

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 ⁻¹)	A ₄₉₀	抑制率 %	
空白	—	0.0890±0.0058	0	
对照	—	0.4640±0.0257	0	
PAB	3.125×10 ⁻⁶	0.3758±0.0295	23.52	
	6.250×10 ⁻⁶	0.3052±0.0276 [*]	42.35	
	1.250×10 ⁻⁵	0.2922±0.0236 [*]	45.82	
	2.500×10 ⁻⁵	0.2702±0.0249 [*]	51.69	
	5.000×10 ⁻⁵	0.2343±0.0145 [*]	61.25	
	1.000×10 ⁻⁴	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^{WAF1}的表达:经免疫细胞化学染色后,在光学显微镜下可见 p21^{WAF1}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 5×10^{-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 μ mol/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 Li-Br 细胞内的 p21^{WAF1} 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^[5]。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⁺,K⁺-ATPase;Ca²⁺,Mg²⁺-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

降低胶原的含量。结论 西红花酸对压力超负荷所致大鼠心肌肥厚具有一定的改善作用。

关键词: 西红花酸; 压力超负荷; 心肌肥厚

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0534-03

Effect of crocetin on ATPase and hydroxyproline in myocardial hypertrophy rat induced by overload pressure

SHEN Xiang-chun, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract **Object** To study the influence of crocetin on the activity of ATPase and the content of hydroxyproline in the myocardial hypertrophy rats induced by overload pressure. **Methods** Abdominal aortic ligation was used to establish the myocardial hypertrophy model in rats. The rats were divided into two groups: 1) The early term group which included five groups: sham-operation group, model group, Captopril groups, crocetin 100, 50 mg/kg groups. 2) The long term group which also included five groups as the same as the early term groups. Heart indexes were examined. The ATPase activity of heart and the content of hydroxyproline in heart were assayed by colorimetric analysis. **Results** Compared with the model group, crocetin can significantly reduce the cardiac indexes, increase the activities of Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and markedly decrease the content of hydroxyproline in heart. **Conclusion** Crocetin could prevent the remodeling of cardiac hypertrophy induced by overload pressure. The ATPase may play an important role in myocardial hypertrophy induced by overload pressure.

Key words crocetin; overload pressure; myocardial hypertrophy

心肌肥厚是心脏长期负荷过重的一种适应性反应,以心肌细胞蛋白合成增加和细胞体积增大为主要特征^[1],多种因素参与心肌肥厚的形成^[2,3]。近年来的研究表明,能量供应和负荷需求之间平衡关系的破坏可能是心肌肥厚发生的决定因素^[4~6]。西红花苷及其苷元——西红花酸是西红花主要有效成分^[7]。国外研究表明,西红花酸具有抑制 PKA, PKC 的作用^[8],本实验室研究结果表明西红花酸对大鼠、犬冠脉结扎引起的心肌缺血具有很好的疗效。本实验研究西红花酸对压力超负荷所致心肌肥厚的心肌细胞 ATPase 活性及胶原的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂:西红花酸,本实验室精制,含量>80%。卡托普利片(常州制药厂,批号 0108028),ATPase 测定试剂盒、羟脯氨酸试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 试验仪器:分析天平,上海第二天平仪器厂生产;电热恒温水浴锅,752 分光光度计, XW80-A 漩涡混合器,上海医科大学仪器厂生产;Eppendorf 5417R 冷冻离心机。

1.3 实验动物:SD 大鼠,雄性,体重 180~220 g,由中国药科大学实验动物中心提供。

1.4 统计方法:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据间显著性差异用 t 检验。

2 方法

2.1 心肌肥厚模型的建立和分组:雄性 SD 大鼠,按表 1 进行分组,每组 7 只,参考 Doering 等^[9]的方法行腹主动脉狭窄,使狭窄处动脉保留 0.7 mm 空隙。假手术组动物除不行腹主动脉狭窄术外,其他操作相同。早期组(术后 24 h 处死)于手术前 30 min, ig 给药 1 次,动物处死前 30 min 再给药 1 次;晚期组(术后 4 周处死)于手术前给药 1 次,术后每天 ig 给药 1 次,连续给药 4 周,末次给药后 30 min 处死。对照组给予等容积的蒸馏水。

2.2 心肌重量参数的测定:大鼠处死后,迅速开胸取出心脏,表面吸干后,分别称心脏和左心室重量,计算心脏系数(全心重/体重, HW/BW)和左心室系数(左心室重/体重, LVW/BW)。将左心室置液氮中保存备用。

2.3 心肌组织 Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力及羟脯氨酸含量的测定:取大鼠心脏,以 10 倍量 Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液在冰浴下制成 10% 心脏匀浆,于 4℃, 1 000 g 离心 10 min,弃去沉淀后,取上清液测定 Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力及羟脯氨酸含量。蛋白含量以考马斯亮蓝法测定,以牛血清白蛋白为标准。

