

黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究

关凤英, 李 红, 杨世杰*

(吉林大学白求恩医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 研究黄芪甲苷 (astragaloside IV, As IV) 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。方法 制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 研究 As IV 对血清中乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响, TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率, 同时电镜观察心肌超微结构变化, Western blotting 法检测心肌细胞胞浆内细胞色素 C (Cyt C) 蛋白表达。结果 与模型组比较, As IV 可降低 LDH 漏出量 ($P < 0.05$), 并可明显降低 MDA 的量 ($P < 0.05$), 增强 SOD 活力 ($P < 0.05$), TUNEL 检测显示 As IV 可降低缺血区周围心肌细胞的凋亡百分率; 超微结构观察显示, 与模型组比较, As IV 组的肌丝、线粒体和细胞核等细胞器形态有明显的改善; Western blotting 法检测结果显示, As IV 组的 Cyt C 释放量低于模型组 ($P < 0.05$)。线粒体 ATP 敏感钾通道 (mito K_{ATP} C) 抑制剂 5 羟癸酸钠 (5HD) 减弱了 As IV 的保护作用。结论 As IV 可以减少心肌缺血再灌注造成的心肌细胞凋亡, 机制与其激活 mitoK_{ATP}C, 抑制细胞凋亡的线粒体信号转导途径有关。

关键词: 黄芪甲苷; 心肌缺血再灌注; 凋亡; 线粒体 ATP 敏感钾通道 (mito K_{ATP} C)

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1146-05

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 是指心肌经受较长时间缺血后得到血液灌注, 此时并不能减轻缺血损伤, 而是加重了损伤, 甚至将可逆性损伤转为不可逆性损伤, MIRI 过程中, 细胞凋亡有着重要的病理意义^[1,2]。一旦心肌细胞受损启动细胞凋亡程序, 可导致心肌细胞数目减少和心功能的降低, 加重 MIRI。1986 年 Murry 等首次报道犬心肌短时反复缺血可缩小随后长时间缺血造成的心肌梗死范围, 即心肌缺血预适应 (myocardial ischemia preconditioning, MIP)。MIP 的保护作用使机体产生了某些活性物质, 增强了细胞或组织器官对不良刺激的耐受性和适应性, 对抗缺血再灌注引起的损伤。MIP 是近年来发现的一种能产生强大而肯定的心脏自我保护作用的措施, 许多临床工作者尝试将 MIP 应用于临床。但其毕竟是一种损伤, 且由于缺血时最佳时间、安全时限等问题使其临床应用受到限制。因此, 近年来提出了药物预适应的概念, 即通过药物激发或模拟内源性保护物质而出现的心肌保护作用, 因其是保护细胞的行之有效的措施, 药物预处理对缺血再灌注损伤心肌的保护成为目前的研究热点之一^[3]。黄芪为重要的益气中药, 在中医方剂中使用广泛, 主要含有多糖、皂苷类等成分, 黄芪多

糖、黄芪甲苷等为其主要有效成分, 药理作用广泛^[4-7]。本实验旨在以细胞凋亡的线粒体途径为切入点, 探讨黄芪中活性成分黄芪甲苷 (astragaloside IV, As IV) 预处理对 MIRI 造成的细胞凋亡的影响及其可能存在的机制。

1 材料

- 1.1 动物: Wistar 雄性大鼠, 清洁级, 体质量 200~250 g, 由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。
- 1.2 药物: 黄芪甲苷 (As IV) 由吉林省中药研究所提供, 质量分数大于 95%。尼可地尔由长春大政国际经贸集团制药有限公司提供。5 羟癸酸钠 (5-hydroxydecanoate, 5-HD) 购于 Sigma 公司。
- 1.3 试剂: 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供; TUNEL 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗大鼠细胞色素 C (CytC) 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 羊抗兔二抗抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。
- 1.4 仪器: GF-200 半自动生化测定仪 (山东高密彩虹仪器有限公司); 6010-紫外分光光度计 (安捷伦上海分析仪器厂生产); GIS-2008 天能凝胶成像分析仪 (上海天能科技有限公司); 立式电泳仪、半干式转膜电泳仪、TS-1 脱色摇床 (江苏海门市麒

