

暑内毒素血症时腹腔巨噬细胞内游离钙离子浓度, 达到保护细胞的目的。

#### 参考文献:

- [1] 谭余庆, 赵一, 林启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24 (3): 166-171.
- [2] 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的炎症因子合成抑制作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8 (5): 262-265.
- [3] 梁爱华, 薛宝云, 李春英, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的一氧化氮合成的抑制作用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26 (11): 770-774.
- [4] 罗炳德, 万为人, 闫文生, 等. 动物受热致死过程中内毒素血症的

研究 [J]. Chinese J Ind Med, 1998, 11 (3): 140-143.

- [5] Yasuda S, Sugiura S, Yamashita H, et al. Unloaded shortening increases peak of  $Ca^{2+}$  transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285 (2): 470-475.
- [6] White DJ, Maass DL, Sanders B, et al. Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after bum trauma [J]. Crit Care Med, 2002, 30 (1): 14-22.
- [7] Tombal B, Denmeade SR, Isaacs TJ. Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of  $[Ca^{2+}]_i$  in individual cells undergoing apoptosis [J]. Cell Calcium, 1999, 25 (1): 19-28.

## 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬功能的影响

谭庆, 罗炳德<sup>\*</sup>, 张培, 周爱军, 杨光, 李文

(第一军医大学高温医学研究室, 广东 广州 510515)

**摘要:** 目的 研究青蒿琥酯 (AR) 对高温内毒素 (LPS) 复合因素下巨噬细胞吞噬功能的影响。方法 采用体外培养的巨噬细胞系 RAW264.7 细胞, 分成空白对照组、AR 组、LPS 组及 AR+LPS 组, 分别于 37℃ 和 40℃, 含 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1、2、3、4 h 后, 台盼蓝染色计数细胞存活数, 吞噬中性红实验检测巨噬细胞的吞噬功能。结果 经不同条件处理 3 h 后各组细胞存活数无差异, 均大于 95%; 高温内毒素复合因素使巨噬细胞的吞噬功能明显降低, 青蒿琥酯亦使巨噬细胞的吞噬功能下降, 但青蒿琥酯加内毒素组的吞噬功能明显强于单纯内毒素组。结论 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下的巨噬细胞的吞噬功能有增强作用。

**关键词:** 高温; 内毒素; 巨噬细胞; 吞噬功能; 青蒿琥酯

中图分类号: R135.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2005) 02-0098-03

### Experimental study of artesunate on phagocytosis of macrophage with compound influence of hyperthermia and lipopolysaccharide

TAN Qing, LUO Bing-de, ZHANG Pei, ZHOU Ai-jun, YANG Guang, LI Wen

(Department of High Temperature Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou, 510515, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of artesunate (AR) on phagocytosis of macrophage with compound influence of hyperthermia and lipopolysaccharide (LPS). **Method** A macrophage cell line RAW264.7 was employed in an in vitro experiment and cells were divided into blank control group, AR group, LPS group and AR+LPS group. Cells were incubated for 1, 2, 3 and 4 hours at 37℃ or 40℃ with 5% CO<sub>2</sub>, respectively, and stained with trypan blue for counting of survival cells and neutral red absorption test was used to observe phagocytosis function of macrophages. **Result** No significant difference in survival rate (more than 95%) of macrophages was observed in all the groups 3 h after different treatments. Phagocytosis of macrophages decreased significantly by AR and under compound influence of hyperthermia and LPS, but phagocytosis in cells treated with both AR and LPS was significantly stronger than that in those treated with LPS only. **Conclusion** AR could evidently enhance phagocytosis of macrophages under compound influence of hyperthermia and LPS.

