

表明 $A\beta$ 诱导的神经元凋亡是通过一些凋亡相关基因表达的改变来实现

调心方由党参、桂枝、茯苓、远志、菖蒲等组成,党参补益元气、安神益智,为君;桂枝温通经脉、振奋心阳为臣;茯苓益气凝神、化痰强记,远志安神、益智、开窍,二药为佐;菖蒲豁痰通窍增智为使,全方共奏益心气、振心阳、化痰浊、通心窍之功效。研究发现调心方能减轻 $A\beta$ 诱导的神经元凋亡,使细胞存活率增加,这可能是调心方临床发挥疗效的机制之一。

研究还发现调心方可降低 Caspase-3 的表达,对凋亡相关的 Caspase-3 途径进行调控。在凋亡相关基因的 mRNA 表达研究中心发现,调心方可提高 bcl-2 表达,降低 bax 和 c-jun 的表达,通过对这些凋亡相关基因表达的调控,来抑制 $A\beta$ 诱导的神经元凋亡。实验中调心方对 c-fos 表达的调控作用不明

显,可能是由于 c-fos 属于即刻早期反应基因,处理 24 h 后其表达变化的高峰已过

参考文献:

- [1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994, 53: 438-447.
- [2] Smale G, Nicolls N R, Brady D R, *et al*. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease [J]. *Exp Neurol*, 1995, 133: 225-230.
- [3] Baringa M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? [J]. *Science*, 1998, 281: 1303-1304.
- [4] 林水森. 调理心肾治疗老年性痴呆 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1992, 12(7): 393.
- [5] 林水森,杨柏灿. 养心健脑液治疗 Alzheimer 痴呆的临床观察 [J]. *上海中医药大学上海市中医药研究院学报*, 1996, 10(2): 44-47.
- [6] 周晖,赵伟康. 调心方对 $A\beta$ 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响 [J]. *中药药理和临床*, 1998, 14(3): 29-31.
- [7] J 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.

海噻啉抗肿瘤作用的实验研究

季宇彬,高世勇,孔琪,张秀娟,杨宝峰*

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 研究海噻啉的抗肿瘤作用。方法 采用 MTT 实验和集落形成实验观察海噻啉的体外抗肿瘤作用;通过海噻啉对 FC 小鼠和 S_{180} H_2 荷瘤小鼠瘤重和生存时间的研究,观察了海噻啉的体内抗肿瘤作用。结果 海噻啉对 8 种人癌细胞具有一定的杀伤作用,以对 BGC-823 Eca-109 HCT-8 细胞的抑制作用最强;对 BGC-823 Eca-109 HCT-8 细胞的集落形成有明显的抑制作用,以对 Eca-109 细胞集落形成抑制作用最强;可明显抑制 FC 小鼠和 S_{180} 小鼠瘤体的生长,明显延长 H_2 荷瘤小鼠的生存时间。结论 海噻啉由中药复方和 5-Fu 两部分复合而成,其抗肿瘤作用与二者相比具有明显的协同作用,使抑瘤率大幅度提高。

关键词: 海噻啉;荷瘤小鼠;抗肿瘤作用

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0524-04

Experimental studies on antitumor activities of Haimiding

JI Yu-bin, GAO Shi-yong, KONG Qi, ZHANG Xiu-juan, YANG Bao-feng

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

Abstract Object To study the antitumor activities of Haimiding. **Methods** The *in vitro* antitumor action was observed by MTT and colony formation, its *in vivo* effects were studied by observing tumor weight and survival time of FC, S_{180} and H_2 mice. **Results** Haimiding is a powerful antitumor agent in 8 kinds of human cancer cell line, especially on BGC-823, Eca-109 and HCT-8, with Eca-109 being the most susceptible. Haimiding also inhibits the growth of cancer cells of FC and S_{180} mice and prolongs the survival time of H_2 mice. **Conclusion** Haimiding is a compounded preparation consisted of 5-Fu and Chinese medicine, they showed obvious synergistic effect to inhibit the growth rate of tumors.