* 收稿日期: 2009-09-21

基金项目: 吉林省中医药管理局项目 (08SYS-074)

作者简介: 关凤英 (1975-), 女 (满族), 辽宁省盖州市人, 讲师, 医学博士, 主要从事心血管药理学研究。

Tel: (0431) 85619799 E-mail: fengying_guan@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 杨世杰 Tel: (0431) 85619483 E-mail: jeyaoli@sina.com

麟医用仪器厂); JEM-1200EX 电子显微镜, CK 80 超速低温离心机 (美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 模型制备^[8]: 将 Wistar 大鼠用乌拉坦 (1 g/kg) 麻醉后, 立即仰位固定于手术台上, 将心电图机针型电极插入大鼠四肢皮下, 记录正常 II 导联心电图。调节小动物呼吸机, 潮气量 7 mL/100 g, 吸呼比 2:1, 呼吸频率 70 次, 然后沿胸骨左缘 3~4 肋间开胸, 连接小动物呼吸机, 再次记录 II 导联心电图。暴露心脏, 结扎左冠状动脉前降支 (LAD, 距左心耳下降 2 mm 水平处), 结扎后心脏回位, 记录 II 导联心电图, 并于结扎 30 min 时松开结扎线, 记录再灌后 II 导联心电图。模型复制成功标准: 结扎后 II 导联心电图以 ST 段明显抬高表现为心肌缺血成功复制, 放松结扎线后, 抬高的 ST 段下降 1/2 以上为再灌注成功复制。符合该标准者入选实验。

2.2 实验分组和给药: 大鼠随机分为假手术组, 模型组, As IV (2.5, 5 mg/kg) 组, As IV (5 mg/kg) + 5-HD (5 mg/kg) 组, 阳性药尼可地尔 (10 mg/kg) 组, 每组 6 只。假手术组: 冠状动脉下穿线不结扎, 开胸前 10 min 给予生理盐水 0.2 mL/100 g; 模型组: 开胸前 10 min 给予生理盐水 0.2 mL/100 g, 结扎 LAD; 给药组: 开胸前 10 min 给予相应治疗药物; 5-HD 组: 开胸前 15 min 相应给予 5-HD。给药途径均为 ip。

2.3 酶学测定: 再灌 2 h 结束后, 腹主动脉取血 8~10 mL, 置于塑料试管中, 在 4 °C 下, 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清备用。采用半自动生化测定仪测定血清 LDH 水平; 采用 6010 紫外分光光度计, 分别在 550 nm 和 532 nm 波长下测定吸光度值, 以测定 SOD 和 MDA 水平 (按试剂盒说明书操作)。

2.4 心肌细胞凋亡检测: TUNEL 染色按试剂盒方法检测凋亡细胞的 DNA 碎片。各组实验结束后, 取心尖部位心肌常规脱水固定, 石蜡包埋, 切片, 从各组取 5 张石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度脱水, PBS (pH 7.2) 冲洗 (每次 5 min, 共 3 次, 下同); 蛋白酶 K (20 μg/mL) 37 °C 消化 30 min, PBS 冲洗; 3% H₂O₂ 室温下处理 5 min 以阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗, 以含 0.1% Triton X-100 的 0.1% 枸橼酸溶液以去除细胞膜表面污物 (冰上 4 min), PBS 冲洗; 加 50 μL TUNEL 反应混合液, 包括脱氧核苷酸转移酶液, 37 °C 孵育 60 min, PBS 冲洗, 加 POD 液 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗, DAB 显色。在 400× 显微镜下, 于缺血区边缘随机采集

