

作用 HO-8910PM 细胞 24 h 后,明显抑制 NF- κ B P65 亚基的表达,从而调控靶基因如 VEGF、尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 和 FAK 的表达,降低 HO-8910PM 细胞的侵袭转移能力。Smad3 是转化生长因子- β (TGF- β) 信号转导通路中的一个关键的信号分子。研究表明,磷酸化激活 Smad 后,Smad3-Smad4 复合物与 Smad 结合元件 (Smad binding element, SBE) 结合,启动相关靶基因的表达,从而影响肿瘤的发生与发展。TGF- β 通常会抑制细胞生长,但是,有研究表明 TGF- β 在很多晚期实质性肿瘤会过度表达,有利于肿瘤细胞逃避免疫监控,并促进肿瘤新生血管生成。Lindemann^[11] 的研究表明,在侵袭性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,两种 TGF- β 的抑制物 SB-202190 和 SB-203580 可明显延迟由 TGF- β 诱导的 Smad3 在核中的堆积,并下调纤维酶原激活物的抑制因子 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 和 uPA 的表达,抑制 MDA-MB-231 的侵袭能力。研究中首次发现,5F 也能明显抑制 Smad3 蛋白的表达,推测 5F 能降低 TGF- β 蛋白表达水平,从而影响侵袭转移相关蛋白 VEGF、uPA 的表达,抑制 HO-8910PM 细胞的侵袭转移能力。癌基因 ETS 家族也在肿瘤发生发展中起着重要作用,特别是其作为转录因子在肿瘤转移中的调控作用。研究表明癌基因 ETS 影响蛋白水解酶的表达以及肿瘤的血管生成。ETS-1 是研究较多的 ETS 家族成员,作为转录因子在细胞侵袭运动、血管生成、细胞凋亡等中发挥重要作用^[12,13]。5F 作用 HO-8910PM 细胞使 ETS-1 mRNA 的表达下降,从而影响肿瘤细胞的侵袭转移能力。5F 抗高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞侵袭转移的作用机制与 NF- κ B、Smad3 和 ETS-1 这 3 个靶点密切相关。

References:

- [1] Wang J B, Liang N C, Mo L E. The effects of a diterpenoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on the activity and expression of mitogen activated protein kinase in k562 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(3): 294-297.
- [2] Wang J B, Liang N C, Mo L E. The effects of a diterpenoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on the expressions of several oncogenes of k562 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18(4): 418-421.
- [3] Xu S H, Qian L J, Niu H Z, et al. Establishment of a highly metastatic human ovarian cancer cell line (HO-8910PM) and its characterization [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 1999, 18(2): 233-239.
- [4] Wang D N, Zhao Y W, Tian H R. Protein quantification with coomassie brilliant blue microplate-colorimetric [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2001, 22(6): 528-529.
- [5] Xie D H, Tang X D, Xia S J, et al. Expressions of NF- κ B in human bladder cancer and its clinical significance [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2002, 21(6): 663-667.
- [6] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6519-6525.
- [7] Perkins N D. Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF- κ B [J]. *Oncogene*, 2003, 22(48): 7553-7556.
- [8] Scialas G M, Fujioaka S, Schmidt C, et al. NF- κ B in pancreatic cancer [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2003, 33(1): 15-26.
- [9] Lin A, Karin M. NF- κ B in cancer: a marked target [J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(2): 107-114.
- [10] Orłowski R Z, Baldwin A S. NF- κ B as a therapeutic target in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(8): 385-389.
- [11] Lindemann R K, Nordheim A, Dittmer J. Interfering with TGF β -induced Smad3 nuclear accumulation differentially affects TGF β -dependent gene expression [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 20-22.
- [12] Rothhammer T, Hahne J C, Florin A, et al. The Est-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(1): 118-128.
- [13] Mukherjee T, Kumar A, Mathur M, et al. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(7): 430-436.

