

FasL 均可从细胞膜上脱落形成可溶形式的 sFas、sFasL, 当 sFas 与 FasL 结合后, 抑制相应受体效应 (Fas-FasL) 从而抑制细胞凋亡作用<sup>[9]</sup>, 而 sFasL 具有与膜 Fas (mFas) 同样生物学作用, 可引起细胞凋亡。

本实验发现未用药处理的对照组 K562 细胞 Fas 阳性表达率为 (13.93 ± 2.56)%, 100 μg/mL TSPG 诱导 K562 细胞凋亡时, Fas 阳性表达率升高, 由此可推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与上调细胞 Fas 表达有关; 另一方面, 对照组 K562 细胞 FasL 阳性表达率为 (8.65 ± 0.8)%; 在 100 μg/mL TSPG 作用 K562 细胞 9 d 中, 实验组与对照组 FasL 表达差异无显著性。根据以上实验结果, 推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能机制为: ① TSPG 诱导 K562 细胞表达 Fas, Fas 直接导致细胞凋亡, 即 Fas 阳性细胞自杀的结果。② 在体外 K562 细胞培养体系中, 虽然 TSPG 不能使 K562 细胞表达 FasL 的阳性细胞升高, 但考虑到仍有部分 K562 细胞 FasL 阳性, 也可通过相邻细胞膜表面 Fas 与 FasL 结合而相互残杀, 从而导致细胞凋亡。③ 有文献报道急性白血病细胞可自分泌肿瘤坏死因子 (TNF)<sup>[11]</sup>, 是否 Fas 阳性细胞对自分泌 TNF 敏感而促进细胞凋亡, 这需要进一步研究。

此外, 本实验还分析了 100 μg/mL TSPG 诱导 K562 细胞凋亡时, 细胞培养上清液中 sFas 的变化情况, 结果显示在 9 d 的观察时间内, 实验组与对照组 sFas 水平无明显变化。由此可初步推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与细胞 Fas 升高及其所产

生的受体效应有关, 而与 sFas 作用无关。

#### References:

- [1] Wang Y, Wang S L, Wang Y P, *et al.* Effect of total saponins of *Panax ginseng* on the bioactivity and mRNA expression of hematopoietic growth factor [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1990, 30(4): 362-366.
- [2] Chen T M, Wang Y P, Chen D L, *et al.* Experimental study on effect of apoptosis of K562 cells treated with TSPG [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 235-237.
- [3] Chen T M, Wang Y P. Experimental study on the effect of proliferation and differentiation of K562 cell treated with TSPG [J]. *Acta Univ Sci Med Chongqing* (重庆医科大学学报), 1999, 24(2): 115-119.
- [4] Komada Y, Sakurai M. Fas receptor (CD95)-mediated apoptosis in leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 1997, 25(1-2): 9-21.
- [5] Nagata S. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 267: 1449-1455.
- [6] Song Y Q, Xu G L, Zhang L Y, *et al.* Transfection of Fas gene into HL-60 cell and its role in rhG-CSF-induced apoptosis [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1999, 20(5): 242-244.
- [7] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, *et al.* A role for CD95 ligand in preventing graft rejection [J]. *Nature*, 1995, 377(6550): 630-632.
- [8] Stuart P M, Griffith T S, Usui N, *et al.* CD95 Ligand (FasL) induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(3): 396-402.
- [9] Feng X Q, Zhou S Y. The expression of apoptotic factor Fas ligand in acute leukemia [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2000, 19(9): 911-913.
- [10] Li A X, Zou P, Wang L L, *et al.* Study on expression and function of Fas ligand in human myeloid leukemia cells [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2002, 10(3): 183-186.
- [11] Luo Y P, Huang Z G. Modulation and significance of IL-6 and TNF on leukemic cells [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1996, 16: 169-171.

