

暴露第一颈椎翼状孔,电灼烧凝固双侧翼小孔内的锥动脉,造成永久性闭塞;24 h后乙醚浅麻醉,切开腹侧颈中皮肤,分离双侧颈总动脉,用动脉夹可逆性夹闭双侧颈总动脉 5 min,缺血共 3次,每次间隔 1 h 术后饲养 4周。进行灌注固定并取材切片。GP 200 mg/kg 给药组,ig 给药 1周后,按照大鼠血管性痴呆模型的制备方法进行手术,术后饲养 4周并观察。伪手术对照组:同样进行手术但不灼烧锥动脉,不夹闭颈总动脉,术后饲养 4周。

2.2 取材和切片:取上述各组大鼠,ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉固定后,于 30~40 min内,从左心室快速依次灌注生理盐水 100~150 mL,4% 多聚甲醛 500 mL (4℃)。迅速取脑,置 4℃ 的同样的固定液中固定 7~9 h后,移入 20% 蔗糖溶液中浸泡 12 h 以上,以恒冷箱冰冻切片机切片 (片厚 50 μm),pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS 接片,进行吖啶橙染色^[2],荧光显微镜下观察结果并拍照。

3 结果

在荧光显微镜下(彩图见封 3),对照组大脑皮层及海马 CA₁区及 CA₃区 DNA 和 RNA 呈黄绿色,均匀分布于大脑皮层的细胞层和海马锥体细胞层(图 1-1~3);血管性痴呆模型大脑皮层和海马 CA₁区及 CA₃区的 DNA 和 RNA 荧光反应强度(反映 DNA 和 RNA 含量)明显减低(图 1-4~6);GP (200 mg/kg) 给药组大脑皮层和海马 CA₁区、CA₃区的 DNA 和 RNA 荧光反应强度较血管性痴呆模型组明显增强(图 1-7~9),与对照组反应强度和分布模型基本相同。

4 讨论

已有研究表明,GP 对大鼠全脑缺血再灌注损伤及家兔急性不完全性脑缺血具有保护作用,认为

GP 对缺血脑组织的保护作用不仅与其抑制自由基的产生和脂质过氧化有关,而且与其对缺血脑组织的神经细胞膜及微血管的稳定性的保护作用相关^[3]。此外,尚有报道,GP 对老龄大鼠学习记忆有改善作用^[4],此作用可能与 GP 清除氧自由基有关。

脑缺血再灌注可导致神经元凋亡或坏死,进而引起痴呆、学习记忆能力下降。而 DNA 梯 (DNA laddering) 的形成是神经元凋亡的重要特征之一。缺血可使胞浆内钙离子增多,激活钙 镁依赖的核苷酸内切酶,将 DNA 切割成许多大小不一的寡核苷酸片段。在中枢神经系统中,大脑皮层、海马等部位是缺血易损区,实验结果显示大脑皮层及海马 CA₁区、CA₃区锥体细胞层 DNA 和 RNA 荧光反应强度明显减低,表明该区神经元 DNA 及 RNA 受到缺血性损伤。已有研究表明,随着缺血时间的延长,可能有诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的激活,从而产生大量具有神经毒性作用的 NO,在海马迟发性神经元凋亡以至 VD 的形成中发挥了一定作用^[5]。

DNA 及 RNA 与蛋白质的合成密切相关,此作用的机制及其与 GP 抗衰老、改善学习记忆及对血管性痴呆保护作用的关系,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 许丹芸,游国雄,苗建亭,等.脑缺血及血管性痴呆形成过程中一氧化氮机制的实验研究[J].中华老年医学杂志,1999,18(4):240-243.
- [2] 鄂征.组织培养技术[M].北京:人民卫生出版社,1988.
- [3] 王竹筠,邱培伦.绞股蓝总皂甙对家兔急性不完全性缺血的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,1992,6(3):204-206.
- [4] 高南南,于仁,吕瑞绵.绞股蓝皂甙对老龄大鼠学习记忆的改善作用[J].中国老年学杂志,1995,15(6):359-361.
- [5] Iadecola C, Zhang F, Xu X H. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage [J]. Am J Physiol, 1995, 268: 286-289.

