

的细胞外环境中, 较高浓度(本实验为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 的 H_2O_2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度增加率会比无 Ca^{2+} 时加大, 可能涉及到 L -型 Ca^{2+} 通道之外的膜通透性增加机制造成胞外 Ca^{2+} 大量内流。

西红花酸具有广泛的药理活性^[8]。目前认为, 西红花酸的各种药理作用可能与其较强的抗氧化作用有关^[8,9]。我们在研究中观察到西红花酸可减轻 H_2O_2 对培养心肌细胞造成的损伤, 推测相关的机制是: 西红花酸具有亲脂性能与细胞膜紧密结合或亲脂部分进入细胞内, 抵抗 H_2O_2 对细胞的攻击; 能与细胞氧化应激中产生的 $\cdot\text{OH}$ 、膜脂质过氧化自由基 ($\text{LOO}\cdot$) 或脂质自由基 ($\text{L}\cdot$) 结合形成较稳定的复合物, 中断膜脂质过氧化反应的连锁和放大, 减轻 $\cdot\text{OH}$ 对膜性细胞器的损伤作用。本研究表明, 无论细胞外环境是否存在 Ca^{2+} , 采用西红花酸均能显著降低 H_2O_2 诱发的培养心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升的幅度, 由此可以断定西红花酸能够有效地调整胞内钙库释放和摄取 Ca^{2+} 、减少 Ca^{2+} 内流, 与我们上述关于西红花酸在细胞膜或细胞内发挥抗氧化作用的推测是相符的。显然, 西红花酸能够抑制 H_2O_2 诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高是其抗氧化应激性损害机制之一。

References

- [1] Gao W Y, Zhu D Y. Advances in chemical and pharmacological studies on Crocus (*Crocus L.*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 389-391.
- [2] Lakowicz J R, Szmacinski H, Johnson M L. Calcium imaging using fluorescence lifetimes and long-wavelength calcium probes [J]. *J Fluorescence*, 1992, 2(1): 47-62.
- [3] Ferrari G, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure [J]. *Eur Heart J*, 1998, 19(Suppl 1B): B2-B11.
- [4] Yuan X M. Apoptotic macrophage-derived foam cells of human atheromas are rich in iron and ferritin, suggesting iron-catalysed reactions to be involved in apoptosis [J]. *Free Radic Res*, 1999, 30(3): 221-231.
- [5] Silverman H S, Stern M D. Ionic basis of ischemic cardiac injury: insights from cellular studies [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(5): 581-597.
- [6] Dhalla N S, Gollman L, Takeda S, et al. Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review [J]. *Can J Cardiol*, 1999, 15(5): 587-593.
- [7] Boraso A, Williams A J. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel by H_2O_2 and dithiothreitol [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267: H1010-H1016.
- [8] Gong G Q, Liu T Z, Li L W, et al. Antioxidative activity of crocetin *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.
- [9] Liu T Z, Lu Y, Bao C Y, et al. Effect of crocetin on protecting DNA against oxidative damages induced by free radical generation system [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(6): 505-509.

槲皮素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响

罗玲, 吴凯南, 吴晓健*

(重庆医科大学附属第一医院 普外科, 重庆 400015)

槲皮素具有广泛的生理及药理活性^[1], 因其扩张冠脉、调血脂、降低血管通透性被作为心血管药物而在临床广泛应用。已有文献报道槲皮素在体外对肿瘤的化学预防和治疗作用及其机制^[2,3]。此前, 已对槲皮素抑制 DMBA (二甲基苯并蒽) 诱导的 SD 大鼠乳腺癌的发生及增殖进行了研究并探讨机制^[4,5]。本实验采用 ER (雌激素受体) 阳性的乳腺癌细胞株 MCF-7, 初步观察槲皮素在体外对该细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响, 为进一步探讨其作用机制及其应用于临床治疗乳腺癌提供部分依据。

1 材料与方 法

1.1 药物与细胞系: Quercetin (槲皮素, Q 0125,

FW: 338.3) 购于美国 Sigma 公司, 用 DM SO (二甲基亚砜) 配成储液, -20℃ 冰箱保存。试验时用 1640 培养基稀释, DM SO 的终浓度小于 0.9%。MCF-7 细胞购自武汉大学典型动物保藏中心。

1.2 MTT 法检测槲皮素对乳腺癌细胞生长的影响: 实验分为 7 组: 细胞对照组、溶剂对照组 (0.9% DM SO)、槲皮素 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组。MTT 法分别测定槲皮素作用 24, 48, 72 h 后的吸光度 (A_{600}) 值, 并计算出槲皮素对乳腺癌细胞的抑制率, 每组实验均重复 3 次。用回归方程求出槲皮素的半数抑药浓度 (IC_{50})。

增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{药物}}/A_{\text{细胞对照}}) \times 100\%$

* 收稿日期: 2003-06-14

基金项目: 重庆市卫生局科研基金面上项目 (99-2021#)

作者简介: 罗玲 (1969—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为槲皮素对肿瘤血管生成因子 VEGF mRNA 及 MTP53, Ras 蛋白表达的影响。Tel: (023) 66908378, 89012715 E-mail: www.11mb.sohu.com.

