

的大鼠胃溃疡均有明显的保护作用,不同之处在于新健胃片 0.50 g/kg 可加快小鼠胃排空,这对改善胃胀明显有益。新健胃片的促进胃排空作用可能与其中的多种中药成分密切相关。

体外实验表明,新健胃片具有明显的中和胃酸作用,且有明显的剂量相关性,1 mg 新健胃片可中和胃液约 0.1 mL,其中和作用成分为 NaHCO_3 ,新健胃片对胃酸的中和作用可快速升高胃液 pH 值,改善由于胃酸过多或胃酸刺激引起的胃部不适。本

实验中所观察到的新健胃片减少胃酸总量的作用实质为对胃酸的中和作用,而非抑制胃酸的分泌,这与传统的胃酸抑制剂明显不同。

References:

- [1] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [2] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.

小白菊内酯诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的实验研究

宋晓凯,张 雯

(天津理工大学生物与化学工程学院,天津 300191)

小白菊内酯属于倍半萜内酯,是墨西哥、印度药用植物的活性成分,也是欧洲小白菊这一常用草药的活性成分^[1],主要用于治疗偏头痛、炎症和各种肿瘤。20 世纪 90 年代末,中国学者从中国特有药用植物观光木树皮中分离得到这一抗肿瘤活性物质,并且经过体外抑瘤实验证实,小白菊内酯 (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对人肝癌细胞的体外抑制率为 67.17%,可见其对入肝癌细胞抑制作用比较明显^[2]。近年来,随着医学技术和分子生物学技术的发展及各种检测手段的出现,发现小白菊内酯可抑制 NF- κB 的激活^[3,4],诱导细胞凋亡^[1],产生细胞毒作用^[5,6]。但有关从分子生物学水平研究小白菊内酯对人肝癌细胞的作用机制还未见报道。本研究旨在探讨小白菊内酯对体外培养的人肝癌 BEL-7402 细胞生长的影响及作用机制,为其应用于肝癌的化学预防和治疗提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物、主要试剂和设备:小白菊内酯(质量分数>99%,HPLC)购自上海康成生物工程有限公司,用三蒸水配制成 10.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 储存液。MTT,每瓶 250 mg,由 Sigma 公司分装;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自中国科学院血液病研究所;二甲基亚砜(DMSO)购自上海光铎科技有限公司(上海新华化工厂);PBS(磷酸盐缓冲液)购自北京中山生物公司;溴化乙锭(EB)由 Sigma

公司分装;TE 缓冲液购自上海基康生物技术有限公司;RNase 购自上海贝塔生物制品有限公司;蛋白酶 K 购自北京拜尔迪生物技术有限公司;琼脂糖购自北京邦定生物医学公司;Giemsa 染料购自 Fluka 公司;氯仿、异戊醇、饱和酚、无水乙醇、甲醇均为分析纯。环磷酸腺苷购自恒瑞医药股份有限公司。倒置式生物显微镜(Nikon ECLIPSE TE 300);5% 二氧化碳培养箱(Thermo Forma MODEL 3111);自动酶标读数仪(TACAN SPECTRA I);三恒电泳仪 DYY-II B 型(BGXP- $\Phi 5 \times 20$);凝胶成像系统。

1.2 细胞株及培养:人肝癌 BEL-7402 细胞株由北京医科大学实验中心细胞库提供。用 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中常规培养。取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 细胞增殖抑制作用的测定:采用 MTT 比色法,将对数生长期的肝癌细胞制备成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板内,每孔 200 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养,待细胞生长一定浓度后换上含有不同质量浓度药物的培养液,各设 6 个复孔,对照组不加药,继续培养 48 h,加入 0.5% MTT (5.0 mg/mL),每孔 20 μL ,孵育 4 h,再加入 DMSO 100.0 μL ,轻微振荡使紫色沉淀溶解,用酶标仪测定 492 nm 波长处的吸光度(A)值,计算抑制率。

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

收稿日期:2005-04-05

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(033607611);天津市高校科技发展基金项目(2001YY15)

作者简介:宋晓凯,男,教授,药理学博士,硕士生导师。Tel: (022) 23679245 Fax: (022) 23679249 E-mail: sxk581214@eyou.com

1.4 倒置显微镜观察:细胞培养同 1.3 项,加小白菊内酯 (15.0 $\mu\text{g/mL}$) 培养 48 h,于倒置显微镜下观察培养瓶内加药组和未加药组的细胞形态变化情况。

1.5 Giemsa 染色:96 孔板培养细胞同 1.3 项。小白菊内酯 (15.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理细胞。染料液配置:Giemsa 染料 0.5 g,甘油 22.0 mL,甲醇 33.0 mL 混合,静置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中 12 h,备用。取染料液 5.0 mL,加入 PBS 50.0 mL,混匀。将混合液加入 96 孔板内,固定 30 min,镜下观察,PBS 分色。