药根碱、小檗碱、黄连煎剂及模拟方对小鼠血糖的影响

付 燕^{1,2}, 胡本容¹, 汤 强¹, 付 琴¹, 张庆业¹, 向继洲¹

(1. 华中科技大学同济医学院 药理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 广州市脑科医院, 广东 广州 510000)

摘要:目的 研究药根碱 (Jat) 的降血糖作用, 并比较 Jat、小檗碱 (Ber)、黄连煎剂 (HLD) 及模拟方 (Ber+Jat) 对小鼠血糖水平的影响。方法 采用薄层扫描法测定 HLD 中 Ber 和 Jat 的质量分数, 并根据其比值配制模拟方。

收稿日期: 2004-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171151)

作者简介: 付 燕 (1979—), 女, 湖北省黄石市人, 药理学专业硕士, 研究方向为心血管药理和神经药理学。

E-mail: Fuyan_1111@hotmail.com

小鼠 ip 四氧嘧啶制备糖尿病模型,模型小鼠和正常小鼠均 ig 给予不同剂量 Jat、Ber、HLD 和模拟方,葡萄糖氧化酶法测定血糖。结果 Jat、Ber、HLD 和模拟方均有不同程度的降低糖尿病和正常小鼠血糖的作用,HLD 作用最强,Jat 较同剂量 Ber 作用弱,模拟方与单用 Ber 作用相当。结论 黄连中可能还有除 Ber 和 Jat 之外的降血糖成分,以天然成分比例配伍 Ber 和 Jat,未见明显协同或拮抗作用。

关键词:药根碱;小檗碱;黄连煎剂;血糖

中图分类号:R286.72

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0548-04

Effect of jatrorrhizine, berberine, Huanglian Decoction and compound-mimic prescription on blood glucose in mice

FU Yan^{1,2}, HU Ben-rong¹, TANG Qiang¹, FU Qin¹, ZHANG Qing-ye¹, XIANG Ji-zhou¹

(1. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou 510000, China)

Abstract: Objective To study the hypoglycemic activity of jatrorrhizine (Jat) and compare the effects of Jat, berberine (Ber), Huanglian Decoction (HLD), and compounds-mimic prescription (Ber+Jat) on blood glucose level in mice. **Methods** TLC-scanning method was adopted for the determination of Ber and Jat in HLD. Ber+Jat was made artificially according to the result of the TLC-scanning. Diabetic model mice were made by ip alloxan, diabetic and normal mice were given Jat, Ber, HLD, and Ber+Jat in different dose by ig and applied in the study. Blood glucose level was analyzed by spectrophotometry with glucose-oxidase. **Results** Jat, Ber, HLD, and Ber+Jat decreased blood glucose level of diabetic and normal mice at different degrees. HLD showed the most significant hypoglycemic activity. Jat also possessed the function of decreasing blood glucose, which was less than that of Ber at the same dose. There was no significant difference between Ber+Jat and Ber. **Conclusion** It implies that there are some other hypoglycemic ingredients in HLD besides Ber and Jat. Jat has no evident synergistic or antagonistic action when coexisted with Ber in natural ratio.

Key words: jatrorrhizine (Jat); berberine (Ber); Huanglian Decoction (HLD); blood glucose

黄连性苦寒,主清胃火,自魏晋时代始,已有用黄连治疗消渴(基本属于现代医学的糖尿病)的记载。小檗碱(berberine, Ber)是黄连中的主要成分之一,能降低正常小鼠和四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖^[1],并对Ⅱ型糖尿病有较好的疗效^[2]。药根碱(jatrorrhizine, Jat)也是黄连所含的一种生物碱,与 Ber 化学结构非常相似。为探讨 Jat 是否也有降糖作用、黄连的降糖作用是否为 Ber 和 Jat 的综合作用、Ber 和 Jat 之间是否又存在着相互作用等问题,本实验研究了 Jat 对小鼠的降血糖作用,并对 Jat、Ber、黄连煎剂(Huanglian Decoction, HLD)及按 Ber 和 Jat 天然成分比值人工配制的模拟方(Ber+Jat)对小鼠血糖的影响进行了比较研究。

