

表达逐渐减弱,Bax 蛋白的表达无明显变化,Bcl-2/Bax 逐渐降低,细胞凋亡率逐渐增加。有学者认为 UA 通过抑制 Bcl-2 表达并同时增加 Bax 表达而促进肿瘤细胞凋亡^[3,7],这与本实验结果不尽相同。由此推测:UA 对凋亡相关基因的影响可能因细胞不同而有所差异,UA 可能通过下调凋亡抑制基因 Bcl-2 表达,进而下调 Bcl-2/Bax,从而促进 SGC7901 细胞凋亡。

综上所述,本研究证实 UA 对胃癌细胞 SGC7901 有明显的生长抑制作用,其具体机制可能与细胞毒作用、干扰细胞周期而抑制细胞增殖以及下调凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达促进凋亡有关。

References:

- [1] Subbaramaiah A D, Liu J J, Nilsson A, et al. Ursolic acid stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3317-3322.
- [2] Baek J H, Lee Y S, Kang C M, et al. Intracellular Ca^{2+} release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells [J]. *Int J Cancer*, 1997, 73(5): 725-728.
- [3] Hsu Y L, Kuo P L, Lin C C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75(19): 2303-2316.
- [4] Hollosv F, Ldei M, Csorba G, et al. Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(5): 3485-3491.
- [5] Kanzler S, Galle P R. Apoptosis and the liver [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(3): 173-184.
- [6] Jo E H, Hong H D, Ahn N C, et al. Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of livorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in MCF-7 human breast cancer cell [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6): 1715-1719.
- [7] Harmand P O, Duval R, Delage C, et al. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 1-11.

女贞子对去卵巢大鼠钙代谢及维生素 D 依赖型基因表达的影响

张 岩^{1,2}, 黄文秀^{2,4}, 陈 斌³, 梁秉中⁵, 吴春福¹, 姚新生³

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中药及分子药理国家重点实验室, 广东 深圳 518057;

3. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 4. 香港理工大学 应用生物与化学技术系, 香港;

5. 香港中文大学 矫形外科及创伤学系, 香港)

摘 要:目的 研究补肾中药女贞子对去卵巢大鼠钙代谢及维生素 D 依赖型基因表达的影响。方法 大鼠去卵巢手术处理 4 周后, ig 给药治疗 14 周。血清、尿液及粪便中钙水平采用比色法测定。RT-PCR 技术分析小肠及肾脏基因表达。结果 大鼠去卵巢后体内钙流失显著增加, 表现在血钙下降, 尿钙及粪钙排泄增加。女贞子可以有效防止尿钙及粪钙排泄增加, 并恢复血钙水平。RT-PCR 分析表明雌二醇和女贞子都可以抑制去卵巢引起的小肠维生素 D 受体 (VDR) mRNA 表达下降。女贞子对肾脏 25-羟基维生素 D 1-羟化酶 (1-OHase) 及 25-羟基维生素 D 24-羟化酶 (24-OHase) mRNA 无明显作用, 但却可以提高肾脏钙结合蛋白-9k (CaBP-9k) 及钙结合蛋白-28 k (CaBP-28k) 的基因表达。结论 女贞子能够改善雌激素缺乏所引起的钙失衡状态, 主要是通过提高小肠对活性维生素 D 的敏感性及加强肾脏对钙的重吸收而发挥作用的。

关键词:女贞子; 钙代谢; 维生素 D; 基因表达; 去卵巢

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0558-04

Effect of *Fructus Ligustri Lucidi* on calcium metabolism and vitamin D-dependent gene expressions in ovariectomized rats

ZHANG Yan^{1,2}, WONG Man-sau^{2,4}, CHEN Bin³, LEUNG Ping-Chung⁵,
WU Chun-fu¹, YAO Xin-sheng³

- (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. State Key Laboratory of China Medicine and Molecular Pharmacology, Shenzhen 518057, China; 3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 4. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR, China; 5. Department of Orthopaedics and Traumatology, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

收稿日期: 2005-07-13

基金项目: 香港特别行政区科技研究发展计划 (AOE/P-10/01) 项目资助课题 (B-Q767; 3-ZF89)