1.6 DNA 琼脂糖凝胶电泳:小白菊内酯 (7.5、15.0 $\mu\text{g/mL}$) 及环磷酰胺 (16.7 mg/mL) 作用 BEL-7402 细胞一定时间后,收集细胞,用 PBS 洗涤数次,加入 0.5 mL 细胞裂解液、10.0 μL 蛋白酶 K (20.0 mg/mL) 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜后,用等体积的饱和酚萃取,10 000 r/min 离心 5 min,取上层,加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 除蛋白,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 3 倍体积的无水乙醇、1/10 体积 (3.0 mol/L) 的醋酸钠,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 20 min 后取出,10 000 r/min 离心 15 min,将沉淀用 70.0% 乙醇洗涤 2 次,空气干燥。加入 200.0 μL TE 缓冲液溶解,加 RNase 2.0 μL (10.0 mg/mL) 反应 30 min (37 $^{\circ}\text{C}$)。取上述样品 10.0 μL ,在 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,75 V 电泳 1.5 h,摄像。

1.7 统计学处理:采用线性相关分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 对细胞增殖的影响:不同质量浓度小白菊内酯作用细胞后,细胞增殖受到不同程度的抑制,这一抑制作用随小白菊内酯质量浓度的升高而增强;组间两两比较差异均非常显著 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 小白菊内酯对 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用 ($n=6$)

Table 1 Inhibition of parthenolide on BEL-7402 cells proliferation ($n=6$)			
组别	$p/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
对照	—	0.160 $\pm$ 0.390	—
小白菊内酯	5	0.140 $\pm$ 0.021	12.5
	7.5	0.114 $\pm$ 0.005	28.75
	10	0.120 $\pm$ 0.012	25.00
	15	0.106 $\pm$ 0.007	33.75
	20	0.121 $\pm$ 0.008	24.38
	30	0.122 $\pm$ 0.008	23.75
	40	0.121 $\pm$ 0.006	24.38
	80	0.110 $\pm$ 0.009	26.25
	100	0.115 $\pm$ 0.007	28.12

2.2 形态学观察

2.2.1 倒置显微镜观察:正常组可见细胞生长状态

良好,细胞呈多边形;加小白菊内酯 (15.0 $\mu\text{g/mL}$) 后,细胞形态发生变化:细胞体积减小,呈圆形,细胞核浓缩,见图 1。

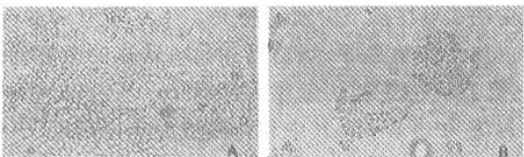
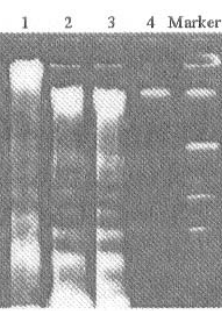


图 1 小白菊内酯对 BEL-7402 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of parthenolide on BEL-7402 cell growth
2.2.2 Giemsa 染色结果:小白菊内酯 (15.0 $\mu\text{g/mL}$) 作用于细胞后可见凋亡小体出现,呈蓝紫色,散落在细胞内外;阳性表达细胞呈浅蓝色。



1-环磷酰胺 (16.7 mg/mL) 2,3-小白菊内酯 (7.5, 15 $\mu\text{g/mL}$) 4-细胞对照
1-Cytosoxan (16.7 mg/mL) 2,3-parthenolide (7.5, 15 $\mu\text{g/mL}$) 4-cell control

图 2 BEL-7402 细胞 DNA 凝胶电泳图谱

Fig. 2 DNA gel electrophorogram of BEL-7402 cells

2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳: BEL-7402 细胞经 7.5、15.0 $\mu\text{g/mL}$ 小白菊内酯处理 48 h 后,出现典型的 DNA 梯形条带,而环磷酰胺组细胞也出现凋亡的梯形条带,见图 2。

3 讨论

本实验发现小白菊内酯对 BEL-7402 细胞的抑制作用随质量浓度增大而增强,但随药物质量浓度继续增大,其抑制率开始下降;在药物的高质量浓度范围内,抑制率基本保持恒定。可见小白菊内酯能明显抑制体外培养的 BEL-7402 细胞的生长,在低质量浓度范围内其抑制作用具有量效关系。

本实验中经倒置显微镜可见细胞体积缩小、核固缩;经 Giemsa 染色观察到凋亡小

体的形成,典型的细胞凋亡形态学变化,此结果表明小白菊内酯可诱导人肝癌细胞凋亡。DNA 琼脂糖凝胶电泳显示,小白菊内酯作用细胞,使细胞 DNA 损伤,出现凋亡细胞的特征性 DNA 梯状条带,进一步证实了小白菊内酯诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡。

