

素在 $1\mu\text{mol/L}$ 浓度时,阻止肿瘤细胞的增生,而不抑制正常细胞的生长和克隆率。以往的研究显示,大剂量蜂毒素在体外对多种肿瘤细胞有极强的杀伤作用,而小剂量蜂毒素具有明显诱导细胞凋亡的作用^[4,5]。本实验是在对蜂毒素的分离、提取、纯化及其抗肿瘤作用研究的基础上,观察蜂毒素对肝癌细胞系 SMMC7721 细胞体外生长、增殖的影响,结果显示 $4, 16\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素对肝癌细胞的生长有明显的抑制作用,并且 $4\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素处理组经台盼蓝染色发现细胞坏死率不足 1%,说明此浓度的蜂毒素对 SMMC7721 生长的抑制不是通过细胞毒作用,有可能是通过细胞凋亡途径。进一步研究表明蜂毒素可以显著降低 PCNA 的表达,并与浓度呈负相关。PCNA 对细胞周期有重要的调控作用,其合成和表达与细胞的增殖状态密切相关,蜂毒素对 SMMC7721 肝癌细胞生长的抑制有可能与 PCNA 的表达降低有关。

肿瘤的特征之一是细胞周期异常,使肿瘤细胞无限地增殖。细胞周期各时相的生化变化是一个连续的过程,细胞周期的任何一个时相的生物合成被阻断,都可使整个细胞周期中断,肿瘤治疗的中心环节就是干扰肿瘤细胞的细胞周期,从而影响细胞的生长、增殖或诱导细胞凋亡的产生。本实验通过流式细胞仪观察了蜂毒素处理后细胞周期变化,发现 $4, 16\mu\text{g/mL}$ 蜂毒素可影响 SMMC7721 细胞的细胞

周期正常移行,阻止 S 期细胞进入 G_2/M 期,造成 S 期细胞的聚集, G_2/M 期细胞的减少。

蜂毒来源丰富,作用广泛,生物活性强,是医药和生物工程方面的重要原料,其主要成分蜂毒肽对淋巴瘤、肉瘤有细胞毒作用,可通过阻抑氧化磷酸化对一些肿瘤产生抑制作用^[6]。但蜂毒在肿瘤临床应用方面尚受到一些毒副作用的限制,随着蜂毒素提纯技术的进步及对其结构、剂型改造工作的深入,蜂毒素在抗肿瘤的临床治疗方面的价值将会越来越大。

References

- [1] Saini S S, Chopra A K, Peterson J W. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells [J]. *Toxicol*, 1999, 37(11): 1605-1619.
- [2] Reiter Y, Giobotariu A, Jones J, *et al.* Fishelson-Z complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis [J]. *J Immunol*, 1995, 155(4): 2203-2210.
- [3] Zhu H G, Tayeh I, Israel L, Castagna M. different susceptibility of lung cell lines to inhibitors of tumor promotion and inducers of differentiation [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1991, 5(2): 52-58.
- [4] Ling C Q, Huang X Q, Liu L. The antitumor effect of melittin *in vitro* [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 612-614.
- [5] Huang X Q, Ling C Q, Chen Z, *et al.* Apoptosis of human acute T lymphocyte leukemia cell line 6T-CEM induced by melittin [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2001, 20(5): 39-41.
- [6] Wei Y, Yang S, Jiang M H. The present state of venom in pharmacological study, clinical application and exploitation [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20(11): 682-683.

泽泻不同溶剂提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响

曹正国¹,刘继红¹,吴继洲²,鲁德曼¹,尹春萍²,叶章群^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 泌尿外科,湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究泽泻不同溶剂提取物对大鼠尿草酸钙结石形成的影响,并确定其抑制尿草酸钙结石形成的有效部位。方法 通过 ig 不同剂量的泽泻不同溶剂提取物对乙二醇和氯化铵诱导的大鼠肾草酸钙结石模型进行试验研究。结果 泽泻乙酸乙酯浸膏高剂量组大鼠的血清 Cr、BUN、肾 Ca^{2+} 含量,24 h 尿 Ca^{2+} 分泌量,肾组织的草酸钙晶体沉积均明显低于成石组 ($P < 0.05$)。结论 泽泻乙酸乙酯浸膏能抑制实验性高草酸尿症大鼠尿草酸钙晶体的形成,是泽泻抑制尿草酸钙结石形成的有效部位。

