

表 4 SF 对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of SF on platelet aggregation induced by ADP in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	聚集率 / %	抑制率 / %
空白对照	—	41.10 ± 6.85	—
NDS	1 000	25.55 ± 3.37 [*]	37.93
SF	40	22.53 ± 3.45 [*]	45.18
	20	29.84 ± 6.68 [*]	27.39
	10	36.24 ± 5.74	11.82

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

脑缺血是一种病理过程复杂的疾病,其发病过程涉及到脑血流减少、缺血缺氧和能量代谢衰竭及氧自由基产生、炎症因子和细胞的参与等,最终导致神经细胞溃变死亡^[8]。血栓形成是脑缺血性疾病的主要致病因素之一;脑缺血时,细胞内钙超载,氧自由基产生增加,激活膜上的磷脂酶 A₂,使膜磷脂分解,生成大量的花生四烯酸,再经环氧酶途径形成不稳定的中间物 PGG₂和 PGH₂,前者经 TXA₂合成酶催化形成 TXA₂,后者则生成 PGE₂,TXA₂大量合成,致 PGE₂/TXA₂比值失调,凝血机制障碍,易于血栓形成,成为脑缺血的重要病理机制之一^[9]。同时,血小板功能异常亢进,血小板激活之后的聚集和粘附则是血栓形成的主要环节,如出血及 ADP, AA, 胶原等血小板激活剂等因素均可诱导血小板聚集和粘附,使血液处于高凝状态,以至于形成血栓,这是造成继发性脑损伤的重要原因之一。抗凝药物能够通过改善血液循环、干扰血栓形成过程,从而为重要侧枝循环的建立及减慢脑缺血过程争取了时间^[10]。

本研究发现红花总黄酮不仅能改善大脑中动脉

栓塞所致脑缺血大鼠的行为障碍,减少脑缺血区面积,也能抑制大鼠体内血栓的形成和 ADP 诱导的大鼠血小板聚集;提示红花总黄酮对大鼠局部脑缺血的保护作用与其抑制血小板聚集、干扰血栓的形成有关。

References

- [1] Xin X L, Geng M Y, Qi X, *et al.* Study on the action mechanism of a new type anti-cerebral ischemia marine drug 989 [J]. *J Qingdao Ocean Univ* (青岛海洋大学学报), 2001, 31 (4): 536-540.
- [2] Huang W M, Li B Z, Yan X J, *et al.* Clinic and basic research on anti-platelet aggregation effect of berberine [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1989, 10: 288.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1998, 20: 84.
- [4] Zhang Y Z, Gu D G, Mao S Y, *et al.* Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on focal cerebral ischemia and thrombogenesis of carotid artery in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1998, 33(12): 901.
- [5] Wang H T, Jin H T, Sun J N, *et al.* Experimental studies on anti-thrombosis effect of 3, 4-oxoisopropylidene-shikimic acid [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2002, 37 (4): 245.
- [6] Wang M, Wang J, Shao M Y, *et al.* Fibrinolytic properties and thrombolytic effect of a novel fibrinolytic enzyme from streptomyces SP. Y405 [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1998, 33(7): 481-485.
- [7] Herbert J M, Bernat A, Samaman N, *et al.* The antiaggregating and antithrombotic activity of ticlopidine is potentiated by aspirin in the rat [J]. *Thromb Haemost*, 1996, 76(1): 94.
- [8] Sesjo B K. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculation synthesis [J]. *J Neuro-trauma*, 1995, 12: 943.
- [9] Wang J, Zhang J T. Relations of anti-cerebral ischemia effect of total salvianolic acid to anti-thrombosis formation [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 16(3): 237-239.
- [10] Geng M Y, Xin X L, Li J, *et al.* Protective effects of DPS on MCAO rats [J]. *Oceanol Limnol Sin* (海洋与湖沼), 2001, 32: 192.

