

- (12): 627-629.
- [4] Fang F, Dong Y S, Li H, *et al.* Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with Allitridin Injection: an experimental study [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1999, 19: 271-275.
- [5] Duan Y, Hernandez R, Pang L, *et al.* Spread of murine cytomegalovirus to inner ocular structures following disruption of the blood-retina barrier in immunosuppressed BALB/c mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(5): 935-940.
- [6] Atherton S S, Newell C K, Kanter M Y, *et al.* T cell depletion increases susceptibility to murine cytomegalovirus retinitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33 (12): 3353-3360.
- [7] Xu S, Bian R L, Chen X, *et al.* *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [8] Knodell R G, Ishak K G, Black W C, *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [J]. *Hepatology*, 1981, 1: 431-435.
- [9] Desmet V J, Gerber M, Hoofnagle J H, *et al.* Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging [J]. *Hepatology*, 1994, 19: 1513-1520.
- [10] Feng Z H, Huang Fu Y M, *Basic Experimental Techniques in Molecular Biology* (分子生物学基本实验技术) [M]. Wuhan: Tongji Medical University Publishing House, 2000.
- [11] Rawlinson W D, Farrell H E, Barrell B G. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus [J]. *J Virol*, 1996, 70 (12): 8833-8849.
- [12] Overall J C J, Kern E R, Glasgow L A. Effective antiviral chemotherapy in cytomegalovirus infection of mice [J]. *J Infect Dis*, 1976, 133: A237-A244.
- [13] Bolger G, Lapeyre N, Rheaume M, *et al.* Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis [J]. *Antiviral Res*, 1999, 44(3): 155-165.
- [14] Smee D F, Reist E J. Potent anti-murine cytomegalovirus activity and reduced nephrotoxicity of ganciclovir cyclic phosphonate [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(8): 1964-1966.
- [15] Fan D H, Wang Y L. *Chinese Drugs Encyclopedia (Western Medicine)* (中国药物大全西药卷) [M]. 2nd ed, Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [16] Alnaqeb M A, Thomson M, Bordia T, *et al.* Histopathological effects of garlic on liver and lung of rats [J]. *Toxicol Lett*, 1996, 85(3): 157-164.

## 土槿乙酸对人黑素瘤细胞增殖抑制作用研究

姜孟臣, 陈虹, 张敏, 陈莉\*

(武警医学院 药学教研室, 天津 300162)

**摘要:** 目的 研究土槿乙酸 (PAB) 对人黑素瘤细胞 (LiBr) 生长的抑制效应, 并探讨其作用机制。方法 用不同浓度的 PAB 加入体外培养 LiBr 细胞中, 观察加药后细胞生长数量及其形态的变化; 用 MTT 法检测 PAB 的细胞毒作用; 用 Hoechst 33342 和 PI 双荧光染色法检测细胞凋亡。用免疫细胞化学方法, 观察 LiBr 细胞基因表达的变化。结果 PAB 明显抑制 LiBr 细胞生长;  $IC_{50}$  值为  $2.5 \times 10^{-5}$  mol/L; 其抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系; 凋亡细胞的比例与药物浓度及作用时间呈正相关。免疫细胞化学检测显示 p21<sup>WAF1</sup> 表达增强。结论 PAB 能有效抑制 LiBr 细胞的增殖。

**关键词:** 土槿乙酸; LiBr 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0532-03

### Effect of pseudolaric acid B on proliferation of human LiBr cell line *in vitro*

JIANG Meng-chen, CHEN Hong, ZHANG Min, CHEN Li

(Department of Pharmacy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

**Abstract** **Object** To study the inhibitory effects and mechanism of pseudolaric acid B (PAB) on the growth of LiBr cell line. **Methods** PAB in different concentrations was added into the medium in which LiBr cells were cultured. The changes of cell morphology were observed by phase contrast microscope. Cytotoxicity of PAB was detected by MTT. The number of apoptotic cell was calculated by double fluorescent staining. The level of p21<sup>WAF1</sup> protein was measured with immunocytochemistry. **Results** The growth of LiBr cell line was remarkably inhibited by PAB. The  $IC_{50}$  values of PAB for LiBr cells was  $2.5 \times 10^{-5}$  mol/L. The inhibitory rate and the apoptotic cell rate were related with the medicine concentration. The level of p21<sup>WAF1</sup> protein in LiBr cells treated with PAB was obviously increased. **Conclusion** PAB can effectively inhibit the proliferation of LiBr cell line.

