

表 5 对四氧嘧啶所致小鼠血糖升高的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 (g 生药 /kg)	动物数 (只)	血糖浓度 (mmol/L)
对照	—	10	9.3 ± 1.39 *
模型	—	10	36.67 ± 4.65
黄精须根	20	10	32.17 ± 5.41
	10	10	31.48 ± 4.64
黄精	20	10	32.54 ± 4.39

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

动物 sc 生理盐水外,其余各组动物 sc 5 mg/kg Iso (以增加心肌耗氧), 15 min 后各组动物分别放置于 200 mL 的密闭广口瓶中 (瓶底铺放 5 g 钠石灰以吸收水分和二氧化碳), 观察小鼠呼吸停止的时间。结果见表 6

表 6 对小鼠常压缺氧能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 (g 生药 /kg)	动物数 (只)	生存时间 (min)
模型	—	10	15.3 ± 2.44
黄精须根	20	10	18.28 ± 3.11
	10	10	18.58 ± 1.30
黄精	20	10	17.69 ± 2.74

与模型组比较: * $P < 0.05$

2.4 对离体心肌冠脉流量的影响: 选用 180~220 g 的 Wistar 大鼠 32 只, 雌雄各半, 随机分成 4 组, 分别为正常组、黄精须根药物大、小剂量组以及黄精阳性对照组。受试药物以水提醇沉的方法去杂质, 测定提取液的 pH 值为 7.0~7.5。击昏动物, 颈动脉放血, 开胸, 暴露心脏, 剪开心包, 取出心脏, 置于冷的洛氏液中, 轻轻挤出心内的余血。迅速将插管插入主动脉, 结扎固定, 打开灌流液的弹簧夹, 使充氧、恒温的洛氏液由冠状动脉经心肌流入右心房, 从腔静

脉、肺动脉的断端流出。稳定 10 min 后, 收集 5 min 的冠脉流量, 之后各组动物分别于灌流侧管内注入生理盐水或药物, 再次收集 5 min 的冠脉流量, 比较给药前后冠脉流量的变化, 计算冠脉流量增长率, 结果见表 7

表 7 对大鼠冠脉流量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量 (g 生药 /kg)	动物数 (只)	冠脉流量增长率 (%)
对照	—	8	2.06 ± 2.88
黄精须根	1.0	8	23.22 ± 15.32 *
	0.5	8	21.50 ± 15.05 *
黄精	1.0	8	19.52 ± 13.22 *

与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

对免疫功能的影响: 黄精根茎及须根与模型组比较皆有显著差异 ($P < 0.05$)。对糖代谢的影响: 对肾上腺素所致小鼠血糖升高的影响, 黄精根茎及须根与模型组比较皆有显著差异 ($P < 0.05$), 而对四氧嘧啶所致小鼠血糖升高的影响, 须根与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$), 根茎与模型组比较差异不显著。对耐缺氧能力的影响: 黄精根茎及须根与模型组比较, 皆有显著差异 ($P < 0.05$)。对离体心肌冠脉流量的影响: 黄精根茎及须根与生理盐水组比较皆有显著差异 ($P < 0.01$), 须根对大鼠冠脉流量增长率略高于根茎。由此可见, 黄精须根有类同于根茎的药理作用。

参考文献:

- [1] 王曙东, 宋炳生, 金亚丽, 等. 黄精根茎及须根中微量元素及氨基酸的分析 [J]. 中成药, 2001, 23(5): 369-370.
- [2] 王曙东, 吴晴斋, 李汉保. 黄精根茎、须根中营养成分的研究 [J]. 时珍国药研究, 1995, 6(4): 14-15.