综上所述,小白菊内酯可抑制人肝癌细胞株 BEL-7402 生长,并具有量效关系;亦能诱导人肝癌细胞的凋亡。诱导细胞凋亡可能是其抑制细胞增殖的机制,这可能是其防癌抗癌作用的主要机制之一。但其诱导凋亡的机制值得深入研究。

致谢:天津中医学院中心实验室及范英昌等老师的大力协助。

References:

- [1] Pozarowski P, Halicka D H, Parzykiewicz Z. NF-kappaB inhibitor sesquiterpene parthenolide induces concurrently a typical apoptosis and cell necrosis: difficulties in identification of dead cells in such cultures [J]. *Cytometry*, 2003, 54A (2): 118-141.
- [2] Song X K, Wu L J, Tu P F. Studies on bioactive constituents in bark of *Tsoongiodendron odoratum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(8): 283-285.
- [3] Witek-awada B, Koj A. Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2003, 54(4): 489-534.
- [4] Fan X. Methvalalvoxal-bovine serum albumin stimulates tumor necrosis factor alpha secretion [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409(2): 274-286.
- [5] Martin-Ventura I L, Blanco-Colio L M, Munoz-Garcia B. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability [J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 458-520.
- [6] Yang C, Yuan C, Jia Z. Xanthanolides, germacranolides, and other constituents from *Carpesium longifolium* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66(12): 1554-1560.

人参花蕾皂苷对脑缺血-再灌注损伤大鼠的抗氧化作用及其机制

张丽君¹, 吕文伟², 王 志², 金永日³, 孙连坤^{2*}

(1. 延边大学医学院附属医院 心内科, 吉林 延吉 133000; 2. 吉林大学基础医学院, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学化学学院, 吉林 长春 130021)

有研究表明脑缺血-再灌注损伤的发病机制中氧自由基起着重要的作用^[1]。人参花和花蕾平时被人们作为有益健康的中药加入到茶、洗发露中使用, 而不作为药物来使用。Yahara 等^[2]在干燥的高丽参的花和花蕾混合物中分离出 20(S) 人参皂苷 Rd、Re 和 Rg₁, 但它们的药理作用还不清楚。本实验探讨本校化学教研室提取的人参花蕾皂苷 (flower-buds ginsenoside, FBG) 是否具有减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤的作用, 并通过观察脑皮质中脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 量的变化及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和 mRNA 基因的表达探讨其作用机制。

1 材料

1.1 试剂和药品: 谷胱甘肽和 GSH 购于 Sigma 公司。TBA、TCA 和 DTND 购于 Wako 公司。人参花蕾皂苷 [FBG, 含有 20(S)-人参皂苷 Rd 7.2%、20(S)-人参皂苷 Re 39.1%、20(S)-人参皂苷 Rg₁ 3.3%] 由吉林大学化学中心提供。GSH、MDA 和 SOD 检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 实验动物: 健康 Wistar 大鼠, 体重 (25±10) g, 雌雄不拘, 由吉林大学实验动物中心提供, 合格证

号 SCXK—(吉) 2003-2004。

2 方法

2.1 分组、给药及造模: 大鼠 32 只, 随机分为对照组, 模型组, FBG 低、高剂量组, 每组 8 只。FBG 组于造模前分别按 25、50 mg/kg ip 给予生理盐水溶解的 FBG, 每天 1 次, 持续 7 d。模型组和对照组大鼠 ip 等量生理盐水。模型组和 FBG 组大鼠通过改良的四血管结扎法^[3]进行 10 min 短暂脑缺血处理。大鼠用 50 mg/kg 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 椎动脉用电烙术进行永久性封闭, 颈动脉用尼龙和聚乙烯管制的扣子结扎, 尼龙和聚乙烯管制的扣子可通过细小的皮肤切口进行放松和收紧。此后用 30% O₂ 和 70% N₂ 混合的三氟溴氯乙烷进行吸入性麻醉。左、右侧颈动脉被同时收紧 10 min, 即大鼠缺血 10 min 后, 再放松, 使脑动脉血流进行 4 h 再灌注, 观察大鼠死亡率。另取 32 只大鼠, 分组、造模及给药方法同上, 脑动脉血流再灌注 1 h 后, 过量戊巴比妥钠麻醉处死大鼠, 断头取脑皮质, 冻于液氮中备用。

2.2 脑皮质中 MDA 和 GSH 水平的测定: 脑皮质组织冰浴匀浆, 分别根据试剂盒方法测定脑皮质匀浆中 GSH 和 MDA 的水平、SOD 活性及匀浆液中总蛋白水平。

收稿日期: 2005-03-15

作者简介: 张丽君 (1963—), 女, 吉林省九台市人, 主治医师, 研究方向为心血管疾病诊断及治疗。Tel: (0433) 2660224

* 通讯作者 孙连坤 Tel: (0431) 5619485