关键词: 泽泻;尿石;草酸钙

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0045-04

* 收稿日期: 2002-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970891)

作者简介: 曹正国 (1975-),男,湖北黄石人,博士研究生,现参与两项国家自然科学基金课题 (39970891 和 39970710) 的研究,主要从事泌尿外科尿石症和膀胱肿瘤的研究。Tel (027) 83663407 E-mail zgcao2002@ hotmail.com

Effect of different extracts of *Alisma orientalis* on urinary calcium oxalate stone formation in rats

CAO Zheng-guo¹, LIU Ji-hong¹, WU Ji-zhou², Radman A. M¹, YIN Chun-ping², YE Zhang-qun¹

(1. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University

of Science and Technology, Hubei 430030, China; 2. School of Pharmacy, Tongji Medical

College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430030, China)

Abstract **Object** To study the effect of different extracts of *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. on urinary calcium oxalate stone formation in rats and to identify the effective constituents. **Methods** Different extracts were administered through a stomach tube to rats of different groups with renal calcium oxalate stone induced by ethylene glycol (EG) and ammonium chloride (AC). **Results** In the rats administered with high dose of EtOAc extract, blood Cr, BUN, renal tissue calcium content, urinary calcium excretion and crystals deposition in renal tissue were significantly lower than that of the stone formation group. **Conclusion** The EtOAc extract of *A. orientalis* can inhibit urinary calcium oxalate stone formation in rats and seems to be the effective constituent of *A. orientalis*.

Key words *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; urinary calculi; calcium oxalate

泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 是中医用于治疗泌尿结石的常用传统中药,为了阐明泽泻治疗尿石症的物质基础及其作用机制,并提取和分离出一种或数种具有抑制尿草酸钙结石形成的活性成分,本研究将泽泻抑制尿草酸钙结石的 50% 甲醇有效性部位进一步分离,得到几种泽泻不同溶剂的提取物来探讨其对尿草酸钙结石形成的影响。

1 材料与方法

1.1 泽泻不同溶剂提取物的提取和分离: 泽泻饮片(产于福建,由华中科技大学同济医学院药学院吴继洲教授鉴定) 10 kg,用 50% 甲醇回流提取,回收甲醇至浸膏状,加适量水溶解后,分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取得泽泻乙酸乙酯部位浸膏 169 g、正丁醇部位浸膏 83 g、水浸膏 1 450 g。分别称取 3.5 g 正丁醇浸膏、7.4 g 乙酸乙酯浸膏、66 g 水浸膏与 25.0 mL 无水乙醇和 25.0 mL Tween-80 混匀后,用蒸馏水定容至 500 mL (每 1 mL 含有 1.0 g 泽泻生药材)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药方法: Wistar 雄性健康大鼠 64 只,体重 180~220 g,随机分为 8 组,每组 8 只。A 组 (空白对照组); B 组 (草酸钙结石成石模型组): 1% 乙二醇 (EG) + 2% 氯化铵 (AC) 水溶液每天 ig 2 mL/只; C₁ 组 (泽泻正丁醇浸膏高剂量组): 在给予与 B 组相同诱石剂的同时,每天 ig 泽泻正丁醇浸膏 1.0 g/只,以下各实验组以此类推,高、低剂量组均分别 ig 各浸膏 1.0 和 0.5 g/只; C₂ 组 (正丁醇浸膏低剂量组); D₁ 组 (乙酸乙酯浸膏高剂量组); D₂ 组 (乙酸乙酯浸膏低剂量组); E₁ 组 (水浸膏高剂量组); E₂ 组 (水浸膏低剂量组)。各组大鼠

均饲养 5 周。

1.2.2 观察指标及检测方法: 实验结束前 1 d 称重比较实验前后大鼠体重的变化,并用代谢笼收集并测 24 h 尿量、尿 pH 值、24 h 尿草酸 (Ox) 的分泌量 (过氧化氢—盐酸苯肼法)。断颈处死大鼠,下腔静脉穿刺取血,离心 (3 500 r/min) 10 min 后,取上层血清测血尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、P、Ca²⁺ 含量 (Olympus Au1000 自动分析仪)。切取双肾,纵向剖开,取左侧肾脏用 10% 中性福尔马林固定,作常规 HE 石蜡切片和 Von-Kossa 染色,偏光显微镜观察肾组织草酸钙结晶形态分布及肾组织的病理改变,日立 180-80 型原子吸收光谱仪进行右肾组织 Ca²⁺、Mg²⁺ 含量,尿总 Ca²⁺、Mg²⁺ 含量测定。

