

瘤细胞生长^[2];③促进线粒体细胞色素 C 释放入胞质,激活相关 caspase 激酶和引起 PARP 蛋白降解,促进细胞凋亡的级联反应过程^[3];④通过抑制 PKC 上调 iNOS 的表达,iNOS 的过量表达引发 caspase-3 表达^[4]。芸香苷具有广泛的生物学活性,既可抑制脂质过氧化、抑制血小板聚集、抑制环氧化酶、对实验性急性胰腺炎具有一定的保护作用,又能够抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。本实验通过 RT-PCR 法证实芸香苷在诱导 K562 细胞凋亡过程中激活了效应蛋白酶 caspase-3 的表达,Western-blotting 检测到胞浆中细胞色素 C 的表达,表明细胞色素 C 促进线粒体细胞色素 C 释放入胞质,激活相关 caspase 激酶,促进细胞凋亡的级联反应过程,诱导肿瘤细胞凋亡。芸香苷诱导实体瘤和白血病细胞凋亡的其他

详细机制还有待于进一步研究探讨。

References:

- [1] Li Y S, Kang T B, Liang N C. Effect of quercetin on the expressions of p53 and Bcl-2 gene proteins in intact HL-60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(3): 255-257.
- [2] Rong Y, Yang E B, Zhang K, et al. Quercetin apoptosis in the monoblastoid cell line U937 *in vitro* and the regulation of heat shock proteins expression [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (6B): 4339.
- [3] Wang I K, Lin-shiau S Y, Lin J K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrom C release and activation of Caspase-9 and Caspase-3 in leukemia HL-60 cells [J]. *Cancer*, 1999, 35(10): 1517-1520.
- [4] Ren W H, Gong C C, Wu J L, et al. Expression of iNOS gene and Caspase-3 in Eca-109 cell apoptosis induced by 8-Br-cAMP and quercetin [J]. *J Zhengzhou Univ: Med Sci* (郑州大学学报:医学版), 2003, 38(5): 684-686.

三七总皂苷改善兔动脉粥样硬化斑块稳定性的机制探讨

袁志兵, 李晓辉*, 李淑惠, 张海港, 刘 雅

(第三军医大学 基础部, 重庆 400038)

动脉粥样硬化 (AS) 不稳定斑块破裂是导致心脑血管事件发生的重要原因, 大量研究表明: 60%~75% 的急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是由于斑块破裂继发血栓引起的。不稳定斑块虽然不易导致严重的管腔狭窄, 却容易发生破裂、糜烂、钙化等情况而易于继发血栓而引起 ACS^[1]。因此, 采取有效措施增强斑块稳定性将对 ACS 的防治有重要意义。但是, 迄今尚缺乏稳定 AS 斑块的有效措施, 因此寻找其有效救治药物十分必要。前期研究发现三七总皂苷 (*Panax notoginseng* total saponin, PNS) 通过抗炎和免疫调节途径对兔 AS 的形成有抑制作用^[2]; PNS 还能增加兔 AS 斑块内胶原水平, 增厚斑块纤维帽, 减少基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达, 有改善兔 AS 斑块稳定性的作用。本实验进一步对 PNS 改善 AS 斑块稳定性的机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物: 日本大耳兔, 一级, 雄性, 体重 2.0~2.5 kg, 第三军医大学实验动物所提供。

1.2 仪器: BX 51/61 显微镜为 Olympus 公司产品; 隔水式电热恒温培养箱为上海跃进医疗器械厂产品; DGF25012C 电热鼓风干燥箱购自重庆华茂仪器有限公司; Image Pro Plus 4.5 图像分析软件由 Media Cybernetics 公司提供, 550 型酶标仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.3 药物与试剂: PNS (质量分数 > 99%) 由中国科学院云南植物研究所提供 (用时以双蒸水配成 3、9、24 mg/mL)^[3]; 胆固醇为成都科龙化工试剂厂产品。兔抗兔肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 一抗为武汉博士德公司产品, 小鼠抗兔二抗、DAB 试剂盒为中山生物制剂公司产品。TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购自第四军医大学。