1 材料

1.1 药品与试剂:HLD 的制备:四川产黄连 40 g (购自武汉同济医院药剂科)制成粗粉,加水适量煮沸 30 min,滤过,共煮 3 次,合并 3 次滤液,浓缩至 40 mL,即相当于含生药 1 g/mL,用时稀释至 0.2 g/mL。盐酸小檗碱,中国药品生物制品检定所,纯度>95%,批号 200001;盐酸药根碱,中国药品生物制品检定所,纯度为 98%,批号 200004。根据薄层

扫描法测定 HLD、Ber 和 Jat 的质量分数及比值,人工配置模拟方。四氧嘧啶:Sigam 公司,批号 A7413。苯、甲醇、异丙醇、醋酸乙酯等所用试剂均为分析纯。葡萄糖测定试剂盒:上海荣盛生物公司。

1.2 动物:昆明种小鼠,体重(20±2)g,雄性,由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。

1.3 仪器:日本岛津 CD-9301 薄层扫描仪, TU-1221 紫外分光光度计(北京市通用仪器设备公司)。

2 方法

2.1 HLD 中 Ber 和 Jat 质量分数的测定:精密称取盐酸小檗碱 5.00 mg 和盐酸药根碱 1.00 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,得 0.5 mg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液和 0.1 mg/mL 盐酸药根碱对照品溶液。将 1 g/mL HLD 稀释至 0.02 g/mL,即得供试品溶液。展开剂:苯-醋酸乙酯-甲醇-异丙醇-水(6:3:3:1.5:0.5)。参照《中华人民共和国药典》2000 年版一部方法,用微量点样器分别吸取 1、2、3、4、5 μL 对照品溶液和 5 μL 供试品溶液点在同一硅胶 G 薄板上,依法展开,取出晾干,扫描测定。

2.2 HLD 给药剂量折算方法:经薄层扫描法测定

HLD 中含 Ber 和 Jat 分别为 0.455、0.095 mg/mL,相当于生药中含 Ber、Jat 分别为 2.27%、0.475%。按文献方法^[1]中 Ber 的给药剂量 50 mg/kg 折算成含有同量小檗碱的 HLD 给药剂量应为 2 202 mg/kg。

2.3 模拟方的配制方法:根据生药中约含有 Ber 2.27% 和 Jat 0.475%,即 Ber 和 Jat 质量分数比例约为 5:1,按此比例称取盐酸小檗碱和盐酸药根碱混合后配制成模拟方。

2.4 糖尿病动物模型制备及分组^[3]:健康成年小鼠 100 只,禁食 18 h,除正常对照组 10 只小鼠 ip 生理盐水 0.1 mL/10 g 外,其余 90 只小鼠均 ip 四氧嘧啶 250 mg/kg。72 h 后小鼠眼眶取血,测定小鼠空腹血糖值。选择血糖值大于 15.1 mmol/L 者即为糖尿病模型小鼠,随机分为 6 组:Jat 50、100 mg/kg 组;Ber 50 mg/kg 组;HLD 生药 2 202 mg/kg (相当于 Ber 50 mg/kg 和 Jat 10 mg/kg) 组;模拟方 (Ber 50 mg/kg+Jat 10 mg/kg) 组;模型组 (生理盐水 0.1 mL/10 g),每组 10 只小鼠。各组 ig 给予相应剂量药物,连续 5 d,在末次给药后 3 h,眼眶采血测空腹血糖。

2.5 对正常小鼠血糖的影响:健康成年小鼠 70 只,禁食 2 h,随机分成 7 组:Jat 25、50、100 mg/kg 组;Ber 50 mg/kg 组;HLD 生药 2 202 mg/kg 组;模拟方 (Ber 50 mg/kg+Jat 10 mg/kg) 组;正常对照 (生理盐水 0.1 mL/10 g) 组,每组 10 只小鼠,各组 ig 给予相应剂量药物 1 次,给药后 3 h,眼眶采血测空腹血糖。

