，与对照组比较，佐太组 *Bax*、*Bak*、*Bcl-2* 表达显著下降 ($P<0.05$)， β -HgS 组 *Bax*、*Bak* 表达显著下降 ($P<0.05$)， $HgCl_2$ 组仅 *Bcl-2* 表达显著下降 ($P<0.05$)。由此可知，佐太和 β -HgS 可能对促凋亡基因 *Bax*、*Bak* 引起的细胞凋亡有抑制作用，而 $HgCl_2$ 可抑制抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达。

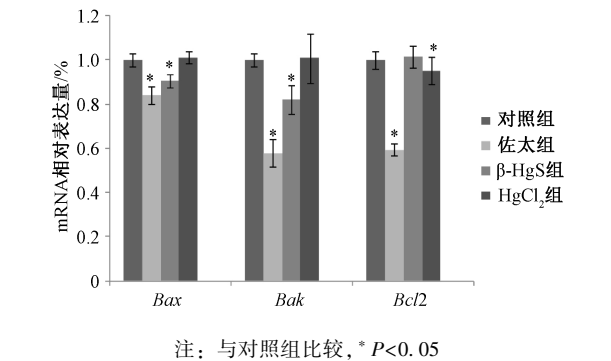


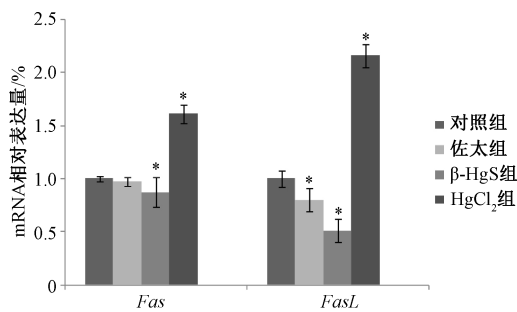
图 3 佐太、 β -HgS、 $HgCl_2$ 对 *Bax*、*Bak*、*Bcl-2* mRNA 表达的影响
Fig. 3 Effects of Zuotai, β -HgS and $HgCl_2$ on *Bax*, *Bak*, *Bcl-2* mRNA expressions

3.4 死亡受体相关凋亡基因 细胞膜表面死亡受体及其配体 (*Fas*/*FasL*) 是细胞凋亡主要途径之一，也是近年来认识较为深入的与细胞凋亡信号传递有关的分子系统^[28-29]。细胞膜表面死亡受体 *Fas* 基因又称 *Apo-1* 或 *CD95*，属于肿瘤坏死因子受体/神经生长因子受体超家族 (TNFR/NGFR)；*FasL* 又称 *CD95L*，是 *Fas* 天然配体，属于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族的细胞因子，两者可反映药物对死亡受体凋亡通路的影响。

图 4 显示，与对照组比较，佐太组 *FasL* 表达显著降低 ($P<0.05$)， β -HgS 组 *Fas*、*FasL* 表达显著降低 ($P<0.05$)， $HgCl_2$ 组两者表达显著升高 ($P<0.05$)。由此可知， $HgCl_2$ 可能通过 *Fas*/*FasL* 途径诱导细胞凋亡，而佐太和 β -HgS 对 *Fas*/*FasL* 通路有一定抑制作用。

4 讨论

本实验发现，佐太、 β -HgS 对 PC12 细胞的毒性远小于 $HgCl_2$ ，并可抑制促凋亡基因 *Bax*、*Bak*



注：与对照组比较，* $P < 0.05$

图4 佐太、β-HgS、HgCl₂对Fas、FasL mRNA表达的影响

Fig. 4 Effects of Zuotai, β-HgS and HgCl₂ on Fas, FasL mRNA expressions

信号传导和Fas/FasL凋亡通路激活；HgCl₂可抑制抗凋亡基因Bcl-2表达，并激活Fas/FasL通路，由此揭示了佐太、β-HgS与HgCl₂在细胞毒性分子机制方面差异，也表明其激活的信号通路有根本差别。同时，佐太、β-HgS对PC12细胞活性的影响程度很接近，但实时荧光定量PCR的结果并不完全相同，前者对线粒体凋亡相关基因（Bcl-2、Bax、Bak）的影响高于后者，但对死亡受体基因（Fas、FasL）表达的影响又弱于后者，推测β-HgS可能不是佐太中的唯一活性成分。

