

传递过程。

为探讨蛋白酪氨酸激酶活性的胞内调节,我们检测了不同浓度的苦参碱作用于 K562 细胞后,总的蛋白酪氨酸磷酸酶的活性变化。实验结果(图 3)表明,在 0.001~1.0 mg/mL 浓度内,苦参碱对蛋白酪氨酸磷酸酶活性的影响没有显著性差异。同时,蛋白酪氨酸磷酸酶的活性有一个显著的先降后升,然后逐渐恢复的过程,正好紧随蛋白酪氨酸激酶活性的变化时相,提示为一个反应性的调节性增高。进一步用蛋白酪氨酸激酶活性抑制剂预处理 K562 细胞后,蛋白酪氨酸磷酸酶的活性不受苦参碱的影响;而经蛋白酪氨酸磷酸酶活性的抑制剂预处理后,蛋白酪氨酸激酶的活性仍受到苦参碱的抑制。表明苦参碱作用 K562 细胞后,可引起广泛性的蛋白酪氨酸激酶的活性变化,同时伴随有蛋白酪氨酸磷酸酶活性的相应改变。

在苦参碱诱导 K562 细胞的增殖抑制与红系分化过程中,除上述改变外,尚有 G 蛋白偶联受体信号通路、磷脂酶 A₂及钙信号等的变化(有关内容将另文发表);许相儒等的研究还发现 K562 细胞膜上

有与苦参碱特异性结合的蛋白^[6];与诱导分化有关的立早基因也正在积极研究之中。随着对苦参碱等诱导分化剂抗肿瘤机制的研究深入,无创伤性的生物学疗法将逐渐走入临床,造福人类。

References:

- [1] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, *et al.* Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by matrine [J]. *Nat Med*, 1998, 52(4): 295-299.
- [2] Rivero J A, Adunyah S H. Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP Kinase (ERK-1) in human K562 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224: 796-801.
- [3] Kang C D, Lee B K, Kim K M, *et al.* Signaling mechanism of PM A-induced differentiation of K562 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 221: 95-100.
- [4] Gordon J A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 201: 477-482.
- [5] Liu B Z, Jiang J K. Signal transduction mechanism of induced proliferation and differentiation of K562 cells [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1999, 20(5): 278-280.
- [6] Xu X R, Jiang J K, Zhang Y, *et al.* Study on the characteristic of matrine binding to human erythroleukemia K562 cell line [A]. *The Symposium of the 5th Southwest Three Provinces and One City Biochemistry Science Conference* (第五届西南三省一市生化学术会议论文集) [C], 1997.

聪圣胶囊对小鼠脑缺血再灌注损伤后自由基变化的影响

赵 玲¹, 徐秋萍², 李 林^{1*}

(1. 首都医科大学宣武医院 药理研究室、北京脑老化重点实验室, 北京 100053; 2. 北京中医药大学 药理教研室, 北京 100029)

摘 要:目的 研究聪圣胶囊对小鼠脑缺血再灌后脑组织自由基变化的影响, 分析聪圣胶囊抗脑缺血损伤的作用机制。方法 采用早老龄小鼠双侧颈总动脉反复缺血再灌合并尾部放血降压模型, 应用分光光度法观察小鼠脑组织自由基的变化及聪圣胶囊对其影响。结果 聪圣胶囊可拮抗脑缺血再灌注引起的 SOD 活力的下降及 MDA 含量的升高, 明显降低脑缺血再灌注引起的 NO 水平及 NOS 活性的升高。结论 聪圣胶囊可通过减轻脑缺血损伤后自由基产生, 降低升高的 NOS 活性来发挥抗脑缺血作用。

关键词: 聪圣胶囊; 脑缺血; 自由基; 一氧化氮

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)01-0051-04

Effect of Congsheng Capsule on free radical change after cerebral ischemia-reperfusion in mice

ZHAO Ling¹, XU Qiu-ping², LI Lin¹

(1. Department of Pharmacology, Beijing Key Laboratory for Brain Aging, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Department of Pharmacology, Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

Abstract: Object To investigate the effects of Congsheng Capsule (CSC) on free radical change after cerebral ischemia-reperfusion, and analyze the mechanisms of CSC anti cerebral ischemia action.