油菜吖啶硫苷降解物对 S₁₈₀小鼠抗肿瘤作用的实验研究

文碧玲¹,李培武²,李航森¹,赵力¹,余萍¹,邹俊清¹,张文¹,刁霞²,杨涓²,汪雪芳²,吴渝^{2*}

(1.湖北中医学院附院,湖北 武汉 430061; 2.中国农业科学院油料作物研究所,湖北 武汉 430062)

摘要:目的 探讨油菜资源中吖啶硫苷降解物对肿瘤的抑制作用及对免疫功能的影响。方法 分别将两种不同提取法制备的高、低浓度的吖啶硫苷对 S₁₈₀小鼠 ig 给药,ip 环磷酰胺。结果 吖啶硫苷降解物 2号高浓度和吖啶硫苷降解物 1号低浓度治疗组与生理盐水对照组相比有明显的抑制作用,能增加淋巴细胞转化率。结论 吖啶硫苷

* 收稿日期:2001-08-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770452)

作者简介:文碧玲(1962-),女,副主任医师,主要从事中医临床和实验研究,现为此项课题组主要成员之一。

降解物可能是通过增强机体免疫功能来抑制移植性肿瘤生长,起到抗肿瘤的作用。

关键词: 吡啶硫苷; S₁₈₀; 抗肿瘤作用

中图分类号: R286. 91 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2002) 04- 0331- 03

Studies on antitumor effect of INDL-GLN in rape on mice transplanted S₁₈₀ cell

WEN Bi-ling¹, LI Pei-wu², LI Hang-sen¹, ZHAO Li¹, YU Ping¹, ZOU Jun-qing¹,
ZHANG Wen¹, DING Xiao-xia², YANG Mei², WANG Xue-fang², WU Yu²

(1. Affiliated Hospital of Hubei College of TCM, Wuhan Hubei 430061, China;

2. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Wuhan Hubei 430062, China)

Abstract **Object** To study the antitumor and immunological effect of INDL-GLN in rape on the cancerous mice transplanted S₁₈₀ cell. **Methods** The treatment group was administrated (ig) INDL-GLN at two doses (high and low dose), control group was administrated (ip) cyclophosphamide. The mechanism of its antitumor action was assessed by lymphocyte conversion test. **Results** Both high (No. 2) and low (No. 1) doses of INDL-GLN exhibited significant antitumor effects as compared with the control group, the lymphocyte conversion rate was increased, respectively. **Conclusion** INDL-GLN has great antitumor activity and immunostimulation, its antitumor mechanism may be due to its immunostimulation.

Key words INDL-GLN; S₁₈₀; antitumor effect

吡啶硫苷是油菜中的一类芳香族硫代葡萄糖苷,国内外学者近几年的研究表明,吡啶硫苷可提高小鼠抗癌能力。本研究以动物实验探讨了两种高、低浓度的吡啶硫苷降解物抗肿瘤作用及对免疫功能的影响。

1 实验材料

1. 1 动物: BALB/C 小鼠 120 只,雌雄皆用,体重 20~ 25 g,由湖北省医学科学院动物中心提供,符合三级实验动物质量标准。

1. 2 药物和试剂: 吡啶硫苷降解物 (INDL-GLN) 由中国农业科学院油料作物研究所从油菜籽中分离制备,分别得到 INDL-GLN 1 号和 2 号,采用高效毛细管电泳仪分离检测^[1]含量分别为 108 和 720 mg/kg 用双蒸水制成 50% 和 25% 的两种高、低浓度,用于动物试验。环磷酰胺 (CTX),上海华联制药有限公司生产,批号 00824; 植物血凝素 (PHA),上海市医学化验所产品,批号 00903。

