

药肿瘤细胞中 Ca^{2+} 浓度高于非耐药肿瘤细胞, 又有学者证实钙拮抗剂可逆转细胞对药物的耐药性^[5], 故推测具有钙离子拮抗作用的补骨脂素逆转肿瘤多药耐药起到的增敏作用是由于降低耐药细胞内 Ca^{2+} 浓度的原因。本实验采用 $1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 不同浓度补骨脂素作用 HL60 和 HL60/HT 细胞, 从静态的不同时段 (24、48、96 h) 和动态不同时间点 (5、10、15、20、25 min) 两方面观察其对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响, 从结果可见: 不同时间段和动态不同时间点补骨脂素对 HL60 细胞内 Ca^{2+} 浓度影响不大, 但不同浓度补骨脂素作用 HL60/HT 细胞内 Ca^{2+} 浓度与作用时间成负相关, 由此提示补骨脂素能影响耐药细胞 HL60/HT 内 Ca^{2+} 浓度, 补骨脂素 10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 作用 HL60/HT 细胞, Ca^{2+} 浓度与扫描时间呈现负相关, 该动态结果说明了补骨脂素具有影响耐药细胞 HL60/HT 内 Ca^{2+} 浓度的趋势, 但上述结果可能在不同细胞类及不同耐药表型中有所差异, Ca^{2+} 浓度的变化可能是补骨脂素逆转耐药机

制之一, 也可能是逆转耐药的結果; 结合本实验细胞内 HT 的量测定结果, 可推测补骨脂素降低了耐药细胞内 Ca^{2+} 浓度, 故降低耐药细胞内药物 HT 泵出胞外; 但 Ca^{2+} 与多药耐药的關係及补骨脂素在多药耐药逆转中的作用机制还有待深入研究。

References:

- [1] Cai Y, Cao K J, Yin Z D. Clinical observation of psoralen capsule in reversal acute leukemia multidrug resistance [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2002, 9 (1): 53.
- [2] Cai Y, Cai T G, Tang F D, et al. Reversal of multi-drug resistance on K562/ADM cell by psoralen [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 2004, 31(3): 146-148.
- [3] Cai Y. Reversal of multidrug resistance in human breast cancer cell by psoralen [J]. *Tumor* (肿瘤), 2004, 24(3): 240-241.
- [4] Tsuruo T, Lida H, Kawabata H, et al. High calcium content of pleiotropic drug resistant P388 and K562 leukemia and Chinese hamster ovary cells [J]. *Cancer Res*, 1984, 44(11): 5095-5099.
- [5] Schlemmer S R, Yang C H, Sirotiak F M, et al. Functional modulation of multidrug resistance related P-glycoprotein by Ca^{2+} calmodin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(19): 11040-11042.

蛭螬石油醚提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响

宋莲莲¹, 孙 抒^{1,2*}, 李香丹¹, 金光洙³, 金莉莉³, 杨万山¹

(1. 延边大学医学部 病理学教研室, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 长白山天然资源与功能分子学部共建教育部重点实验室, 吉林 延吉 133000; 3. 延边大学药学院 植物化学教研室, 吉林 延吉 133000)

摘 要: 目的 研究蛭螬石油醚提取物对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其作用机制。方法 MTT 法检测蛭螬石油醚提取物对体外培养的 HeLa 细胞株增殖抑制作用及细胞毒活性; 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的脱氧核苷酸缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法检测细胞凋亡; 通过免疫细胞化学 S-P 法测定凋亡相关基因产物 Bcl-2、Bax 蛋白与凋亡相关蛋白 caspase-8 和 caspase-3 的表达情况。结果 蛭螬石油醚提取物对 HeLa 细胞的增殖抑制作用呈剂量依赖性和时间依赖性 ($P < 0.01$)。蛭螬石油醚提取物作用细胞后凋亡细胞数目随时间延长而增多; 凋亡指数与药物处理呈时间依赖性和剂量依赖性。蛭螬石油醚提取物作用后 Bcl-2 蛋白表达均下降, Bax、caspase-8 和 caspase-3 表达上升, 4 种蛋白表达各组间比较均差异显著 ($P < 0.01$)。结论 蛭螬石油醚提取物对 HeLa 细胞具有抑制增殖及诱导凋亡作用。蛭螬石油醚提取物对 HeLa 细胞抑制增殖作用 ($50 \mu\text{g/mL}$ 作用 48 h 之前) 主要以诱导凋亡为主。蛭螬石油醚提取物诱导凋亡作用可能与下调 Bcl-2 表达, 上调 Bax、caspase-8 和 caspase-3 表达有关。