5 个非重叠视野, 检测 100 个心肌细胞中 TUNEL 阳性细胞数, 取其平均值。凋亡阳性率以单位面积内凋亡细胞数占细胞总数百分比表示。

2.5 电镜观察: 取 1.5 mm³ 的大鼠新鲜心尖部分组织, 用 2.5% 戊二醛固定 1.5 h, 1% 锇酸固定 60 min, 经 30%、70%、80%、90%、100% 丙酮逐级脱水, 逐步渗透, 以包埋剂环氧树脂 812 包埋聚合, 超薄切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后, 在电子显微镜下进行心肌细胞超微结构观察。

2.6 Western blotting 检测心肌细胞胞浆内 CytC 蛋白表达: 配制组织裂解缓冲液 [0.1 mol/L Tris · Cl (pH 7.4), EDTA 1 mmol/L, 1% 的 Triton X100, 0.3 μmol/L Aprotinin, 1 mmol/L PMSF]。分别将液氮内冻存的各组心肌组织取出 120~150 mg, 在液氮内研磨成粉末后倒入一塑料管中, 加入 1 mL 溶液悬浮, 冰上匀浆 3 次, 每次 10 s, 超声处理 3 次。10 000×g 离心 10 min。取 1 mL 上清, 并用超高速离心机以 48 000×g, 4 °C 离心 20 min, 上清即为胞质蛋白。蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳并转膜。蛋白转膜结束后, 以 5% 脱脂奶粉 PBS 配制液封闭后, 膜置于含兔抗大鼠 CytC 抗体溶液中, 室温摇床反应 2 h, TBS [154 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris (pH 9.5), 0.05% 聚山梨酯 20] 洗膜, 并将膜置于二抗溶液中室温摇床反应 2 h, 用 ECL 试剂盒显色, X-胶片显影。用 NIH Image 软件对 X 线胶片上阳性条带实施扫描, 测定吸光度值, 检测胞浆部分 CytC 量。

2.7 数据处理: 数据经单因素方差分析统计学检测, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对血清 LDH、SOD 及 MDA 水平的影响: 模型组的 LDH 水平显著高于假手术组 ($P < 0.001$), 表明心肌缺血再灌注模型成立。As IV 组血清 LDH 水平低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$), 5-HD 减弱了 As IV 的保护作用, 血清 LDH 值高于 As IV 组 ($P < 0.05$), 结果见表 1。模型组大鼠血清 SOD 水平显著低于假手术组 ($P < 0.01$), 而模型组 MDA 的量显著高于假手术组 ($P < 0.01$), 说明心肌缺血再灌注损伤导致组织的抗氧化能力显著降低。As IV 组血清 SOD 水平显著高于模型组, 差异显著 ($P < 0.01$); As IV 组血清 MDA 水平显著低于模型组, 差异显著 ($P < 0.01$), 说明 As IV 可提高机体的抗氧化能力, 而 5-HD+As IV 组 SOD 活性及 MDA 水平与 As IV 组比较差异显著 ($P <$

0.05), 说明 5-HD 对抗了 As IV 的抗氧化能力, 结果见表 1。

3.2 对心肌细胞凋亡的影响: TUNEL 染色结果表明凋亡阳性细胞呈深棕色, 细胞核萎缩, 染色质边聚, 胞浆不着色。假手术组存在少量凋亡细胞, 模型

组可见大量凋亡细胞, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.001$); As IV 组凋亡细胞百分率低于模型组, 差异显著 ($P < 0.05$)。5-HD+ As IV 组凋亡细胞百分率高于 As IV 组, 差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1 和表 1。

