

- on increase in $[Ca^{2+}]_i$ and TNF- α release in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *Acta Nankai Univ Nat Sci* (南开大学学报, 自然科学版), 2003, 6(3): 1-5.
- [6] Liu H J, Hu F, Sun W W, et al. Effects of physon on $[Ca^{2+}]_i$ and TNF- α production in rat peritoneal macrophages [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(Suppl): 283-287.
- [7] Kierner A K, Hartung T, Vollmar M. CGMP-mediated inhibition of TNF- α production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 175-181.
- [8] Monich M M, Hunninghake G W. Activation of second messenger pathway in alveolar macrophages by endotoxin [J]. *Eur Respir J*, 2002, 20: 210-222.
- [9] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF- κ B [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 2195-2224.
- [10] Shen J, Sakaida I, Uchida K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(13): 1502-1515.
- [11] Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, et al. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(4): 316-324.
- [12] Zhou X Y, Yang W X, Li J Y. Ca^{2+} and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor- κ B activation, inducible nitric oxide synthase expression, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 31337-31347.

赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

许惠玉¹, 陈志伟², 王继峰¹, 沈丽霞¹, 梁欣钰¹, 牛建昭^{1*}

(1. 北京中医药大学 细胞生化实验室, 北京 100029; 2. 齐齐哈尔医学院 组胚教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161042)

摘要:目的 探讨赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤生长及肿瘤细胞凋亡的影响及其机制。方法 60 只健康昆明小鼠, 随机分 5 组, 分别为模型组, 环磷酰胺 (100 mg/kg) 组, 赤芍总苷 (240、120 mg/kg) 组, 环磷酰胺 (100 mg/kg) + 赤芍总苷 (240 mg/kg) 组。复制小鼠 HepA 肝癌皮下移植模型后, 第 2 天 ig 给药, 连续给药 7 d, 第 8 天处死, 取肿瘤组织, 计算抑瘤率, 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率和分析细胞周期, 以及免疫组化法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 赤芍总苷高、低剂量明显抑制 HepA 肝癌小鼠肿瘤的生长; 肿瘤细胞凋亡指数增加; 抑制肿瘤细胞 G₀/G₁ 期比例, 向 S 期细胞转化, 凋亡率增高; 下调肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白的表达, 同时明显提高肿瘤细胞中 Bax 蛋白的表达。结论 赤芍总苷对 HepA 肝癌小鼠肿瘤生长有明显抑制作用, 并诱导肿瘤细胞凋亡, 其主要机制与调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达有关。

关键词: 赤芍总苷; 肝癌 HepA; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)09-1364-04

Effect of total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on apoptosis of hepatoma cell in mice

XU Hui-yu¹, CHEN Zhi-wei², WANG Ji-feng¹, SHEN Li-xia¹, LIANG Xin-yun¹, NIU Jian-zhao¹

(1. Laboratory of Cell and Biochemistry, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Department of Histoembryo, Qiqihaer College of Medicine, Qiqihaer 161042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on the growth and apoptosis of hepatoma cells HepA and its mechanism. **Methods** KM Mice (60) inoculated with hepatoma cells were randomly divided into five groups; the model group, the cyclophosphamide (CY, 100 mg/kg) group, the groups with high- and low-doses (240 and 120 mg/kg) of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* the group with combination of CY (100 mg/kg) and high-dose (240 mg/kg) of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra*, ig administration was given to the mice in day 2, respectively. The administration lasted 7 d, then the mice were sacrificed at day 8 and the tumor tissue was weighed. The inhibitory rates were calculated by weighing the tumor separately; The flow cytometer (FCM) was used to determine the apoptosis rates of hepatoma cells; The expression levels of Bcl-2 and Bax of the hepatoma cells were assayed by immunohistochemistry. **Results** The hepatoma

收稿日期: 2006-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助 (305404200032; 30510403202); 长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT0413); 博士点基金资助项目 (20050026012); 齐齐哈尔市科学技术计划重点项目

