

增殖活性和 α -SMA 表达阳性的肌成纤维细胞,合成大量细胞外基质(尤其是 I 型和 III 型胶原),导致肝纤维化发生。LX-2 细胞是活化的人肝星状细胞株,它有典型的星状细胞特征,在培养状态下,可表达 α -SMA 蛋白^[7]。

本实验运用了一种可信、准确而相对经济的基于 SYBR Green I 的实时定量 PCR 技术,检测了复方 861 对 LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 表达的影响。为保证反应的特异性,减少非特异性扩增和获得正确的扩增产物,本实验对包括引物、离子浓度和反应程序等在内的各种条件进行了优化。结果显示,本次实验的 PCR 反应具有高度的特异性,扩增产物为均一的目的片段。标准曲线亦显示,在 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^3$ 内,曲线呈非常好的线性关系。实验结果表明,复方 861 作用 48 和 72 h 后,LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 的水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。这说明该药可抑制 LX-2 细胞中 α -SMA 基因的表

达,提示其抗肝纤维化的作用可能与其抑制肝星状细胞的活化有关。

References:

- [1] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 2247-2250.
- [2] Iredale J P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 427-436.
- [3] Bataller R, Brenner D A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 437-451.
- [4] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: 808-826.
- [5] Wang T L, Wang B E, Zhang H H. Pathological study of the therapeutic effect on—related liver fibrosis with herbal compound 861 [J]. *Chin Gastro Hepatol* (胃肠病学和肝病杂志), 1998, 7(2): 148-153.
- [6] Ma H, Wang B E, Ma X M, et al. Effects of compound 861 on rat hepatic stellate cell collagen synthesis and degradation in vitro [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝病杂志), 1999, 7 (Suppl): 30-32.
- [7] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, et al. Activated stellate cells express the TRAIL Receptor-2/Death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1): 87-95.

川芎嗪对人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的影响

徐晓玉,杨丽蓉,陈刚

(重庆医科大学中医药学院,重庆 400050)

川芎为活血化瘀代表性中药,临床应用甚广。川芎嗪(Tranethylpyrazine, TMP)为川芎主要有效成分之一。前期研究表明,川芎嗪注射液能抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠移植瘤的生长和肺转移,可降低肿瘤组织微血管密度和抑制肿瘤细胞血管内皮生长因子(VEGF)的表达。本试验旨在进一步探讨川芎嗪含药血清对人脐静脉内皮细胞 ECV304 的增殖和对 VEGF 诱导的 ECV304 的增殖是否具有抑制作用,为深入研究川芎嗪抗血管生成的机制,应用川芎嗪治疗血管新生性疾病(肿瘤、类风湿性关节炎、增殖性视网膜病变等)^[1]提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:盐酸川芎嗪注射液,无锡市第七制药有限公司产品,规格:40 mg/2 mL,批号 011014。RPMI-1640 培养基(Gibco,美国);新生小牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司);

³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)试剂盒(中国科学院上海原子核研究所);四氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、胰酶等,均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 主要仪器:3111 型二氧化碳培养箱 TC2323 (SHELLAB, 美国),LS6500 型液体闪烁计数仪(Beckman, 美国),Ⅲ型多头细胞样品收集器(绍兴卫星医疗设备制造有限公司),TECAN SPECTRA Ⅲ自动酶标仪(澳大利亚),Olympus 倒置相差显微镜(日本)。

1.3 川芎嗪含药血清的制备:取 160~200 g 雌性 Wistar 大鼠 30 只,随机分为 3 组,川芎嗪 143.0、71.5 mg/kg 组,空白对照组(ip 生理盐水),各组 ip 给药,每日 1 次;连续 7 d。末次给药 0.5 h 后,乙醚麻醉,无菌条件下经腹主动脉取血。血液于 4 ℃ 静置 4 h,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液滤过除菌,4 ℃ 冷藏备用。

收稿日期:2004-02-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070915)

作者简介:徐晓玉(1958—),女,四川人,教授,博士生导师,主要从事活血化瘀药及补益药的中药药理学研究,主持国家自然科学基金等科研项目 8 项,发表学术论文 45 篇。Tel: (023)68447637 E-mail: xxy0618@sina.com

1.4 细胞培养与实验分组:人脐静脉内皮细胞系(HUVEC,购于上海细胞生物研究所) ECV304 细胞培养,分为川芎嗪大、小剂量(143.0、71.5 mg/kg)、空白血清对照组:每组分别设 20%、10%、5% 血清 3 组,各组均设复孔 3 个。

1.5 川芎嗪含药血清对 ECV304 细胞增殖的作用

1.5.1 ^3H -TdR 掺入法:取生长期 ECV304 细胞按 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板,在 RPMI-1640 培养液中培养 24 h 至细胞贴壁,用 PBS 冲洗 2 次。换成含 0.5% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 24 h,用不同的大鼠含药血清处理细胞,培养 48 h。每孔加入 ^3H -TdR $3.7 \times 10^6 \text{ Bq}$,继续培养 24 h,用 0.25% 胰酶消化细胞,用多头细胞收集器将细胞抽吸到玻璃纤维滤纸上,用 3% 醋酸水溶液洗涤滤纸 3 次,洗去游离的 ^3H -TdR,烘干,加闪烁液测脉冲计数(cpm)值。