* 收稿日期: 2002-04-27

基金项目: “九五”国家攻关课题 (96-906-09-03)

作者简介: 赵 玲(1972—), 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 博士。1996年毕业于辽宁中医学院中医系, 获医学学士学位; 同年考入北京中医药大学, 攻读硕士学位, 导师为徐秋萍教授。在读期间获准硕博连读, 2001年获医学博士学位。研究方向为脑缺血的发病机制和脑缺血与 AD 的相关因素分析及中药的影响。

Methods Bilateral carotid artery occlusion and reperfusion combined with tail bleeding hypotension were employed in this study. Changes in free radicals were observed by means of spectro photometry. **Results** CSC 1, 3, 9 g/kg could enhance SOD activity, reduce the MDA content, and decrease NOS activity and NO content. **Conclusion** The protective effects of CSC on cerebral ischemia may be mediated by its anti-free radical and NO damage.

Key words: Congsheng Capsule; cerebral ischemia; free radical; NO

聪圣胶囊来源于王永炎院士的临床经验方, 功能为益肾养肝、活血化浊、健脑增智, 临床主治脑血管病后出现的老年期血管性痴呆。本研究前期工作表明, 本方具有缩小大鼠大脑中动脉阻断后脑梗死面积, 改善神经功能缺失症状, 减轻脑水肿; 改善早老龄小鼠脑缺血再灌注致血管性痴呆模型的学习记忆障碍程度, 提高脑血流量等作用。本研究拟进一步探讨聪圣胶囊的脑保护作用与脑缺血后自由基变化的关系。

1 材料与方法

1.1 动物: 昆明种小鼠, 12 月龄, (50±5) g, 雌雄兼用, 由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供, 合格证号为 医动字>第 01—3001 号。

1.2 药物: 聪圣胶囊实验用浸膏系按处方 (制首乌、荷叶、漏芦、肉苁蓉、地龙) 制成, 由吉林省辽源市亚东药业股份有限公司提供, 批号为: 970606, 含量为 400 g 生药/100 mL 浸膏。用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 配制成所需浓度。阳性对照药喜得镇片, 由瑞士山德士药厂与天津华津制药厂合作生产, 批号 971166。丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS)、蛋白定量 (双缩脲法) 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供; 其他药品与试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器: 400R 低温离心机, 德国 Heraeus 产品; HZQ-C 空气浴振荡器, 哈尔滨市东明医疗仪器厂生产; 722 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂生产。

1.4 方法: 取 12 月龄小鼠, 随机分为 6 组: 正常对照组; 模型组; 模型+ 聪圣胶囊 1, 3, 9 g/kg 组; 模

型+ 喜得镇 0.6 mg/kg 组。于术前 ig 给药 5 次, 末次给药后 1 h 以乌拉坦麻醉, 按照文献稍加改进^[1,2], 行双侧颈总动脉反复缺血再灌 (缺血 15 min—再灌 10 min—缺血 15 min) 合并尾部放血降压术, 术中小鼠体温保持在 36.5℃。模型组分别于术后 1, 4, 7 d 断头取脑; 其他组分别于术后连续 ig 4, 7 d, 末次给药后 1.5 h 断头取脑。制备 10% 的组织匀浆液。按 SOD, MDA, NO, NOS 试剂盒说明书进行测定, 按双缩脲法测定蛋白浓度。

1.5 统计: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 早老龄小鼠脑缺血再灌后脑组织 SOD, MDA 的变化及聪圣胶囊对其影响: 见表 1, 2。结果表明, 早老龄小鼠脑缺血再灌后 1, 4 d, 脑组织 SOD 活力明显下降, MDA 含量明显升高, 7 d 时则恢复正常水平, 聪圣胶囊各剂量 (1, 3 和 9 g/kg) 均可明显降低小鼠脑内 MDA 水平, 升高 SOD 活性。