1. 3 细胞株和动物移植性肿瘤: S₁₈₀由湖北省肿瘤研究所提供,湖北中医学院附院肿瘤研究所传代,实验时,在无茵条件下用生理盐水稀释成癌细胞悬液,浓度为 1×10^7 /mL。

2 方法和结果

2. 1 吡啶硫苷降解物抗肿瘤作用

2. 1. 1 吡啶硫苷降解物对 S₁₈₀小鼠瘤重、胸腺重和抑瘤率的影响: 小鼠右腋窝 sc S₁₈₀癌细胞悬液 0. 2 mL,次日动物随机分组,雌雄兼有,每天分别灌服 1 号 50% INDL-GLN (54 mg/kg), 1 号 25% INDL-GLN (27 mg/kg), 2 号 50% INDL-GLN (360 mg/

kg), 2 号 25% INDL-GLN (180 mg/kg), 设生理盐水空白对照组 25 mL/kg,连续 15 d,设 CTX 阳性对照组 (20 mg/kg, ip, 隔日 1 次),第 16 天处死,称体重,剥瘤和胸腺,称重,计算抑瘤率^[2]。

肿瘤抑制率 (%) = $\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$

结果显示: 治疗组 1 号 50% INDL-GLN 抑制率为 35%, 1 号 25% INDL-GLN 抑制率 59%, 2 号 50% INDL-GLN 抑制率为 71%, 2 号 25% INDL-GLN 抑制率为 43%,见表 1。

表 1 吡啶硫苷降解物对小鼠 S₁₈₀瘤重、胸腺重和抑瘤率的影响

组别	动物数 (只)	剂量 (mg/kg)	瘤重 (g)	胸腺重 (mg)	抑瘤率 (%)
生理盐水对照	10	-	1. 22± 0. 33	0. 026± 0. 019	
CTX 阳性对照	10	20	0. 83± 0. 23	0. 023± 0. 0079	32
1 号 50% INDL-GLN	10	54	0. 76± 0. 39	0. 024± 0. 0049	35
1 号 25% INDL-GLN	10	27	0. 50± 0. 32	0. 031± 0. 012	59*
2 号 50% INDL-GLN	10	360	0. 36± 0. 17	0. 025± 0. 0065	71**
2 号 25% INDL-GLN	10	180	0. 69± 0. 33	0. 033± 0. 017	43*

与 CTX 组比较: * P < 0. 05 ** P < 0. 01

2. 1. 2 吡啶硫苷降解物对肿瘤组织形态的影响: 剥瘤后取组织,用 4% 甲醛溶液固定,常规石蜡切片,肉眼和镜下观察组织病理学形态改变。肉眼观察,2 号 50% INDL-GLN 治疗组的瘤体小,呈乳白色,质地较硬,比较光滑,干燥;生理盐水组,瘤体边界不清,如豆腐渣,与周围组织粘连紧,不易剥离。镜下结果,2 号 50% 和 1 号 25% INDL-GLN 治疗组和对照组比较^[3],肿瘤组织细胞变性坏死,瘤细胞数明显减少,肿瘤组织边缘整齐,可见淋巴细胞浸润。

2.2 吡啶硫苷降解物对小鼠免疫功能的影响: 给小鼠右腋窝 sc S_{180} 癌细胞悬液 0.2 mL , 分组及给药方法同 2.1.1, 连续 6 d, 第 7 天开始给每只小鼠 im PHA 6 mg/kg , 连续 3 d, 第 10 天由小鼠尾静脉取血推片, 瑞氏染色, 显微镜下数 100 个淋巴细胞, 淋巴细胞及过渡态细胞数, 计算淋巴细胞转化率^[4]。结果表明, 2 号 50% INDL-GLN 和 1 号 25% INDL-GLN 治疗组与生理盐水组相比, 有极显著性差异 ($P < 0.01$), 而 CTX 组与生理盐水组比较, 无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2