1.5.2 MTT 法:按 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 接种 ECV304 细胞于 96 孔细胞培养板,培养 24 h 使细胞贴壁,用 Hank's 液冲洗 2 次。换成含 0.5% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 24 h 后,加入不同的大鼠含药血清,培养 48 h。每孔加入 200 μL MTT 溶液(5 mg/mL),培养 4 h。每孔加入 200 μL DMSO,振荡混匀。在自动酶标仪上检测吸光度(A)值,检测波长 492 nm。

1.6 川芎嗪含药血清对 VEGF 诱导的 ECV304 细胞增殖的作用

1.6.1 ^3H -TdR 掺入法:细胞培养及处理方法同 1.5.1 项,不同的只是在加入含药血清的同时各组均加入 VEGF(100 ng/mL)。

1.6.2 MTT 法:细胞培养及处理方法同 1.5.2 项,不同的只是在加入含药血清的同时各组均加入 VEGF(100 ng/mL)。

1.7 统计学分析:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件进行方差分析,采用 Newman-Keuls 和 Dunnett's T_3 进行组间比较。

2 结果

2.1 对 ECV304 细胞增殖的影响

2.1.1 ^3H -TdR 掺入法:空白血清对照组各血清不同体积分数组间差异无显著性($P > 0.05$),表明单纯大鼠血清对 ECV304 细胞的增殖均无明显影响。川芎嗪大、小剂量含药血清与空白血清相同体积分数组比较差异显著($P < 0.05$)。结果显示川芎嗪大鼠含药血清对 ECV304 细胞增殖有显著抑制作用,大剂量抑制效果较强,见表 1。

2.1.2 MTT 法:空白血清对照组各血清不同体积分数组间差异无显著性,川芎嗪小剂量含药血清(5%)与空白血清对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。川芎嗪大剂量含药血清和川芎嗪小剂量含药血清(20%、10%)对 ECV304 细胞增殖显著低于空白血清相同体积分数组($P < 0.05$)。实验结果显示川芎嗪大剂量(20%、10%、5%)、小剂量(20%、10%)含药血清对 ECV304 细胞增殖有显著的抑制作用,见表 1。

表 1 川芎嗪对 ECV304 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of TMP on proliferation of ECV304 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂 量	大鼠血清	cpm 值	A 值
	/(mg · kg ⁻¹)	/%		
对照	—	20	5 256.82 ± 183.18	0.823 ± 0.031
	—	10	5 225.83 ± 100.10	0.798 ± 0.015
	—	5	5 120.84 ± 301.49	0.816 ± 0.068
TMP	143	20	3 570.45 ± 130.52**	0.765 ± 0.027*
	143	10	2 430.06 ± 265.98**	0.630 ± 0.017**
	143	5	3 340.45 ± 567.76**	0.720 ± 0.024**
	71.5	20	3 287.25 ± 144.82**	0.749 ± 0.012*
	71.5	10	4 571.14 ± 275.39*	0.775 ± 0.023*
	71.5	5	4 638.56 ± 246.76*	0.809 ± 0.008

与相应的对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

2.2 对 VEGF 诱导的 ECV304 细胞增殖的影响

2.2.1 ^3H -TdR 掺入法:VEGF 能显著刺激 ECV304 细胞的增殖,与生理盐水对照组比较差异显著($P < 0.05$)。川芎嗪大剂量、小剂量(20%)与 VEGF 对照组比较差异显著($P < 0.05$),与生理盐水对照组、空白血清对照组比较,细胞增殖均显著减少($P < 0.05$)。实验结果显示川芎嗪对 VEGF 诱导的 ECV304 细胞增殖有显著的抑制作用,见表 2。

2.2.2 MTT 法:VEGF 显著刺激 ECV304 细胞的增殖($P < 0.05$)。川芎嗪大剂量、小剂量(20%、10%)与 VEGF 对照组相同体积分数的空白血清对照组比较,细胞增殖均显著性减少($P < 0.05$)。实验结果显示川芎嗪对 VEGF 诱导的 ECV304 细胞增殖有显著的抑制作用,见表 2。

3 讨论

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,通过与内皮细胞上两个特殊受体 flt 和 flt/KDR 作用,直接刺激内皮细胞增殖,并产生纤维蛋白溶酶原激活剂(组织型、尿激酶型)和胶原酶等^[2]。现已证实 VEGF 及其家族成员在肿瘤血管生成及其他生理和病理的血管生成中都是必不可少的诱导因子^[3]。研究显示川芎嗪(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抑制体