然而，细胞活性实验结果和实时荧光定量PCR结果并不一致。佐太、β-HgS并未表现出明显的对细胞不利的调节作用，但两者确实对细胞活性造成一定损伤，这是因为本实验只检测5个基因（Bcl-2、Bax、Bak、Fas、FasL）表达差异，不能代表药物对机体的全部影响，故对佐太、β-HgS、HgCl₂产生细胞毒性的信号通路还需要进一步深入探索。

综上所述，佐太、β-HgS对PC12细胞的毒性远小于HgCl₂，两者可能会引起促凋亡基因Bax、Bak和死亡受体Fas/FasL通路的信号传导阻滞，而HgCl₂可能通过抑制抗凋亡基因Bcl-2表达、激活Fas/FasL通路来引起细胞凋亡，这可为研究佐太等含汞药物的药理活性、毒理作用提供新思路。

参考文献：

[1] 王智森, 基础藏药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
[2] 贾敏如, 卢晓琳, 马逾英. 初论我国少数民族使用矿物药的品种概况[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4693-4702.
[3] 嘎玛曲培, 土登格桑, 格 穷. 药用水银粉末(坐台)的加工方法: 中国, CN1038406[P]. 1990-01-03.

[4] Zhao X Y, Sun M, Wang J X, et al. Characterization of tibetan medicine Zuota by multiple techniques [J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2013, 2013: 198545.
[5] Li C, Yang H X, Du Y Z, et al. Chemical species, micromorphology, and XRD fingerprint analysis of Tibetan medicine Zuotai containing mercury [J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2016, 2016: 7010519.
[6] 王东平, 魏立新, 杜玉枝, 等. 藏药“佐太”中硫化汞含量测定的方法学考察[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1359-1361.
[7] 王维恩. 藏药“佐太”的粉末X射线衍射指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1179-1184.
[8] 李 岑, 占 堆, 楞本才让, 等. 藏药佐太的化学成分、汞配位结构及微观形貌分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 1072-1078.
[9] 赵 静, 张 明, 耿卢婧, 等. 藏药佐太在两种抑郁小鼠模型中的抗抑郁活性[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1461-1467.
[10] 曾 勇, 何毓敏, 刘 颖, 等. 藏药“佐塔”对中枢神经系统的部分药理作用研究[J]. 四川中医, 2005, 23(11): 33-34.
[11] 何海洋, 康 峰, 颜俊文, 等. 朱砂、朱砂安神丸与氯化汞、轻粉的急性毒性对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 219-223.
[12] 朱洪梅, 魏立新, 杜玉枝, 等. 藏药佐太长期给药对小鼠毒性的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 2022-2024.
[13] Wu Q, Li W K, Zhou Z P, et al. The Tibetan medicine Zuotai differs from HgCl₂ and MeHg in producing liver injury in mice [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 78: 1-7.
[14] Shi J Z, Kang F, Wu Q, et al. Nephrotoxicity of mercuric chloride, methylmercury and cinnabar-containing Zhu-Sha-An-Shen-Wan in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 200(3): 194-200.
[15] Chu J J, Liu S H, Lin-Shiau S Y. Differential neurotoxic effects of methylmercury and mercuric sulfide in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 169(2): 109-120.
[16] Liu J, Shi J Z, Yu L M, et al. Mercury in traditional medicines: is cinnabar toxicologically similar to common mercurials? [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 233(7): 810-817.
[17] Wu Q, Lu Y F, Shi J Z, et al. Chemical form of metals in traditional medicines underlines potential toxicity in cell cultures[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 839-843.
[18] 阎立峰. 藏药“佐太”的微结构与成分分析[J]. 中国藏学, 2007(3): 150-152, 174.
[19] Asharani P V, Low Kah Mun G, Hande M P, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(2): 279-290.
[20] Hussain S M, Javorina A K, Schrand A M, et al. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 92(2): 456-463.
[21] Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation[J]. *J Immunol Methods*, 1986, 94(1-2): 57-63.