Key words Haimiding; tumor bearing mice; antitumor activity

* 收稿日期: 2001-01-11
 基金项目: 国家科委生命中心博士基金资助(项目编号: 96-901-06-10); 中国优秀博士后基金资助(中博号[1999]17号); 黑龙江省杰出青年基金资助(19906); 黑龙江省自然科学基金项目资助(项目编号: D9801)
 作者简介: 季宇彬,男,博士,教授,硕士,博士研究生导师,44岁。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。
 * 哈尔滨医科大学博士后导师

海嘧啶是由抗癌药 5-Fu (5-fluorouracil) 和中药海藻、昆布、黄芪、苦参提取的有效成分组方而成的中西药复方抗癌制剂。在国内外首次将中西药复方用于抗癌药领域,其组方思路具有创新性。本研究从体内、外抗肿瘤两方面观察了海嘧啶的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 药品:海嘧啶注射剂(10 mL/支)批号 980606,中药复方注射液(不含 5-Fu 的海嘧啶注射剂)批号 980507,由哈尔滨商业大学药物研究所药剂室制备;5-Fu 由上海海普药厂提供,批号 990304

1.2 肿瘤细胞系:人口腔上皮癌 KB 人食管癌 Eca-109 人胃癌 BGC-823 A549 人肺腺癌、人结肠癌 HCT-8 人乳腺癌 MCF-7 人卵巢癌 A2780 人肝癌 Bel-7402 均由中国医科院药物研究所药理室提供

1.3 动物:昆明种小鼠由哈尔滨医科大学动物医学部提供,615 纯种小鼠由中国医学科学院药物研究所提供。

1.4 瘤株:FC 小鼠、S₁₈₀A 小鼠、H₂ 小鼠均由中国医学科学院药物研究所提供,体重(20±2)g,同一性别

1.5 试剂:小牛血清和 RPMI-1640 培养基均为 Gibco 产品,MTT 为 Sigma 公司产品

1.6 主要仪器设备:超速离心机 HITACH 85p72 (日本),二氧化碳培养箱 LNA-III 型(日本),酶标仪 EL311(美国 BIO-TEK 公司)。

2 方法

2.1 体外抗肿瘤作用

2.1.1 MTT 实验^[1]:采用 96 孔培养板,每孔接种 1 200 个细胞,24 h 后加入受试药物,同时设溶剂对照,每个剂量设 3 个平行孔,置 37℃、5% 湿化的 CO₂ 培养箱中培养 4 d 后,向每孔加入 MTT 储备液 10^μL (5 mg/mL),振荡混匀后,继续培养 4 h,加入 10% 酸化的十二烷基磺酸钠(SDS) 100^μL (pH=4.7),过夜用 EL311 型酶标仪测其吸光度(A),测定波长 570 nm,参考波长 630 nm,计算对细胞抑制 50% 的药物浓度(IC₅₀)。

2.1.2 集落形成实验^[2]:将实验所用细胞接种于直径为 35 mm 的塑料培养皿中(100 个细胞),24 h 后加入受试药物,第 9 天弃去培养液,PBS 冲洗 3 遍,10% 甲醛固定,0.25% 龙胆紫染色,显微镜下计数每皿大于 50 个细胞的克隆数,对照组以溶剂代替受试药物

2.2 体内抗肿瘤作用

2.2.1 海嘧啶对 FC 小鼠瘤重的影响:615 系 FC 小鼠进行肿瘤细胞移植,取接种 9 d 并生长良好的 FC 小鼠,超净工作台里在冰盘上取出生长良好的瘤组织剪成小块,用玻璃匀浆器进行匀浆,用灭菌生理盐水制成肿瘤细胞混悬液(5.6×10⁶/mL),按常规方法^[3],在无菌条件下接种于 615 系小鼠右侧腋窝皮下(每只 0.2 mL),24 h 后称重,随机分组:海嘧啶为分高、中、低 3 个剂量组,分别 ip 27.05, 13.53, 6.76 g/kg (相当于原生药量)的海嘧啶注射剂,每日 1 次,每次每只小鼠 0.4 mL; 5-Fu 组: ip 25 mg/kg 5-Fu 注射液,每日 1 次,每次每只小鼠 0.4 mL; 中药复方: ip 13.500 g/kg (相当于原生药量)的中药复方注射液,给药方式、给药体积同海嘧啶给药组;对照组:按接种 24 h 后每天 ip 生理盐水,每次每只小鼠 0.4 mL。接种第 11 天停药,次日处死动物,剥瘤称重,按公式计算抑瘤率,进行统计学处理(进行 3 次重复实验)。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