作者简介: 张 岩 (1978-), 男, 河北省石家庄市人, 沈阳药科大学药理学在读博士研究生, 研究方向为抗骨质疏松中药筛选及作用机制研究。Tel: (0755) 26737176 E-mail: medicineyan@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL), a kidney-tonifying Chinese herbal medicine, on calcium metabolism and vitamin D-dependent gene expression in ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Four weeks after OVX surgical operation the OVX rats were ig administered with estradiol and FLL for 14 weeks. Ca^{2+} Level in serum, urine, and feces was measured by colorimetric methods, and gene expressions in duodenum and kidney were analyzed by reversed transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Ovariectomy of rat led to significant loss of calcium *in vivo*, as demonstrated by decreasing serum Ca^{2+} level and increasing Ca^{2+} excretion rate in urine and feces in OVX rat group. Treatment of OVX rats with FLL could effectively restore serum Ca^{2+} level and prevent the increase of Ca^{2+} excretion from urine and feces. RT-PCR Analysis showed that both estradiol and FLL could prevent OVX-induced decrease of mRNA expression in duodenal vitamin D receptor (VDR). In kidney, FLL did not alter mRNA expressions of 25-hydroxyvitamin D 1-hydroxylase (1-OHase) and 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase (24-OHase), while increased the mRNA expression levels of renal calcium-binding protein-9k (CaBP-9k) and calcium-binding protein-28k (CaBP-28k). **Conclusion** FLL could improve the state of calcium imbalance induced by estrogen deficiency and the potential mechanism that contributes to the improvement of calcium status by FLL might involve the increase in intestinal sensitivity to active vitamin D through its up-regulation of VDR expression in duodenum and the enhancement in Ca^{2+} reabsorption via the up-regulation of calcium binding proteins expression in kidney.

Key words: *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL); calcium metabolism; vitamin D; gene expression; ovariectomy (OVX)

女性绝经后骨质疏松通常伴有体内钙流失增加,从而导致负钙平衡^[1]。随着老龄化社会的到来,绝经后骨质疏松将是威胁人类健康的重要疾病之一。美国 FDA 已批准上市一些化学药用来防治绝经后妇女骨质疏松,但近来研究表明,这些药物的长期使用会带来不同程度的副作用^[2]。于是,人们开始致力于从祖国丰富的天然中药宝库中寻求安全有效的药物来防治此病。

女贞子系木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,在我国广泛分布于华南地区,有滋补肝肾、强壮腰膝的功能,主治肝肾阴虚、头晕目眩、头发早白、风湿性疼痛、腰膝酸软等。Hao 等^[3]通过考察女贞子对大鼠垂体促肾上腺素细胞微结构的影响,从形态学角度探讨了女贞子对内分泌系统滋补功能的机制。关于女贞子对去卵巢大鼠体内钙代谢及相关维生素 D 依赖型基因表达情况的作用未见报道,本实验对此进行了研究,为女贞子的进一步研究开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 药材及试剂:女贞子干粉由中国 999 公司(深圳)提供,深圳中药及天然产物研究中心采用 HPLC 方法测定其中含齐墩果酸 4.25%。17 β -雌二醇从 Sigma 公司购得。钙试剂盒购于北京中生北控生物有限公司。引物全部由北京赛百盛公司合成。反转录用试剂从广州 Invitrogen 公司购得。PCR 试剂从深圳精美生物公司购得。

1.2 仪器:全自动生化分析仪 (ALCYON 300i, Abbott Laboratories, 美国);凝胶成像、定量系统 (BIO-RAD Laboratories, 意大利);PCR 仪 (MJ Research, 美国);紫外-可见分光光度计 (Perkin Elmer, 美国)。

1.3 动物及分组:由广州中医药大学实验动物中心购得 3 月龄雌性 SD 大鼠 36 只,平均体重 225 g。动物自由饮水及摄食,适应环境 1 周后,8 只做假手术处理,剩余 28 只行双侧去卵巢手术。4 周后,去卵巢大鼠随机分为 3 组:模型组 ($n=8$);雌二醇组 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=10$);女贞子组 (500 mg/kg , $n=10$)。各组持续 ig 给药 14 周。

