- 38.
- [3] 张岭, 宋艳, 李长岭, 等. 羟红花黄色素A对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中草药, 2008, 39(1): 90-93.
- [4] Motohiro N, Sho-ichi Y. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes [J]. *J Biochem*, 1995, 47(270): 28316-28324.
- [5] Zhu H B, Wang Z H, Ma C J, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 429-433.
- [6] Gargett C E, Bucak K, Roger P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 293-301.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] 陈莉莉, 陈静, 杜毅, 等. 基于生物传感器Biacore S51技术的新药发现与开发[J]. 生命的化学, 2004, 24(6): 507-509.
- [9] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1843-1851.
- [10] Masabumi S. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis [J]. *Cell Struct Func*, 2001, 26: 25-35.

苦瓜蛋白抗肿瘤作用及其分子机制

熊术道¹, 尹丽慧¹, 李景荣², 叶爱芳¹, 章圣辉¹, 温博贵^{3*}

(1. 温州医学院附属第一医院医学科学研究所, 浙江温州 325000; 2. 温州医学院附属第一医院 急诊科, 浙江温州 325000; 3. 汕头大学医学院 分子生物学研究室, 广东汕头 510031)

摘要: 目的 探讨苦瓜蛋白对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响和荷瘤小鼠血清基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的活性及变化以及细胞因子白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响。方法 将清洁级 ICR 雄性小鼠按体重随机分成 5 组, 建立肝癌 H₂₂ 皮下移植瘤模型, 分为模型组、苦瓜蛋白高、中、低剂量 (100、50、25 mg/kg) 组及环磷酰胺组 (CTX, 40 mg/kg), 各组均 ip 给药, 观察苦瓜蛋白对肿瘤生长的影响; 分离血清, 明胶酶谱法检测荷瘤小鼠血清基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的活性及其变化, ELISA 检测细胞因子 IL-6 及 TNF- α 表达。结果 苦瓜蛋白组与模型组相比, 肿瘤质量明显减轻 ($P < 0.01$), 小鼠体重也较模型组小鼠轻 ($P < 0.01$); 苦瓜蛋白 (100、50、25 mg/kg) 组及 CTX 组抑瘤率分别为 85.81%、66.89%、52.05%、65.10%; 各苦瓜蛋白组与模型组相比, MMP-2、MMP-9 的活性降低, 酶原表达下调 ($P < 0.01$); 细胞因子 IL-6 及 TNF- α 表达明显下调 ($P < 0.01$), 上述作用与苦瓜蛋白剂量相关。结论 苦瓜蛋白具有较强的体内抗肿瘤活性, 其抗肿瘤作用可能与苦瓜蛋白抑制 MMPs 的活性及表达, 以及调节 IL-6 及 TNF- α 等细胞因子的表达水平有关。

关键词: 苦瓜蛋白; 移植性肿瘤; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0408-04

苦瓜蛋白 (momorcharin glycoproteins) 是从苦瓜籽中分出的一种相对分子质量约为 30 000 的碱性糖蛋白质, 属于 I 型核糖体失活蛋白 (ribosome inhibiting protein, RIP)。RIP 具有明显的抗肿瘤、抗病毒作用, 具有极高的药用价值^[1,2]。前期研究表明苦瓜蛋白可以明显诱导 K562 细胞产生细胞凋亡^[3]。为进一步研究苦瓜蛋白对动物移植性肿瘤的作用及分子机制, 笔者研究了不同剂量苦瓜蛋白对移植性肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及其对荷瘤小鼠基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) MMP-2、MMP-9 的活性与变化以及细胞

因子白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响。

1 材料

1.1 仪器及试剂: Image master 凝胶成像系统 (GE health)、ELx800 酶标仪、IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒购自 Biosource 公司。

1.2 实验动物与细胞株: 清洁级 ICR 雄性小鼠, 体重 18~22 g, 温州医学院实验动物中心提供。ICR 小鼠 H₂₂ 腹水瘤细胞由浙江中医药大学生命科学系惠赠。

2 方法

* 收稿日期: 2007-07-07

基金项目: 浙江省中医药管理局资助课题 (2002C080); 广东省教育厅自然科学基金项目 (Z02041); 浙江省教育厅研究项目 (2006-1779)