关键词: 蛭螬石油醚提取物; 人宫颈癌 HeLa 细胞; 增殖; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax; caspase-8; caspase-3

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)06-0884-05

Effect of petroleum ether extract from *Holotrichia diomphalia* grub on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells

SONG Lian-lian¹, SUN Shu^{1,2*}, LI Xiang-dan¹, JIN Guang-zhu³, JIN Li-li³, YANG Wan-shan¹

(1. Department of Pathology, Medical College of Yanji University, Yanji 133000, China; 2. Key Laboratory

收稿日期: 2005-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30460047)

作者简介: 宋莲莲 (1979-), 女, 吉林省双辽市人, 延边大学医学部病理学教研室, 硕士研究生, 医师, 研究方向为肿瘤分子病理学。

Tel: (0433) 2660535 E-mail: jsilotus@sohu.com

* 通讯作者 孙 抒 Tel: (0433) 2660535 E-mail: sunshu@ybu.edu.cn

of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules Co-established by Province and Ministry of Education, Yanbian University, Yanji 133000, China; 3. Department of Phytochemistry, College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract; Objective To investigate the effect of petroleum ether extract from the grub of *Holotrichia diomphalia* on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells *in vitro* and explore its probable molecular mechanisms. **Methods** The growth inhibition of petroleum ether extract from the grub of *H. diomphalia* on HeLa cells was measured with MTT assay. Apoptosis cells were determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. The Bcl-2, Bax, caspase-8, and caspase-3 protein expressions were determined by immunohistochemical S-P staining technique. **Results** Petroleum ether extract from the grub of *H. diomphalia* significantly inhibited the proliferation of HeLa cells in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.01$). The effect of petroleum ether extract from the grub of *H. diomphalia* increased HeLa apoptosis numbers greatly with the time lasting. The apoptosis of HeLa could be induced by the grub extract in a dose- and time-dependent manner. After treated with the extract, the Bcl-2 expression was decreased, while the Bax, caspase-8, and caspase-3 expressions were increased; the expressions of the four kinds of protein were significantly changed among the different treatings with the grub extract ($P < 0.01$). **Conclusion** Petroleum ether extract from the grub of *H. diomphalia* could significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HeLa cell *in vitro*. Before treating 48 h on HeLa cells with the grub extract (50 $\mu\text{g/mL}$), the inhibitory effect on proliferation and its cytotoxicity was mainly completed by the induction of apoptosis. The mechanism of the grub petroleum ether extract inducing apoptosis for HeLa might be related to down-regulation of Bcl-2 expression and up-regulation of Bax, caspase-8, and caspase-3 expressions.

Key words: petroleum ether extract from the grub of *Holotrichia diomphalia* (Bates); human cervical carcinoma HeLa cell; proliferation; apoptosis; Bcl-2; Bax; caspase-8; caspase-3

蛴螬为鳃金龟科昆虫大黑鳃角金龟 *Holotrichia diomphalia* (Bates) 的干燥幼虫。在祖国传统中医药学中有破血、行瘀、散结、通乳等功效,用于折损瘀痛、破伤风、喉痹、目翳等病症。近年来有报道蛴螬等多味中药复方药物对人胃癌 MGC-803 细胞株具有诱导凋亡作用^[1]。有研究表明蛴螬提取物对人胃癌 MGC-803 细胞株具有体外抑瘤活性^[2]。本实验以人宫颈癌 HeLa 细胞为受试细胞,采用 MTT 比色法检测蛴螬石油醚提取物体外抑制细胞增殖作用。采用 TUNEL 法以期证明凋亡细胞的形成。通过免疫细胞化学的方法检测 Bcl-2、Bax、caspase-8 和 caspase-3 蛋白的表达情况,探讨蛴螬石油醚提取物对 HeLa 细胞株的抑制增殖及诱导凋亡作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器:人宫颈癌 HeLa 细胞株购于中国科学院上海细胞研究所。RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品。新生牛血清:中美合资兰州民海生物工程有限公司产品。胰蛋白酶 (Trypsin): Difco 公司产品。噻唑蓝 (MTT): 美国 Sigma 公司产品。p53、Bcl-2、Bax 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。caspase-8 和 caspase-3 蛋白单克隆抗体:购于福州迈新生物技术开发有限公司。原位细胞凋亡检测试剂盒:罗氏公司产品。酶联免疫