泽泻对 Lewis 肺癌自发性转移的抑制作用及其机制研究

马 兵¹, 项 阳¹, 李 涛¹, 于和鸣², 李学军^{1*}

(1. 北京大学基础医学院 药理学系, 北京 100083; 2. 国家计划生育委员会科学技术研究所, 北京 100081)

摘要: 目的 研究泽泻对 Lewis 肺癌自发性转移的影响及其可能机制。方法 以 Lewis 肺癌自发性转移为模型, 测定泽泻对瘤重指数、转移灶数的影响及其转移抑制率。用激光衍射法和微压积管法测定红细胞的变形指数及比容。双相凝胶电泳分析给药后小鼠血清蛋白质组变化。结果 泽泻 10, 20 g/(kg · d) 连续给药 20 d 均可使肺中的

* 收稿日期: 2002-09-10

作者简介: 马 兵 (1970-), 女, 山西运城人, 博士, 讲师, 1993年在沈阳药科大学获学士学位, 1996年在该校获硕士学位, 1996-2000年在北京医科大学 (现北京大学医学部) 基础医学院药理学系工作, 任助教、讲师, 2000年至今在北京大学基础医学院攻读博士学位, 研究方向为分子药理学。Tel (010) 62091421 E-Mail: matongbing@yahoo.com

* 通讯作者 Tel (010) 62091421 E-mail: lix@bjmu.edu.cn

转移灶数明显减少,其转移抑制率分别为 56.92% 和 88.82%。荷瘤小鼠红细胞变形指数及比容明显降低,泽泻对其无明显改善。泽泻可使荷瘤小鼠的血清蛋白成分发生显著变化。结论 泽泻可显著抑制 Lewis 肺癌的自发性转移,其机制可能与血清中某些蛋白成分的改变有关。

关键词:泽泻;肿瘤转移;红细胞变性;红细胞比容;蛋白质组

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2003)08-0743-04

Inhibitory effects of *Alisma orientalis* on spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma and its mechanism

M A Bing¹, XIANG Yang¹, LI Tao¹, YU He-ming², LI Xue-jun¹

(1. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

Key words *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; tumor metastasis; erythrocyte deformability; hematocrit; proteome

泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 为泽泻科植物的干燥块茎。现代临床研究表明,泽泻及其复方在治疗高脂血症、脂肪肝、免疫复合物型及抗基底膜型肾炎、肾结石、高血压、冠心病、腹水及美尼尔氏综合症等常见病方面取得了良好的疗效。有报道泽泻还具有明显的抗血小板聚集、抗血栓形成及促进纤溶酶活性等作用^[1]。而最近的研究发现肿瘤转移与血栓形成、纤溶酶原系统的活性有密切关系^[2]。为深入研究与开发泽泻的药理作用,本研究以 Lewis 肺癌自发性转移为模型,研究了泽泻对肿瘤转移的影响,并观察其对红细胞变形能力、红细胞比容等血液流变学参数的影响。同时应用双相凝胶电泳技术研究了给药后小鼠血清的蛋白质组变化。

1 材料与方法

1.1 药物:泽泻醇提浓缩液(每克浓缩液相当于 16.1 g 原药)由北京大学药学院中药研究室车庆明老师惠赠,将其混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠中,并用超声粉碎机打匀。

1.2 动物模型与分组: C57BL/6 小鼠,雌性,6~8 周龄,体重 18~20 g,购自北京大学医学部实验动物中心。Lewis 肺癌荷瘤小鼠购自中国医学科学院药物研究所。从荷瘤小鼠上剥离皮下瘤,选取生长良好的瘤块,按肿瘤(g)和生理盐水(mL) 1:3 的比例研磨成匀浆, C57BL/6 小鼠腋窝皮下接种肿瘤组织匀浆液每只 0.2 mL。实验共分 4 组:正常组(不接种肿瘤);模型组(接种肿瘤,不用药);泽泻 10 和 20 g 生药/(kg·d)剂量组,每组 9 只动物。于肿瘤接种后第一天开始 ig 给药,共给药 20 d。对照组仅给予同体积溶媒。

1.3 转移分析:于接种后第 21 天颈椎脱臼处死动物,称体重、皮下瘤重、双肺湿重,并在解剖显微镜下计数双肺中所形成的转移瘤灶数目。计算瘤重指数

与转移抑制率

瘤重指数 = 皮下瘤重/体重 × 100%

转移抑制率 = (模型组双肺湿重 - 治疗组双肺湿重) / (模型组双肺湿重 - 正常组双肺湿重) × 100%

1.4 红细胞变形能力和比容测定^[3] 悬浮介质 PV P (聚乙烯吡咯烷酮)溶液相对分子质量 3×10^4 , pH 7.4, 渗透压 300 mOsm/kg, PV P 浓度 1%,黏度 8 mPa·s,含 0.004% 牛血清白蛋白。5 mL PV P 溶液配成浓度为 2×10^7 /mL 的红细胞悬液。