作者简介: 熊术道 (1970—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为肿瘤分子生物学及抗肿瘤药理学。

Tel: (0577) 86550296 E-mail: xshdao@163.com

* 通讯作者 温博贵 Tel: (0754) 8900437

2.1 苦瓜蛋白的分离与纯化: 预冷梯度丙酮沉淀得到的苦瓜籽粗蛋白经 SP Sepharose High Performance 阳离子交换色谱柱在 GE-Health 中压色谱系统中分离纯化得到的一种相对分子质量约为 25 200 的碱性糖蛋白质^[4,5]。

2.2 荷瘤小鼠模型的建立: 无菌条件下抽取肝癌小鼠腹水中的 H₂₂ 细胞, 无菌生理盐水调整肿瘤细胞浓度为 1 × 10⁶/mL, 于 ICR 小鼠左前肢腋下无菌皮下接种, 细胞总数为 2 × 10⁵/只。

2.3 实验动物分组及处理: 将清洁级 ICR 雄性小鼠按体重随机分成 5 组 (每组 12 只), 建立肝癌 H₂₂ 皮下移植瘤模型, 分别为苦瓜蛋白低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组, 模型组给以等量生理盐水、环磷酰胺 (CTX, 40 mg/kg)。各组均 ip 给药, 给药体积为每只 0.2 mL, 每日 1 次, 连续 12 d。停药后次日对小鼠进行眼静脉穿刺取血, 离心分离血清, - 20 冻存备用。

2.4 苦瓜蛋白对荷瘤小鼠肿瘤抑制作用: 停药后次日处死小鼠, 剥离瘤体称其质量, 计算肿瘤生长抑制率 (抑瘤率)。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 × 100%

2.5 MMPs 酶谱检测: 血清 MMP 酶谱检测参考文献方法^[6]。配制 7.5% 分离胶 (含 0.1% 明胶) 和 5% 浓缩胶, 取 1:20 稀释小鼠血清 10 μL 加等体积无变性 2 × SDS 上样缓冲液进行电泳, 电泳完成后剥离凝胶, 用 2.5% TritonX-100 中洗脱 15 min × 2 后, 凝胶置于反应液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 0.02% NaN₃] 37 孵育过夜。取出凝胶进行考马斯亮蓝染色并脱色, 结果用 Imageaster 进行拍照, 结果分析采用 quantity one 软件进行积分吸光度扫描分析。其中: MMP 活性表现为深色背景中的白色或浅色条带。其中相对分子质量 92 000 为 MMP-9 酶原相应条带, 84 000 为其活化形式; 72 000 为 MMP-2 酶原相应条带, 64 000 为其活化形式相应的条带。

2.6 L-6 及 TNF-α 检测: 严格按 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测血清中 L-6 及 TNF-α 水平。

2.7 统计学处理: 用 One-way ANOVA 统计方法进行 student-t 检验。

3 结果

3.1 色谱分离得到的峰蛋白经 SDS-PAGE 电泳及等电聚焦电泳, 考马斯亮蓝 G-250 染色鉴定为相

对分子质量约为 25 200, 等电点 (PI) 约为 8.3 的单一一条带蛋白。

3.2 苦瓜蛋白对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用: 不同剂量苦瓜蛋白及 CTX 对 ICR 小鼠 H₂₂ 实体瘤均有明显抑制作用 (表 1)。25、50、100 mg/kg 苦瓜蛋白组及 CTX 组抑瘤率与模型组比较差异非常显著 (P < 0.01), 苦瓜蛋白高剂量与中、低剂量组间差异显著 (P < 0.05), 中、低剂量组间无统计学意义 (P > 0.05)。同时, 苦瓜蛋白组及 CTX 组 ICR 小鼠体重较模型组轻 (P < 0.01)。

表 1 苦瓜蛋白对肝癌移植瘤 H₂₂ 小鼠体重及瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

Table 1 Effect of momordin on body weight and tumor weight of H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	体重/g	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	-	32.10 ± 1.91	1.49 ± 0.34	-
苦瓜蛋白	25	27.40 ± 4.05**	0.71 ± 0.17**	52.05
	50	24.02 ± 2.06**	0.49 ± 0.18**	66.89
	100	21.89 ± 1.83**	0.21 ± 0.15**	85.81
CTX	40	25.08 ± 2.16**	0.52 ± 0.22**	65.10