**Key words:** Hyperthermia; Lipopolysaccharide; Macrophage; Phagocytosis; Artesunate

Shapiro 及 Gathiram 等研究表明, 内毒素在中暑的发病过程中起着不可忽视的作用。研究表明青蒿衍生物青蒿琥酯对

抗外源性内毒素血症、降低内毒素引起的细胞因子对机体的危害方面有着很好的效果<sup>[1,2]</sup>, 对细胞的保护作用也十分明显<sup>[3]</sup>。本实验旨在研究高温及内毒素复合因素条件下青蒿琥酯对巨噬细胞吞噬功能的影响, 以期探讨青蒿琥酯抗中暑内毒素血症的机制。

#### 1 材料与方法

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2004-11-25

作者简介: 谭庆 (1976-), 男, 在读硕士研究生。

<sup>\*</sup>: 通讯作者, 研究员, 博士生导师, 主要从事实验性中暑 LPS 血症及其对策的研究。

### 1.1 试剂

青蒿琥酯（桂林第二制药厂生产，批号：030101），临用前用专用的  $\text{NaHCO}_3$  溶液溶解，再用生理盐水稀释成 2 mg/ml 的工作液。细菌内毒素（LPS，美国 Sigma 公司），用 RPMI1640 配成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的储存液置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱保存，临用前稀释成 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的工作液。RPMI1640（美国 Gibco 公司生产，Cat. No. 31800-022，Lot No. 1120708），按说明书配成所需溶液。小牛血清（杭州四季青公司生产），灭活后分装，于  $-20^\circ\text{C}$  保存。胰酶（上海生工，AMRESCO 分装，Lot No. 0182b97），用 D-hank's 液配成 0.25% 溶液， $4^\circ\text{C}$  冰箱保存。中性红（上海新中化工厂生产，批号：6-60-02-25），用生理盐水配成 0.075% 溶液，滤过除菌后分装。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞

RAW264.7 细胞为小鼠来源的巨噬细胞系，用 RPMI1640 完全培养基（含 10% 灭活小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素，pH 7.1~7.2）传代培养。

### 1.3 实验方法

1.3.1 RAW264.7 细胞培养 细胞用 RPMI1640 完全培养基传代培养。实验时用 0.25% 胰酶消化细胞后收集细胞，细胞浓度调制成  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，加入到 96 孔培养板（共计 6 块板），每孔 200  $\mu\text{l}$ ，每组 3 个复孔，于 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  条件下培养 12 h 后用于实验。

1.3.2 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞死亡率的影响 向培养有细胞的 96 孔板中按实验要求分别加入 AR 1  $\mu\text{l}$ （使 AR 终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），LPS 1  $\mu\text{l}$ （使 LPS 终浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），AR 1  $\mu\text{l}$  + LPS 1  $\mu\text{l}$ （使其终浓度分别为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ），再同时分别置入  $37^\circ\text{C}$  和  $40^\circ\text{C}$ ，含 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中，1、2、3、4 h 后取出，分别加入 100  $\mu\text{l}$  0.5% 台盼蓝染液，并用 100  $\mu\text{l}$  的微量移液器反复吹打使细胞与染液充分混匀。于倒置显微镜下计数 200 个细胞，活细胞圆形透明，死细胞染成蓝色，用死细胞占计数细胞中的百分比表示细胞死亡率。

1.3.3 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬能力的影响（中性红吞噬实验）200  $\mu\text{l}$  细胞悬液，实验条件同上，分别于 1、2、3 h 后取出 96 孔板，弃上清，预温 PBS 洗 2

次，加入 0.075% 中性红生理盐水溶液 100  $\mu\text{l}$ ， $37^\circ\text{C}$  含 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中继续培养 1 h，弃上清，预温 PBS 洗 2 次，加入 200  $\mu\text{l}$  裂解液（无水乙醇 0.1 mol/L 乙酸，比例 1:1），室温震荡 3 h 使其充分溶解、破碎，置酶标仪于 570 nm 波长测吸光度，以吸光度值大小表示巨噬细胞摄取中性红的能力强弱（吸光度值大则吞噬能力强）。