作者简介: 许惠玉 (1973-), 女 (朝鲜族), 讲师, 2005 级博士生, 研究方向为中药抗肿瘤。

Tel: (010) 64287538 E-mail: czwzp@tom.com

* 通讯作者 牛建昭 Tel: (010) 64286716 E-mail: niujz@263.net

cells in both high- and low-doses groups with the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* were inhibited in a significant difference compared with the model group; It is showed that the larger dosage of the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* is, the higher inhibitory rates are; The proportion in G₀/G₁ period cells could be inhibited and made to transfer to S period cell and increase the apoptosis rates by the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra*; The expression levels of Bcl-2 could be decreased while the expression levels of Bax in hepatoma cells could be increased by the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra*. **Conclusion** The total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* can inhibit the growth of hepatoma cells significantly and induce the apoptosis of hepatoma cells, which may be closely related with regulating the expression levels of Bcl-2 and Bax.

Key words: the total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra*; hepatoma cell HepA; apoptosis

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根,味酸、苦,性寒,入肝脾经,凉血、活血。动物实验证明,赤芍具有解痉、扩张血管、镇痛作用。赤芍是重要的活血化瘀中药,常以复方组成成分用于肿瘤和血症的治疗,尤以肝病常见。赤芍总苷系赤芍中的主要活性部位,其主要有效成分包括芍药苷(3.1%~7.0%)芍药内酯苷(0.1%)羟基芍药苷(0.06%),苯甲酰芍药苷(0.01%)等单萜苷类化合物。文献报道赤芍总苷有明显的抑制肿瘤作用^[1~2],本实验进一步探讨其抑瘤作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物及瘤株:健康昆明种小鼠,50只,体重(20±2)g,均为雄性,由中国中医科学院提供。HepA瘤株由北京肿瘤医院提供,第5代。

1.2 主要药物和仪器:赤芍总苷由西安奥晶科技发展有限公司提供,批号060417,质量分数>95%。环磷酰胺,上海华联制药有限公司生产,批号011016。Bcl-2、Bax即用型免疫组化试剂盒,DAB染色剂均购于武汉博士德生物有限公司。Olympus显微镜,HIMAS-1000病理图文分析系统,流式细胞仪(FACScan, Beckman公司),由北京东直门医院检验科提供。

1.3 赤芍总苷对HepA荷瘤小鼠的影响

1.3.1 分组及给药:无菌刺取传代8d的HepA肝癌瘤块,研磨300目筛网过滤,用生理盐水调整细胞浓度至 1×10^7 ,台盼蓝染色,光镜下瘤细胞计数,活瘤细胞>90%。每只0.2mL接种于小鼠右腋部皮下,24h后60只小鼠随机分为5组:模型组,环磷酰胺组,赤芍总苷高、低剂量(240、120mg/kg)组,联合用药组,各12只。模型组ig生理盐水0.4mL/只;赤芍总苷组ig赤芍总苷120、240mg/kg;环磷酰胺组生理盐水ig赤芍总苷0.4mL/只,第3天ip环磷酰胺100mg/kg,联合用药组ig赤芍总

苷120mg/kg,第3天ip环磷酰胺100mg/kg。各组在接种后第2天开始给药,连续7d后禁食,第8天处死动物。根据各组小鼠死亡情况每组取10只动物,准备组织处理,测定指标。

1.3.2 指标测定:动物处死后,称体重,取瘤组织,计算抑瘤率[抑瘤率=(1-给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%]。

1.3.3 凋亡指数测定:取各组小鼠的肿瘤组织,10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,HE染色。于光学显微镜下观察,每张切片取5个不同坏死视野,计数500个肿瘤细胞阳性细胞所占百分比,计算凋亡指数(凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.3.4 免疫组化测定Bcl-2及Bax蛋白表达:瘤组织切片常规脱蜡至水,加3% H₂O₂室温封闭10min,PBS洗,浸泡于0.01mol/L枸橼酸缓冲液,高压后冷却至室温。滴加5%BSA封闭液37℃、20min,I抗蛋白4℃过夜,PBS洗,I抗37℃、2min,PBS洗,滴加SABC试剂37℃、20min,PBS洗,DAB显色。Bcl-2、Bax抗体为单克隆抗体(1:100),以PBS代替I抗作为阴性对照。

