

并维持在较高水平。本研究应用染料排除法、活细胞悬液荧光染色结合 DNA 电泳及 FCM 分析,均观察到 THH 诱导细胞凋亡的典型表现,并且检测结果较一致地反映了 THH 诱导细胞凋亡的动态变化规律。证实 THH 具有较强的诱导白血病 HL-60 细胞凋亡的能力。

Bcl-2 基因在细胞凋亡中起负性调节因子作用,其过度表达可保护肿瘤细胞,使许多瘤细胞对阿糖胞苷、长春新碱、顺铂等化疗药物产生抗性,这可能是形成多药耐药性的原因之一^[5]; Bcl-2 表达增强是许多肿瘤的共性,能使肿瘤细胞维持明显的生长优势。HL-60 细胞作为 Bcl-2 基因高表达细胞株,实验观察到,THH 水提取液 (10^{-6} L/mL) 处理后 4 h, Bcl-2 基因表达即出现显著降低,直到处理后 24 h 均保持持续降低趋势。同步 FCM 分析则显示凋亡的高峰发生在 24 h 左右,说明 Bcl-2 表达下调是一个早期事件,提示 Bcl-2 基因有可能是 THH 诱导 HL-60 细胞凋亡的启动基因。由于 80% 以上的肿瘤其 p53 基因为突变型,使这些肿瘤对传统化疗药物并不敏感^[6]。在 p53 基因突变的 HL-60 细胞中,THH 能通过下调 Bcl-2 基因诱导凋亡发生,提示 THH 可能发展成为一种广谱抗肿瘤药物。

大量研究表明,在 HL-60 细胞凋亡过程中至少存在两种不同的信号途径:一种以 Ca^{2+} 为第二信使,通过参与凋亡过程中一些关键点的调节,包括激

活 Ca^{2+} 依赖性核酸内切酶,而启动细胞自主死亡程序;另一种可能依靠其他信号通路诱导细胞凋亡。目前认为凋亡时细胞内信号还涉及 cAMP、蛋白激酶系统、氧化应激等。本研究采用目前应用较广的 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fura-2/AM 检测 HL-60 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度,结果提示 THH 在启动细胞凋亡过程中未引起细胞内 Ca^{2+} 稳态的改变。结果提示 THH 可能有通过 Ca^{2+} 以外的其他信号通路启动 HL-60 细胞凋亡。此外,HL-60 细胞为 Bcl-2 高表达细胞株,研究表明,过表达的 Bcl-2 蛋白能抑制胞内 Ca^{2+} 库的动员,阻止 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高及核钙的积累^[7],这可能是 THH 诱导 HL-60 细胞凋亡早期 $[\text{Ca}^{2+}]$ 未发生变化的一个重要原因。

参考文献:

- [1] 舒尚义. 昆明山海棠毒性及毒性成份的研究 [J]. 云南中医杂志, 1983, 4(6): 43-44.
- [2] 王士民,王 慧,张珠涛,等. 昆明山海棠对雄性大鼠的抗生育作用及其可逆性的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(11): 652-654.
- [3] 曹 佳, Michael Nusse. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株发生细胞凋亡 [J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1169-1173.
- [4] 张钧田. 用 Fura-2/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法 [J]. 中国药理学杂志, 1991, 26(11): 665-668.
- [5] 曾庆平,郭 勇. 细胞凋亡异常及其药物治疗法 [J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(12): 733-736.
- [6] Hartwell L H, Kerr F R, Arends M J, *et al.* Cell cycle control and cancer [J]. Science, 1994, 266: 1821-1825.
- [7] Zamzami N, Tutaka M F, Kane B J, *et al.* Subcellular and Mitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins [J]. Oncogene, 1998, 16(17): 2265-2282.

桂枝对致痫大鼠海马 CA1 区诱发场电位的影响

徐淑梅,何津岩,林来祥,郑开俊,仇晓菁

(天津医科大学 生理教研室,天津 300070)

摘要:目的 探讨桂枝对癫痫模型海马脑片诱发场电位的影响。方法 以毛果芸香碱致痫大鼠为实验对象,用细胞外玻璃微电极记录方法,观察桂枝对癫痫模型离体海马脑片 CA1 区锥体细胞诱发群峰电位 (population spike, PS) 的影响。结果 桂枝提取液使致痫大鼠海马脑片 PS 幅度平均降低 28.73%,平均 16.8 min 恢复。结论 桂枝能降低致痫大鼠海马脑片 CA1 区顺向诱发 PS 幅度,提示桂枝对中枢神经系统的突触传递过程有明显的抑制效应。

关键词:桂枝;癫痫;海马脑片;群峰电位

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-0916-03

Effect of cassia twig on evoked field potential of CA1 of hippocampal slice in epileptogenic rat

收稿日期: 2001-04-27

基金项目: 天津市 21 世纪—青年科学基金资助项目 (No. 963708411)