表 1 As IV 对心肌缺血再灌注大鼠血清 LDH、SOD 和 MDA 水平及心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of As IV on levels of LDH, SOD, and MDA in serum and cardiomyocyte apoptosis of myocardial ischemic reperfusion rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	LDH/(U · L ⁻¹)	SOD/(U · mL ⁻¹)	MDA/(μmol · L ⁻¹)	凋亡细胞/%
假手术	-	460.8 ± 79.3	378.4 ± 22.3	4.0 ± 0.6	2.2 ± 0.2
模型	-	1285.8 ± 298.9 ^{***}	234.9 ± 17.5 ^{**}	6.9 ± 0.7 ^{**}	19.8 ± 2.4 ^{***}
As IV	5.0	930.7 ± 131.5 ^Δ	346.7 ± 21.0 ^{ΔΔ}	4.9 ± 0.6 ^{ΔΔ}	12.7 ± 2.0 ^Δ
5-HD+ As IV	5.0+ 5.0	1222.5 ± 109.3 [▲]	246.4 ± 17.1 [▲]	6.1 ± 0.8 [▲]	18.9 ± 2.0 [▲]
尼可地尔	10.0	977.9 ± 132.1 ^Δ	294.2 ± 16.7 ^Δ	5.0 ± 0.9 ^Δ	13.5 ± 1.7 ^Δ

与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$; 与 As IV 组比较: ▲ $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs As IV group

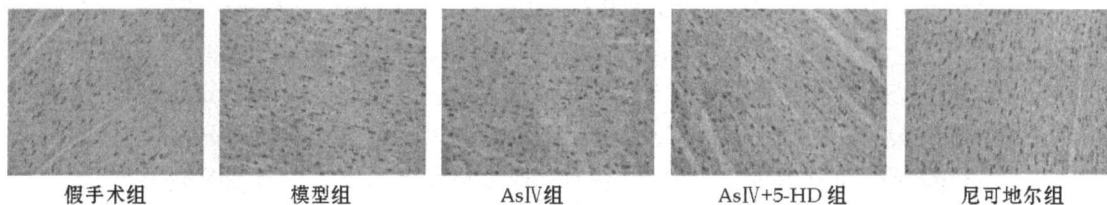


图 1 As IV 对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色)

Fig. 1 Effects of As IV on cardiomyocyte apoptosis of myocardial ischemic reperfusion rats (TUNEL stain)

3.3 电镜观察: 模型组肌丝排列疏松、紊乱, 局部肌丝呈断裂溶解状, 肌丝明暗带模糊不清; 有些线粒体排列紊乱, 有空化, 线粒体膜局部破损, 嵴不清晰, 还有一些较特征地表现为线粒体增生, 个别核呈固缩状, 染色质凝聚, 核周围细胞质空化, 表明心肌损伤时主要表现在线粒体和肌丝的形态结构的改变。电镜下可见假手术组心肌细胞肌丝排列整齐, 肌节明暗带清晰, 线粒体沿肌丝长轴排列整齐, 核膜清晰完整, 染色质较均匀分布。镜下可见 As IV 组的心肌细胞肌丝排列整齐, 肌节明暗带清晰可见, 线粒体排列整齐, 局部线粒体空化, 形成髓样小体, 亦有许多线粒体呈凝聚状, 嵴致密, 闰盘结构较正常, 核仁清晰, 核膜完整。5-HD+ As IV 组心肌超微结构损伤

介于 As IV 组及模型组之间。见图 2。

3.4 心肌细胞线粒体 CytC 释放情况: 正常心肌细胞 CytC 主要位于线粒体, 胞浆中的量极少。心肌缺血再灌注后可见胞浆中 CytC 显著增多 ($P < 0.01$)。As IV 组可明显抑制 CytC 的胞浆释放量 ($P < 0.01$)。As IV+ 5-HD 组 CytC 表达量高于 As IV 组 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

4 讨论

MIRI 过程中细胞凋亡有着重要的病理意义, 细胞凋亡机制与心肌短暂缺血后再灌注损伤密切相关。姚震等^[9]研究表明, 不同时间的心肌缺血再灌注损伤均可导致心肌细胞凋亡, 以缺血 30~ 60 min 后再灌注时明显, 说明心肌细胞凋亡的发生率与此