## 樟芝菌粉对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用

陆震鸣, 敖宗华\*, 陶文沂, 邹锡良, 符慧子

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

樟芝 *Antrodia camphorata* (M. Zang & C. H. Su) Sheng H. Wu, Ryvaden & T. T. Chang, 又名牛樟菇、牛樟芝, 是一种寄生于台湾特有树种——牛樟树脂腐朽内壁的多孔菌<sup>[1]</sup>。在民间, 樟芝长久以来被用来治疗食物、酒精和药物所引起的中毒, 以及腹泻、腹痛、高血压、乙型肝炎<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>和抗氧化<sup>[4]</sup>

等。有研究证实樟芝发酵液对四氯化碳所诱发的肝损伤也有很好的预防和治疗作用<sup>[5,6]</sup>, 多糖、三萜类化合物和酚类物质被认为是樟芝中主要的活性成分。本实验采用大鼠急性乙醇性肝损伤模型来评价樟芝菌粉的保肝作用。

#### 1 材料

收稿日期: 2006-08-27

作者简介: 陆震鸣(1981—), 男, 江苏无锡人, 硕士研究生, 研究方向为天然生物活性物质的药物化条件的研究。Tel: (0510) 85862938

\* 通讯作者 敖宗华 Tel: (0510) 85862412 E-mail: azh2003@sytu.edu.cn

1.1 药物:樟芝菌粉由本实验室根据专利方法进行生产<sup>[7]</sup>,其中含多糖 20.65%、三萜类化合物 4.3%、酚类物质 10.54%。樟芝菌粉临用时用 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液悬浮。水飞蓟素(常州神马植物提取有限公司,质量分数 80%)临用时加 1% CMC-Na 制成混悬液。

1.2 试剂:无水乙醇分析纯(国药集团化学试剂有限公司),以去离子水稀释成 60% 溶液。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(BIL)和甘油三酯(TG)测定试剂盒(罗氏诊断试剂有限公司,上海)。丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽还原酶(GR)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。DTNB、还原型谷胱甘肽(GSH)购自 Sigma 公司。

1.3 动物:SD 大鼠,雄性,清洁级,(180±20)g,购自浙江省实验动物中心[许可证号:SCXK(浙)2003-0001]。大鼠于实验开始前在温度和光照严格控制的房间内先适应一周,饲料和饮水不受控制。

2 方法

2.1 大鼠急性乙醇性肝损伤模型:大鼠随机分为 6 组,分别为正常组、樟芝菌粉对照组(1 000 mg/kg)、乙醇损伤模型组、水飞蓟素组(200 mg/kg)、樟芝菌粉组(500、1000 mg/kg),每组 8 只。正常组和模型组每天 ig 1% CMC-Na,其他各组每天 ig 相应药物,连续 10 d。第 11 天时,除正常组和樟芝菌粉对照组给予等体积生理盐水外,其余各组大鼠 ig 60% 乙醇(1 mL/kg),禁食 18 h 后摘眼球取血,分离血清;取肝脏用 0.86% 氯化钠溶液制备 10% 肝脏匀浆;取肝左叶小块置 10% 福尔马林中固定。

2.2 肝功能评价:于全自动分析仪上用试剂盒方法测定血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 水平。

2.3 病理学观察:肝组织进行苏木精-伊红染色,光镜下观察。

2.4 肝组织 MDA、GSH 水平和 GPx、GR 活性测定:GSH 水平采用 Ellman 方法测定<sup>[8]</sup>。其他指标严格按照试剂盒说明分别进行测定。

2.5 数据分析:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计程序进行单因素方差分析,组间采用 Dunnett 方法比较。

3 结果

3.1 对急性乙醇性肝损伤大鼠血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 的影响:与正常组相比,模型组大鼠血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 明显升高( $P < 0.01$ );樟芝菌粉对照组大鼠各项指标与正常组比较没有差异;与模型组相比,水飞蓟素组和樟芝菌粉高、低剂量组大鼠血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 明显下降( $P < 0.05$ )。见表 1。