土槿乙酸体外诱导 K562 细胞凋亡的研究

张 敏, 买 霞, 陈小义, 陈 莉, 陈 虹, 李灵芝*

(武警医学院 生物教研室, 天津 300162)

摘 要: 目的 研究土槿乙酸体外对人白血病细胞 (K562) 凋亡的诱导作用, 探讨其抗癌作用机制。方法 以不同浓度土槿乙酸分别处理 K562 细胞, 用琼脂糖凝胶电泳、荧光显微镜和倒置光显微镜、MTT 法观察 K562 细胞 DNA 带型、形态和抑制率的变化。结果 1×10^{-5} mol/L 土槿乙酸作用 30 h 能有效诱导 K562 细胞凋亡, 凋亡细胞有典型的形态学改变及 DNA 梯形带形成。MTT 法测定不同浓度土槿乙酸明显抑制 K562 细胞系的生长, 其 IC_{50} 值为 2×10^{-6} mol/L。结论 土槿乙酸能成功诱导 K562 细胞凋亡, 此种诱导作用呈药物作用浓度及时间依赖性。

关键词: 土槿乙酸; 人白血病细胞系; 细胞凋亡; 生长抑制率

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)06-0533-03

* 收稿日期: 2001-09-10

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (No. 003805211)

作者简介: 张 敏 (1969-), 女, 江苏启东人, 1991 年毕业于天津师范大学, 理学学士学位, 现任武警医学院生物教研室讲师, 主要从事抗癌药物作用机制的研究。Tel: 022-60578063

Studies of apoptosis on K562 cell line induced by pseudolaric acid B *in vitro*

ZHANG Min, MAI Xia, CHEN Xiao-yi, CHEN Li, CHEN Hong, LI Ling-zhi

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

Key words pseudolaric acid B; human leukemic K562 cell line; cell apoptosis; growth inhibitory rate

土槿乙酸是从松科植物金钱松 *Pseudolarix amabilis* (Nelson) Rehd. 的树皮(土槿皮)中分离出的一种主要成分,为萜类化合物,是五元与七元合并的芳环骨架,天然产物中许多具有此类结构的化合物具有显著的抗肿瘤作用^[1]。在民间,土槿皮曾用于治疗肝癌的一种生药^[2]。1988年马瑾瑜等人报道^[4,5]土槿乙酸苷具有抑制肝癌细胞的作用^[3-5],但目前国内外尚未见土槿乙酸抗癌作用的报道。本文以人白血病细胞系 K562 细胞为靶细胞研究土槿乙酸对 K562 细胞凋亡诱导作用,为探讨土槿乙酸的抗癌作用提供实验依据。

1 材料

土槿乙酸(pH约为 5.4,经中国药品生物制品检定所检测纯度> 98%)由武警医学院药学教研室提供,经二甲基亚砜(DMSO)溶解,无血清培养基稀释(DMSO 终浓度≤ 0.1%),过滤除菌。培养基 RPMI 1640均为 GIBCO 公司产品, Hoechst33342、碘化丙啶(PI)、噻唑蓝(MTT)和 DMSO 为 SIGMA 公司产品。胎牛血清为中国医学科学院血液学研究所生产,琼脂糖和溴化乙锭(EB)为 SIGMA 公司产品。

2 方法和结果

2.1 细胞系培养: K562 细胞系由协和医科大学基础所馈赠,我室传代培养,常规培养于 RPMI 1640,补充 10% 热灭活胎牛血清,2 mmol/L 谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素,置 5% 体积 CO₂ 孵育箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞抑制率测定(MTT 法): K562 细胞直接调整浓度为 4×10⁴个/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 200 μL,培养 24 h,实验组分别加入 5 种不同浓度土槿乙酸,另设对照组(不加药)和空白组(只有培养基),每组处理都是 6 个复孔,培养 72 h,加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL,4 h 后加入 DMSO 200 μL,避光振荡 10 min,用全自动酶标仪测定 570 nm 处吸光度 A 值。细胞抑制率按下列方法计算^[6]。

抑制率(%) = $\frac{\text{对照组 } A - \text{实验组 } A}{\text{对照组 } A - \text{空白组 } A} \times 100\%$