1.3 统计学分析: 所有检验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用 *t* 检验进行显著性检验。

2 结果

2.1 一般情况: 泽泻各浸膏组大鼠的尿量明显多于 A 和 B 组,有显著性差异 ($P < 0.05$), 3 种不同的泽泻脂溶性提取物对尿 pH 值无明显影响 (pH 值在 6.45 左右)。B 组大鼠的食量、体重增量均少于其他组,但无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 血生化检查: 见表 1。A 组血清 BUN、Cr 含量明显低于其他组,有显著性差异;与其他浸膏组相比, D₁、D₂ 组血清 BUN 含量和 D₂ 组的血清 Cr 含量均明显低于 B 组,有显著性差异;血清 Ca²⁺、P 含量各组间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 24 h 尿 Ox、Ca²⁺、Mg²⁺ 分泌量和肾组织 Ca²⁺、Mg²⁺ 含量: 见表 2。A 组 24 h 尿 Ox、Ca²⁺ 分泌量、肾 Ca²⁺ 含量明显低于其他各组,有显著性差

表 1 8组大鼠血清生化检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Results of serum biochemistry values in eight groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组 别	BUN/(mmol° L ⁻¹)	Cr/(μmol° L ⁻¹)	Ca/(mmol° L ⁻¹)	P/(mmol° L ⁻¹)
A	5.42±0.60 ^{△△△}	61.82±7.20 ^{△△△}	2.27±0.04	2.92±0.22
B	10.99±0.85 ^{**}	105.02±9.34 ^{**}	2.35±0.06	2.86±0.56
C _H	10.75±1.12 ^{**}	105.38±18.82 ^{**}	2.34±0.07	2.68±0.26
C _L	10.39±1.63 ^{**}	109.20±26.30 ^{**}	2.35±0.06	2.32±0.32
D _H	9.04±1.65 ^{**△}	85.60±17.57 ^{*△}	2.24±0.56	2.35±0.10
D _L	9.49±1.84 ^{**△}	102.5±20.90 ^{**}	2.34±0.08	2.69±0.60
E _H	9.9±1.66 ^{**}	116.4±18.53 ^{**}	2.3±0.06	2.99±0.79
E _L	10.12±1.67 ^{**}	103.25±17.19 ^{**}	2.36±0.08	2.57±0.87

与 A 组相比: ** P<0.01 *** P<0.001; 与 B 组相比: △ P<0.05 △△△ P<0.001

** P<0.01 *** P<0.001 vs A group △ P<0.05 △△△ P<0.001 vs B group

表 2 8组大鼠 24 h 尿 O_x, Ca²⁺, Mg²⁺ 分泌量和肾组织 Ca²⁺, Mg²⁺ 含量的结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Results of 24 h urinary O_x, Ca²⁺ and Mg²⁺ excretions and renal tissue

Ca²⁺ and Mg²⁺ content in eight groups of rat ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组 别	尿 O _x	尿 Ca ²⁺	尿 Mg ²⁺	肾 Ca ²⁺	肾 Mg ²⁺
	/(μmol° 24 h ⁻¹)	/(μmol° 24 h ⁻¹)	/(mmol° 24 h ⁻¹)	/(mg° g ⁻¹)	/(μmol° g ⁻¹)
A	22.57±3.36 ^{△△△}	17.30±4.53 ^{△△△}	0.13±0.03	1.52±0.18 ^{△△△}	7.79±2.08
B	83.09±8.17 ^{**}	62.36±16.44 ^{**}	0.13±0.02	11.32±0.91 ^{**}	7.98±0.97
C _H	84.38±14.46 ^{**}	54.22±12.35 ^{**}	0.13±0.05	11.45±2.38 ^{**}	8.29±1.11
C _L	80.89±13.94 ^{**}	59.29±19.59 ^{**}	0.14±0.04	11.33±2.44 ^{**}	8.6±0.32
D _H	84.58±14.35 ^{**}	34.03±12.53 ^{**△△△}	0.13±0.01	8.79±1.21 ^{**△△}	7.65±2.26
D _L	89.96±23.00 ^{**}	46.13±11.57 ^{**△}	0.13±0.03	10.62±3.35 ^{**}	7.82±1.68
E _H	83.14±19.85 ^{**}	62.92±13.37 ^{**}	0.13±0.02	11.24±2.72 ^{**}	7.90±1.62
E _L	81.40±17.10 ^{**}	60.23±20.28 ^{**}	0.13±0.06	10.35±2.81 ^{**}	7.90±1.57