2 方法

2.1 实验分组及造模: 日本大耳兔 46 只, 给予高胆固醇饲料 [基础饲料 + 0.5% 胆固醇 + 10% 鸡蛋 (去蛋清) + 5% 猪油] 60 g/(kg·d) 喂养, 第 12 周末随机选取 6 只解剖观察模型建立情况。其余动物随机分 4 组: 模型组 [生理盐水 5 mL/(kg·d)];

收稿日期: 2005-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470465; 30371768)

作者简介: 袁志兵 (1979—), 男, 湖南省新化县人, 硕士, 助教, 主要从事动脉粥样硬化斑块稳定性的药物干预研究。

Tel: (023) 68753397-83 E-mail: zhibinyuan@sina.com

* 通讯作者 李晓辉 Tel: (023) 68753397-81 Fax: (023) 68753397-82 E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn

PNS 低、中、高剂量 [15、45、120 mg/(kg·d)] 组。所有动物均采用单笼饲养,各组均 ig 给药,以基础饲料喂养至第 20 周末。

2.2 ELISA 方法测定血清中 TNF- α 和 IL-6 水平:分别于第 14、17、20 周末兔耳缘静脉取血,静置后离心得血清,按照试剂盒说明操作(同时设正常组,取血测定)。

2.3 标本取材及免疫组织化学测定斑块中 TNF- α 和 IL-6 表达:于第 20 周末,兔耳缘 iv 空气处死后,立即剖开胸、腹腔,游离主动脉全长,剥离外膜脂肪组织,纵行剖开,血管壁可见隆起斑块。置于 4% 中性福尔马林中浸泡 48 h,常规酒精脱水,石蜡包埋,将其横断面制成 5 μ m 连续切片。每个待测指标在每条动脉中随机选取 3 张切片用免疫组织化学方法进行 TNF- α 和 IL-6 表达测定(SP 法,阴性对照一抗用 0.01 mol/L PBS 代替^[4]),每张切片随机选取 5 个视野($\times 200$),用 Image Pro Plus 4.5 图像分析系统测定阳性物质表达面积和吸光度,取其均值作为结果。

2.4 统计学处理:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student-*t* 检验方法。

3 结果

3.1 动物模型情况:实验期间有 8 只兔因腹泻拒食,于 1~4 周死亡;第 12 周末随机选取 6 只兔解剖,血管壁均可见明显隆起斑块,表明兔 AS 模型建立成功。

3.2 血清中 TNF- α 和 IL-6 水平:PNS 组血清中 TNF- α 水平显著降低,与模型组比较,第 14、17、20 周末低剂量组分别下降了 21.49%、23.03%、25.15% ($P < 0.05$);中剂量组分别下降了 31.37%、38.39%、58.56% ($P < 0.01$);高剂量组分别下降了 33.28%、39.37%、62.27% ($P < 0.01$)。PNS 对血清中 IL-6 水平的影响与对 TNF- α 的影响结果相似(见表 1)。

3.3 AS 斑块中 TNF- α 和 IL-6 的表达:PNS 组 AS 斑块中 TNF- α 表达显著降低。与模型组相比,低剂量组表达面积、吸光度分别下降了 15.52%、32.36% ($P < 0.05$);PNS 中剂量组分别下降了 41.95%、51.60% ($P < 0.01$);高剂量组分别下降了 44.54%、55.39% ($P < 0.01$)。PNS 对斑块中 IL-6 表达的影响与对 TNF- α 的影响结果相似(见表 2)。