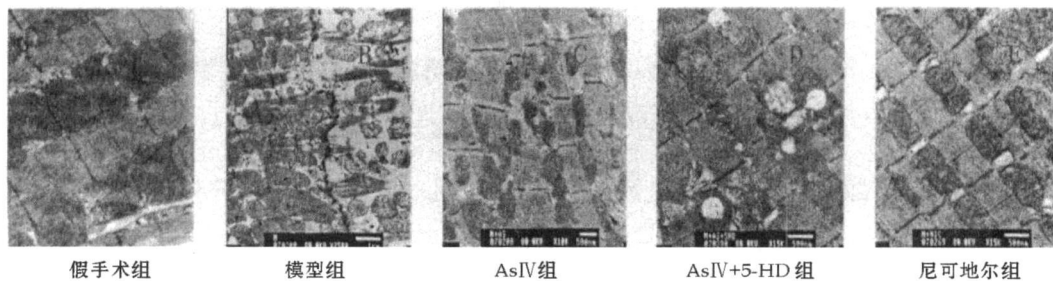
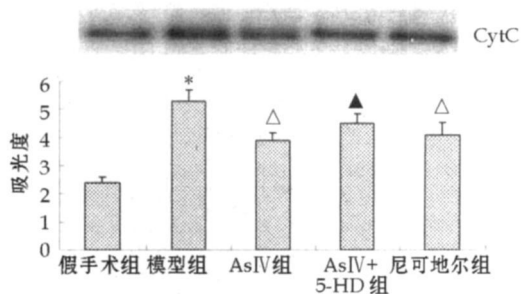


图 2 As IV 对心肌缺血再灌注大鼠心肌超微结构的影响

Fig. 2 Effects of As IV on ultrastructure changes of cardiomyocyte of myocardial ischemia reperfusion rats



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$
与 As IV 组比较: $\blacktriangle P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

$\blacktriangle P < 0.05$ vs As IV group

图 3 As IV 对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞线粒体释放 CytC 的影响

Fig. 3 Effects of As IV on release of CytC from cardiomyocyte mitochondria of myocardial ischemia reperfusion rats

前心肌缺血时间长短有关。再灌注损伤引起的细胞凋亡多分布于短暂缺血后血管再通的相关部位和梗死灶的收缩带区域。

本研究观察到,与假手术组比较,模型组 LDH 的漏出量增加;细胞凋亡率增高;超微结构结果显示细胞核固缩、线粒体膜等细胞器受损。而预先给予 As IV 可明显减轻 LDH 的漏出量;细胞凋亡率显著降低;超微结构观察显示,As IV 组的亚细胞形态有明显的改善,其作用与阳性药尼可地尔相似(尼可地尔为公认的具有药理预适应作用的药物),说明 As IV 对实验大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡具有明显的保护作用。

心肌缺血再灌注损伤时细胞内氧自由基增多,钙超载,细胞内产生的活性氧可通过多途径导致细胞凋亡,线粒体内钙超载和胞浆内大量的自由基使线粒体的 PTP 呈高通透性持久开放状态,使线粒体内钙释放,线粒体肿胀破坏,膜电位完全、永久消失,对线粒体结构和功能造成不可逆性损伤。线粒体膜势能改变进而引起线粒体释放 CytC、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF) 等凋亡因子,释入胞浆引起一系列级联反应,从而诱发心肌细胞凋亡^[10]。在细胞凋亡过程中 CytC 释放进入胞质,参与哺乳动物细胞凋亡信号转导过程,是线粒体释放最重要的促凋亡因子之一。研究表明,在凋亡初期, CytC 可从线粒体内膜释放,从而启动线粒体的凋亡机制^[11]。