1.4 样本收集:大鼠置于代谢笼,收集 24 h 尿液及粪便。在轻度乙醚麻醉下,腹主动脉取血,离心得血清,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。剪取近胃端小肠(约 3 cm),用冰冷 PBS 冲洗,将小段肠纵向剪开后,用冰冷 PBS 冲洗,置于玻璃板上,用盖玻片轻轻刮下黏膜,置入含 1 mL Trizol 的离心管内保存,整个过程中所用器具全部事先用冰冷 PBS 浸泡,用时取出。迅速取出大鼠双侧肾,剥去肾外膜,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 钙水平测定:大鼠粪便于 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 12 h,研磨成粉,溶于 6 mol/L 盐酸,于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,离心取上清液,制成储备液。比色法测定血清、尿液及粪便中钙的水平。

1.6 提取 RNA 及反转录 (RT):根据说明书操作步骤,使用 Trizol 提取总 RNA,并在 260、280 nm

处测定吸光度 (A) 值。 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 说明提得总 RNA 质量很好。取 $3 \mu\text{g}$ 总 RNA 于 $20 \mu\text{L}$ 反应体系内, 使用反转录酶 SuperScript™ II 制备 cDNA。

1.7 多聚酶链扩增反应 (PCR): 使用半定量 PCR 考察小肠钙结合蛋白-9k (CaBP-9k)、维生素 D 受体 (VDR) 和肾脏 25-羟基维生素 D 1-羟化酶 (1-OHase)、25-羟基维生素 D 24-羟化酶 (24-OHase)、钙结合蛋白-28k (CaBP-28k) 及 CaBP-9k 的基因表达。管家基因 GAPDH 作为内参。加 $1 \mu\text{L}$ cDNA 模板于 $20 \mu\text{L}$ PCR 反应体系, 其中包括: 300 nmol/L 引物, $1 \times \text{PCR}$ 反应缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl_2 , $200 \mu\text{mol/L}$ dNTPs 和 1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序, 以最初于 95°C 变性 3 min 开始, 最后于 72°C 延伸 2 min 结束, 中间 PCR 循环, 包括: 变性 95°C , 15 s ; 退火 50°C (CaBP-9k)/ 56°C (其他基因), 20 s ; 延伸 72°C , 20 s 。PCR 产物于 0.6% 琼脂糖凝胶电泳后, 通过 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件进行半定量。基因表达水平以目标基因/GAPDH 表示。

1.8 统计分析: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 GraphPad 公司统计分析软件 Prism 4 对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 接着用 Turkey 检验来比较各组间差异。

2 结果

2.1 对去卵巢大鼠钙代谢的影响: 见表 1。同假手术组对比, 去卵巢大鼠血清钙水平下降 ($P < 0.05$), 而尿钙和粪钙排泄增加 ($P < 0.01$)。雌二醇可恢复去卵巢大鼠血钙水平, 女贞子组大鼠同去卵巢组相比, 尿钙 ($P < 0.001$) 和粪钙 ($P < 0.01$) 排泄明显减少, 同样在雌二醇组也观察到此作用。

表 1 女贞子对血钙、尿钙和粪钙水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of FLL on Ca^{2+} level in serum, urine, and feces ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	血钙/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿钙(mg)/ 肌酐(mg)	粪钙/ ($\text{mg} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$)
假手术	8	109.4 ± 2.3	0.035 ± 0.004	55.7 ± 5.7
模型	8	$103.5 \pm 1.3^{\#}$	$0.068 \pm 0.007^{\#\#}$	$87.3 \pm 7.3^{\#\#}$
雌二醇	10	$111.8 \pm 2.3^{**}$	$0.027 \pm 0.006^{***}$	$48.3 \pm 4.5^{**}$
女贞子	10	107.6 ± 1.6	$0.034 \pm 0.004^{***}$	$58.0 \pm 6.1^{**}$

与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$

与模型组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$

$^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ vs Sham group

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group

2.2 对去卵巢大鼠小肠基因表达的影响: 同假手术组相比, 大鼠去卵巢后, 小肠 VDR 表达显著下降 ($P < 0.05$, 图 1), 女贞子可显著上调 VDR 水平, 各