结果见表 1,可见 4×10⁻⁶ mol/L 土槿乙酸作用 72 h 的细胞抑制率为 17.3%,随着浓度的增加,

抑制作用也明显增加,4×10⁻⁴ mol/L 土槿乙酸作用 72 h 的细胞抑制率达 92.4%,半数抑制浓度(IC₅₀)约为 2×10⁻⁶ mol/L。说明土槿乙酸对 K562 细胞的生长有显著的抑制作用。

表 1 土槿乙酸对 K562 细胞的生长抑制作用

组别	浓度 (mol/L)	A _{570nm}	抑制率 (%)
对照	-	1.765±0.024	
空白	-	0.359±0.026	
土槿乙酸	4×10 ⁻⁴	0.46±0.065	92.4
	4×10 ⁻⁵	0.62±0.065	81.4
	2×10 ⁻⁶	1.074±0.035	49.2
	4×10 ⁻⁶	1.522±0.108	17.3
	4×10 ⁻⁷	1.67±0.053	6.7

与对照组比较: * P<0.01

2.3 细胞形态学观察

2.3.1 倒置光显微镜下观察细胞形态变化: 对照组细胞为圆形,核大而圆,位于细胞中央。而实验组细胞 4×10⁻⁵ mol/L 以下浓度组体积变小,细胞密度下降,药物连续处理 48 h,可见许多膜包小体形成; 4×10⁻⁵ mol/L 及以上浓度组,细胞变成蝌蚪形、哑铃形等不规则形状,甚至变为长杆状细胞,药物连续处理 30 h,可见许多膜包小体形成。

2.3.2 Hoechst33342/PI 荧光双染法观察细胞形态学变化: 4×10⁻⁴ mol/L 土槿乙酸处理 28 h,将细胞制成细胞悬液,每组取 200 μL,加入荧光染料 Hoechst33342 至终浓度 10 μg/mL,PI 50 μg/mL,37℃ 染色 15 min 后滴片观察。在荧光显微镜(日本 Nikon)下可见对照组细胞核染色质均匀,胞浆被 Hoechst33342 染成蓝色荧光,经土槿乙酸处理后,核染色质凝集,分布不均匀的蓝色凋亡细胞明显增多,约占 70% 以上,而被 PI 染成红色的坏死细胞较少。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测土槿乙酸诱导细胞 DNA 裂解: 收集 2×10⁶个细胞, PBS 洗涤,按常规方法提取 DNA^[7],样品溶于 30 μL TE 中,1% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭),50 V,电泳 4 h,紫外灯下拍照,凋亡细胞典型的生化改变之一是核酸分子被核酸内切酶在核小体之间切成 180 bp 左右及其倍数的 DNA 片段的“DNA ladder”。实验结果可见: 土槿乙酸处理 K562 细胞 30 h,在 4×

10^{-4} 和 $\times 10^{-5}$ mol/L浓度下,电泳呈清晰的梯状带;处理 48 h,在 $\times 10^{-5}$ 和 $\times 10^{-6}$ mol/L 浓度下,电泳出现清晰的梯状带,而 $\times 10^{-4}$ mol/L 浓度下则显示出细胞坏死时表现的模糊的膜状带。

2.5 统计学处理:样品均数的比较采用 t 检验。

3 讨论

研究表明许多抗癌药物能够诱导肿瘤细胞发生凋亡,且其疗效与诱导细胞凋亡的反应能力有关。本实验表明,土槿乙酸能有效抑制 K562 细胞系的增殖,其抑制程度随土槿乙酸作用时间的延长和作用浓度的增大而增强。在研究中作者发现,土槿乙酸在抑制细胞系生长的同时,这些细胞表现出明显的形态变化,K562 细胞 $\times 10^{-5}$ mol/L 及以上浓度组,细胞变形明显,成为蝌蚪、哑铃等形状, $\times 10^{-5}$ mol/L 以下浓度组,细胞体积变小,并有膜包的圆形小体出现。这些形态变化随用药时间的延长而愈加明显。据马瑾瑜等人报道,土槿皮及其提取物土槿乙酸苷均对人体肝癌细胞 (SM-MC-7721) 的增殖有明显的抑制作用,并可引起细胞形态的变化^[2,3],故可推断土槿乙酸为其抑制作用的有效成分。