4 讨论

表 1 PNS 对 AS 兔血清中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of PNS on TNF- α and IL-6 levels in serum of AS rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)			IL-6/(ng·mL ⁻¹)		
		第 14 周	第 17 周	第 20 周	第 14 周	第 17 周	第 20 周
正常	—	0.91 $\pm$ 0.25	0.90 $\pm$ 0.19	0.89 $\pm$ 0.21	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
模型	—	5.77 $\pm$ 0.87 Δ	5.08 $\pm$ 0.95 Δ	4.85 $\pm$ 0.83 Δ	2.35 $\pm$ 0.43 Δ	2.20 $\pm$ 0.28 Δ	2.03 $\pm$ 0.33 Δ
PNS	15	4.53 $\pm$ 0.84** Δ	3.91 $\pm$ 0.68** Δ	3.63 $\pm$ 0.57** Δ	1.96 $\pm$ 0.34** Δ	1.78 $\pm$ 0.30** Δ	1.59 $\pm$ 0.39** Δ
	45	3.96 $\pm$ 0.49** Δ	3.13 $\pm$ 0.75** Δ	2.01 $\pm$ 0.44** Δ	1.73 $\pm$ 0.24** Δ	1.40 $\pm$ 0.36** Δ	1.04 $\pm$ 0.22** Δ
	120	3.85 $\pm$ 0.66** Δ	3.08 $\pm$ 0.52** Δ	1.83 $\pm$ 0.41** Δ	1.68 $\pm$ 0.25** Δ	1.35 $\pm$ 0.28** Δ	0.98 $\pm$ 0.21** Δ

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与正常组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs normal group

表 2 PNS 对兔 AS 斑块中 TNF- α 和 IL-6 表达的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of PNS on TNF- α and IL-6 expressions in AS plaques of rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	TNF- α		IL-6	
		表达面积($\times 10^2$)/ μ m ²	吸光度 ($\times 10^6$)	表达面积($\times 10^2$)/ μ m ²	吸光度 ($\times 10^5$)
模型	—	3.48 $\pm$ 0.50	3.43 $\pm$ 0.60	2.07 $\pm$ 0.31	10.66 $\pm$ 2.91
PNS	15	2.94 $\pm$ 0.41*	2.32 $\pm$ 0.51*	1.64 $\pm$ 0.29*	7.65 $\pm$ 1.52*
	45	2.02 $\pm$ 0.46**	1.66 $\pm$ 0.43**	0.96 $\pm$ 0.24**	4.08 $\pm$ 1.20**
	120	1.93 $\pm$ 0.32**	1.53 $\pm$ 0.48**	0.89 $\pm$ 0.21**	3.88 $\pm$ 0.98**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

炎症几乎贯穿于 AS 发生、发展的全过程。在 AS 病变的早期,炎症可引起血管平滑肌的增殖及

迁移、脂质的堆积、内皮功能损害,从而加速 AS 病变的进展;在 AS 病变晚期,炎症在粥样斑块破裂和继发血栓形成过程中起决定性作用^[6]。成熟斑块中大量炎症细胞的聚集是斑块不稳定的关键因素,激活的 T 细胞释放包括干扰素- γ (IFN- γ)、IL-6 和 TNF- α 在内的大量细胞因子,作用在内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞上,使粥样斑块进一步发展^[6]。AS 斑块的稳定性与斑块的成分密切相关,是斑块破裂的内因和主要因素。纤维帽较厚,脂质的量和新生血管较少的斑块较稳定。纤维帽的主要成分为血管平滑肌细胞和细胞外基质 (ECM),ECM 包括 I、II、III、IV 型胶原,弹性蛋白,蛋白多糖,糖蛋白及糖胺多糖五大类。TNF- α 、IL-6 作为炎症反应重要的级联因子,可以刺激平滑肌细胞、内皮细胞等产生

基质金属蛋白酶 (MMPs), 可有效地降解胶原和纤维帽内其他细胞外基质, 使得纤维帽变薄, 纤维帽的不断变薄将最终导致粥样斑块的破裂。另外, $\text{TNF-}\alpha$ 还能诱导斑块内平滑肌细胞的凋亡, 从而使得平滑肌细胞产生的间质胶原减少, 斑块的稳定性降低。炎症细胞因子还能促使斑块中 VEGF 表达增加^[7], VEGF 能促进斑块新生血管生成, 新生血管形成是斑块不稳定的又一因素^[8]。