与模型组比较: ** P < 0.01

** P < 0.01 vs model group

3.3 苦瓜蛋白对荷瘤小鼠血清 MMPs 的影响: 不同剂量苦瓜蛋白及 CTX 对 H₂₂ 荷瘤小鼠血清 MMPs 表达及活性均有明显的下调作用, 与模型组比较, 差异非常显著 (P < 0.01); 不同苦瓜蛋白剂量组间差异显著 (P < 0.05), MMPs 表达及活性下调与苦瓜蛋白处理的剂量的高低呈正相关, 以高剂量组变化最明显, 见表 2。

3.4 苦瓜蛋白对荷瘤小鼠血清 L-6 和 TNF-α 的影响: 不同剂量苦瓜蛋白及 CTX 对 H₂₂ 荷瘤小鼠血清 L-6 和 TNF-α 表达均有明显的下调作用, 与模型比较, 差异非常显著 (P < 0.01); 不同苦瓜蛋白剂量组间差异显著 (P < 0.05), L-6 和 TNF-α 表达下调与苦瓜蛋白处理的剂量的高低相关, 其中高剂量组 L-6 和 TNF-α 表达下调最明显, 见表 3。

4 讨论

苦瓜作为药食同源的植物, 苦瓜蛋白药理活性显著, 不良反应小, 具抗肿瘤、抗病毒等作用, 具有极大的药用价值。其中苦瓜蛋白属于 I 型 RIP, 是从苦瓜种仁中分离出来的一类能够使核糖体失活、抑制细胞蛋白质合成的碱性糖蛋白。近年来研究发现某些植物来源的 I 型 RIP 能够诱导肿瘤细胞产生凋亡^[1~3], 而对正常的小鼠上皮培养细胞 (Sm ac-13) 无抑制作用^[7]。另外, 前期研究表明苦瓜蛋白可以明

表2 苦瓜蛋白对肝癌移植瘤 H₂₂小鼠血清 MMPs 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)Table 2 Effect of momordin on MMPs in serum of H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	积分吸光度			
		MMP-9 酶原	活性MMP-9	MMP-2 酶原	活性MMP-2
模型	-	1 395.45 ± 301.31	908.96 ± 102.53	796.73 ± 212.94	1 125.15 ± 331.81
苦瓜蛋白	25	1 237.45 ± 236.94**	801.35 ± 93.91**	816.50 ± 113.88**	979.14 ± 156.05**
	50	785.55 ± 243.95**	548.56 ± 137.35**	736.94 ± 185.06**	914.69 ± 155.16**
	100	536.67 ± 133.72**	323.79 ± 116.39**	653.01 ± 33.82**	629.38 ± 121.37**
CTX	40	582.34 ± 86.53**	408.71 ± 102.37**	738.84 ± 49.65**	706.72 ± 115.32**

与模型组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs model group

表3 苦瓜蛋白对肝癌移植瘤 H₂₂小鼠血清 L-6 和 TNF-α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)Table 3 Effect of momordin on expression of L-6 and TNF-α in serum of H₂₂ mice ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	L-6/(pg · mL ⁻¹)	TNF-α/(pg · mL ⁻¹)
模型	-	29.10 ± 1.27	116.16 ± 4.89
苦瓜蛋白	25	20.23 ± 0.98**	89.22 ± 2.99**
	50	4.72 ± 0.86**	60.04 ± 3.41**
	100	0.98 ± 0.69**	55.88 ± 1.54**
CTX	40	12.38 ± 0.76**	57.21 ± 1.26**

与模型组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs model group

显诱导 K562 细胞产生凋亡,同时细胞黏附分子 CD54 表达上调与苦瓜蛋白诱导肿瘤细胞凋亡相关^[3]。

本实验结果表明,苦瓜蛋白对小鼠移植性肿瘤 H₂₂ 的生长有显著的抑制作用,且同剂量呈正相关;高、中剂量组抑瘤率高于 CTX 阳性对照组。同时,各剂量组及 CTX 组小鼠的体重有一定的下降,说明在上述给药剂量范围内苦瓜蛋白和 CTX 一样还是具有一定的毒副作用。