作者简介: 徐淑梅 (1960-),女,河北省人,副教授,学士学位。1983 年毕业于天津医学院医疗系,主要从事神经电生理研究。

XU Shu-mei, HE Jin-yan, LIN Lai-xiang, ZHENG Kai-jun, QIU Xiao-jing

(Department of Physiology, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300070, China)

Key words cassia twig; epilepsy; hippocampal slices; population spikes

桂枝的主要有效成分为挥发油,油中主成分为桂皮醛,具有镇痛、镇静和抗惊厥作用。临床上用柴胡桂枝汤治疗癫痫取得了满意的效果^[1]。海马脑片具有较完整的神经元之间的突触联系,且不受全身性因素的影响。本研究以离体海马脑片 CA1区锥体细胞诱发群峰电位 (PS) 的幅度为指标,观察桂枝对毛果芸香碱致痫大鼠海马脑片诱发场电位的影响,探讨桂枝对中枢神经系统的作用。

1 材料和方法

1.1 动物和材料: Wistar 大鼠,体重 120~150 g,雌雄不限,由天津市劳动卫生研究所实验动物研究中心提供。盐酸毛果芸香碱 (pilocarpine·HCl) 德国 GMBH 生产,由天津市化学试剂公司提供,加蒸馏水配制成 100 mg/mL 浓度溶液。桂枝注射液由天津市南开医院中西医结合研究所制剂室采用水提醇沉及提取挥发油的方法制成 1 g/mL 注射针剂 (1 g 生药制成 1 mL 提取液)。人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 成分 (单位: mmol/L): NaCl 124, NaHCO₃ 26, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ · 6H₂O 2.4, KCl 3.3, CaCl₂ 2.5, C₆H₁₂O₆ · H₂O 10 pH 值为 7.35。

1.2 癫痫模型制备: Wistar 大鼠,ip 盐酸毛果芸香碱 (350 mg/kg 体重) 制备癫痫模型^[2]。选取出现癫痫大发作的大鼠饲养 1 周后进行实验。

1.3 离体海马脑片的制备: 致痫后 7 d,将大鼠在清醒状态下断头,迅速取全脑置于 4℃ 人工脑脊液中持续给予 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和,待脑组织冷却后迅速剥离出海马,沿海马槽纤维平行方向切成 350~400 μm 厚的脑片,至预先通以 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气的室温的 ACSF 中 (pH 为 7.35),室温下孵育 1~2 h。

1.4 诱发场电位的记录及给药: 将孵育后脑片移至以上述人工脑脊液灌流的内浴槽,灌流速率为 1.25 mL/min,保持温度 35℃。用微操纵器将充满生理盐水的玻璃微电极 (即记录电极) 插入海马 CA1 区锥体细胞层,以引导诱发的场电位。刺激电极则置于 CA3 区发出的 Schaffer 侧支处。刺激参数为 0.1 ms 和 1 Hz。由刺激电极诱发的场电位经记录电极引导,经微电极放大器放大,输入 SBR-1 型双线示波器,经友好生物信号分析系统 (由天津医科大学研

制) 转换至电子计算机进行观察、记录、测量、分析。实验时选取能记录出诱发场电位的脑片进行实验,首先记录给药前的诱发场电位,待其稳定 30 min 后再进行药物实验,给药后连续观察 20~30 min,记录诱发场电位幅度变化和恢复时间。给药途径选用脑片旁微量滴注法,滴注量为 20 μL (分 4 滴)。

本研究以正常大鼠海马脑片 CA1 区诱发场电位为空白对照,观察了毛果芸香碱致痫后 PS 的变化;以滴加生理盐水为实验对照组,观察桂枝提取液对致痫大鼠 CA1 区 PS 的影响。

1.5 数据处理: 对空白对照组与注射毛果芸香碱组的大鼠海马脑片诱发场电位的比较采用成组 *t'* 检验;对致痫大鼠滴药前、后诱发场电位幅度值采用配对 *t'* 检验,利用 SPSS 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 致痫前后海马脑片 CA1 区诱发场电位的变化: 结果显示毛果芸香碱使海马脑片 CA1 区诱发场电位的幅度增大,出现痫样放电。提示毛果芸香碱具有致痫作用 (表 1)。

表 1 致痫前后海马 CA1 区 PS 幅度的比较 (mV, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PS 幅度
正常对照	10	2.64 ± 0.27
致痫	10	4.06 ± 0.24

与正常对照组比较: * $P < 0.01$

2.2 生理盐水对致痫海马脑片 CA1 区诱发场电位的影响: 滴注生理盐水前后, PS 幅度无明显变化 ($P < 0.05$)。说明脑片表面微量滴注生理盐水后,对诱发场电位无明显影响。

2.3 桂枝提取液对致痫海马脑片 CA1 区诱发场电位的影响: 结果显示 1 g/mL 浓度的桂枝使致痫海马脑片 PS 幅度明显下降,幅度平均降低 28.73%,平均 16.8 min 恢复,经统计学检验 $P < 0.01$,有显著意义 (图 1 和表 2)。