与 A 组相比: *** P<0.001; 与 B 组相比: △ P<0.05 △△ P<0.01 △△△ P<0.001

*** P<0.001 vs A group △ P<0.05 △△ P<0.01 △△△ P<0.001 vs B group

异;与其他浸膏组相比, D_H, D_L组 24 h 尿 Ca²⁺ 分泌量和 D_L组的肾 Ca²⁺ 含量均明显低于 B 组,有显著性差异; 24 h 尿 O_x 分泌量除 A 组外,各组间差异均无显著性意义; 24 h 尿 Mg²⁺ 分泌量、肾 Mg²⁺ 含量,各组间均无显著性差异。

2.4 肾组织病理学检查及偏光显微镜检查: 除 A 组外,各组肾脏大体观察,外形、颜色无差别,但 B 组肾脏明显肿大,切面苍白色,用手触摸有明显之细砂摩擦感,皮质和髓质分界不清楚,而其他组则不明显。常规病理切片 HE 染色之后,草酸钙晶体在镜下显示为淡蓝色晶体,不规则、折光性较强; Von-Kossa 染色后,草酸晶体呈黑褐色。A 组肾组织无结晶形成; B 组肾组织有少数结晶形成,结晶主要存在于肾乳头和肾皮质内,部分结晶成堆而且互相连接成片,其中 3 只大鼠肾盂内有小结石形成,高倍镜下晶体主要存在于近曲小管和远曲小管,上皮细胞明显肿胀、变性、坏死,管腔明显扩张,管腔内可见嗜伊红染色样坏死物质及部分脱落上皮细胞,周围有晶体聚集,肾间质有明显的慢性炎性细胞浸润; D_H, D_L组结晶明显少于 B 组,仅有少数结晶分布在肾皮质和髓质,个别大鼠结晶出现在肾乳头,肾盂内

无结石,结晶大多数不成堆,管腔内仅见散在草酸钙结晶,管腔扩大明显比 B 组轻,腔内也无明显的坏死脱落样物质; C 和 C_L, E_H, E_L组情况与 B 组类似,但较轻

3 讨论

尿石症是一种常见疾病,草酸钙结石占尿石症的 80% 左右。中医药治疗尿石症有悠久的历史和良好的效果,然而,有关中药对尿草酸钙结石作用的基础实验研究报道较少,特别是对其中的单味中药的研究更少。泽泻具有利水渗湿功效,可与多种中药配伍组成治疗尿路结石的传统方剂,泽泻主要含挥发油、树脂、蛋白质、淀粉、糖类、脂肪酸等,并已分离出 5 种萜类化合物: 泽泻醇 A 泽泻醇 B 乙酸泽泻醇 A 酯、乙酸泽泻醇 B 酯和表泽泻醇 A 泽泻醇类为其主要活性成分,都具有利尿和治疗脂肪肝的作用^[1]。药理研究还表明其中的酸性多糖和泽泻醇类具有增强网状内皮系统及抗补体活性和抗 III 型变态反应的作用^[2]。

Ustunomiya 等^[3]发现泽泻水提液能明显抑制草酸钙结晶的生长和聚集。Yamaguchi 等^[4]和尹春萍等^[5]发现泽泻水提液能明显抑制大鼠尿草酸钙结

石形成,同时泽泻水提液组对草酸及钙的代谢没有影响,其抑制结石的形成,可能是通过抑制草酸钙结晶的生长和聚集,减少肾小管内草酸钙晶体的形成和沉积从而抑制实验性大鼠尿草酸钙结石的形成。本实验采用 1% 乙二醇和 2% 氯化铵水溶液 ig 诱导大鼠肾草酸钙结石形成。实验表明 B 组大鼠的血清 BUNM, Cr 含量, 24 h 尿 Ox , Ca^{2+} 分泌量和肾 Ca^{2+} 含量显著高于 A 组,这与肾组织病理切片观察到的结果是一致的。而泽泻的乙酸乙酯浸膏高、低剂量组体内均能明显降低实验性草酸钙结石大鼠 24 h 尿 Ca^{2+} 分泌量和减轻肾小管损伤的程度,而且泽泻的乙酸乙酯浸膏高剂量组也显著降低大鼠肾组织 Ca^{2+} 的含量,因此能抑制体内尿草酸钙结石的形成。但泽泻正丁醇浸膏和水浸膏对体内草酸钙结石的形成影响较小。同时本研究显示,泽泻的各实验组体内均不能降低尿 Ox 的排泄,这与以往的研究结果是一致的,进一步证实泽泻的乙酸乙酯浸膏主要是通过阻止草酸钙结晶生长和聚集作用而抑制结石形成,是泽泻抑制尿草酸钙结石形成的有效活性部位。