**Key words** pseudolaric acid B (PAB); LiBr cell line; cell proliferation

收稿日期: 2002-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171108); 天津市自然科学基金重点课题 (003805211)

作者简介: 姜孟臣 (1962-), 男, 内蒙古赤峰市人, 学士, 毕业于内蒙古医学院, 硕士学位在读, 现在武警医学院药学教研室工作, 研究方向: 抗肿瘤药物作用机制研究。

土槿乙酸 (pseudolaric acid B, PAB) 是松科植物金钱松树皮 (土槿皮) 中提取的有效成分。近年来研究发现 PAB 具有较强的抗肿瘤作用,对 K562, MCF-7, MGC-803, HT1080 等肿瘤细胞株有抑制作用<sup>[1,2]</sup>,而对人黑素瘤细胞 (LiBr) 的作用研究尚未见报道。我们以 LiBr 细胞株为靶细胞观察了不同浓度的 PAB 在体外对该细胞增殖的影响及细胞形态变化,并对其抗肿瘤作用机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器: PAB (含量 98%, 武警医学院药理学教研室提供), DMEM 培养基 (Gibco 公司产品), MTT, Hoechst 33342, PI (碘化丙啶), 胰蛋白酶 (均为 Sigma 公司产品), LiBr (由天津市肿瘤医院生化室引进), 胎牛血清 (中国医学科学院血液学研究所提供), 青霉素、链霉素 (华北制药厂生产), 550 型全自动酶标仪 (美国 BIO RAD)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: LiBr 细胞株体外培养于 DMEM 培养基中, 培养基内含 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中进行体外培养。

1.2.2 细胞生长曲线的测定: 取对数生长期 LiBr 细胞, 用 0.125% 胰酶和 EDTA 液消化细胞, 制成细胞混悬液, 计数, 调整细胞浓度为 3.0 × 10<sup>5</sup> /mL, 接种于 25 mL 培养瓶内培养 24 h 后, 实验组加入不同浓度的 PAB (5, 10, 50 μmol/L), 对照组加等量培养基。以后每天随机从 4 组细胞中, 各取出 3 瓶细胞, 用台盼蓝拒染法, 在光镜下计活细胞数, 取平均值, 以时间为横坐标, 活细胞数为纵坐标, 作图得细胞生长曲线。

1.2.3 细胞形态学观察: 于加药后不同时间, 在倒置显微镜下, 观察细胞形态变化, 并摄像记录。

1.2.4 PAB 对 LiBr 的细胞毒作用: 按上述方法制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 4 × 10<sup>4</sup> /mL, 接种于 96 孔培养板上, 每孔加 200 μL 细胞悬液, 培养 24 h 后, 加入不同浓度 PAB (3.125 × 10<sup>-6</sup> ~ 1 × 10<sup>-4</sup> mol/L), 倍比梯度稀释, 另设对照组 (不加 PAB) 和空白对照组 (只加培养基)。每组设 8 个复孔, 加药后 48 h, 加 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 4 h 后, 加入 DMSO 200 μL 避光振荡 10 min, 用全自动酶标仪 (波长 490 nm) 测定各孔吸光度 (A) 值, 按文献<sup>[3]</sup>方法计算细胞生长抑制率。

1.2.5 双荧光染色法检测细胞凋亡: 取对数生长期细胞加入不同浓度的 PAB (5 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup>, 5 × 10<sup>-6</sup>