MMPs 作为一组 Zn²⁺ 依赖性具有相关结构的内肽酶,可水解细胞外基质。它们在生理状态下主要参与组织发育、伤口愈合、骨生长及血管生成等参与组织的重建等;在病理情况下,MMPs 则能促进许多疾病的发生、发展,如参与肿瘤的侵袭和转移以及促进新生血管的形成等病理过程,在肝癌等肿瘤中高表达 MMP-2 及 MMP-9,因此阻断细胞外基质降解及抑制 MMPs 活性已逐渐成为肿瘤治疗的新靶点^[8-9]。本研究结果表明,苦瓜蛋白对 MMP-2 及 MMP-9 的酶原及其活性具有明显的抑制作用,作用与苦瓜蛋白剂量呈正相关,其中,以 MMP-9 活性降低最为明显。因此,苦瓜蛋白通过抑制 MMPs 的合成,特别可能是抑制其活性等机制来发挥抗肿瘤生长、侵袭和转移作用。

肿瘤细胞以自分泌和旁分泌方式表达的多种细

胞因子,这些细胞因子可以调节肿瘤细胞的生长。肝癌、食道癌、胃癌、大肠癌、肺癌等恶性肿瘤患者血清中 L-6 及 TNF-α 等细胞因子表达明显升高,L-6 及 TNF-α 表达上调与恶性肿瘤的治疗及预后密切相关^[10]。本研究结果表明,苦瓜蛋白处理移植性肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠时,可见血清中 L-6 及 TNF-α 表达明显下降,说明苦瓜蛋白抗肿瘤作用时,通过诱导细胞凋亡等方式导致肿瘤细胞数目的减少,引起肿瘤细胞分泌到循环系统中的 L-6 及 TNF-α 等细胞因子水平相应降低所致。因此,L-6 及 TNF-α 变化可能反应了苦瓜蛋白抗肿瘤作用的药用效果,至于 L-6 及 TNF-α 变化本身是否参与了其抗肿瘤的病理生理过程,尚需进一步研究加以阐明。

综上所述,苦瓜蛋白具有较强的体内和体外抗肿瘤作用的活性;其抗肿瘤作用可能和苦瓜蛋白具有抑制 MMPs 的活性及其表达,以及调节 L-6 及 TNF-α 等细胞因子的表达水平有关。

References

- [1] Lee H S, Huang P L, Sun Y, *et al*. Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by antitumor agents GA P30 and MAP30 [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 653-659.
- [2] 李 喲, 温博贵, 王 云. 苦瓜蛋白的药用价值 [J]. *中草药*, 2004, 35(9): 1068-1170.
- [3] 熊术道, 尹丽慧, 李景荣, 等. 粘附分子 CD54, CD44 在苦瓜蛋白诱导 K562 细胞凋亡中的作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(12): 1403-1407.
- [4] Lee H S, Huang P L, Chen H C, *et al*. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon [J]. *Gene*, 1995, 161(2): 151-156.
- [5] Tsang K Y, Ng T B. Isolation and characterization of a new ribosome inactivating protein momorgrosvin, from seeds of the monk's fruit *Momordica grosvenorii* [J]. *Life Sci*, 2001, 68(7): 773-784.
- [6] Liu L T, Chang H C, Chiang L C, *et al*. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3069-3072.
- [7] Ling J, Liu W Y. Cytotoxicity of two new ribosome-inacti-

vating protein, cinnamom in and camphorin to carcinoma cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 1996, 14: 157-161.

[8] Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, *et al* Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1043-1048.

[9] Kruger A, Arlt M J, Gerg M, *et al* Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3523-3526.

[10] Yanagawa H, Sone S, Takahashi Y, *et al* Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 1995, 71: 1095-1098.