表2 川芎嗪对 VEGF 诱导的 ECV304
细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of TMP on proliferation of ECV304
induced by VEGF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	大鼠血清/%	cpm 值	A 值
NS	—	3 625.34 ± 315.58	0.621 ± 0.008
VEGF	—	10 694.68 ± 537.25 [#]	0.963 ± 0.009 [#]
VEGF+空白血清	20	7 197.07 ± 169.92 ^{**}	0.924 ± 0.004 [*]
	10	8 052.76 ± 65.19 [*]	0.933 ± 0.014
	5	9 821.82 ± 128.05	0.964 ± 0.004
VEGF+TMP (143 mg/kg)	20	5 405.45 ± 140.90 ^{**△}	0.717 ± 0.003 ^{**△}
	10	5 024.48 ± 100.57 ^{**△}	0.712 ± 0.004 ^{**△}
	5	5 760.46 ± 49.64 ^{**△}	0.726 ± 0.004 ^{**△}
VEGF+TMP (71.5 mg/kg)	20	5 720.09 ± 279.03 ^{**△}	0.693 ± 0.006 ^{**△}
	10	7 526.47 ± 169.21 ^{**}	0.703 ± 0.005 ^{**△}
	5	10 754.90 ± 176.96 [*]	0.953 ± 0.007

与 NS 组比较: [#] $P < 0.01$; 与 VEGF 组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$; 与相应的空白血清对照组比较: [△] $P < 0.05$

[#] $P < 0.01$ vs NS group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs VEGF group; [△] $P < 0.05$ vs corresponding blank serum group

外培养的内皮细胞生长^[4],但其是否能抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的增殖尚无报道。本实验表明川芎嗪能抑制血管内皮细胞的增殖,同时亦能抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞增殖。这可能是其抑制血管生成的机制之一。川芎嗪抑制血管内皮细胞增

殖的机制可能为:①钙离子阻滞作用^[5,6]。②抑制细胞黏附分子^[7]。③对某些参与血管内皮细胞增殖、血管生成过程调控的生长因子的对抗或协同作用。川芎嗪抑制血管内皮细胞增殖的确切机制尚有待进一步研究。

References:

- [1] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors [J]. *Science*, 1987, 235(4787): 442-447.
- [2] Connolly D T, Heuvelman D M, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84(5): 1470-1478.
- [3] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*, 1996, 380(6573): 435.
- [4] Zhou W D, Pan M X, He H B, et al. Effects of Tramethylpyrazine and Aspirin on endothelial cell in culture [J]. *Acad J First Med Coll PLA* (第一军医大学学报), 1992, 12(1): 52-53.
- [5] Stephanie T, Judah F. Protamine is an inhibitor of angiogenesis [J]. *Nature*, 1982, 297(5864): 307-312.
- [6] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, 13(1): 9-22.
- [7] Zeng S Y, Fan S X, Jiang X Q. Inhibitory effects of Ligustrazine on the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells induced by preeclamptic plasma [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2000, 35(5): 282-284.

引流熊胆的抗溃疡作用

洪雪梅¹, 金春玉², 朴世浩²

(1. 吉林省延边第二人民医院 内科, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林省延边大学医学院 药理教研室, 吉林 延吉 133000)

熊胆 (bear bile) 为熊科动物黑熊 *Selenarctor thibetanus* G. Curier 或棕熊 *Ursus arctor* Linnaeus 的干燥胆汁。习以杀熊取胆,但近年国内广泛采用导管活体引流熊胆汁再经干燥而制得,称引流熊胆。熊胆为我国稀有珍贵中药材之一,具有利胆溶石、抗炎、解热、镇痛、扩冠、降压、调血脂等药理作用^[1~3],临床用于治疗多种疾病,且毒性低、副作用少,有很高的应用价值。目前尚未见有关引流熊胆对实验性胃溃疡作用的研究报道。本研究观察引流熊胆对大鼠急、慢性实验性胃溃疡的防治作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物:Wistar 大鼠,体重 200~250 kg,雌雄兼

用,由延边大学医学院实验动物科提供。

1.2 药品:干燥引流熊胆 (含牛黄去氧胆酸 42.8%),由延边经济动物研究所提供,临用时用蒸馏水配制。甲氰咪胍 (Cimetidine, CT),上海第一制药厂生产,批号 970505,临用时用蒸馏水配制。利血平注射液,上海医科大学红旗制药厂生产,批号 960313。消炎痛粉,沈阳市第五制药厂生产,临用时溶于 5% NaHCO₃ 溶液,再用蒸馏水稀释。五肽胃泌素,美国 Sigma 公司产品。

2 方法与结果

2.1 对大鼠醋酸型胃溃疡的影响:取大鼠 40 只,雌雄不拘,随机分为模型组、CT (0.2 g/kg) 组和引流熊胆 0.05、0.1、0.2 g/kg 组。按文献方法^[4]将

收稿日期:2004-01-11

作者简介:洪雪梅(1970—),女(朝鲜族),吉林省延吉市人,吉林省延边大学医学院药理学硕士,现任吉林省延边第二人民医院内科主治医师。Tel: (0433) 2911153