3 结果

3.1 西红花酸对心脏系数的影响:与假手术组比较,模型晚期组心脏系数及左心室系数明显升高 ($P < 0.01$)。卡托普利及西红花酸 2 个剂量晚期组

心脏系数及左心室系数比模型组明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 早期组心脏系数及左心室系数具有升高的趋势, 但与假手术组比较未见明显差异, 给药组具有降低的作用趋势。见表 1

表 1 西红花酸对压力超负荷致心肌肥厚大鼠心脏重量参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of crocetin on heart weight parameters in myocardial hypertrophy rats induced by overload pressure ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 $/(mg \cdot kg^{-1})$	早期组		晚期组	
		HW /BW	LVW /BW	HW /BW	LVW /BW
假手术	—	3.26± 0.23	2.26± 0.43	2.98± 0.19	2.24± 0.14
模型	—	3.88± 0.70	2.96± 0.40	4.30± 0.97 ^{△△}	3.31± 0.76 ^{△△}
卡托普利	60	3.18± 0.09	2.41± 0.02	2.91± 0.25 [*]	2.21± 0.17 [*]
西红花酸	100	3.48± 0.29	2.61± 0.25	3.13± 0.24 [‡]	2.46± 0.27 [‡]
	50	3.48± 0.14	2.66± 0.13	3.36± 0.25 [‡]	2.58± 0.20 [‡]

与假手术组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\triangle\triangle P < 0.01$ vs sham-operation group; $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs model group

3.2 西红花酸对左心室匀浆 Na^+, K^+ -ATPase; Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase 活性及羟脯氨酸含量的影响: 造模 4 周后, 心肌组织的羟脯氨酸的含量明显升高, ATPase 活力明显抑制 ($P < 0.01$); 西红花酸和卡托普利可以明显抑制心肌组织羟脯氨酸含量的增加, 提高 ATPase 的活力。

表 2 西红花酸对压力超负荷致心肌肥厚大鼠 Na^+, K^+ -ATPase; Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase 活性及羟脯氨酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of crocetin on activities of Na^+, K^+ -ATPase; Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase and level of hydroxyproline in myocardial hypertrophy rats induced by overload pressure ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 $/(mg \cdot kg^{-1})$	羟脯氨酸 $/(μg \cdot mg^{-1})$		Na^+, K^+ -ATPase $/(\mu mol P_i \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1})$		Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase $/(\mu mol P_i \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1})$	
		早期组	晚期组	早期组	晚期组	早期组	晚期组
假手术	—	0.37± 0.14	0.34± 0.12	0.38± 0.08	0.38± 0.11	0.33± 0.10	0.35± 0.09
模型	—	0.45± 0.25	0.67± 0.14 ^{△△}	0.21± 0.13 [△]	0.08± 0.06 ^{△△}	0.20± 0.02 [△]	0.08± 0.07 ^{△△}
卡托普利	60	0.44± 0.14	0.38± 0.21 [‡]	0.36± 0.04 [*]	0.22± 0.10 [‡]	0.28± 0.06 [‡]	0.18± 0.08
西红花酸	100	0.46± 0.18	0.40± 0.21 [‡]	0.36± 0.12	0.20± 0.05 [‡]	0.28± 0.07	0.19± 0.03 [‡]
	50	0.41± 0.18	0.37± 0.18 [‡]	0.27± 0.10	0.20± 0.11 [‡]	0.25± 0.08	0.19± 0.04 [‡]

与假手术组比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组比较: $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$

$\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs sham-operation group; $^* P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs model group

4 讨论

压力超负荷所致的早期组, 在心肌和左心室重量没有增加时, ATPase 的活力已经发生明显的改变。细胞膜上的 Na^+, K^+ -ATPase; Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase 对于维持细胞内的正常离子浓度以及细胞的能量产生和利用有重要的意义。心肌 Na^+, K^+ -ATPase 和 Na^+-Ca^{2+} 交换活性对维持细胞内钙浓度恒定也有重要的意义^[4], Na^+, K^+ -ATPase 活性下降会引起胞内 Na^+ 超负荷。后者激活心肌膜上的 Na^+-Ca^{2+} 交换蛋白, 使 Ca^{2+} 进入胞内增加; Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase 活性下降则主要导致细胞内外 Ca^{2+}, Mg^{2+} 分布失衡, 细胞内 Ca^{2+} 聚集, ATPase 活性的下降最终会引起细胞内钙超载, 钙超载可以激活心肌细胞的多种信号传导系统和激酶的活性, 从而导致心肌肥厚的发生。本实验结果证实模型组的 ATPase 的活性降低而西红花酸可以改善 ATPase

的活性, 这可能是其抗心肌肥厚作用的一个方面。心肌肥厚的发生过程中, 心肌细胞表型变化, 体积增大, 心肌细胞内收缩蛋白的类型改变, 心肌间质细胞增殖, 纤维组织增生, 产生大量的胶原和纤维素, 使心肌结构紊乱^[10]。本实验的结果提示, 模型组心肌羟脯氨酸的含量增加, 而用药后, 心肌羟脯氨酸的含量下降, 提示西红花酸具有抑制间质细胞胶原增加, 改善心肌重构。