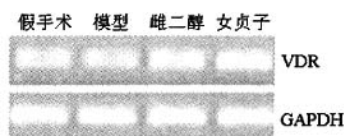


图 1 女贞子对小肠 VDR 基因表达的影响

Fig. 1 Effect of FLL on mRNA expression of VDR in duodenum

组间 CaBP-9k 表达差异无显著性。

2.3 对去卵巢大鼠肾脏基因表达的影响: 去卵巢大鼠肾脏 VDR 和 24-OHase 基因表达水平比假手术组显著提高, 但却可以被雌二醇抑制。女贞子对 1-OHase、24-OHase 等维生素 D 代谢酶表达无明显作用, 同去卵巢组比较, 可以显著上调 CaBP-9k 和 CaBP-28k 的基因表达 ($P < 0.05$, 图 2)。

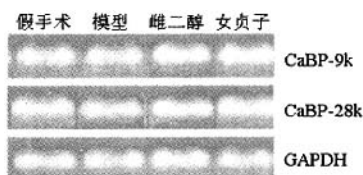


图 2 女贞子对肾脏钙结合蛋白基因表达的影响

Fig. 2 Effect of FLL on mRNA expression of calcium-binding protein in kidney

3 讨论

雌激素缺乏除了对骨有直接损害作用外, 还可以导致人类和动物体内钙吸收减少, 排泄增加, 使体内呈现负钙平衡状态^[4], 因此, 改善体内钙代谢状况是防治绝经后骨质疏松的有效措施。

本实验结果表明, 女贞子可恢复去卵巢大鼠血钙至正常水平, 同时, 显著抑制去卵巢大鼠尿钙和粪钙的排泄增加, 显示出女贞子对体内钙平衡有明显改善作用。钙吸收和排泄是钙平衡的两个重要因素^[5], 因此, 本实验考察了负责肠钙吸收和肾钙排泄及重吸收的基因表达水平, 试图阐明女贞子影响钙代谢的作用机制。肠钙吸收主要有两条路线^[6]: 一种是按照电化学梯度, 由低浓度到高浓度, 非饱和的被动转运吸收方式; 另外一种就是逆着电化学梯度, 由高浓度到低浓度, 需要能量的主动转运吸收方式。多数情况下, 钙的主动转运状态是决定钙吸收的重要因素。主动转运受钙激素控制, 主要是活性维生素 D [$1, 25 (\text{OH})_2\text{D}_3$]、甲状旁腺激素 (PTH)。 $1, 25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 主要通过位于小肠壁细胞核中的维生素 D 受体 (VDR) 发挥作用。本实验指出女贞子可以提高小肠 VDR 基因表达水平, 因此提高了小肠对 $1, 25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 的反应活性, 从而提高钙的主动转运

吸收,这同时也可以解释女贞子组的粪钙排泄减少。另外,各组间 CaBP-9k 表达无显著差异,这与实验用饲料含钙量较高有关,说明在高钙饮食情况下,女贞子对小肠钙结合蛋白的表达没有影响,但是,女贞子是否对低钙饮食动物小肠 CaBP-9k 的表达有作用,这需要作进一步研究。

女贞子对肾钙排泄的抑制作用与其可以提高肾脏 CaBP-9k 及 CaBP-28k 的表达有关,因为在肾脏 CaBP-28k 主要负责钙的重吸收^[7],CaBP-9k 负责肾钙重吸收时的转运^[8],此两种钙结合蛋白表达升高,使得肾钙排泄减少,重吸收增加,因此女贞子组的尿钙水平下降。当然,还有其他调控肾钙代谢的影响因素,包括骨转换,肾小球滤过率以及其他基因的表达^[9]。因此,今后的研究重点可考察女贞子是否对其涉及调控肾钙代谢的因素有作用。

本实验结果表明女贞子可通过上调小肠 VDR 表达而提高肠钙吸收,通过上调肾脏钙结合蛋白而加强肾钙重吸收。因此,女贞子对于维持体内钙稳态,改善绝经后骨质疏松症具有重要意义,值得进一步研究开发。

References:

- [1] Kaplan B, Hirsch M. Current approach to fracture prevention in postmenopausal osteoporosis [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2004, 31: 251-255.
- [2] Tuck S P, Francis R M. Osteoporosis [J]. *Postgrad Med J*, 2002, 78: 526-532.
- [3] Hao S C, Bi P, Yu K. *et al.* Electron microscopic studies on the effect of a Chinese medicine *Fructus Ligustri Lucidi* on the corticotrophs of rats hypophyses [J]. *J Tianjin Normal Univ: Nat Sci* (天津师范大学学报:自然科学版), 1997, 17: 49-52.
- [4] Fujita T. Calcium intake, calcium absorption, and osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 1996, 58: 215.
- [5] Nordin B E C, Frep M D. Calcium and osteoporosis [J]. *Nutrition*, 1997, 13: 664-686.
- [6] Monique van A, Joost G J H, Annemiete W C M, *et al.* Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285: G78-G85.
- [7] Bouhdauy I, Lajeunesse D, Christakos S, *et al.* Two vitamin D_3 -dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K [J]. *Kidney Int*, 1994, 45: 461-468.
- [8] Bouhdauy I, Lajeunesse D, Christakos S, *et al.* Two vitamin D_3 -dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 9K [J]. *Kidney Int*, 1994, 45: 469-474.
- [9] Li Y C, Merry J G B, Cao L P, *et al.* Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281: E558-E564.

脂质体-姜黄素水溶制剂抗肝癌效应的稳定性研究

李瀚旻, 晏雪生, 明安萍, 彭亚琴, 桂文甲

(湖北中医学院附属医院肝病研究所, 湖北 武汉 430061)

摘要:目的 研究脂质体-姜黄素水溶制剂抗肝癌效应的稳定性。方法 MTT 法观察脂质体-姜黄素水溶制剂(放置 1、2、4、8、12 个月)对 Bel-7402 细胞增殖的抑制作用。原位末端标记方法(TUNEL 技术)观察脂质体-姜黄素水溶制剂放置 12 个月后感导 Bel-7402 细胞凋亡的作用。免疫组织化学染色(SABC)法检测脂质体-姜黄素水溶制剂放置 12 个月对 Bax、Bcl-2 和 P53 蛋白表达的影响。结果 姜黄素水溶制剂随着放置时间的延长,抑制 Bel-7402 细胞增殖和诱导凋亡的作用均显著减弱。脂质体-姜黄素随放置时间的延长,抑制 Bel-7402 细胞增殖和诱导凋亡的作用无明显衰减现象,至放置 12 个月后脂质体-姜黄素 10、5 及 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个剂量对 Bel-7402 细胞增殖仍有显著抑制作用,与同质量浓度的姜黄素比较,差异显著($P < 0.01$),抑制作用随药物质量浓度增高而有加强趋势,最高抑制率可达 43.90%,且呈量效关系,3 个剂量组间差异有显著性($P < 0.01$),同质量浓度的脂质体-姜黄素的抑制率显著高于姜黄素的抑制率($P < 0.01$)。姜黄素-脂质体放置 12 个月, Bel-7402 细胞凋亡率达 63.7%。结论 脂质体能显著提高姜黄素对 Bel-7402 细胞增殖的抑制和诱导凋亡作用。脂质体-姜黄素水溶制剂放置 12 个月对 P53 表达有显著影响,但对 Bax 和 Bcl-2 的表达无显著影响。

关键词:姜黄素; 脂质体; Bel-7402 细胞; 细胞凋亡; Bcl-2 基因家族

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)04-0561-05

收稿日期:2005-09-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271562, 30371787); 国家科技部重大基础研究资助项目(2002CCC00300); 湖北省自然科学基金资助项目(2001ABB171); 湖北省教育厅“十五”重大研究项目(2002D00003); 湖北省“十五”攻关项目(2002AA301C08)

作者简介:李瀚旻(1956—),男,湖北省利川市人,博士,主任医师,研究生导师,湖北中医学院附属医院肝病研究所副所长,国家中医药科研 II 级实验室主任,主要研究方向为中医药治疗慢性肝病,在该领域已发表论文 40 余篇,出版专著 6 部,获省部级科技进步奖 4 项,申报专利 2 项,转让科研成果 1 项。Tel: (027) 88929180 E-mail: lihaamin69@126.com