1.3 形态学观察: 倒置显微镜、光镜、电镜观察槲皮素对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率: 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h, 70% 乙醇固定, 4 过夜。取 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液, PBS 洗涤, $2000 \times g$ 离心 5 min, 去上清, PI 染液 1.0 mL 染 30 min, 混合液过 300 目尼龙网以除去杂质, 用 488 nm 激发波长测定样品, 分析细胞周期和凋亡率。

1.5 免疫细胞化学检测槲皮素影响 PCNA (增殖细胞核抗原) 蛋白质的表达: PCNA 定位于细胞核, 细胞核内有中等强度以上棕黄色或棕褐色颗粒, 或

核内弥散着色为阳性; 每张切片选择 3 个密集区域的细胞观察, 计算 100 个细胞中的阳性细胞数, 取其平均值。阳性着色细胞数 $< 10\%$ 为“-”, $10\% \sim 50\%$ 为“+”, $> 50\%$ 为“++”。

1.6 统计分析: 实验采用 SAS 6.12 软件包进行分析。MTT 检测结果采用方差分析, 组间两两比较用 SNK 法 (q 检验); 免疫细胞染色结果分析采用秩和检验进行统计处理。

2 结果

2.1 MTT 法检测槲皮素对乳腺癌细胞生长的影响: 见表 1。

表 1 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响

Table 1 Effect of quercetin on breast cancer MCF-7 cells growth

组别	剂量 $/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
细胞对照	-	0.623 \pm 0.04	0	0.854 \pm 0.034	0	0.873 \pm 0.02	0
DM SO 对照	-	0.631 \pm 0.08	0	0.852 \pm 0.08	0	0.869 \pm 0.04	0
槲皮素	1	0.621 \pm 0.018	1.91	0.804 \pm 0.021	6.80	0.782 \pm 0.045	10.42
	10	0.550 \pm 0.021	13.00	0.704 \pm 0.086	18.98	0.623 \pm 0.076	28.64
	25	0.510 \pm 0.015	16.22*	0.599 \pm 0.013	32.69*	0.366 \pm 0.011	58.12*
	50	0.468 \pm 0.03	20.22*	0.532 \pm 0.017	39.68*	0.217 \pm 0.06	75.20*
	100	0.427 \pm 0.02	34.22*	0.310 \pm 0.014	45.25*	0.166 \pm 0.68	81.00*

与细胞对照组比较: * $P < 0.05$; 与 24 h 作用组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs cell control group; $P < 0.05$ vs 24 h group

从表 1 可见, 槲皮素对 MCF-7 细胞生长抑制作用存在时间及浓度依赖性。与槲皮素作用 24 h 相比, 槲皮素作用 72 h 后乳腺癌细胞抑制率差异显著 ($P < 0.05$), 但与作用 48 h 后乳腺癌细胞抑制率比差异不显著。说明随作用时间延长, 药物抑制作用增强。不同时间细胞对照组与 DM SO 对照组差异不显著, 说明用作溶剂的 DM SO 对 MCF-7 细胞生长无影响; 与细胞对照组比, 槲皮素 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 对乳腺癌细胞抑制率差异不显著; 而 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素对乳腺癌细胞抑制率差异显著 ($P < 0.05$)。

用 SAS 6.12 软件包分析药物浓度的对数与存活率之间的关系, 求出 IC_{50} (槲皮素作用 72 h, 细胞被抑制 50% 的半数抑药浓度) 为 15.54 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 形态学观察: 25 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h 后, 倒置显微镜、光镜及电镜下均可观察到 MCF-7 细胞出现凋亡的典型形态学改变: 细胞皱缩, 胞质浓缩, 胞核凝聚, 位于核周膜成新月状, 块状。另可见核碎裂成几个小块, 形成凋亡小体。而作用 3 d 后则可见肿胀性坏死的表现。

2.3 流式细胞仪分析细胞周期分布和凋亡率: 见表 2。用流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布, 对照组未检测到凋亡; 槲皮素作用 48 h 后 MCF-7 细胞凋亡

率为 15.53% (25 $\mu\text{mol/L}$) 和 17.79% (50 $\mu\text{mol/L}$)。此外, 还显示出细胞的周期分布, 与对照组比槲皮素致细胞 G_0/G_1 期阻滞; S 期细胞也有所下降。

表 2 槲皮素作用 48 h 后对 MCF-7 细胞周期分布及凋亡率的影响

Table 2 Effect of quercetin for 48 h on cell cycle distribution and apoptosis rate of MCF-7 cancer cell

组别	剂量 $/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞周期/%			凋亡率 /%
		G_0/G_1	S	G_2/M	
对照	-	46.75	39.44	13.81	-
槲皮素	25	49.92	32.30	18.28	15.53
	50	48.39	37.72	13.88	17.79

2.4 免疫细胞化学检测槲皮素作用前后 PCNA 蛋白质的表达, 见表 3。

表 3 槲皮素对 PCNA 蛋白质表达的影响 (n = 8)

Table 3 Effect of quercetin on expression of PCNA protein (n = 8)