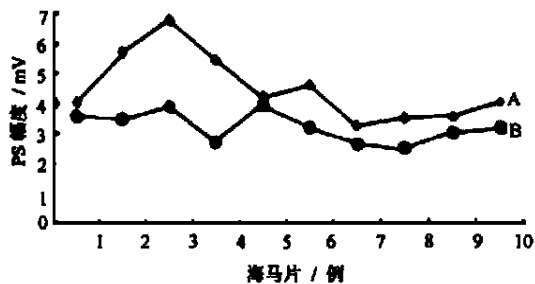
表 2 桂枝对 CA1 区 PS 幅度的影响 (mV, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	给药前	给药后
生理盐水	10	3.88 ± 0.63	3.87 ± 0.83
桂枝	10	4.49 ± 1.13	3.20 ± 0.51

与给药前比较: * $P < 0.01$

3 讨论

本研究利用海马脑片 CA3 区锥体细胞的 Schaffer 侧支与 CA1 区锥体细胞之间的突触联系,



A滴加桂枝前 B滴加桂枝后

图 1 桂枝对海马脑片 PS 幅度的影响

观察了桂枝对毛果芸香碱致痫大鼠离体海马脑片 CA1 区诱发场电位的影响,结果显示桂枝能明显降

低致痫大鼠海马静发场电位的幅度 ($P < 0.01$),表明桂枝能抑制致痫大鼠中枢神经系统突触传递过程,具有抗痫作用

桂枝对毛果芸香碱致痫大鼠海马脑片诱发场电位幅度的抑制作用,可能与对 Ca^{2+} 通道直接阻滞机制或 GABA 受体有关。桂枝通过何种途径产生抗痫作用还有待进一步研究

参考文献:

- [1] 王本祥. 现代中药药理学 [M]. 天津: 天津科技出版社, 1999.
- [2] Turski W A, Cavalheiro E A, Schawarz M, et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural electroencephalographic and morphological analysis [J]. Brain Res, 1984, 321: 237-253.

白藜芦醇苷的体外抗氧化活性

田京伟, 杨建雄

(山东省天然药物工程技术研究中心, 山东绿叶制药集团, 山东 烟台 264003)

摘要: 目的 研究白藜芦醇苷的清除自由基、抗氧化活性。方法 以 NADH-PM S-NBT 系统产生氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$; EDTAN₂-Fe(II)-H₂O₂系统和 Fe^{2+} + Vit C 系统产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$); H₂O₂诱导大鼠红细胞氧化溶血来研究白藜芦醇苷的生物活性。结果 白藜芦醇苷体外可清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\cdot\text{OH}$; 抑制 H₂O₂诱导的大鼠红细胞氧化性溶血; 抑制 $\cdot\text{OH}$ 引起的小鼠肝微粒体过氧化脂质 (LPO) 和大鼠红细胞膜丙二醛 (MDA) 含量的升高。结论 白藜芦醇苷具清除自由基及抗脂质过氧化的作用。

关键词: 白藜芦醇苷; 自由基; 抗氧化作用

中图分类号: R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)10-0918-03

In vitro antioxidative effect of polydatin

TIAN Jing-wei, YANG Jian-xiong

(Shandong Engineering Research Center for Natural Drugs, Shandong LUYE Pharmaceutical CO., Ltd., Yantai Shandong 264003, China)

Key words polydatin; free radical; antioxidation

白藜芦醇苷 (Polydatin, 简写 Pol) 是中药虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc 中所含的一种有效成分, 据报道, Pol 对心脑血管系统具有十分明显的药理作用, 能扩张血管, 抑制血小板聚集, 改善微循环, 保护血管内皮等^[1,2]; 有关研究证明其对脑缺血再灌注大鼠脑组织具有保护作用^[3]。但其体外抗自由基作用尚未见报道, 而自由基反应在心脑血管损伤中起着重要作用。为了对 Pol 进一步开发及应用, 探讨其作用机制, 对其体外抗氧化作用进行了初步研究

1 材料

1.1 药物与试剂: 白藜芦醇苷: 白色晶体, 由陕西师范大学科学院生化室提供 (含量为 96.2%), 以生理盐水配成不同浓度的溶液。1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷 (TEP), 还原型辅酶 I (NADH), 酚嗪二甲基硫酸盐 (PMS), 四氮唑蓝 (NBT) 为 Sigma 产品, 硫代巴比妥酸 (TBA), 三氯乙酸 (TCA) 为国产分析纯。

1.2 动物: SD 雄性大鼠, 200~250 g, 昆明种小鼠, 18~22 g, 雌雄各半, 由陕西省中医药研究院提供

2 方法与结果

收稿日期: 2001-04-03

作者简介: 田京伟 (1976.11-), 男, 山东省青岛市人, 1997 年就读于陕西师范大学生命科学院, 2000 年获理学硕士学位。目前从事于心脑血管方向研究。E-mail: jingwei@luye-pharm.com