1.3.4 统计学方法 实验资料均用 SPSS10.0 进行方差分析。

### 2 结果

#### 2.1 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞死亡率的影响

在各种因素处理 3 h 后，各实验组的细胞存活数均在 95% 以上，说明在高温、青蒿琥酯、内毒素复合因素下作用 3 h 并未对细胞造成致死性伤害，而处理时间达 4 h 时，高温加内毒素组的细胞存活数低于 95%，与其他组比较差异有显著性（表 1），因此选择 3 h 为处理因素作用时间，而为下一步实验具有可比性打下基础。

表 1 各处理因素作用 3、4 h 后巨噬细胞死亡率的比较（%）（ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别       | 37 $^\circ\text{C}$ |               | 40 $^\circ\text{C}$ |                |
|----------|---------------------|---------------|---------------------|----------------|
|          | 3 h                 | 4 h           | 3 h                 | 4 h            |
| 空白对照     | 4.4 $\pm$ 0.5       | 3.2 $\pm$ 0.9 | 3.6 $\pm$ 0.5       | 4.2 $\pm$ 0.5  |
| AR 组     | 4.2 $\pm$ 0.5       | 4.2 $\pm$ 0.5 | 3.6 $\pm$ 0.5       | 3.6 $\pm$ 0.5  |
| LPS 组    | 4.2 $\pm$ 0.5       | 4.4 $\pm$ 0.5 | 4.8 $\pm$ 0.8       | 6.4 $\pm$ 1.1* |
| AR+LPS 组 | 4.8 $\pm$ 0.8       | 4.4 $\pm$ 0.5 | 4.2 $\pm$ 0.5       | 4.4 $\pm$ 0.5  |

与其他处理组比较 \*  $P < 0.05$

#### 2.2 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬能力的影响

在  $37^\circ\text{C}$  及  $40^\circ\text{C}$  条件下，青蒿琥酯终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时，1 h 时吞噬功能有明显增强，随着作用时间的不断延长，对巨噬细胞的吞噬功能主要表现为抑制。内毒素终浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时亦有同样表现。

AR+LPS 组在  $37^\circ\text{C}$  和  $40^\circ\text{C}$  条件下 1 h 时吞噬功能有明显增强，其后亦表现为抑制；但  $37^\circ\text{C}$  1 h、2 h 时和  $40^\circ\text{C}$  1 h、2 h、3 h 时 AR+LPS 组对吞噬功能的抑制程度均明显小于 LPS 组，差异有显著意义（表 2）。

表 2 青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬能力的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别       | 37 $^\circ\text{C}$ 条件下 OD 值 |                      |                     | 40 $^\circ\text{C}$ 条件下 OD 值 |                     |                     |
|----------|------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
|          | 1 h                          | 2 h                  | 3 h                 | 1 h                          | 2 h                 | 3 h                 |
| 空白对照     | 1.081 $\pm$ 0.014            | 1.080 $\pm$ 0.029    | 1.083 $\pm$ 0.031   | 1.161 $\pm$ 0.012            | 1.195 $\pm$ 0.012   | 1.215 $\pm$ 0.013   |
| AR 组     | 1.142 $\pm$ 0.015**          | 1.052 $\pm$ 0.011    | 1.024 $\pm$ 0.029*  | 1.157 $\pm$ 0.014            | 1.163 $\pm$ 0.010*  | 1.164 $\pm$ 0.009*  |
| LPS 组    | 1.135 $\pm$ 0.028**          | 0.990 $\pm$ 0.017**  | 0.981 $\pm$ 0.018*  | 1.163 $\pm$ 0.024            | 1.136 $\pm$ 0.011*  | 1.122 $\pm$ 0.015*  |
| AR+LPS 组 | 1.190 $\pm$ 0.014*▲          | 1.024 $\pm$ 0.015**▲ | 1.003 $\pm$ 0.016** | 1.197 $\pm$ 0.010*▲▲         | 1.160 $\pm$ 0.010*▲ | 1.146 $\pm$ 0.013*▲ |

与同温度同时间空白对照组比，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ；与同温度同时间内毒素组比较，▲  $P < 0.05$ ，▲▲  $P < 0.01$