以血清药理学方法研究复方丹参缓释片的缓释作用

邱明丰^{1,2}, 彭 腾², 罗海燕⁴, 杨远友³, 谢秀琼², 贾 伟^{1*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075; 3. 四川大学原子核科学技术研究所, 四川 成都 610041; 4. 海南医学院 药理学系, 海南 海口 571101)

摘要: 目的 以含药血清钙拮抗作用为指标, 研究复方丹参缓释片缓释作用。方法 以自制复方丹参片作对照, 心肌缺血模型犬口服复方丹参缓释片后, 在规定时间内取血清样品, 用⁴⁵Ca 跨膜内流测量技术测定含药血清钙拮抗作用, 考察含药血清的时间-钙拮抗作用规律。结果 复方丹参缓释片含药血清样品在 2~ 10 h 均有显著或极显著的钙拮抗作用, 自制复方丹参片含药血清在 1~ 4 h 有显著或极显著钙拮抗作用。结论 复方丹参缓释片与自制复方丹参片相比, 可延长钙拮抗作用持续的时间, 具有缓释作用, 含药血清钙拮抗作用测定方法可作为其缓释作用评价的方法之一。

关键词: 复方丹参缓释片; 血清药理学; ⁴⁵Ca 跨膜内流测量技术; 缓释作用

中图分类号: R286.64 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)03-0411-03

复方丹参属研制方^[1], 其成药复方丹参片和复方丹参缓释片(Compound Danshen Sustained-release Tablet, CDST)均为钙拮抗剂, 体外释放样品钙拮抗作用研究表明, 复方丹参缓释片具有延缓起效的作用^[2]。本研究用血清药理学方法, 以含药血清的钙拮抗作用为指标, 观察犬给予复方丹参缓释片后, 不同时间含药血清钙拮抗作用的经时变化, 并与自制复方丹参片进行比较, 旨在探讨复方丹参缓释片体内缓释作用评价的方法。

1 材料

1.1 动物: Wistar 大鼠, 体重(200±20)g, 雌雄各半, 四川大学华西医学院实验动物中心提供。6~8月龄 Begle 犬(合格证号医动字 2416013123), 雄性, (12±2)kg, 四川省医学科学院动物研究所犬养殖场提供。

1.2 仪器与试剂: FJ—210TP 液体闪烁计数器(西安二六二厂), 十六道生理记录仪(美国BDPAC公司), ECG—6511 心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司), 动物呼吸机(浙江大学医学仪器厂), 离心机(北京医用离心机厂)。放射性同位素

⁴⁵CaCl₂ (1 570 MBq/g, 英国 Amersham 公司), 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 药品: 维拉帕米(Verapamil, 江苏省连云港制药厂, 批号为 991115, 2 mL 5 mg)。复方丹参缓释片和自制复方丹参片, 成都中医药大学中药炮制与药剂教研室自制, 每片 0.5 g, 含丹参酮 II_A 5.67 mg, 丹参素 13.82 mg, 原儿茶醛 2.61 mg, 三七总皂苷 48.2 mg, 冰片 33.21 mg^[2]。

1.4 实验用溶液: 复合电解质溶液(PSS 溶液): NaCl 137 mmol/L、CaCl₂ 1.5 mmol/L、MgCl₂ 1.0 mmol/L、KCl 3.0 mmol/L、HEPES 20 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L; 高钾 PSS 溶液: KCl 100 mmol/L、NaCl 400 mmol/L, 其余同 PSS 溶液; 无 Ca²⁺-EGTA [钙螯合剂, 乙二醇双(α-氨基乙酸)醚四乙酸]洗涤液: EGTA 10 mmol/L, 其余成分同 PSS 溶液(无 CaCl₂)。以上溶液用重蒸水配制, pH 为 7.4。甲苯闪烁液: PP0 5.0 g, 乙二醇乙醚 300 mL, 加甲苯定容至 1 000 mL。

2 方法

2.1 溶液制备: 以重蒸水为空白对照溶液, 盐酸维

* 收稿日期: 2006-06-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30000223)

作者简介: 邱明丰(1970—), 男, 山东省滕州人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药新剂型和新制剂研究。

E-mail: miqu@sjtu.edu.cn

* 通讯作者 贾 伟 Tel: (021) 62932292 E-mail: weijia@sjtu.edu.cn