2.2.2 海嘧啶对 S₁₈₀ 小鼠瘤重的影响:昆明种小鼠进行肿瘤细胞移植,取接种 7 d 生长良好的 S₁₈₀A 小鼠,无菌条件下抽取腹水,在冰浴条件下用灭菌生理盐水 4:1 稀释,混匀制成肿瘤细胞混悬液(5.8×10⁶/mL),癌细胞混悬液应为乳白色半透明状态,若有血性腹水不可使用,接种于昆明种小鼠右侧腋窝皮下(每只 0.2 mL),接种按《全国抗肿瘤药物体内筛选规程进行》^[4]。24 h 后小鼠称重,随机分组,分组、给药、剥瘤、称重、计算抑瘤率同 2.2.1

2.2.3 海嘧啶对 H₂ 小鼠生存时间的影响:昆明种小鼠进行肿瘤细胞移植,取接种 7 d 生长良好的 H₂ 小鼠,无菌条件下抽取腹水,在冰浴条件下用灭菌生理盐水 4:1 稀释,混匀制成肿瘤细胞混悬液(6.0×10⁶/mL)接种于昆明种小鼠腹腔体内,每只 0.2 mL,24 h 后称重,随机分组,分组、给药同 2.2.1,停药后观察记录各组小鼠的死亡数。各组小鼠全部死亡后,计算生命延长率,重复 3 批实验

$$\text{生命延长率}(\%) = \frac{\text{给药组生存天数} - \text{对照组生存天数}}{\text{对照组生存天数}} \times 100\%$$

3 实验结果

3.1 海嘧啶体外抗肿瘤作用

3.1.1 对人肿瘤细胞的细胞毒作用:结果见表 1 海嘧啶对 8 种人癌细胞具有一定的杀伤作用,以对 BGC-823 Eca-109 HCT-8 细胞的抑制作用较强,

并具剂量依赖性,经直线回归计算出海嘧啶对 BGC-823 Eca-109 HCT-8的 IC₅₀分别为 25.28, 12.78, 28.29 mg(生药量)/mL

3.1.2 对 BGC-823 Eca-109 HCT-8细胞集落形

成的影响:结果见表 2 海嘧啶对 BGC-823 Eca-109 HCT-8癌细胞的集落形成有明显的抑制作用,以对 Eca-109细胞集落形成抑制作用最强,并呈量效正相关。

表 1 海嘧啶对人肿瘤细胞的细胞毒作用 (MTT)

药物	IC ₅₀ (mg/mL)							
	KB	BGC-823	A ₅₄₉	MCF-7	A ₂₇₈₀	Bel-7420	HCT-8	Eca-109
海嘧啶	83.89	25.28	292.41	34.14	16.84	36.57	28.29	12.78
5-Fu	0.12	0.06	0.19	0.10	0.08	0.09	0.08	0.04
中药复方	428.58	274.90	685.70	365.00	124.65	295.60	187.58	100.42

表 2 海嘧啶 BGC-823 Eca-109 HCT-8细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

药物	剂量 (mg/mL)	集落形成百分率 (%)		
		BGC-823	HCT-8	Eca-109
海嘧啶	10.00	72.18±7.29 ^Δ	83.19±9.01	61.58±4.12 ^Δ
	20.00	50.2±5.18 ^{ΔΔ}	59.45±6.78 ^Δ	22.43±3.65 ^{ΔΔ}
	40.00	28.43±3.42 ^{ΔΔΔ}	30.15±4.20 ^{ΔΔΔ}	0
5-Fu	0.04	61.18±4.27 ^Δ	68.70±5.15	69.27±5.48
中药复方	19.63	90.5±7.42	82.15±7.92	78.29±6.25
空白对照	-	98.27±6.58	95.68±9.12	97.14±8.26 ^Δ