检测仪:美国 RT-2100C 型。

1.2 体外细胞培养:人宫颈癌 HeLa 细胞贴壁生长于 RPMI-1640 培养液 (含 10% 新生牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL) 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度恒温细胞培养箱中培养。

1.3 蛴螬提取物制备和配制:蛴螬购于延边利民药店,经延边大学药学院医药研究中心刘永镇教授鉴定为正品。称取蛴螬 5 kg,粉碎,用甲醇回流提取 3 次,在水浴上挥尽溶剂,加水制成混悬液后,依次用石油醚、醋酸乙酯、氯仿等萃取,得到石油醚萃取物 60.62 g,用于本实验。初步化学成分分析实验显示,蛴螬石油醚提取物中含有甾体化合物及脂肪酸等成分,其中甾体化合物约占 3.5%。石油醚提取物用少量 0.5% 羧甲基纤维素钠生理盐水和聚山梨酯 80 溶解 (聚山梨酯 80 在药液中的体积分数 $< 0.01\%$)^[3]。

1.4 MTT 法测定体外细胞毒作用:体外常规培养 HeLa 细胞,以 MTT 法测定蛴螬石油醚提取物 (25、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$) 在处理 12、24、36、48 h 后的细胞增殖抑制情况。实验重复 3 次。计算肿瘤细胞增殖抑制率及半数抑制浓度 (IC_{50}),绘制浓度-抑制率曲线。

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

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡: HeLa 细胞经 25 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 蛭螭石油醚提取物处理 24、48 h 后, 吹打制成细胞悬液; 离心、洗涤细胞 2 次; 4% 多聚甲醛 0.1 mL 固定 30 min, 取细胞悬液均匀涂布于载玻片上, 制成细胞涂片, 设立对照组。应用 TUNEL 法原位检测试剂盒检测 HeLa 的凋亡, 用 0.1% 核固红溶液复染。每次 TUNEL 染色中已已知阳性物质的乳腺癌组织切片为阳性对照, 以不含 TdT 的 TdT 缓冲液代替 TUNEL 反应混合液作阴性对照。结果判断: 细胞凋亡阳性物质呈紫蓝色位于细胞核内, 部分细胞浆也可因核 DNA 碎片的逸出呈阳性着色; 阴性细胞呈淡红色。每张涂片在 400 $\times$ 高倍镜下观察 5 个视野, 每个视野下分别计数凋亡细胞和总细胞数并计算凋亡率。

凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$

1.6 免疫细胞化学染色: 取对数生长期的 HeLa 细胞制成 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 接种于内铺小玻片的 12 孔培养板内。待贴壁生长后, 分别加入 25 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 蛭螭石油醚提取物药液处理 24 h 后, 取出进行免疫细胞化学染色。染色操作按 S-P 试剂盒说明书进行。染色结果判断: 以细胞内见清晰棕色颗粒为阳性细胞; Bcl-2 和 Bax 在胞质中呈棕黄色阳性表达; caspase-8 和 caspase-3 主要在胞质中或胞质与胞核共表达^[4]; 以细胞未着色或轻微着色为阴性。每一指标观察 3 张涂片或细胞爬片, 每张片在 400 $\times$ 高倍镜下观察 5 个视野, 每个视野下分别计数阳性细胞数和总细胞数并计算阳性表达率 (阳性表达率 = 阳性细胞总数 / 总细胞数 $\times 100\%$)。caspase-8 和 caspase-3 结果判定采用 H-score 法, 每片观察 5 个视野, 以 i 代表染色深浅, 共 0~3 分: 0 分为不着色; 1 分为浅着色, 呈淡黄色; 2 分为中度着色, 呈深黄色; 3 分为深着色, 呈棕色/咖啡色。Pi 代表每一着色程度的细胞所占的比例为 0~100%, $\text{H-score} = \sum \text{Pi}(i+1)$, 满分为 4 分。免疫细胞化学染色设立阳性对照和阴性对照。

1.7 统计学处理: 应用 SPSS 10.0 软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; MTT 法检测的抑制率之间的比较采用 t 检验; 用相关分析与直线回归计算 IC_{50} ; 凋亡率之间的比较采用方差分析多样本均数间 q 检验; Bcl-2、Bax 蛋白表达率组间的比较采用 χ^2 检验; caspase-8 和 caspase-3 阳性表达统计分析采用 t 检验。