川村等^[6]对泽泻具有体外抑制草酸钙结晶生长和聚集的有效成分进行了研究,发现主要是相对分子质量 $> 10^4$ 的物质,并不含葡胺聚糖类物质。

Honda 等^[7]发现,泽泻煮沸提取的成分中相对分子质量小于 10^5 及 $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 的成分有抑制草酸钙结晶生长的作用,因此,有必要对泽泻抑制草酸钙结晶生长和聚集的有效活性成分作进一步的研究。

References

- [1] China Pharmaceutical University, China Medicinal Science and Technology Publishing House. *Collection Words of Chinese Materia Medica* (中药辞海) [M]. Beijing: China Medicinal Science and Technology Publishing House, 1996.
- [2] Tomoda M, Gonda R, Shimizu N, *et al.* Characterization of an acidic polysaccharide having immunological activities from the tuber of *Alisma orientalis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17 (5): 572-576.
- [3] Utsunomiya M, Koide T, Yamaguchi S, *et al.* The effect of kanpou medicine on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro* [J]. *Hinyokika Kyo*, 1991, 37 (10): 1097-1101.
- [4] Yamaguchi S, Jihong L, Utsunomiya M, *et al.* The effect of takusha and kagosou on calcium oxalate renal stones in rats [J]. *Hinyokika Kyo*, 1995, 41 (6): 427-431.
- [5] Yin C P, Liu J H, Zhang Y S, *et al.* Effects of *Alisma orientalis* Juzep. on calcium oxalate crystallization *in vitro* and calcium oxalate renal stone in rat [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1997, 26 (2): 99-101.
- [6] Kawamura K, Moriyama M, Nakajima C, *et al.* The inhibitory effects of Takusha on the formation, growth and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro* [J]. *Acta Urol Jpn*, 1993, 39: 695-700.
- [7] Honda M, Yoshimura K, Miyake O, *et al.* Inhibitory of oral administration of Takusha on calcium oxalate crystallization in human whole urine [J]. *Hinyokika Kyo*, 1997, 43 (5): 333-337.

苦参碱诱导 K562 细胞酪氨酸激酶与磷酸酶的活性改变

刘北忠¹, 蒋纪恺¹, 何於娟¹, 张彦¹, 刘小珊^{2*}

(1. 重庆医科大学 临床生化教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学临床学院 血液科, 重庆 400016)

摘要: 目的 研究苦参碱诱导 K562 细胞分化的信号转导机制。方法 运用链亲和素-生物素放大系统结合的酶联免疫法, 动态检测苦参碱作用于 K562 细胞后, K562 细胞膜相与胞浆内的酪氨酸激酶与磷酸酶的变化。结果 结合特异性激酶抑制剂的使用, 首次证实了在苦参碱对 K562 细胞的诱导分化过程中, 有广泛性的蛋白酪氨酸激酶活性的短暂下降, 同时伴有蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化。结论 在苦参碱诱导 K562 细胞分化的信号转导过程中, 涉及到蛋白酪氨酸激酶的活性改变, 膜相中蛋白酪氨酸激酶的活性改变先于胞浆内的改变, 提示有一个信号的跨膜转运过程。同时伴有蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化, 反映了胞内的蛋白酪氨酸残基磷酸化与去磷酸化的即时调节机制。

关键词: 苦参碱; K562 细胞; 细胞分化; 信号转导; 酪氨酸激酶; 酪氨酸磷酸酶

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0048-04

Change of tyrosine kinase and phosphatase activity in K562 cells induced by matrine

LIU Bei-zhong¹, JIANG Ji-kai¹, HE Yu-juan¹, ZHANG Yan¹, LIU Xiao-shan²

* 收稿日期: 2002-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670881, 30171150)

作者简介: 刘北忠 (1970-), 男, 重庆人, 博士, 重庆医科大学临床生化教研室副主任, 主要从事中药抗肿瘤的分子机制研究。

Tel (023) 68894666 E-mail: lbz2753@hotmail.com