### 3 讨论

单核巨噬细胞是内毒素的主要效应细胞<sup>[4]</sup>。实验结果提示，随着作用时间的延长内毒素对巨噬细胞的效应最终表现为抑制。这与 Hampton 观察到 LPS 对 RAW264.7 有强烈的抑制作用以及临床上见到的在内毒素血症时巨噬细胞的吞噬功能表现

为抑制的现象是一致的； $40^\circ\text{C}$  条件下，尽管高温使巨噬细胞的吞噬功能有明显增强，但内毒素使巨噬细胞的吞噬功能的抑制效应表现更为明显，最终使我们观察到在高温内毒素复合因素作用下巨噬细胞的吞噬功能表现为抑制。此提示在中暑发生发展的过程中，当机体存在内毒素血症时，巨噬细胞的吞噬功

能极可能发生一定变化,但由于体内和体外培养的条件不同,在活体条件下是否表现为抑制尚有待进一步探讨。

有研究表明 LPS 刺激能降低几种溶酶体酶的活性。内毒素可直接激活磷脂酶 A<sub>2</sub>, 使花生四烯酸释放增多,同时在环氧化酶的作用下生成前列腺素(PGE<sub>2</sub>、PGH<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>等),在这个过程中伴有大量自由基的产生;巨噬细胞在发挥吞噬作用时,也会产生大量的氧自由基。氧自由基可损伤细胞本身,其中包括细胞的凋亡和吞噬功能的降低。本实验 1 h 时处理组吞噬功能增强而其后最终表现为较空白组降低似乎与此有关。

在本实验中 AR+LPS 组的吞噬功能在 2、3 h 时介于 AR 组和 LPS 组之间,与单纯内毒素组比较差异有显著性(表 2),说明青蒿琥酯对高温内毒素复合因素下巨噬细胞吞噬功能有增强作用。我们前期实验发现青蒿琥酯能增加细胞应激后的 SOD 含量及降低 MDA 水平,降低应激时细胞内钙离子的浓度,亦有研究表明青蒿琥酯能保护和稳定溶酶体<sup>[4]</sup>,并能降低细胞凋亡率<sup>[5,6]</sup>。鉴于上述,考虑青蒿琥酯对巨噬细胞吞噬功能增强的作用机制可能是:(1)抑制细胞应激过程中的脂质过氧化作用;(2)降低热应激时细胞内钙离子的浓度;(3)保护和稳定

溶酶体;(4)拮抗内毒素对巨噬细胞的凋亡。总之,青蒿琥酯能够增强高温内毒素复合因素下巨噬细胞的吞噬功能,此也可能是该药在防治中暑内毒素血症中发挥有效作用的机制之一。

参考文献:

[1] Schmidt M, Pauels H G, Luger N, et al. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta [J]. Immunol, 1999, 163 (6): 3484-3490.  
[2] 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的炎症因子合成抑制作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8 (5): 262-265.  
[3] 谭余庆, 赵一, 林启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24 (3): 166-171.  
[4] 曹中伟, 张顺财. 内毒素的结构与生物遗传学特征 [A]. 张顺财. 内毒素基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 1-21.  
[5] 李文桂, 陈雅棠, 刘成伟. 双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫肺炎大鼠脾细胞凋亡的影响 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003 19(2): 55-59.  
[6] Buggen I V, Robertson T A, Papadimitriou J M. The effect of mild hyperthermia on the morphology and function of murine resident peritoneal macrophages [J]. Exp Mol Pathol, 1991, 55 (2): 119-134.

·短篇报道·

口腔医务人员 HBV 职业接触的风险及防护

富春时<sup>1</sup>, 邵丽娜<sup>1</sup>, 姜文兰<sup>2</sup>

(1. 沈阳市红十字会医院, 辽宁 沈阳 110013; 2. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种严重威胁人类健康的传染病, 据估计全世界约有 2.15 亿 HBsAg 无症状携带者, 我国有 1 亿人左右。这些看似“健康”的慢性带病毒者, 经常就诊口腔科, 其潜在危害相当严重。