3 结果

3.1 HLD 中 Ber 和 Jat 的质量分数测定结果:以峰面积 (Y) 为纵坐标,对照品质量 (X) 为横坐标,得 Ber 和 Jat 回归方程分别为 $Y = 2\,651 X + 89.171$, $r = 1.000$; $Y = 1\,937.5 X + 32.239$, $r = 0.997$ 。Ber 和 Jat 线性范围分别为 0.5~2.5 mg 和 0.1~0.5 mg。供试品中 Ber 和 Jat 质量分数分别为 0.455 和 0.095 mg/mL,相当于生药中含 Ber 和 Jat 分别为 2.27%、0.475%。

3.2 对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠血糖的影响:结果见表 1。Jat、Ber、HLD 及模拟方均有不同程度降低糖尿病小鼠血糖的作用,HLD 效果最明显,模拟方组与 Ber 组影响差异无显著性,Jat 较同剂量 Ber 降糖作用弱。

3.3 对正常小鼠血糖的影响:结果见表 2。HLD、Ber、Jat 及模拟方均有不同程度降低血糖作用,

HLD 效果最明显,模拟方组与 Ber 组差异无显著性,Jat 较同剂量 Ber 降糖作用弱。

表 1 Jat、Ber、HLD 及模拟方对四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of Jat, Ber, HLD, and Ber+Jat on blood glucose in diabetic mice induced by alloxan ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	血糖/(mmol · L ⁻¹)
正常对照	—	5.8±1.3
模型	—	21.6±1.4 ^{##}
Ber	50	15.9±1.9 ^{***△△}
Jat	50	17.4±2.8 ^{**}
	100	16.4±1.1 ^{**}
HLD	2 202	12.8±1.1 ^{***▽▽}
Ber+Jat	50+10	15.8±1.6 ^{**}

与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型对照组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$; 与 Jat 50 mg/kg 组比较: [△] $P < 0.05$; 与 HLD 组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与 Ber + Jat 组比较: ^{▽▽} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs Jat 50 mg/kg group; ^{△△} $P < 0.01$ vs HLD group; ^{▽▽} $P < 0.01$ vs Ber + Jat group

表 2 Jat、Ber、HLD 及模拟方对正常小鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of Jat, Ber, HLD, and Ber+Jat on blood glucose in normal mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	血糖/(mmol · L ⁻¹)
正常	—	5.9±1.2
Ber	50	3.4±0.8 ^{***△△}
Jat	25	5.7±1.6
	50	4.8±0.9 [*]
	100	4.6±0.7 ^{**}
HLD	2 202	2.2±0.7 ^{***▽}
Ber+Jat	50+10	4.1±1.5 [*]

与正常组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 Jat 50 mg/kg 组比较: [△] $P < 0.05$; 与 HLD 组比较: ^{△△} $P < 0.05$; 与 Ber + Jat 组比较: [▽] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs normal group; [△] $P < 0.05$ vs Jat 50 mg/kg group; ^{△△} $P < 0.05$ vs HLD group; [▽] $P < 0.05$ vs Ber + Jat group

4 讨论

单味中药成分繁多,在明确各主要成分药理效应的基础上,寻找合理的中药成分配伍,发挥各成分间的协同作用,消除或减少某些成分的毒性或副作用,是加速中医药现代化,化繁为简的思路之一。黄连治疗糖尿病已有悠久的历史,疗效确切。Ber 是黄连中的主要单体之一,临床和动物实验都证实 Ber 能降低血糖^[4,5],改善胰岛素抵抗^[6],并对 I 型糖尿病有较好的疗效。Jat 也是黄连中的一种异喹啉生物碱,为 Ber 的同系物。本实验证实 Jat 在 50、100