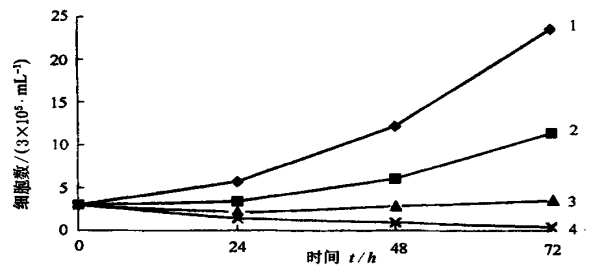
mol/L) 进行实验, 于 24, 48, 72 h 取出细胞, 按文献<sup>[4]</sup>方法, 将细胞消化, 离心, 洗涤后制成细胞悬液, 用 Hoechst 33342 和 PI 进行双荧光染色, 在荧光显微镜下观察细胞核形态变化, 并计数和摄像记录。

1.2.6 PAB 对 LiBr 细胞 p21<sup>WAF1</sup> 表达的影响: 取对数生长期的细胞, 加入不同浓度的 PAB (5 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-5</sup>, 5 × 10<sup>-6</sup> mol/L) 继续培养 24 h, 并设对照组, 将细胞消化, 离心, 洗涤后涂片, 用丙酮固定, 免疫细胞化学染色步骤按博士德公司试剂盒说明书进行。

1.2.7 统计学处理: 实验结果用统计软件 SPSS 分析, 组间进行 t 检验。

2 结果

2.1 PAB 对 LiBr 细胞生长的抑制作用: 由细胞计数绘制的生长曲线可见, LiBr 细胞经 3 种不同浓度的 PAB 处理后, 细胞生长受到明显的抑制, 其中 PAB 50 μmol/L 组的抑制作用最强, 见图 1。



1-对照 2-PAB 5 μmol/L 3-PAB 10 μmol/L 4-PAB 50 μmol/L  
图 1 PAB 对 LiBr 细胞生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of PAB on grown of LiBr cells

2.2 PAB 对 LiBr 细胞形态变化的影响: 实验组细胞在加药后 24 h, 在倒置光学显微镜下观察, 可见大部分细胞由梭形变为圆形, 胞体皱缩, 细胞核边移, 核凝集, 细胞周围出现大小不等的膜被小体, 尤以 PAB 50 μmol/L 组细胞形态变化最明显, 细胞数与对照组比较明显减少。

2.3 PAB 对 LiBr 的细胞毒作用: LiBr 细胞经 PAB 处理 48 h 后, 经 MTT 法检测, 活细胞数明显减少, IC<sub>50</sub> 值为 2.5 × 10<sup>-5</sup> mol/L, 与对照组有显著性差异, 见表 1。

2.4 PAB 诱发 LiBr 细胞凋亡: 经双荧光染色法染色后, 可见对照组细胞核均匀一致, 被 Hoechst 33342 染成蓝色荧光, 经 PAB 处理后, 核染色质凝集, 碎裂, 出现凋亡小体, 凋亡细胞数目随药物浓度增加及用药时间延长逐渐增多, 其中 PAB 5 × 10<sup>-5</sup> mol/L 作用最为明显, 于加药后 24 h 细胞凋亡比率

表 1 PAB对 LiBr的细胞毒作用  
Table 1 Cytotoxic effect of PAB on LiBr cells

组别	药物浓度 / (mol · L <sup>-1</sup> )	A <sub>490</sub>	抑制率 / %
空白	-	0.0890 ± 0.0058	0
对照	-	0.4640 ± 0.0257	0
PAB	3.125 × 10 <sup>-6</sup>	0.3758 ± 0.0295	23.52
	6.250 × 10 <sup>-6</sup>	0.3052 ± 0.0276 *	42.35
	1.250 × 10 <sup>-5</sup>	0.2922 ± 0.0236 *	45.82
	2.500 × 10 <sup>-5</sup>	0.2702 ± 0.0249 *	51.69
	5.000 × 10 <sup>-5</sup>	0.2343 ± 0.0145 *	61.25
	1.000 × 10 <sup>-4</sup>	0.1893 ± 0.0065 *	73.25