3.2 对急性乙醇性肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响:与正常组相比,模型组大鼠肝脏出现肝细胞肿大,胞浆疏松,脂肪空洞,汇管区炎症细胞浸润等现象;樟芝菌粉高、低剂量组除了肝窦和血管周围还有少量炎症细胞之外,对于其他病变具有很好的保护作用;樟芝菌粉对照组的观察结果与正常组相似。

3.3 对急性乙醇性肝损伤大鼠肝脏 MDA、GSH 水平和 GPx、GR 活性的影响:与正常组相比,模型组大鼠的肝脏 MDA 水平显著升高( $P < 0.05$ );模型组 GSH 水平、GPx 和 GR 活性与正常组比较,分别下降 42.1%、26.2% 和 33.7%,差异具有显著性( $P < 0.05$ );樟芝菌粉高、低剂量组均能够抑制乙醇所致的 MDA 升高,并显著提高 GSH 水平及 GPx 和 GR 活性。见表 2。

4 讨论

乙醇摄入能够通过两种途径导致脂质过氧化物的发生,即增加活性氧系(ROS)的产生和降低内源性抗氧化物质如维生素 E、谷胱甘肽的水平<sup>[9,10]</sup>。MDA 为脂质过氧化产物之一,机体组织 MDA 的增加或减少间接反映了机体细胞受自由基攻击的严

表 1 樟芝菌粉对急性乙醇性肝损伤大鼠血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of *A. camphorata* powder on serum AST, ALT, ALP, BIL, and TG levels in acute ethanol-induced liver damage of rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	ALT/(U·L <sup>-1</sup> )	AST/(U·L <sup>-1</sup> )	ALP/(U·L <sup>-1</sup> )	BIL/(μmol·L <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )
正常	—	53.9±5.1	169.6±18.2	267.3±9.0	0.90±0.13	0.68±0.04
樟芝菌粉对照	1 000	56.9±9.7	156.0±9.41	320.4±7.8	0.95±0.06	0.46±0.03
模型	—	80.1±8.8△△	287.5±32.6△△	377.4±18.7△△	1.70±0.10△△	1.14±0.08△△
水飞蓟素	200	56.5±5.2**	219.0±18.1**	306.1±9.8**	0.95±0.07**	0.80±0.10**
樟芝菌粉	500	59.9±7.1**	224.3±28.8**	285.8±11.8**	1.41±0.05*	0.72±0.09**
	1 000	63.1±6.1**	200.6±29.9**	330.6±8.0*	1.28±0.10**	0.80±0.04**

与正常组比较:△△ $P < 0.01$ ;与模型组比较:\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
 △△ $P < 0.01$  vs normal group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group

表 2 樟芝菌粉对急性乙醇性肝损伤大鼠肝脏 MDA、GSH 水平和 GPx、GR 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 2 Effect of *A. camphorata* powder on hepatic MDA, GSH levels, and GPx, and GR activities

in acute ethanol-induced liver damage of rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(mg · kg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol · mg <sup>-1</sup> )	GSH/(μmol · g <sup>-1</sup> )	GPx/(μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )	GR/(mmol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> )
正常	—	0.89 ± 0.12	1.52 ± 0.14	43.9 ± 0.9	9.8 ± 0.2
樟芝菌粉对照	1 000	0.71 ± 0.13	1.56 ± 0.71	45.6 ± 0.8	10.9 ± 0.4
模型	—	1.78 ± 0.19 <sup>△</sup>	0.88 ± 0.15 <sup>△</sup>	34.2 ± 0.8 <sup>△</sup>	6.5 ± 0.1 <sup>△</sup>
水飞蓟素	200	0.82 ± 0.12 <sup>**</sup>	1.35 ± 0.23 <sup>*</sup>	46.5 ± 1.2 <sup>**</sup>	8.7 ± 0.5 <sup>**</sup>
樟芝菌粉	500	0.95 ± 0.14 <sup>**</sup>	1.38 ± 0.21 <sup>*</sup>	39.6 ± 1.1 <sup>*</sup>	7.4 ± 0.5 <sup>**</sup>
	1 000	1.03 ± 0.13 <sup>**</sup>	1.33 ± 0.15 <sup>*</sup>	42.7 ± 1.3 <sup>**</sup>	8.1 ± 0.3 <sup>**</sup>