与空白对照比: * P < 0.05; 与中药复方比: Δ P < 0.05 ΔΔ P < 0.01

3.2 海嘧啶体内抗肿瘤作用

效果呈正相关,海嘧啶 13.53 g/kg(含 5-Fu 25 mg)

3.2.1 对 FC小鼠瘤重的影响:结果见表 3 海嘧啶对 FC小鼠的瘤体生长有显著的抑制作用,剂量与

的抑瘤作用比 5-Fu 25 mg/kg的作用要强,并有统计学意义 (P < 0.05)。

表 3 海嘧啶对 FC小鼠瘤重的影响

药物	剂量 (g/kg)	给药途径	动物数 (n)	平均瘤重 ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
海嘧啶	27.05	ip	30	0.42±0.21 * ΔΔ	76.92
	13.35	ip	30	0.58±0.30 * ΔΔ	68.13
	6.76	ip	30	0.88±0.34	51.65
中药复方	13.50	ip	30	1.2±0.45	33.52
5-Fu	0.03	ip	29	0.89±0.40	51.10
生理盐水	-	ip	30	1.82±0.43	

与中药复方比: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与 5-Fu比: ΔΔ P < 0.01

3.2.2 对 S₁₈₀小鼠瘤重的影响:结果见表 4 海嘧啶对 S₁₈₀小鼠的瘤体生长有显著的抑制作用,剂量与

效果呈正相关,并有统计学意义 (P < 0.01, P < 0.05)。

表 4 海嘧啶对 S₁₈₀小鼠瘤重的影响

药物	剂量 (g/kg)	给药途径	动物数 (n)	平均瘤重 ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
海嘧啶	27.05	ip	30	0.28±0.10 * Δ	73.33
	13.35	ip	30	0.40±0.15	61.91
	6.76	ip	30	0.49±0.31 [†]	53.33
中药复方	13.50	ip	28	0.79±0.33	24.76
5-Fu	0.03	ip	28	0.54±0.21	48.57
生理盐水	-	ip	29	1.05±0.32 ^{ΔΔ}	

与中药复方比: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与 5-Fu比: Δ P < 0.05 ΔΔ P < 0.01

3.2.3 对 H₂₂小鼠生存时间的影响:结果见表 5 海嘧啶对 H₂₂小鼠的生存时间有显著的延长作用,剂量与效果呈正相关 海嘧啶 13.53 g/kg(含 5-Fu 25 mg)对 H₂₂小鼠的生命延长作用比 5-Fu(25 mg/kg)单用的作用强 (P < 0.05),同时也比不含 5-Fu的中药复方作用强 (P < 0.05)

海嘧啶是一个中西药复方抗癌注射剂,经大量抗癌实验表明:该制剂具有显著的抗癌作用,体外实验中,我们采用 MTT方法和细胞集落形成法对 8 种人类肿瘤细胞(人口腔上皮癌 KB细胞、人食管癌 Eca-109细胞、人前胃癌 BGC-823细胞、人肺腺癌 A₅₄₉细胞、人结肠癌 HCT-8细胞、人乳腺癌 MCF-7细胞、人卵巢癌 A₂₇₈₀细胞、人肝癌 Bel-7402细胞)进

4 讨论

表 5 海嘧啶对 H₂₂小鼠生存时间的影响

药物	剂量 (g/kg)	给药途径	动物数 (n)	生存时间 (d, $\bar{x} \pm s$)	生命延长率 (%)
海嘧啶	27.05	iv	27	21.1 ± 1.6 [△]	74.4
	13.53	iv	28	18.6 ± 2.9 [△]	53.7
	6.76	iv	30	17.1 ± 3.2	41.3
中药复方	13.50	iv	30	15.8 ± 2.5	30.6
5-Fu	0.03	iv	29	14.6 ± 2.7	20.7
生理盐水	-	iv	30	12.1 ± 3.1	