本研究观察到 As IV 明显降低 MDA 的量,增强 SOD 活力,提示 As IV 可清除氧自由基,对抗脂

质过氧化反应,从而减轻损伤。另外 Western blotting 结果显示 MIRI 导致 CytC 释放量增加,As IV 保护组 CytC 释放量低于模型组,说明 As IV 可稳定线粒体膜,降低其通透性进而维持跨膜电位的稳定,维持线粒体膜的屏障功能,保护线粒体,降低 CytC 的释放量,从而阻止缺氧心肌细胞经线粒体途径凋亡。

以往研究发现哺乳动物心肌有两种不同的 ATP 敏感钾通道 ($K_{ATP}C$): 一种通常位于细胞膜上 (sarc $K_{ATP}C$); 另一种分布于线粒体内膜 (mitochondrial $K_{ATP}C$, mito $K_{ATP}C$)。最近研究提示, mito $K_{ATP}C$ 可能在缺血预适应 (IP) 中发挥更重要的作用^[12]。Murata^[13] 认为 mito $K_{ATP}C$ 激活,膜电位去极化,可以促进线粒体内钙离子的释放,减轻线粒体钙超载从而促进缺血心肌功能恢复。Wakiyama 等^[14] 的研究证实 mito $K_{ATP}C$ 开放减少,可减少 CytC 的释放,抑制 caspase 3 活性,保护线粒体膜电位而抑制心肌细胞凋亡。实验结果显示, mito $K_{ATP}C$ 抑制剂 5-HD 减弱了 As IV 对心肌损伤的保护作用,说明 mito $K_{ATP}C$ 的激活可能是 As IV 保护心肌细胞的机制之一。

目前对预适应保护作用机制研究的焦点集中在寻找其作用的最终效应器,以促进其早日应用于临床。一些研究表明, mito $K_{ATP}C$ 可能是介导 IPC 的最终效应器^[15]。本实验结果表明, As IV 可直接或者间接激活 mito $K_{ATP}C$, 保护线粒体功能,并且降低 CytC 的胞浆释放量,阻断线粒体凋亡途径,而产生药理预适应作用。其具体分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Elsasser A, Vogt A M, Nef H, et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(12): 2191-2199
- [2] Katori M, Buelow R, Key B, et al. Heine oxygenase 1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an anti apoptosis pathway [J]. *Transplantation*, 2002, 72(2): 287-292
- [3] Riksen N P, Smits P, Rongen G A. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application part II [J]. *Neth J Med*, 2004, 62(11): 409-423
- [4] 王 畅, 张艳军, 冯 英, 等. 黄芪甲苷对短暂性前脑缺血模型大鼠海马神经再生的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40(5): 754-758
- [5] 黄 迪, 陈崇宏, 余 涓. 黄芪总苷对小鼠吗啡条件性位置偏爱及中枢 NO 水平的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(11): 1704-1706
- [6] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, et al. Effects of astragaloside IV derivative on heart failure in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53
- [7] 吕文伟, 刘淑杰, 王秋静, 等. 黄芪多糖对麻醉犬急性心源

- 性休克血流动力学和氧代谢的影响 [J]. 中草药, 2006, 37 (10): 1547-1550
- [8] 汤东, 王英, 朱永泽. 心肌损伤动物模型的建立及应用 [J]. 解剖与临床, 2004, 9(2): 126-127
- [9] 姚震, 焦解歌, 冯建章. 心肌缺血再灌注损伤与细胞凋亡关系的实验研究 [J]. 海南医学院学报, 2000, 6(3): 129-133
- [10] Hearse D J. Reperfusion of the ischaemic myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1977, 9(8): 605-616
- [11] Morita Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, et al. Release of mitochondrial cytochrome c and DNA fragmentation after cold injury induced brain trauma in mice: possible role in neuronal apoptosis [J]. *Neurosci*, 1999, 267(3): 201-205
- [12] Pain T, Yang X M, Critz S D, et al. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals [J]. *Circ Res*, 2000, 87(6): 460-466
- [13] Murata M, Akao M, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} over load during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection [J]. *Circ Res*, 2001, 89(10): 891-893
- [14] Wakiyama H, Cowan D B, Toyoda Y, et al. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(3): 424-433
- [15] Wang Y, Kudo M, Xu M, et al. Mitochondrial K^+ (ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(11): 2037-2046