为进一步探讨土槿乙酸抑制细胞增殖的作用机制,采用了荧光双染法观察 K562 细胞内 DNA 的

含量及对细胞核形态学的影响。在荧光显微镜下,可见核染色质凝集和凋亡小体形成。琼脂糖凝胶电泳得到典型的梯状带,由此证实土槿乙酸能成功诱导 K562 细胞凋亡,有力说明了土槿乙酸的有效抗癌作用,也为该药用于临床治疗肿瘤提供了一定的实验依据。但不同浓度土槿乙酸作用于不同肿瘤细胞株的凋亡效应以及其凋亡过程中抑癌基因的表达有何改变有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李珠莲,潘德济,胡桂奇,等. 土槿皮新二萜成分的研究 I. 土槿甲酸和土槿乙酸的化学结构测定 [J]. 化学学报, 1982, 40 (5): 453-457.
- [2] 竺叶青,马瑾瑜,陈明华,等. 八种生药体外抗肝癌作用的实验研究 [J]. 上海医科大学学报, 1989, 16(3): 240.
- [3] 马瑾瑜,余竹元,竺叶青,等. 土槿乙酸苷对培养人体肝癌细胞的作用 [J]. 上海医科大学学报, 1988, 15(3): 208.
- [4] Li E, Clark A M, Hufford C D. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi* [J]. J Nat Prod, 1995, 58(1): 57-67.
- [5] 王伟成,顾芝萍,顾克仁,等. 土荆皮乙酸对妊娠大鼠子宫内膜及肌层血流量的影响 [J]. 中国药理学报, 1991, 12 (5): 423-425.
- [6] 张敏,买霞,陈小义,等. PB230 体外抗肿瘤活性的研究 [J]. 武警医学院学报, 2000, 9(4): 243-244.
- [7] 买霞,张敏,陈小义,等. PB231 诱导 K562 细胞凋亡的初步研究 [J]. 武警医学, 2001, 12(1): 12-15.

络泰治疗激素性股骨头坏死的实验研究

李峻辉,宁亚功,彭仲杰,栾晓文,刘国光,王云华,吴亚玲,叶建红*
(成都军区昆明总医院 中医科,云南 昆明 650032)

摘要:目的 评价络泰对激素性股骨头坏死的治疗作用。方法 将 30 只兔随机分为空白对照组、模型组、治疗组,于实验后 8、16 周分别进行血液流变学、血脂测定,16 周处死动物行组织形态学观察。结果 治疗组动物血浆和全血粘度、红细胞聚集指数、总胆固醇、甘油三酯均明显低于模型组 ($P < 0.05$),股骨头空骨陷窝数虽没有达到正常水平,但较模型组有明显改善 ($P < 0.05$)。结论 iv 经股动脉穿刺介入给予大剂量络泰治疗股骨头坏死,可以降低血脂,改善血液循环,改善股骨头的供血情况,从而促进坏死骨修复和新生骨再生。

关键词: 股骨头坏死;络泰;血液流变学;血脂;病理学

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0535-03

Experimental study on hormonal femoral head necrosis by LUOTAI INJECTION*

LI Jun-hui, NING Ya-gong, PENG Zhong-jie, LUAN Xiao-wen, LIU Guo-guang,
WANG Yun-hua, WU Ya-ling, YE Jian-hong

(Department of TCM, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming Yunnan 650032, China)

Key words femoral head necrosis; LUOTAI INJECTION; blood rheology; serum lipid; pathology

* LUOTAI INJECTION is made from total saponin of *Panax pseudo-ginseng* var. *notoginseng*

* 收稿日期: 2001-01-09

作者简介: 李峻辉 (1972-) 男,成都军区昆明总医院全军中医内科专科中心主治医师,主要从事骨关节疾病及股骨头坏死的临床和科研工作。Tel (0871) 4074639