表 1 脑缺血再灌注小鼠脑组织 SOD 活力、MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of SOD activity and MDA contents in brain of imitated VD mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	SOD/(<i>n</i> U · <i>mg</i> ⁻¹)	MDA/(<i>nmol</i> · <i>mg</i> ⁻¹)
正常	9	72.86±5.14	5.27±0.65
1 d 模型	8	66.19±4.57*	6.83±0.89*
4 d 模型	8	65.85±5.74*	6.22±0.83*
7 d 模型	9	67.95±8.32	5.66±1.28

与正常组相比: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

* *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 *vs* normal group

表 2 聪圣胶囊对脑缺血再灌注小鼠脑组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of CSC on SOD activity and MDA contents in brain of imitated VD mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/(<i>g</i> · <i>kg</i> ⁻¹)	<i>n</i>	SOD/(<i>n</i> U · <i>mg</i> ⁻¹)		MDA/(<i>nmol</i> · <i>mg</i> ⁻¹)	
			4 d	7 d	4 d	7 d
正常	—	9	72.86±5.14	72.86±5.14	5.27±0.65*	5.27±0.65
模型	—	8	65.85±5.75	67.95±8.32	6.22±0.83	5.66±1.28
喜得镇	6×10 ⁻⁴	9	71.45±3.74*	73.68±3.59	5.26±0.49*	4.46±1.19
聪圣胶囊	1	10	71.24±5.42*	73.74±11.01	5.05±1.30*	6.00±1.27
	3	10	74.33±3.67*	74.34±6.60	5.25±1.23	5.79±1.14
	9	8	72.01±4.66*	77.44±4.94*	4.89±0.73**	4.44±1.07*

与模型组相比: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

* *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 *vs* model group

2.2 早老龄小鼠脑缺血再灌后脑组织 NO, NOS 的变化及聪圣胶囊对其影响: 见表 3, 4。结果表明, 早老龄小鼠脑缺血再灌后 1, 4, 7 d, 脑组织 NOS 活力持续升高, NO 含量持续增加, 对脑组织产生有害作用。聪圣胶囊各剂量 (1, 3 和 9 g/kg) 均可明显降低小鼠脑内 NO 水平和 NOS 活性。

表 3 脑缺血再灌注小鼠脑组织 NOS 活力、NO 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Changes of NOS activity and NO contents in brain of imitated VD mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	NOS/(U · mg ⁻¹)	NO/(μmol · mg ⁻¹)
正常	9	220.30 ± 43.66	0.58 ± 0.16
1 d 模型	8	262.60 ± 151.54	0.96 ± 0.57
4 d 模型	8	336.68 ± 128.68	0.83 ± 0.28
7 d 模型	9	339.95 ± 111.51*	1.16 ± 0.51*

与正常组相比: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs normal group

表 4 聪圣胶囊对脑缺血再灌注小鼠脑组织 NOS 活力和 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Effects of CSC on NOS activity and NO contents in brain of imitated VD mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/(g · kg ⁻¹)	n	NOS/(U · mg ⁻¹)		NO/(μmol · mg ⁻¹)	
			4 d	7 d	4 d	7 d
正常	—	9	220.30 ± 43.66	220.30 ± 43.66*	0.58 ± 0.16	0.58 ± 0.16*
模型	—	8	336.68 ± 128.68	339.95 ± 111.51	0.83 ± 0.28	1.16 ± 0.51
喜得镇	6 × 10 ⁻⁴	9	244.59 ± 40.39	232.22 ± 40.55*	0.63 ± 0.27	0.60 ± 0.26*
聪圣胶囊	1	10	246.59 ± 65.58	266.60 ± 73.48	0.78 ± 0.37*	0.82 ± 0.38
	3	10	220.36 ± 61.92	245.90 ± 72.87*	0.72 ± 0.34*	0.72 ± 0.27*
	9	8	207.55 ± 33.46*	241.40 ± 29.14*	0.55 ± 0.19*	0.65 ± 0.35*