与中药复方比: * $P < 0.05$; 与 5-Fu比: $\Delta P < 0.05$

行了抑制作用的预测,结果表明,海嘧啶均有一定的抑制作用。综合两种实验方法的实验结果,对其中的人胃癌 BGC-823细胞、人食管癌 Eca-109细胞、人结肠癌 HCT-8细胞的杀伤力最强,并具有剂量依赖性。这一结果与本方在临床上治疗噎膈与反胃是相吻合的。同时这一结果揭示海嘧啶对消化道肿瘤(胃癌、食管癌等)具有较强的敏感性。在体内抗肿瘤实验中,我们采用动物体内移植肿瘤的方法^[3],观察了海嘧啶对3种小鼠肿瘤(小鼠胃癌 FG、小鼠肉瘤 S₁₈₀、小鼠肝癌 H₂₂)生长的影响。实验结果表明,海嘧啶对 FG、S₁₈₀小鼠的瘤体生长具有显著的抑制作用,且药物剂量与效果具正相关性。对于 H₂₂小鼠的生命延长作用有一定意义,但作用强度不及对 FG、S₁₈₀的强度大,提示海嘧啶对实体瘤的抑制作用要优于对腹水癌的抑制作用。这一结果也与本方在临床对胃癌、食管癌效果好,而对腹水期肝癌疗效较差的临床效果是一致的。

海嘧啶注射剂是由两部分构成,一部分是中药复方部分,另一部分为西药部分(5-Fu),我们在研究中均设立了中药复方组、西药组(5-Fu)做对照,结果显示在抗肿瘤作用方面,海嘧啶中西药复方后其作用远远大于中药复方、5-Fu单独使用时的作用(等同剂量)。根据上述结果我们认为中药复方部分与5-Fu复合成海嘧啶后其抗肿瘤方面产生了明显的协同作用,使抑瘤率大幅度提高。

参考文献:

- [1] 吴军正. MTT试验及其在抗癌中药筛选中的应用[J]. 中华口腔医学杂志, 1992, 27(6): 373-375.
- [2] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、北京协和医科大学联合出版社, 1997.
- [3] 高进. 肿瘤学基础及实验[M]. 北京: 北京医科大学、北京协和医科大学联合出版社, 1992.
- [4] 贾林森, 王淑兰, 李淑莲. 人参茎叶皂苷对外培养胃癌细胞的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1992, 18(1): 27-28.
- [5] 李家庚. 中医肿瘤防治大全[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994.

广枣总黄酮对阿霉素引起大鼠心肌过氧化损伤的保护作用

乌日娜¹, 张昕原¹, 张维兰², 王哲², 王玉莹¹, 李宝山^{1*}

(1. 内蒙古民族大学 西区中心实验室, 内蒙古 通辽 028041; 2. 内蒙古民族大学 附属医院 检验科, 内蒙古 通辽 028041)

摘要: 目的 通过广枣总黄酮(TFCA)对阿霉素(ADR)引起大鼠心肌过氧化损伤保护作用的研究,进一步证实广枣疗效可能与TFCA抗氧化作用有关。方法 动物分为空白组、ADR组和实验组(ADR+TFCA 100, 150, 200 mg/kg组)以“心酶谱”、抗氧化酶做为检测指标。结果 ADR组心酶谱、MDA均比空白组高,而抗氧化酶活性均比空白组低。TFCA干预后“心酶谱”、MDA下降,抗氧化酶活性上升。结论 TFCA能抑制ADR所引起大鼠心肌过氧化损伤。

关键词: 广枣总黄酮; 心酶谱; 抗氧化酶; 丙二醛; 阿霉素

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0527-03

Protective effect of total flavonoids of *Choerospondias axillaris* on rat myocardial peroxidation injury caused by adriamycin

* 收稿日期: 2000-10-26

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助(NO. 9713031)

作者简介: 乌日娜(1956-),女(蒙古族),内蒙古科右中旗人,现任内蒙古民族大学实验中心实验师,主要从事蒙药药理学研究工作。