本实验提示, 西红花酸具有改善 ATPase 酶活性, 抑制心肌胶原增生, 改善心肌重构的作用, 但西红花酸是直接作用还是间接作用有待于进一步研究。

References

[1] Teng Z Y, Zhang Y N. Intracellular molecular mechanisms of cardiac hypertrophy [J]. J Harbin Med Univ (哈尔滨医科大学学报), 2001, 35(4): 319-320.
[2] Black F M, Packer T G, Packer S E, et al. The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load [J]. J Clin Invest, 1991, 88

- (5): 1581-1588.
- [3] Parker T G, Chow K L, Schwartz R J, *et al.* Differential regulation of skeletal alpha-actin transcription in cardiac muscle by two fibroblast growth factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 87(18): 7066-7070.
- [4] Xiang Y, Huang J. Effect of valsartan and fosinopril on catecholamine-induced cardiac hypertrophy [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 21(9): 850-854.
- [5] Pan D S, Tian C, Chen L Y. Study on the mechanisms of cardiac hypertrophy [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1999, 30(2): 113-117.
- [6] Moisin C, Balta N, Filcescu V, *et al.* Activity of Na/K-ATPase and of Ca^{2+} -ATPase under the action of adenosine triphosphate in experimental myocardial hypertrophy [J]. *Rom J Physiol*, 1998, 35(3-4): 303-311.
- [7] Gao W Y, Zhu D Y. Advances in chemical and pharmacological studies on *Crocus L.* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 389-391.
- [8] Wang B H, Polya G M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 55-63.
- [9] Doering C W, Jalil J E, Janicki J S, *et al.* Collagen network remodeling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 686-695.
- [10] Tang J, Zhou A R. Molecular biology basic of myocardial hypertrophy [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1994, 26(Suppl): 208-215.

草问荆总生物碱对大鼠脑内单胺类神经递质含量的影响

季宇彬, 高世勇*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 研究草问荆总生物碱 (TAEP) 抑制中枢神经系统的作用机制。方法 采用高效液相色谱-电化学检测法 (HPLC-EC) 及 HPLC-UV 法测定大鼠脑内单胺类神经递质含量。结果 TAEP 对大鼠纹状体的单胺类神经递质的含量具有显著的降低作用, 同时升高纹状体单胺类递质中性及酸性代谢产物的含量; 对大鼠前脑边缘区的单胺类递质具有显著的降低作用, 同时显著升高边缘区单胺代谢物 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA), 高香草酸 (HVA) 的含量。但对于 3, 4-二羟基苯乙醇 (DHPG) 的升高作用无统计学意义。结论 TAEP 具有与利血平相似的单胺排空作用, 是 TAEP 对中枢神经系统镇静安定的作用机制。

关键词: 草问荆总生物碱; 中枢抑制; 单胺类神经递质; 作用机制

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0537-03

Effect of total alkaloids of *Equisetum pratense* on contents of monoamine neurotransmitters in rat brain

Ji Yu-bin, GAO Shi-yong

(Postdoctoral Research Station, Pharmaceutical Research Institute of Harbin Commercial University, Harbin 150076, China)

Abstract **Object** To reveal the mechanism of inhibitory action on the central nervous system (CNS) of total alkaloids of *Equisetum pratense* Ehrh. (TAEP). **Methods** Contents of monoamine neurotransmitters in brain of rats were determined by HPLC-EC and HPLC-UV. **Results** TAEP can significantly decrease the contents of monoamine neurotransmitter in the striate body and the bordering area of rat forebrain, increase the contents of neutral and acidic metabolites in the striate body, and increase the contents of 5-HIAA and HVA of the monoamines in the bordering area of rat forebrain. But its raise of DHPG showed no statistical significance. **Conclusion** TAEP has an evacuating action of monoamine similar to Reserpine. This may be considered as one of the mechanisms of sedative and tranquilizing effect CNS.

Key words total alkaloids of *Equisetum pratense* Ehrh. (TAEP); CNS inhibition; monoamine neurotransmitter; action mechanism

草问荆 *Equisetum pratense* Ehrh. 系木贼科问荆属多年生草本植物。问荆 *E. arvense* L. 的药用价值在本草多有记载,《本草拾遗》记载:“问荆有止

血,利尿之功”;《本草纲目》记载:“问荆性味苦、平,功能活血化瘀,清热利尿”,“主结气瘤痛,上气气急”。草问荆总生物碱 (TAEP) 是从草问荆中提取

* 收稿日期: 2002-10-12

基金项目: 黑龙江省科委自然科学基金资助项目 (D01-05)

作者简介: 季宇彬 (1958-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究, 1999 年进入哈尔滨医科大学博士后工作流动站工作。