裙带菜多糖诱导人食管癌细胞 TE-13 凋亡的实验研究

商晓辉*

(河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056002)

摘要:目的 探讨裙带菜多糖诱导人食管癌细胞 TE-13 凋亡的作用及其机制。方法 采用 MTT 法分析裙带菜多糖 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别作用 24、48、72 h 后对 TE-13 细胞增殖的抑制作用; 用透射电镜观察 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖分别作用 48 h 后细胞的凋亡结构变化; 用流式细胞术分析 TE-13 细胞的凋亡率和检测 Survivin 蛋白的表达水平。结果 不同质量浓度的裙带菜多糖均可明显抑制食管癌 TE-13 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 其抑制作用呈质量浓度依赖性, 作用 24 h 后的 IC_{50} 为 44.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。不同质量浓度裙带菜多糖作用 48 h 后, 均可诱导 TE-13 细胞凋亡, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖可诱导 TE-13 细胞凋亡率达 70.51%, 导致 TE-13 细胞发生凋亡特征性超微结构改变, 并使 TE-13 细胞 Survivin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论 裙带菜多糖可抑制 TE-13 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 该作用与下调细胞 Survivin 蛋白表达有关。

关键词: 裙带菜多糖; 食管癌; 细胞凋亡; Survivin 蛋白

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1150-04

裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur. 为多年生大型褐藻, 属于昆布纲, 与海带同属于藻类植物。裙带菜成分主要包括多糖类化合物^[1]、挥发油、类脂、固醇类、亚麻酸和花生四烯酸等不饱和脂肪酸。裙带菜多糖可用于防治缺碘性甲状腺肿、动脉硬化、高血脂症、高血压等。近年来关于海藻多糖的抗癌研究报道很多^[2-4], 但关于裙带菜多糖诱导食管癌细胞凋亡研究很少。本实验探讨裙带菜多糖抗食管癌的机制, 为研发抗肿瘤新药提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 裙带菜多糖的提取和纯化: 采用传统的水提乙醇沉淀法。取裙带菜洗净, 捣碎后, 甲醛浸泡固色, 用 30 倍的 pH 8.0 的蒸馏水加热提取 5 h, 滤过, 浓缩, 浓缩液加入 3 倍量的乙醇, 静置过夜, 离

心, 收集沉淀物, 再进行一次加水溶解, 80% 乙醇沉淀, 离心, 收集沉淀物进行透析, 透析保存液再加入无水乙醇沉淀得裙带菜多糖。裙带菜多糖粗品含较多的水溶性蛋白, 60 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水溶解, 用 2% 三氯乙酸 (TCA) 使水溶性蛋白变性, 静置过夜, 6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 以 75% 乙醇沉淀, 离心收集沉淀。最后进行透析脱盐, 用蒸馏水对多糖粗品进行溶解, 使用相对分子质量为 12 000 透析袋, 每袋 5 mL, 蒸馏水搅拌透析过夜, 24 h 换一次蒸馏水, 收集透析液, 蒸发浓缩, 减压干燥, 得到多糖晶体 (收率 0.4%)。取裙带菜多糖晶体样品 200 g, 混合溶于 2 L 蒸馏水中, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液用 RPMI 1640 培养基稀释 (终体积分数小于 0.1%)。

* 收稿日期: 2009-11-27

基金项目: 邯郸市科技厅资助项目 (0823108062-2)

作者简介: 商晓辉 (1976-), 女, 山东省聊城人, 硕士, 讲师, 研究方向是肿瘤免疫学、抗肿瘤中药研究。E-mail: geer345@sina.com