组别	剂量 $/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	PCNA 阳性表达/例			阳性表达率 /%
		++	+	-	
对照	-	4	1	3	62.5
槲皮素	25	1*	1	6*	25*
	50	1*	1	6*	25*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

槲皮素在体外实验中可抑制乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、胃癌、白血病等多种恶性肿瘤的生长。机制可能与下列因素有关: 阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞信号传导、调节生长因子等导致细胞增殖抑制; 诱导肿瘤细胞发生凋亡及分化等^[6,7]。

本研究 MTT 实验显示: 槲皮素对 ER 阳性 MCF-7 细胞的增殖有明显的抑制作用, 并呈时间及浓度依赖性。实验测得槲皮素对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 为 15.54 μmol/L。PCNA 是反映细胞增殖的指标, S 期合成最多, 免疫细胞化学检测结果表明用药组 PCNA 指数明显低于对照组, 提示槲皮素可通过降低 PCNA 蛋白质表达抑制癌细胞 DNA 生长, 从而抑制细胞增殖。槲皮素 25 和 50 μmol/L 作用 48 h 后, G₀/G₁ 期细胞较对照组明显增高, 故认为槲皮素可引起 MCF-7 乳腺癌细胞 G₀/G₁ 期阻滞。槲皮素具有诱导乳腺癌细胞凋亡的作用。倒置显微镜下动态观察槲皮素诱导凋亡的作用, 25 μmol/L 作用 48 h, 可见到典型的凋亡细胞, 随作用时间延长, 凋亡细胞数量明显增多。100 μmol/L 槲皮素作用 24 h 后可见大量的凋亡细胞及悬浮不透亮的死细胞, 随作用时间延长, 悬浮死细胞明显增多。在光镜下, HE 染色显示同样的结果。提示随着槲皮素浓度增加或作用时间延长, 可见凋亡细胞发生继发性坏死, 表明

凋亡在一定的条件下可转化为坏死。

通过流式细胞仪观察到: 槲皮素作用 48 h 后诱导凋亡, 随药物浓度增加, 凋亡率也随之增加, 而对照组均未检测到凋亡细胞。槲皮素可抑制乳腺癌细胞增殖, 引起 G₀/G₁ 周期阻滞, S 期细胞数目下降, 并诱导其凋亡, 这为其应用于临床提供了依据。

References

- [1] Holman P C, Kata M B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37 (9-10): 937-942.
- [2] Luo L, Wu K L. Study improvements on cancer chemopreventive effects of quercetin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 378-379.
- [3] SoFv, Guthrie N, Chambers A F, et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juice [J]. *Nutr Cancer*, 1996, 26(2): 167-181.
- [4] Kong L Q, Wu K L, Lin H. Study on inhibitory effect of quercetin on neovascularization of experimental mammary carcinoma [J]. *Chin J Clin Oncology* (中国肿瘤临床), 2001, 28(4): 295-299.
- [5] Lin H, Kong L Q, Wu K L. Study on the inhibitory effects of quercetin on occurrence and proliferation of experimental mammary carcinoma [J]. *Chin J Basis Clin Gen Surg* (中国普外基础与临床杂志), 2001, 8(5): 288-291.
- [6] Shen F, Herenyi M, Weber G. Synergistic down-regulation of signal transduction and cytotoxicity by tiazofurin and quercetin in human ovarian carcinoma cells [J]. *Life Sci*, 1999, 64(21): 1869-1872.
- [7] Balabhadrapathruni S, Thomas T J, Yurkow E J, et al. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(1): 3-12.

六味地黄颗粒剂与丸剂的药效学研究

高瑞峰¹, 于永芳², 李沈明^{3*}

(1. 承德医学院附属医院, 河北承德 067000; 2. 承德医学院中药研究所, 河北承德 067000; 3. 承德中药厂, 河北承德 067000)

六味地黄丸(简称丸剂)是传统的中成药,由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮 6 味中药材经粉碎后用蜂蜜配制而成。在临床上曾发挥了卓越的效能,但随着医药科技的进步,发现其有作用慢,含糖不利于糖尿病患者服用,水分高易于霉变,不利于贮存等缺点。六味地黄颗粒剂(简称颗粒剂)取代了传统剂型,既保留了原药成分含量高的优点,又有用量小、口感好、起效快、疗效高等特点。本实验就两种剂型在药效学上的差异进行了研究。

1 材料

地黄、山药(购于河南省温县医药公司),山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮(购于河北省承德市医药公司),均由承德医学院中药研究所于永芳副主任药师鉴定。山茱萸、牡丹皮用 95% 乙醇提取 2 次,浓缩到 300 mL 备用,提取过的山茱萸、牡丹皮与其他 4 味中药用水煎煮 2 次,浓缩到 150 mL 后,加 2 倍量 95% 乙醇搅拌,放置 24 h,滤过。回收乙醇,浓缩,加甜蜜素 1.0 g、糊精 300 g 混匀,烘干,粉碎成 80~

* 收稿日期: 2003-04-25

作者简介: 高瑞峰(1953—),男,河北省承德市人,副主任药师,执业药师,副主任,学科带头人,研究方向为临床药理学及中药药理。