与模型组相比: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group

注引起的升高的 MDA 含量, 说明聪圣胶囊可通过抗自由基引起的脂质过氧化反应来减轻脑缺血再灌注损伤。

近期研究表明, NO 途径中可能产生一种非常重要的氧自由基——硝基过氧化物, 从而严重损伤神经元。因此, NO 在脑缺血损伤中有十分重要的意义。NO 在脑缺血几分钟内就可迅速增加, 大约在 1 h 内恢复正常, 再灌注时又增加。对脑缺血早期增加的 NO 的来源和意义尚不清楚, 因其迅速恢复, 一般认为它来源于内皮细胞型 NOS (eNOS), 此 NO 可能对缺血性脑损伤有保护作用。神经元型 NOS (nNOS) 和诱导型 NOS (iNOS) 源性 NO 则可能分别介导了脑缺血早期及后期神经毒性的产生^[6]。iNOS 在正常条件下有少量分布, 而在一些外源性物质如内毒素、细胞因子等的刺激下, iNOS 可被一些细胞诱导产生, 如肥大细胞、巨噬细胞、神经胶质细胞以及内皮细胞等, 其一旦表达后能够持续不断地催化 NO 的产生。此 NO 可加重缺血性脑损伤^[7, 8]。Endoh 等的研究发现, 在大鼠全脑缺血

3 讨论

脑缺血时, 脑微血管系统中存在的谷胱甘肽—谷胱甘肽还原酶自由基清除系统含量下降^[3], 再灌注时则导致微血管周围有大量自由基产生。氧自由基可损伤血脑屏障, 促进脑水肿形成, 促进血管内皮粘附分子表达及白细胞和血小板与内皮的粘附, 加重再灌注后脑微循环障碍^[4]。大鼠大脑中动脉阻断 6 h, 再灌注 1 h 可引起缺血脑组织中脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高, 给予抗自由基药物可以减轻脑缺血再灌注损伤^[5], 说明自由基引起的脂质过氧化反应在脑缺血再灌注损伤过程中发挥重要作用。研究结果表明, 早老龄小鼠脑缺血再灌后 1, 4 d, 脑组织 SOD 活力明显下降, MDA 含量明显升高, 7 d 时已接近正常水平, 聪圣胶囊可升高脑缺血再灌注引起的下降的 SOD 活力, 减少脑缺血再灌

10 min 再灌 3 d 后, 脑星形胶质细胞表达 iNOS, 这种表达在一周至一月时最明显^[9]。可见 iNOS 源性 NO 可能介导了脑缺血后期神经毒性的产生。本实验的目的是研究 iNOS, 采用脑缺血再灌注模型, 并在此模型上观察了脑缺血再灌注 1, 4 和 7 d 脑组织 NO, NOS 的改变。实验结果表明, 早老龄小鼠脑缺血再灌后 4 d 起, 脑组织 NOS 活力明显升高, NO 含量有所升高, 7 d 时与正常组产生明显区别, 推测这种增高可能源于 iNOS 的激活与表达, 对机体具有损伤作用, 其意义可能与脑缺血引起的迟发性神经元损伤有关。聪圣胶囊可以降低这种升高的 iNOS 活性对缺血性脑损伤显然具有积极的治疗意义。因此, 我们认为聪圣胶囊对拟缺血再灌注损伤的保护作用与其抗自由基损伤及抗 NO 神经毒作用有关。

References:

[1] Li W, Yan H J, Zhao H M. Protective effect of drug and influence of cerebral ischemia reperfusion on learning and remembrance in mice [J]. Chin J Rehabil Med (中国康复医学杂志), 1995, 19(2): 67-69.
[2] Zhao L, Xu Q P, Si Y C, et al. Effects of Congsheng capsule on the disturbance in learning and memorizing caused by cere-

bral ischemia reperfusion in presenile mice [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24(1): 36-38.