表 2 吡啶硫苷降解物对 S_{180} 小鼠的淋巴细胞转化率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (mg/kg)	淋巴细胞转化率 (%)
1 号 25% INDL-GLN	10	27	$37.00 \pm 4.80^*$
1 号 50% INDL-GLN	10	54	32.40 ± 5.10
2 号 25% INDL-GLN	10	180	30.10 ± 3.70
2 号 50% INDL-GLN	10	360	$40.50 \pm 6.20^*$
CTX	10	20	9.80 ± 2.60
生理盐水	10	-	29.00 ± 5.30

与生理盐水组比较: $** P < 0.01$

3 讨论

油菜是白花菜目十字花科中我国种植面积最大的油料作物, 吡啶类硫苷是油菜籽硫苷中的重要组成部分。自 1974 年加拿大育出第一双低油菜品种, 世界各国油菜育种家致力于降低油菜籽中硫苷含量

研究, 并选育出适于不同生态种植的双低油菜品种。研究发现这些双低油菜品种降低的硫苷含量主要是脂肪族硫苷, 而吡啶类硫苷含量保持相对稳定。本研究采用从双低油菜籽中提取的吡啶类硫苷进行试验, 结果 2 号 50% 吡啶硫苷降解物治疗组抑瘤率 71%, 1 号 25% 吡啶硫苷降解物治疗组抑瘤率 59%, 从组织形态学上观察, 吡啶硫苷治疗组与生理盐水空白组相比, 有明显的抑瘤作用, 同时能提高淋巴细胞转化率, 说明吡啶硫苷降解物能抑制移植性肿瘤的生长, 具有抗肿瘤的作用^[5], 其机制可能是通过增强机体免疫力来实现的, 而两种不同提取法制备的高、低浓度的吡啶硫苷其抗肿瘤作用不同, 可能与吡啶硫苷纯度所含杂质成分有关, 有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Peiwu I, Soren M, Peter M, *et al.* Micellar electrokinetic Capillary chromatography as a fast, cheap, and efficient HPLC Method for separation and quantification of intact and desulfo glucosinolates [J]. *Geirc Bulletin*, 1994, 10: 64-69.
- [2] 李和根, 陈秀华, 姚玉龙, 等. 金复康治疗肝癌的实验研究 [J]. *中草药*, 2000, 13(7): 533-535.
- [3] 韩 锐. 肿瘤化学预防及药物治疗 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992.
- [4] 朱忠勇. 实用医学检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1992.
- [5] Yannai S, Bradlow H L. *International Euro Food Tox III*. [M]. Olsztyn Poland, 1994.

四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用研究

孙慧兰, 吴伟康*

(中山大学中西医结合研究所, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 考察四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用。方法 采用正交试验法, 以超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 以及乳酸为指标, 考察附子生物碱 (A)、干姜挥发油 (B)、甘草酸粗品 (C) 3 个因素。结果 3 种有效成分最佳剂量为 $A_4B_4C_4$, 3 因素对 SOD 和 MDA 影响大小顺序为 $A > C > B$, 对乳酸影响大小顺序为 $A > B > C$ 。结论 3 种有效成分临床极量组合的疗效最佳。附子生物碱是四逆汤有效成分组合中的关键因素, 干姜挥发油和甘草酸粗品也是组方中不可或缺的因素。

关键词: 四逆汤; 有效成分; 心肌缺血再灌注; 正交设计

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)04-0333-04

* 收稿日期: 2000-10-11

基金项目: 中山大学“211工程”重点建设项目 (98176); 广东省中医药管理局科研基金项目 (100118)

作者简介: 孙慧兰 (1972-), 女, 山西太原人, 1995 年本科毕业于山西中医学院临床专业, 1997 年硕士毕业于湖南中医药研究院中医内科学专业, 1997~1999 年在山西中医药研究院中心实验室从事中药新药的开发工作, 现为中山大学中西医结合研究所在读博士生, 导师吴伟康教授, 主要从事中西医结合心血管病理生理学研究, Tel 020-87331624 E-mail hjjlosh@263.com