1.4.1 测量方法:处死动物前,摘眼球取血约 0.6~0.9 mL (肝素抗凝),用微压积管测定红细胞比容。用激光衍射法(LBY-BX2 型激光衍射仪,北京普利生仪器中心)测定全血中红细胞在切变率为 50~1 000 s⁻¹ 的变形指数(DI)。

1.4.2 计算公式:通过测量衍射环的短轴 a 和长轴 b ,可计算出红细胞变形指数: $DI = b/a$ 。

1.5 蛋白质组学分析:动物模型与分组同 1.2。于接种肿瘤后第 21 天,摘取小鼠眼球取血,待血凝后取血清,立即分装,投入液氮,然后转移至 -70℃ 冰箱保存待用。双相凝胶电泳所用试剂均为 Amersham Pharmacia 或 Bio-Rad 公司产品。

1.5.1 双相凝胶电泳分离血清总蛋白:第一相固相梯度等电聚焦 IPG-DALT 主要按 Sanchez 的方法^[4]和 IPGphorTM 等电聚焦系统指南进行。取模型组和泽泻 20 g/(kg·d) 组小鼠血清,室温融化后,Bradford 法^[5]测定血清总蛋白浓度。各取 140 μg,加入水化液(8 mol/L Urea, 2% CHAPS, 0.28% DTT, 0.5% IPG Buffer),总体积 350 μL,加入 IPGstrip 持胶槽中,将 IPG 干胶条去保护膜胶面朝下,轻轻置入持胶槽中,覆盖一层矿物油,盖好盖子后置于 IPGphor 水平电泳仪(Amersham Pharmacia)电极板上。等电聚焦程序如下:无电压溶胀 6

h; 30 V, 6 h; 200 V, 0. 5 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 4~ 8 h 第二相垂直板 SDS-PAGE电泳: 等电聚焦结束后, 胶条在含 50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L Urea, 30% 甘油, 2% SDS, 1% DTT和痕量溴酚蓝的平衡液 (pH8. 8) 中平衡 15 min, 然后于 2. 5% 碘代乙酰胺替换 1% DTT的同样的平衡液中平衡 15 min 胶条移至 10% SDS-PAGE胶的上端, 0. 5% 琼脂糖封胶, SDS-PAGE在 ProteanII (Bio-Rad) 电泳槽中进行, 20 mA 胶电泳, 40 min后换用 30 mA 胶, 直到溴酚蓝到达胶的底线 将胶放入考马斯亮蓝溶液中染色 4 h, 脱色。

1. 5. 2 图像的采集与分析: 双相电泳凝胶用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统获取图象, 用 Imagemaster R 2D Elite (Amersham Pharmacia) 软件包进行分析。图像分析过程包括蛋白点的检测、量化、背景扣除和点的匹配。蛋白点检测后进行匹配、编辑。以治疗组双相凝胶电泳图作为参考胶, 并建立一些匹配

点, 然后自动匹配其他蛋白点。蛋白点的相对分子质量和等电点采用二维校正法确定

1. 6 统计学处理: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示 采用 SPSS 10. 0 软件, 多组样本均数比较采用 ANOVA 分析。

2 结果

2. 1 泽泻对 Lewis 肺癌自发性转移的影响: 表 1 结果显示泽泻 10 和 20 g/(kg·d) 对 Lewis 癌皮下瘤的瘤重指数无显著影响, 提示其不能明显抑制皮下瘤的生长。但两种剂量的泽泻均可抑制 Lewis 肺癌的自发性转移, 使肺中的转移灶数及双肺湿重均明显降低且呈现一定剂量依赖关系。其转移抑制率分别为 56. 92% 和 88. 82%。