- [3] Chandan K S, Lester P. Antioxidant and redox regulation of gene transcription [J]. *FASEB J*, 1996, 10: 709-720.
- [4] Chan P H. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia [J]. *Brain Pathol*, 1994, 4: 59-65.
- [5] Soehle M, Heimann A, Kempinski O. Postischemic application of lipid peroxidation inhibitor U101033E reduces neuronal damage after global cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(6): 1240-1246.
- [6] Dalkara T, Moskowitz M A. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia [J]. *Brain Pathol*, 1994, 4: 49-57.
- [7] Zhao X, Haensel C, Araki E, et al. Gene-dosing effect and persistence of reduction in ischemic brain injury in mice lacking

inducible nitric oxide synthase [J]. *Brain Res*, 2000, 872 (1-2): 215-218.

- [8] Parmentier-Batteur S, Bohme G A, Lerouet D, et al. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21 (1): 15-21.
- [9] Endoh M, Maiese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia [J]. *Brain Res*, 1994, 651: 92-100.
- [10] Zhao L, Xu Q P, Tang M K. Experimental study on protective effect of Congsheng capsule in acute cerebral ischemia and improvement of cerebral blood flow and energy metabolism [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 21 (5): 379-381.

海藻甘草对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响

丁选胜, 阚毓铭, 李 欧*

(南京中医药大学 海洋药物研究开发中心, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 观察海藻、甘草单煎液及其不同比例合煎、单煎后混合液对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响。方法 每日给大鼠 ig 丙基硫氧嘧啶 (0.15 g/kg), 连续造模 10 d。给药组动物在造模的同时分别 ig 海藻、甘草单煎液及其不同比例合煎、单煎后混合液。15 d 后采血, 处死大鼠, 放射免疫法测定血清中三碘甲状腺原氨酸 (T₃)、四碘甲状腺原氨酸 (T₄) 及甲状腺微粒体抗体 (TM)、甲状腺球蛋白抗体 (TG) 的含量。结果 海藻单煎液及海藻、甘草不同比例合煎及单煎后混合液均有不同程度降低 TM、TG 作用, 其中 TM 的降低幅度大于 TG, 且二者合煎液作用大于单煎后混合液, 当二者为 1:1 合煎时作用最显著。但未见对 T₃、T₄ 的影响。结论 海藻及海藻、甘草合用可抑制丙基硫氧嘧啶所致甲状腺肿模型大鼠甲状腺抗体升高。

关键词: 海藻; 甘草; 甲状腺激素; 抗体

中图分类号: R 286.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)01-0054-03

Effect of *Sargassum pallidum* and *Glycyrrhiza uralensis* on thyroid hormones and its antibodies of model goitered rats

DING Xuan-sheng, KAN Yu-ming, LI Ou

(Research & Development Center for Marine Medicine, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

Key words: *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag.; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; thyroid hormone; antibodies

中医之瘰癧包括现代医学的甲状腺肿、甲状腺机能亢进症、甲状腺腺瘤等病症。临床上, 诸多医家将含有海藻、甘草配伍的方药应用于治疗瘰癧, 如海藻玉壶汤、瘰癧丸等, 疗效显著^[1]。近年来, 两药配伍同用的报道更是屡见不鲜。本实验通过观察海藻、甘草单煎液及其不同比例合煎、单煎后混合液对甲状腺肿模型大鼠甲状腺激素及其抗体的影响, 初步探讨了二者配伍用于甲状腺疑难症的作用机制。

1 实验材料

1.1 药品及试剂: 甘草购于南京医药股份公司, 经本校中药鉴定学教研室鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根及根茎的饮片。海藻购于南京医药股份公司, 经本校中药鉴定学教研室鉴定为马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Ag. 的干燥藻体。丙基硫氧嘧啶, 南通制药总厂生产, 批号: 990904。碘化钾, 宜兴市化学试剂厂, AR 级, 批号: 980922。T₃试剂盒, 天津德普生物技术和医学产品有限公司, 批号: KT3D1

* 收稿日期: 2002-03-27

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助课题 (KJB360003)

作者简介: 丁选胜(1962—), 男, 安徽广德人, 讲师, 博士, 现中国药科大学博士后, 主要从事功能食品、中药新药开发及方剂配伍研究。

Tel: (025) 3271270 E-mail: dxs0162@sina.com