目前, 临床上发现的 AS 病人大部分属于中、晚期病变, 这一时期最大的威胁是不稳定斑块破裂后产生的并发症。目前对斑块稳定性的研究也越来越受到重视。本室既往研究发现 PNS 对 AS 的早期病变有防治作用, 在此基础上进一步研究发现 PNS 对 AS 成熟斑块也有改善稳定性作用。本实验发现 PNS 能降低兔 AS 中、晚期病变血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的水平及斑块内 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 表达; 中、高剂量组效果更为显著, 二者无明显差异。PNS 能有效改善斑块稳定性, 其抗炎作用能延伸至 AS 斑块内部, 提示 PNS 改善斑块稳定性的机制可能与其抗炎作用有关。斑块稳定性的影响因素是非常复杂的,

本课题组将继续就 PNS 改善斑块稳定性的机制做进一步探讨。

References:

- [1] Virmani R, Kolodgie F D, Burke A P, *et al.* Lessons from sudden coronary atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1262-1275.
- [2] Liu Y, Li X H. Effect of *Panax notoginseng* total saponin on inflammatory immune factors in atherosclerosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 728-730.
- [3] Li S H, Li X H, Chu Y. Anti-inflammation mechanisms of drugs [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 676-678.
- [4] Sun Q, Gao Z Y, Lu W. Immunohistochemistry and its image analysis study of PCNA in the thyroid tumours [J]. *Chin J Stereol Image Anal* (中国体视学与图像分析), 1998, 3(4): 228-229.
- [5] Mulvihill N T, Foley J B. Inflammation in acute coronary syndromes [J]. *Heart*, 2002, 87(2): 201-204.
- [6] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [7] Li J, Perrella M A, Tsai J C, *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 in rat aortic smooth muscle cells [J]. *J Biochem*, 1995, 270(1): 308-312.
- [8] O'Brien E R, Garvin M R, Dev R, *et al.* Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(4): 883-894.

4 种中药提取液对不同来源成纤维细胞作用的实验研究

郭 军^{1,2}, 陈宝田¹, 刘文超², 孟 华³, 谢 炜¹, 杜永平⁴

(1. 南方医科大学南方医院 中医科, 广东 广州 510000; 2. 第四军医大学西京医院 肿瘤中心, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学 生理教研室, 陕西 西安 710032; 4. 第四军医大学西京医院 中医科, 陕西 西安 710032)

胸部恶性肿瘤患者常需要接受胸部放射治疗, 其中胸部的两个重要脏器心脏和肺脏是最易受到放射损伤的部位, 这不仅限制了肿瘤的照射剂量, 从而也限制了疗效, 也影响患者的生存质量, 有时甚至成为导致肿瘤患者死亡的直接原因。在放射性损伤过程中比较重要的一个机制就是成纤维细胞的过度增殖^[1], 因此本实验体外培养了这两种不同来源的成纤维细胞, 并观察当归、川芎、黄芪及丹参各中药提取液对其的作用。

1 材料

川芎 (*Rhizoma Chuanxiong*, 四川) 购于四川绿色药业科技发展股份有限公司; 当归 (*Radix Angelicae Sinensis*, 甘肃)、丹参 (*Radix Salviae Milti-*

orrhizae, 甘肃), 黄芪 (*Radix Astragali*, 甘肃) 均购于甘肃陇南礼县药材公司, 药材均由第四军医大学西京医院药剂科杨喜忠主任药师鉴定; 1 个月 SD 雄性大鼠由第四军医大学动物中心提供。DMEM (Sigma), 胶原酶 (Gibco), 胰酶 (Gibco)。

2 方法

2.1 中药制备: 当归、川芎、黄芪、丹参粉碎, 各称取 100 g, 其中当归置圆底烧瓶内, 加 50% 乙醇浸泡 30 min, 在水浴锅上加热回流提取 60 min, 搅拌、滤过; 药渣同法提取 60 min, 滤过。川芎、黄芪、丹参置烧杯内, 加蒸馏水 600~800 mL 浸泡 30 min, 在水浴锅上加热 60 min, 搅拌、滤过; 药渣再加蒸馏水同法煎煮 60 min, 滤过。合并两次煎液, 浓缩至含生药

收稿日期: 2005-08-17

作者简介: 郭 军 (1966—), 男, 山西人, 第四军医大学西京医院主治医师、讲师, 南方医科大学中医科博士研究生, 主要研究方向为中西医结合临床药理、肿瘤。Tel: 13008409962 E-mail: guojundoc@163.com