2 结果

2.1 蛭螭提取物对 HeLa 细胞的增殖抑制作用: 从表 1 可知, 蛭螭石油醚提取物对 HeLa 细胞株的增

殖抑制作用具有时间及剂量依赖性。以蛭螭石油醚提取物 (作用 24 h) 质量浓度和肿瘤细胞增殖抑制率做相关分析和直线回归, 得直线方程为: $Y = 16.080 + 0.437 X$, $r = 0.965$ 。求得作用 24 h 的 IC_{50} 为 77.62 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 蛭螭石油醚提取物对 HeLa 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Inhibition of petroleum ether extract from grub of *H. diomphalia* on proliferation of HeLa cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞增殖抑制率/%			
	12 h	24 h	36 h	48 h
25	12.32 $\pm$ 1.64	21.77 $\pm$ 4.38	24.74 $\pm$ 0.99	31.47 $\pm$ 1.35
50	27.23 $\pm$ 5.06*	34.60 $\pm$ 3.18*	58.83 $\pm$ 0.91***	65.87 $\pm$ 0.65***
100	43.73 $\pm$ 1.05*	77.59 $\pm$ 3.75**	86.34 $\pm$ 0.36***	94.13 $\pm$ 0.65***
200	82.23 $\pm$ 0.85***	96.82 $\pm$ 1.05***	98.50 $\pm$ 0.20***	99.46 $\pm$ 0.22***

与前一组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs former group

2.2 蛭螭提取物诱导 HeLa 细胞凋亡的作用: TUNEL 染色法镜下可见, 癌细胞发生两种变化, 一种为细胞凋亡, 表现为细胞体积缩小, 核固缩, 胞浆减少, 可见核内出现大小不等的蓝色颗粒, 有的弥散分布, 有的偏侧分布或核膜周边分布。另一种变化为细胞肿胀, 胞膜破裂, 内容物流出而坏死。阴性对照组少见凋亡细胞。给药组随着剂量的增大和作用时间的延长凋亡细胞数量增加。结果表明 HeLa 细胞的凋亡率与蛭螭石油醚提取物质量浓度之间存在剂量和时间依赖关系, 这与 MTT 检测结果具有一致性。可见表 2。

表 2 蛭螭石油醚提取物对 HeLa 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of petroleum ether extract from grub of *H. diomphalia* on apoptotic rate of HeLa cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	凋亡率/%	
	24 h	48 h
0 (对照)	2.06 $\pm$ 0.63	3.07 $\pm$ 0.63
25	14.45 $\pm$ 1.19**	20.37 $\pm$ 1.78**
50	26.94 $\pm$ 1.47*** $\Delta\Delta$	37.25 $\pm$ 2.22*** $\Delta\Delta$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与前一组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs former group

2.3 免疫细胞化学法检测凋亡相关蛋白表达水平: 光镜下观察, Bcl-2 蛋白染色位于细胞浆内, 对照组阳性颗粒在胞浆内均匀分布, 阳性细胞数居多, 实验组阳性细胞数减少, 染色明显变浅; Bax 蛋白染色阳性部位主要见于胞浆, 呈细颗粒状均匀分布。实验组随提取物质量浓度增加, 出现越来越多胞体浓缩变

圆的细胞,这些细胞可见 Bax 阳性信号广泛分布于胞核和胞浆。而这种转位表达于核内的异位表达现象,只见于那些出现显著染色体和胞浆浓缩的细胞(凋亡细胞)。其中 Bcl-2 与 Bax 细胞爬片中可以见到细胞浆中出现较大的空泡,细胞膜尚完整。在相同作用时间后随着提取物作用的质量浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达下降,Bax 蛋白表达增强。与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 蛭螬石油醚提取物对 HeLa 细胞 Bcl-2、Bax、caspase-8 和 caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of petroleum ether extract from grub of *H. diomphalia* on protein expressions of Bcl-2, Bax, caspase-8, and caspase-3 in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	蛋白表达阳性细胞/%		蛋白表达阳性评分值	
	Bcl-2	Bax	caspase-8	caspase-3
0 (对照)	79.58 $\pm$ 3.08	36.17 $\pm$ 3.45	1.894 $\pm$ 0.074	1.916 $\pm$ 0.040
25	57.44 $\pm$ 2.98**	69.34 $\pm$ 4.71**	3.210 $\pm$ 0.119**	3.201 $\pm$ 0.053**
50	38.60 $\pm$ 2.61*** $\Delta\Delta$	83.20 $\pm$ 3.72*** $\Delta\Delta$	3.773 $\pm$ 0.054*** $\Delta\Delta$	3.811 $\pm$ 0.064*** $\Delta\Delta$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与前一组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

*** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs former group

蛭螬石油醚提取物作用于 HeLa 细胞 24 h 后, 25 与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组凋亡相关蛋白 caspase-8 与 caspase-3 均有表达,并且表达具有一致性。视野内的细胞着色的深浅可以看出表达程度的增加和表达量的增多。见表 3。

3 讨论

经 MTT 法测定表明,蛭螬石油醚提取物对 HeLa 细胞增殖具有抑制作用,同时呈剂量依赖性和时间依赖性。本实验 TUNEL 法观察结果表明蛭螬石油醚提取物可以诱导 HeLa 细胞凋亡;随着作用时间延长和质量浓度的提高,凋亡率升高 ($P < 0.01$);表现为时间依赖性和剂量依赖性。由此可推测在蛭螬石油醚提取物作用的 48 h 之内,其抑制增殖作用主要由诱导凋亡作用而实现,从而完成对肿瘤细胞的杀伤。

诱导细胞凋亡必要的信号分子是一类半胱氨酸蛋白酶称为 caspases 家族。迄今为止发现细胞凋亡主要经过两条死亡通路^[5]。一种为死亡受体通路,又称外源通路,是由肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族介导的^[6];另一通路为线粒体通路,即内源通路。在这条通路中 Bcl-2 家族成员发挥着重要作用^[7]。在 caspases 家族中 caspase-3 是最重要的,与凋亡的关系最为密切,参与多种因素诱导的细胞凋亡。正常情况下,细胞质中的 caspase-3 无活性以酶原的形式

存在,当细胞接受凋亡信号刺激后才被系列反应激活,进而诱导细胞发生凋亡^[8-9]。本实验从蛋白水平上初步检测了蛭螬石油醚提取物处理前后 HeLa 细胞中 caspase-8 和 caspase-3 的表达情况。在对照组中两者均呈弱表达或不表达,而药物处理组两者表达明显增强,并且两者高表达的同时凋亡指数也升高。提示两种 caspase 蛋白的表达改变与本实验中蛭螬石油醚提取物诱导 HeLa 细胞发生凋亡有密切关系;两者参与 HeLa 细胞的凋亡调控;推测蛭螬提取物可能通过与细胞膜表面死亡受体结合,然后激活细胞内 caspase 级联反应由外源性凋亡通路完成对 HeLa 细胞的凋亡诱导作用。今后有待进一步实验证实 Fas 及其受体是否参与蛭螬提取物的诱导凋亡过程。

Bcl-2 其主要生物功能为延长细胞寿命,增加细胞对多种凋亡刺激因素的抗性。已经证明:bcl-2/bcl-2 同源二聚体可结合于线粒体内膜稳定其通透性,以防止细胞凋亡末端效应分子 caspases 的激活^[10],通过阻断细胞凋亡信号传递系统的最后通道而抑制细胞凋亡,从而调控凋亡的线粒体通路,促进细胞存活。Bax 基因即 bcl-2 相关 x 蛋白基因,它与 bcl-2 具有高度同源性,是凋亡基因家族中的核心成员之一。本实验中,随药物作用剂量和时间的增加,Bcl-2/Bax 蛋白表达比例减小,凋亡指数升高,表明 Bcl-2/Bax 参与介导 HeLa 的凋亡,增强细胞对提取物中所含诱导凋亡因素刺激的敏感性,促进细胞凋亡。推测蛭螬石油醚提取物诱导 HeLa 细胞的凋亡过程可能经由改变 Bcl-2/Bax 的蛋白表达,通过凋亡通路中线粒体途径实现的,其具体机制有待进一步研究。

References:

- [1] Xu X F, Sun S. Studies on apoptosis relative-gene for MGC-803 human gastric cancer cell line *in vitro* by anti-cancer oral liquid [J]. *Chin J Compos Clin Med* (中华综合临床医学杂志), 2003, 5(1): 14-15.
- [2] Jin Z, Sun S, Li J J, et al. Studies on sero-pharmacological experiment of the grub extract for MGC-803 human gastric cancer cell line *in vitro* [J]. *Chin J Tradit West Med* (中华中西医杂志), 2003, 4(10): 1441-1442.
- [3] Yuan J P, Ling H, Zhang M X, et al. Effect of diallyl disulfide on apoptosis and cell cycle arrest of human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(3): 299-302.
- [4] Yin D, Liu T. Expression of caspase-3 and Bcl-2 protein in epithelial ovarian tumor and relation of the expression with cell apoptosis and proliferation [J]. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2004, 14(8): 55-58.
- [5] Rust C, Gores G J. Apoptosis and liver disease [J]. *Am J Med*, 2000, 108(3): 567-574.