mg/kg 能剂量依赖性降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠和正常小鼠血糖,提示 Jat 也是黄连治疗糖尿病的有效成分之一。但其降糖作用不及同量的 Ber,推测可能是 Ber 对 α 肾上腺素受体的阻断作用强于 Jat^[7],而更强地降低交感神经张力,抑制肾上腺皮质功能,从而抑制糖异生。为进一步研究 Jat 与 Ber 以天然比例配伍是否存在相互作用,本实验又观察了按 Ber 和 Jat 天然比例配制的模拟方对小鼠血糖的影响。结果表明,模拟方的降糖作用与单用同剂量的 Ber 相当,提示 Ber 和 Jat 以天然比例配伍未见明显协同或拮抗作用,但不能排除黄连中可能还存在其他的重要成分与 Ber、Jat 之间有着复杂的相互作用,或 Ber 和 Jat 之间存在更佳的比例组合,仍须进一步研究验证。而 HLD 的降血糖作用比单用 Ber、Jat 和模拟方都强,恰好提示了黄连中除了 Ber 和 Jat 之外,可能还有其他成分起着重要作用。

References:

- [1] Chen Q M, Xie M Z. Studies on the hypoglycemic effect of *Cortis chinensis* and berberine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1986, 21(6): 401-406.
- [2] Hu F G, Du B X. Clinical study on treatment of type 2 diabetes with berberine [J]. *Pract J Integration Chin West Med* (实用中西医结合杂志), 1995, 8(6): 358-359.
- [3] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [4] Chen Q M, Xie M Z. Effects of berberine on blood glucose regulation of normal mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 22(3): 161-165.
- [5] Tao Y, Cui X L. Clinical study on treatment of type 2 diabetes with berberine plus Chinese herbal medicines [J]. *Pract J Integration Chin West Med* (实用中西医结合杂志), 1995, 8(10): 602.
- [6] Gao C R, Zhang J Q, Huang Q L. Experimental study on berberine raised insulin sensitivity in insulin resistance rat models [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1997, 17(3): 162-164.
- [7] Han H, Fang D C. The blocking and partial agonistic actions of jatrorrhizine on α -adrenoceptors [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1989, 10(5): 385-389.

川芎嗪含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖的抑制作用

丰俊东,徐晓玉

(重庆医科大学中医药学院,重庆 400050)

摘要:目的 观察川芎嗪(TMP)含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖的影响。方法 选用 SD 雄性大鼠 30 只,随机分成 3 组,分别 ip TMP 143.0、71.5 mg/kg、生理盐水 0.8 mL,制备 TMP 大、小剂量组及生理盐水组含药血清,采用 RP-HPLC 法测定含药血清中 TMP 的质量浓度。将各组含药血清作用于人肝癌细胞 Hep G₂ 48 h,MTT 法测定不同质量浓度 TMP 含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖的抑制作用。结果 TMP 大剂量组血清(20%、10%、5%),TMP 小剂量组血清(20%、10%)对人肝癌细胞 Hep G₂增殖较生理盐水组有显著抑制作用($P < 0.05$),最高抑制率可达 46.1%。结论 TMP 含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖有一定的抑制作用。

关键词:川芎嗪;人肝癌细胞 Hep G₂;高效液相色谱;MTT 法

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0551-03

Inhibition of tetramethylpyrazine-containing serum on proliferation of human liver cancer cells Hep G₂

FENG Jun-dong, XU Xiao-yu

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To observe the effects of rat tetramethylpyrazine (TMP)-containing serum on the proliferation of human liver cancer cells Hep G₂. **Methods** Thirty SD male rats were divided into three groups randomly and the serum was collected after ip TMP with the dosage of 143.0, 71.5 mg/kg or NS 0.8 mL to prepare the TMP-containing serum in large- and small-dose groups and NS group as well. A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was used to determine the TMP concentration in rat serum. Human liver cancer cells Hep G₂ was treated with rat TMP-containing serum for 48 h. Inhibition of the TMP-containing serum on proliferation of Hep G₂ was detected by MTT

收稿日期:2004-07-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070915)

作者简介:丰俊东(1978—),女,黑龙江人,在读博士,主要从事中药药理研究。

Tel: (023) 89014331 E-mail: FengJunDong2001@sohu.com