2. 2 泽泻对 Lewis 癌荷瘤小鼠血液流变学参数的影响: 如表 2 结果所示, 荷瘤小鼠红细胞在切变率为 1 000 s⁻¹ 时的变形指数以及红细胞比容与正常组小鼠相比均明显降低, 给泽泻后不能使红细胞的流变学特性得到有效恢复。

表 1 泽泻对小鼠 Lewis 肺癌自发性转移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *A. orientalis* on spontaneous metastases of Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物数	瘤重指数	转移灶数	双肺湿重 / mg	转移抑制率 / %
对照	-	9	-	-	173. 90± 5. 99 ^{**}	-
模型	-	8	29. 30± 1. 00	21. 67± 1. 31	370. 00± 62. 62	-
泽泻	10	8	22. 89± 3. 00	16. 25± 1. 73 [*]	258. 38± 23. 98 [*]	56. 92
	20	6	22. 22± 1. 61	6. 33± 0. 80 ^{**}	195. 83± 7. 94 [*]	88. 82

与模型组比较: * P < 0. 05 ** P < 0. 01 *** P < 0. 001

* P < 0. 05 ** P < 0. 01 *** P < 0. 001 vs model group

表 2 泽泻对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠红细胞流变学特性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *A. orientalis* on erythrocyte rheological behavior of mice bearing Lewis lung carcinoma ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物数	变形指数 / %	红细胞比容 / %
对照	-	9	33. 75± 0. 53	46± 1
模型	-	8	26. 13± 0. 76 ^{**}	28± 2 ^{**}
泽泻	10	8	25. 77± 1. 59 ^{**}	21± 1 ^{**}
	20	6	28. 33± 0. 76 [*]	24± 1 ^{**}

与正常组比较: ** P < 0. 01 *** P < 0. 001

** P < 0. 01 *** P < 0. 001 vs normal group

2. 3 泽泻对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠血清蛋白质组的影响: 模型组和治疗组小鼠血清总蛋白经 IPG-2D-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色得到的图谱, 其模式非常相似。二维凝胶电泳图谱经 Imagemaster R 2D Elite 软件进行分析, 模型组检测到 (269± 12) 个蛋白点 (n= 3), 治疗组检测到 (295± 8) 个蛋白点 (n= 3)。选取治疗组胶作为参考胶进行匹配, 匹配 (109± 11) 个蛋白点 (n= 3) 提示药物治疗前后血清蛋白质组发生了显著变化。

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤的基本特征, 亦是临床肿瘤患者的主要死因。因此, 努力开发出高效低毒的抗转移药物将在肿瘤治疗中具有重要意义。本研究中所用的 Lewis 肺癌为自发性肺内未分化上皮样癌。移植瘤主要通过血行播散在肺部形成转移灶。

Lewis 肺癌从移植后的增殖、侵袭、转移, 到最终形成肺转移瘤的过程基本类似于人类肿瘤从生长到转移瘤形成所经历的一系列步骤, 故称之为癌的自发性转移模型。所以, 用此模型来研究药物的抗癌转移活性更具有临床意义。本研究结果发现, 泽泻醇提物 10 和 20 g/(kg·d) 可使肺内形成的转移瘤灶数显著减少, 对转移的抑制率分别为 56. 92% 和 88. 82%。提示泽泻具有较强的抗恶性肿瘤转移作用。

随着恶性肿瘤的演进, 荷瘤动物都有轻重不等的代谢性酸中毒及电解质平衡紊乱, 可直接影响血液的渗透压, 而红细胞所处介质的渗透压和 pH 值对其膜的稳定性和变形能力都有很大影响, 结果可造成红细胞的皱缩、膨胀、破碎及硬化。晚期荷瘤动

物出现恶液质、严重贫血也会使红细胞比容降低。本实验结果表明,荷瘤组小鼠与正常组小鼠相比,红细胞在切变率为 $1\,000\text{ s}^{-1}$ 时的变形指数显著降低,红细胞比容也明显下降。研究结果证实泽泻不能有效改善荷瘤小鼠的血液流变学特性,提示其抗肿瘤转移活性是通过其他途径实现的。