57-63.

[22] Liu J, Lu Y F, Li W K, *et al.* Mercury sulfides are much less nephrotoxic than mercury chloride and methylmercury in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 262: 153-160.

[23] Dong W, Liu J, Wei L X, *et al.* Developmental toxicity from exposure to various forms of mercury compounds in medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2282.

[24] Carranza-Rosales P, Said-Fernandez S, Sepulveda-Saavedra J, *et al.* Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultra-structural evidence for an apoptotic mechanism of damage [J]. *Toxicology*, 2005, 210(2-3): 111-121.

[25] 孟祥东, 严云勤. BCL-2 家族与线粒体对细胞凋亡的调控 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(S1): S77-S79.

[26] Ormerod M G, O’ neill C F, Robertson D, *et al.* Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA [J]. *Exp Cell Res*, 1994, 211(2): 231-237.

[27] Kiefer M C, Brauer M J, Powers V C, *et al.* Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak [J]. *Nature*, 1995, 374(6524): 736-739.

[28] Munoz L E, van Bavel C, Franz S, *et al.* Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2008, 17(5): 371-375.

[29] Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis [J]. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 29-55.

大鼠皮肤类过敏试验的组织学机制

黄怡文, 谢家骏*, 杨艺帆, 陈 锰, 宋艳荣
(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

摘要: **目的** 探索大鼠皮肤类过敏试验的组织学机制。**方法** 大鼠背部脊柱两侧分别皮内注射 C48/80、吐温-80、碘海醇注射液、紫杉醇注射液、注射用血塞通 (冻干)、喜炎平注射液后, 立即尾静脉注射 0.5% 伊文思蓝溶液, 15 min 后麻醉处死, 剪取背部皮肤, 测量蓝斑直径, 取蓝斑皮肤观察肥大细胞形态, 计算脱颗粒率。再采用 Pearson 检验进行相关性分析。**结果** 皮内注射 C48/80、吐温-80、碘海醇注射液、紫杉醇注射液、注射用血塞通 (冻干) 后, 蓝斑直径、肥大细胞脱颗粒率与药物质量浓度 (体积分数) 均呈正相关, 两者之间亦然, 但肥大细胞数均无明显变化 [除 0.8、1.6 mg/mL 注射用血塞通 (冻干) 外]; 皮内注射喜炎平注射液后, 蓝斑直径、肥大细胞数、脱颗粒率均无明显变化 (除质量浓度 5 mg/mL 时蓝斑直径外)。**结论** 大鼠皮肤类过敏试验组织学机制是类过敏阳性物质致皮肤肥大细胞脱颗粒, 其脱颗粒率与阳性物质浓度、皮肤蓝斑直径呈高度正相关, 可作为药物类过敏性及其反应强度评判的一项补充指标。

关键词: 大鼠皮肤类过敏试验; 组织学机制; 肥大细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)03-0548-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.03.013

Histological mechanisms for rat skin anaphylactoid test

HUANG Yi-wen, XIE Jia-jun*, YANG Yi-fan, CHEN Meng, SONG Yan-rong
(Research Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS: rat skin anaphylactoid test; histological mechanisms; mast cells

研究表明, 在中药注射液静脉注射产生的不良反应中, 类过敏反应居多^[1-2], 它主要通过直接刺激肥大细胞^[3-5]、激活补体^[6-8]等途径致肥大细胞脱颗粒, 并释放组胺等多种活性介质, 进而引发毛细血管扩张、腺体分泌增加、平滑肌收缩等一系列病理变化, 导致皮肤、呼吸道、消化道、甚至全身

收稿日期: 2018-11-20
基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09301-009)
作者简介: 黄怡文 (1983—), 女, 实验师, 从事中药毒理学研究与安全性评价。Tel: (021) 51322402, E-mail: hyw@shutcm.edu.cn
* 通信作者: 谢家骏 (1959—), 男, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药理毒理学研究与中药新药开发。Tel: (021) 51322395, E-mail: xiejj001@163.com