与正常组比较: <sup>△</sup>P<0.05; 与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

<sup>△</sup>P<0.05 vs normal group; \*P<0.05 \*\*P<0.01 vs model group

重程度。细胞内,尤其是线粒体上的 GSH 是能起到阻碍乙醇性肝病发展的体内抗氧化系统中的主要抗氧化剂。同时,肝脏 GPx 和 GR 活性也与谷胱甘肽的水平有关。本实验证实乙醇可使小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显上升,同时肝组织 MDA 水平明显增加,GSH 水平减小,GPx 和 GR 活性降低。樟芝菌粉高、低剂量均可显著降低小鼠血清 AST、ALT、ALP、BIL 和 TG 水平,在某些指标上 (AST、ALT),其保护程度可与水飞蓟素相比。同时樟芝菌粉能降低肝组织 MDA 水平,提示具有明显的抗脂质过氧化作用,其作用机制与上调肝脏 GSH 水平以及 GSH 相关酶系 GPx 和 GR 的活性有关。

值得注意的是樟芝菌粉高剂量组在某些指标方面,如 ALT、ALP、TG、MDA 等,其作用效果没有低剂量组好,此结果表明樟芝菌粉预防急性乙醇性肝损伤作用没有剂量依赖性。樟芝中主要成分有甾体、三萜类化合物、多糖、倍半萜内酯、酚和二酚类衍生物等,其中发挥保肝作用的有效成分及最佳剂量有待进一步研究。

References:

[1] Wu S H, Ryvardeen L, Chang T T. *Antrodia camphorata*

("niu-chang-chih"), new combination of a medicinal fungus in Taiwan [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1997, 38; 273-275.

[2] Lee I H, Huang R L, Chen C T, et al. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 209; 63-67.  
[3] Song T Y, Hsu S L, Yen G C. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by mycelia of *Antrodia camphorata* in submerged culture [J]. *J Ethnopharm*, 2005, 100; 158-167.  
[4] Song T Y, Yen G C. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50; 3322-3327.  
[5] Hsiao G, Shen M Y, Lin K H, et al. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51; 3302-3308.  
[6] Song T P, Yen G C. Protective effects of fermented filtrate from *Antrodia camphorata* in culture against CCL<sub>4</sub>-induced hepatic toxicity in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51; 1571-1577.  
[7] Ao Z H, Fu H Z, Zou X L. Large scale Zhangzhi fungus deep fermenting process [P]. CN: 1456661, 2003-11-19.  
[8] Sedlak J, Lindsay R H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent [J]. *Anal Biochem*, 1968, 25; 192-205.  
[9] Ishii H, Kurose I, Kato S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12; 272-282.  
[10] Cederbaum A I. Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity [J]. *Free Radic Biol Med*, 1989, 7; 537-539.

云南重楼提取物及化学成分的抗肿瘤活性研究

张兰天<sup>1</sup>, 左予桐<sup>1</sup>, 高文远<sup>1</sup>, 张富庚<sup>1</sup>, 陈海霞<sup>1</sup>, 段宏泉<sup>2\*</sup>

(1. 天津大学药物与科学技术学院, 天津 300072; 2. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yun-nanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 为百合科重楼属植物, 分布于云南、四川、贵州等地<sup>[1]</sup>, 其干燥根茎具

有止血、免疫调节、心血管作用<sup>[2]</sup>等药理活性, 尤其在抗肿瘤方面, 已经作为云南白药、楼莲胶囊、博尔宁、金复康等多种成药的组成成分之一, 用于治疗肝

收稿日期: 2006-08-10

基金项目: 天津医科大学科研基金 (035200026)

\* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022)23542838 Fax: (022) 23542838 E-mail: duanhq@tjmu. jmu. edu. cn