- [6] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors signaling and modulation [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [7] Cain K, Bratton S B, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6067-6070.
- [8] Karajewska M, Wang H G, Krajewska S, et al. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(8): 1605-1607.
- [9] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis: Definition, mechanism, and relevance to disease [J]. *Am J Med*, 1999, 107(5): 489-506.
- [10] Zamzami N, Brenner C, Marzo I, et al. Subcellular and sub-mitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins [J]. *Oncogene*, 1998, 16(7): 2255-2282.

淫羊藿苷伍用三七总皂苷对小鼠免疫功能的调节作用

肖幸丰, 王志强, 楼宜嘉*

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 研究淫羊藿苷(icariin, ICA)伍用三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)对小鼠免疫功能的调节作用,为该组合药物改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)动物模型空间学习记忆能力的作用机制提供部分实验依据。**方法** 采用血清药理学方法观察小鼠连续 ig ICA+PNS [(40+320)、(80+640)、(160+1 280) mg/kg]、单用 ICA (80 mg/kg) 和 PNS (640 mg/kg) 7 d 制得的含药血清对伴刀豆蛋白 A (ConA) 和脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖、IL-2 分泌的影响,并观察脏器指数的变化。**结果** ICA 伍用 PNS [(80+640)、(160+1 280) mg/kg] 具有较强的协同作用,其含药血清能明显促进 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖 ($P<0.01, 0.05$),量效曲线呈倒 U 形;含药血清对 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖无显著促进作用 ($P>0.05$)。ICA+PNS [(80+640) 和 (160+1 280) mg/kg] 含药血清能明显促进 IL-2 生成 ($P<0.01$),两组分合用作用强于单用,提示具有较强的协同作用,其量效曲线亦呈倒 U 形分布。单用 ICA、PNS 或两者合用均未明显影响小鼠脏器指数 ($P>0.05$)。**结论** ICA 伍用 PNS 对小鼠免疫系统具有一定的选择性调节作用,主要增强 T 细胞功能。**关键词:**淫羊藿苷;三七总皂苷;免疫调节作用;血清药理学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0888-04

Immunoregulation of icariin combined with *Panax notoginseng* saponins in mice

XIAO Xing-feng, WANG Zhi-qiang, LOU Yi-jia

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of icariin (ICA) combined with the *Panax notoginseng* saponins (PNS) on immunological function in mice and provide some experimental evidences for the combination mechanism improving the spatial learning and memory abilities of Alzheimer's disease (AD) animal model. **Methods** Based on serum pharmacological method, the ICR mice were individually ig administrated with ICA+PNS [(40+320), (80+640), and (160+1 280) mg/kg] or ICA (80 mg/kg), and PNS (640 mg/kg) only for 7 d. Drug-containing serum was prepared and effects on spleen lymphocyte proliferation of Bable/c mice induced by concanavalin-A (ConA) or lipopolysaccharide (LPS) and on interleukin-2 (IL-2) secretion were observed *in vitro*. Meanwhile, the immunological organ indexes of treated mice were evaluated. **Results** Drug-containing serum of ICA+PNS [(80+640) and (160+1 280) mg/kg] could improve the spleen lymphocyte proliferation induced by ConA ($P<0.01, 0.05$), and its dose-effect curves were shapely similar to "∩". Proliferation of spleen lymphocyte induced by LPS in tested groups could not be enchanced ($P>0.05$). Drug-containing serum of ICA+PNS [(80+640) and (160+1 280) mg/kg] could improve IL-2 production ($P<0.01$). ICA combined with PNS showed synergistic effect and an upside-down U shaped dose-effect curve. Compared with the control group, however, there were no significant differences in the immunological organ indexes of all groups administrated by ICA, PNS or the combination of the two ($P>0.05$), respectively. **Conclusion** ICA combined with PNS could

收稿日期:2005-10-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472112);浙江省中医药管理局重点资助项目(2002KF001);浙江省科技厅计划项目(2004C33106)

作者简介:肖幸丰(1978—),男,浙江大学硕士研究生,研究方向为中药药理学。Tel: (0571) 87230372 E-mail: xiaoxf21st@sina.com

* 通讯作者 楼宜嘉 Tel/Fax: (0571) 87217206 E-mail: yijialou@zju.edu.cn