蛋白质组学是在体液、组织或细胞整体水平上研究蛋白质的属性:表达水平、翻译后修饰、相互作用等,并由此在蛋白质水平上获得对疾病过程、细胞生理、生化过程和调控网络的广泛而完整的认识^[6]。肿瘤转移是由既相互联系又相互作用的多步骤构成的级联过程。以往的研究多集中于单个或少数几个基因或蛋白质。采用蛋白质组学的分析方法从整体水平上探讨这类多基因、多蛋白参与的疾病的生化过程具有重要的实际的理论意义。蛋白质组学的技术提供了一种发现和鉴定疾病状态下表达异常的蛋白质的方法。这些蛋白质可以作为药物设计的靶点。还可通过对肿瘤演进的不同阶段蛋白质组变化的分析,获得一些肿瘤不同时期的标志分子,这不仅对药物发现具有指导意义,还对肿瘤的诊断、治疗提供理论基础^[7,8]。在本研究中,建立了 Lewis 肺癌转移模型,用蛋白质组学的关键技术对模型组与给药组动

物血清蛋白质组进行了比较分析,发现在用泽泻治疗后血清中的很多蛋白质成分发生了显著变化,这些蛋白质成分可能参与了肿瘤恶性生长、去分化和其他表型与生物学特征改变的调控。为了进一步探讨其与泽泻的抗肿瘤转移活性之间的关系,笔者正在对这些差异蛋白进行识别与鉴定。

References

- [1] Wang X H. Advances in the studies on *European Water-plantain* (*Alisma plantago-aquatica*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(7): 557-561.
- [2] Valente M, Ponte E. Thrombosis and cancer [J]. *Minerva Cardioangiol*, 2000, 48(4-5): 117-127.
- [3] Wen Z Y, Ma W Y, Gao T, *et al.* Effect of suspending medium viscosity on orientation and deformation of RBC in a shear flow field [J]. *Clin Hemorrhol*, 1995, 15(4): 619-625.
- [4] Sanchez J C, Rouge V, Pisteur M, *et al.* Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 324-327.
- [5] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation [A]. Walker J M. *The Protein Protocols Handbook* [M]. New Jersey: Humana Press Inc, 1996.
- [6] Blackstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. *TIBTECH*, 1999, 17: 121-127.
- [7] Hanash S M, Madoz-Gurpide J, Misek D E. Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics [J]. *Leukemia*, 2002, 16(4): 478-485.
- [8] Searls D B. Using bioinformatics in gene and drug discovery [J]. *Drug Discovery Today*, 2000, 5(4): 135-143.

仙灵骨葆治疗膝关节髌骨软化 110例临床观察

苗 兵*

(天津医院,天津 300160)

仙灵骨葆是一种具有标本兼治通过对机体的全身性调节而达到纠正机体激素失衡作用,既抑制骨吸收又促进骨形成治疗骨质疏松的中药内服制剂,具有明显抗骨质疏松作用。仙灵骨葆能使被破坏的性腺组织结构趋于正常达到保护性腺的作用,维持体内正常激素水平。本观察采用仙灵骨葆治疗髌骨软化症 110例,获得满意疗效,并与双氯芬酸钠对照组 110例进行比较,现将观察结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料:220例患者均为门诊病人,随机分为两组,治疗组 110例用仙灵骨葆,对照组 110例用双氯芬酸钠治疗。治疗组男 48例,女 62例;有外

伤史或劳损史 72例,无明显外伤史为 38例;单膝为 63例,双膝为 47例;年龄 16~70岁;病程 1年以内 11例,1~3年 50例,4~5年 43例,5年以上 6例。对照组男 45例,女 65例;年龄 15~68岁;病程 1年以内 12例,1~3年 48例,4~5年 45例,5年以上 5例,两组资料比较差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 诊断标准:膝关节疼痛,蹲起及上下楼梯时加重,髌骨研磨试验 X线显示有骨质疏松,髌骨软骨下骨吸收或囊性变髌骨软骨表面凹凸不平。排除其他膝关节疾病^[1]。

1.3 治疗方法:治疗组口服仙灵骨葆(贵州同济堂

* 收稿日期:2002-10-12

作者简介:苗兵(1966-),男,河北人,主治医师,1989年毕业于天津医学院,现在天津医院关节炎科工作,主要致力于关节外科、类风湿及关节置换的研究。