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs control group

可达 50% 以上,加药后 48 h 细胞凋亡比率可达 80% 以上

2.5 PAB增强 LiBr细胞 p21<sup>WAF1</sup>的表达:经免疫细胞化学染色后,在光学显微镜下可见 p21<sup>WAF1</sup>表达阳性产物位于细胞核和细胞浆中,其中核周区染色较深,其余区域则较浅。实验组经 PAB处理后可见阳性颗粒在细胞核区明显增强,以  $5 \times 10^{-5}$  mol/L PAB处理后作用最为明显。在放大 200倍的视野下计数 1 000个细胞,计算阳性细胞占总细胞的比率,每种处理取 4个标本的均值,阳性细胞百分率由 (4.13 ± 1.08)% 升高至 (43.18 ± 4.35)%,有显著性差异 ( $P < 0.01, n = 4$ )。

### 3 讨论

实验结果表明,PAB能有效地抑制 LiBr细胞的体外增殖,并能诱导其凋亡。50 μmol/L PAB处理 LiBr细胞 24 h后,活细胞数较对照组减少达 66%,48 h达 89%,并随时间延长对细胞的抑制率也增加,细胞生长曲线测定及 MTT细胞毒实验检测均证明 PAB对细胞有明显抑制作用,其抑制率

与药物浓度呈剂量依赖关系。细胞形态观察与双荧光染色法观察证明,PAB可诱导 LiBr细胞凋亡,使细胞核染色质凝集、边移,并发生碎裂,出现凋亡小体,而且还观察到凋亡细胞的比例与药物浓度及作用时间呈正相关。通过免疫细胞化学染色方法检测 LiBr细胞内的 p21<sup>WAF1</sup>基因表达,其表达明显增强,表明 PAB能阻止 LiBr细胞进入 S期,抑制细胞增殖,初步阐明了 PAB抑制肿瘤细胞生长的作用机制。

细胞凋亡是正常细胞发育过程中细胞清除的正常途径,许多研究表明,肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱密切相关<sup>[5]</sup>。凋亡发生时,有凋亡小体形成,并被巨噬细胞吞噬,因此不会引起炎症反应,因此采用外源性药物诱导肿瘤细胞凋亡是一种非常理想的方法。本实验证明 PAB在抑制人黑素瘤细胞增殖的同时使细胞趋于凋亡,但作用机制尚不十分清楚,PAB作为细胞外信号分子,作用于细胞后,其受体和信号转导的过程,以及如何启动细胞凋亡基因表达值得进一步研究。

### References

- [1] Zhang M, Mai X, Chen X Y, et al. The study of anti-carcinoma activity of PAB231 *in vitro* [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2000, 9(12): 243-246.
- [2] Jiang M C, Chen H, Zhang M. Effect of pseudolaric acid B on proliferation of human HT1080 cell line *in vitro* [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2002, 14(2): 36-39.
- [3] Yu B M, Lu A G, Zheng M H, et al. Preliminary study on A-TRA-induced apoptosis of LoVo cell [J]. *Pract J Cancer* (实用癌症杂志), 1998, 13(3): 167-170.
- [4] Chen X Y, Zhang M, Mai X. The rapid test by Hoechst 33342/PI live biofluorescence of medication sensitivity of tumour cell [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2001, 10(4): 300-303.
- [5] Carson D A, Ribeiro J. Apoptosis and disease [J]. *Lancet*, 1993, 341: 1251-1254.

## 西红花酸对压力超负荷致心肌肥厚大鼠的 ATPase 及胶原的影响

沈祥春,钱之玉\*

(中国药科大学 药理教研室,江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究西红花酸对压力超负荷所致心肌肥厚大鼠的 ATPase 及胶原含量的影响。方法 采用腹主动脉部分狭窄术致大鼠心肌肥厚模型,大鼠分为早期组和晚期组,又各自分为假手术对照组、模型组、卡托普利组、西红花酸 100,50 mg/kg 组。测定心脏重量参数,采用试剂盒测定 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-ATPase 的活力及羟脯氨酸的含量。结果 模型早期组(术后 24 h)ATPase 活性明显降低,模型晚期组(术后 1个月)ATPase 活性降低更加明显,羟脯氨酸的含量明显增加。西红花酸晚期组(给药 1个月)能显著提高心肌组织的 ATPase 活力,

\* 收稿日期:2002-10-28

作者简介:沈祥春,男,山东郯城人,中国药科大学博士研究生,主要研究方向:生化药理

\* 通讯作者 Tel (025) 3271322