1 口腔医护人员职业接触后感染 HBV 及传播

口腔科器械多为锐器, 器械刺伤较频繁。在口腔治疗过程中, 如拔牙时牙龈及牙髓腔出血, 可能污染器械, 感染口腔医务人员, 若器械消毒不彻底, 又会感染其他患者。Feldman 对美国 434 名口腔科工作者进行了调查, 发现肝炎患病率为 6.7%, 其中口腔外科医生患病率高达 21%, 口腔矫正医生为 11%, 儿童医生为 10%, 普通牙科医生为 5%, 大大高于美国一般人群乙型肝炎患病率<sup>[1]</sup>。国外资料表明, 口腔医务人员的肝炎发病率为普通人群 6 倍, HBsAg 携带率及其抗体 (抗 HBs) 为普通人群 3~5 倍。Mosley 指出 HBsAg 阳性率随工龄而增长, 工龄 40 年以上工作者 HBV 感染率为 29.9%, 高于上海传染病医院总阳性率 (24.7%), 证明口腔科医师的职业感染不容忽视。另外值得注意的是, 不仅牙科病人可以将 HBV 传染给医护人员, 医护人员同样可以将 HBV 传染给病人。Rimland<sup>[2]</sup> 在 1977 年曾追踪报道了 1 例无症状 HBsAg 携带者的口腔外科医生, 55 例经其治疗的患者中 79% 发展为 HBsAg 阳性, 进一步研究证实, 这些患者大部分没有可能从其他途径感染 HBV; 而且对 HBV 感染中的 11 例进行 HBsAg 亚型的检测, 其中 9 例与该医生相同。再者, 由于口腔器械的使用常可以引起病人一病人之间的传播。王

中和<sup>[3]</sup> 对 300 例拔牙后的器械采样进行检测 HBsAg, 阳性率为 4.7%; 污物中 HBsAg 阳性率为 6.7%。口腔器械消毒不当, 也可引起病人一病人之间的交叉感染应引起高度重视。1991 年 Porter<sup>[4]</sup> 报道, 由于器械消毒等工作逐步完善, HBV 在口腔科医务人员中感染率已明显下降。

2 防止 HBV 交叉感染的对策

2.1 认真做好医护人员个人防护 口腔科医务人员应加强职业卫生习惯教育, 操作时, 必须坚持戴口罩、帽子和一次性手套, 必须带防护眼镜, 穿领式工作衣, 做到内衣不外露。医师治疗每一病人后, 双手用 3% 碘伏洗刷 2 min, 然后在流动水下清洗。

2.2 严格做好器械消毒 朱天岭<sup>[5]</sup> 研究发现, 大多数消毒剂对手部表面的消毒效果不好。只有用高压蒸气法或高温真空消毒法, 可达到彻底消毒, 但需 20~30 min。目前, 卫生部提倡实施“一人一机一用一消毒灭菌”的制度是完全必要的。凡进入口腔内的器械, 均应进行消毒灭菌处理, 口杯、注射器、手套等使用一次性用品, 以避免交叉污染。

2.3 及时发现传染源 对患者的病毒感染情况应进行详细询问, 必要时进行病毒学检测, 及时发现, 做好消毒隔离。

2.4 医务人员的健康监测 定期体检, 进行必要化验检查, 并根据自身实际情况, 做好计划免疫, 定期注射疫苗。

参考文献:

[1] 查启民. 乙型病毒肝炎与口腔医生 [J]. 国外医学口腔分册, 1990, 7 (5): 275.  
[2] Rimland, Celland NL, Meb C. Hepatitis about break traced to an oral surgeon [J]. The New Eng J Med 1987, 296 (17): 953.  
[3] 王中和. 乙型肝炎病毒口腔颌面外科传染的危险性 [J]. 口腔医学, 1992, 2 (1): 13.  
[4] Porter SR. Infection control in dentistry [J]. Curr Opin Dent, 1991, 1: 429-435.  
[5] 朱天岭, 董晶, 周耀皓, 等. 加强口腔消毒灭菌的规范管理 [J]. 中华医院感染学杂志, 2001, 6 (2): 102-103.