1.3.5 细胞周期分析:取70%冷乙醇固定的细胞样品,用PBS洗两次,以洗去残留的乙醇,加碘化丙锭染液(4℃、避光30min),用流式细胞仪检测细胞周期的变化,测定凋亡率。

1.3.6 图像分析方法:采集Bcl-2和Bax免疫组织化学染色图像,用Image-ProPlus分析软件进行图像分析,每组涂片取10个视野测定小鼠肿瘤细胞Bcl-2和Bax蛋白阳性产物的积分吸光度,取平均值代表Bcl-2和Bax蛋白表达强度,吸光度值越大表示阳性产物表达越强。

1.4 统计学方法:实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据先行方差齐性检验,再进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 抑瘤率的比较:见表 1。结果显示治疗组均有一定的抑瘤作用,与模型组比较差异显著。环磷酰胺组抑瘤效果最好,但死亡率高,小鼠消瘦,毛稀疏,食欲降低。赤芍总苷高剂量组与低剂量组比较瘤体较小,两组小鼠状态良好,但抑瘤效果不如环磷酰胺组。而联合用药组不但抑瘤效果好,而且小鼠的生存质量高。

2.2 凋亡指数比较:见表 1。结果显示与模型组比较,治疗组凋亡指数明显升高,差异显著。模型组坏死区面积大,坏死细胞多,凋亡细胞少,而治疗各组坏死面积相应缩小,坏死细胞少,而凋亡细胞增多。

表 1 赤芍总苷对荷瘤小鼠肿瘤质量及肿瘤细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* on tumor weight and tumor apoptosis in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	瘤质量/ g	抑瘤率/ %	凋亡指数/ %
模型	—	1.28±0.35	—	7.83±2.67
环磷酰胺	100	0.45±0.23**	64.84±2.34	32.54±3.56**
赤芍总苷	240	0.79±0.26**	38.75±2.41	28.76±3.23**
	120	0.91±0.32**	28.90±1.67	24.52±2.45**
联合用药	120+100	0.53±0.34**	58.59±3.24	29.64±3.47**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

2.3 对小鼠肝癌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响:见表 2。Bcl-2 和 Bax 蛋白定位于胞浆,阳性产物为棕黄色颗粒。模型组肿瘤细胞中 Bcl-2 蛋白表达增强,治疗组肿瘤细胞组中 Bcl-2 蛋白表达减弱,两者表达的差异非常显著 ($P<0.01$)。Bax 正好相反,与模型组相比,治疗各组肿瘤细胞中 Bax 蛋白表达都有所增强 ($P<0.01$)。

表 2 赤芍总苷对 HepA 肿瘤细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on protein expression of Bcl-2 and Bax in hepatoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Bcl-2	Bax
模型	—	14.37±0.88	9.64±1.72
环磷酰胺	100	6.34±0.56**	18.67±1.56**
赤芍总苷	240	10.65±0.63**	12.78±1.57**
	120	8.98±0.41**	14.53±1.84**
联合用药	120+100	6.67±0.83**	15.38±1.96**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

2.4 对体内小鼠肝癌细胞周期的影响:见表 3。模型组的细胞周期明显,模型组凋亡峰不明显,在较小的凋亡峰前,有许多细胞碎片,而赤芍总苷高剂量组

表 3 赤芍总苷对 HepA 肿瘤细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of total glucosides from *Radix Paeoniae Rubra* on tumor cell cycle in hepatoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	细胞周期/%			凋亡指数/ %
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	
模型	—	56.69±3.26	10.49±1.14	32.81±2.16	7.76±1.25
赤芍总苷	240	53.05±1.78	11.40±1.34	35.54±2.23	45.57±2.67**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

无细胞碎片, G₀/G₁期细胞比例明显减少, G₀/G₁期前具有明显凋亡峰, S 期细胞明显增多, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$)。G₂/M 期细胞数变化不大, 赤芍总苷高剂量组凋亡率明显增高。

3 讨论

细胞周期是反映细胞生存周期的重要指标之一, 细胞周期各个时相的分布情况可以反映肿瘤细胞增殖的状态。在细胞周期调控机制中有两个重要点, 分别位于 G₁期与 S 期。肿瘤细胞 G₀/G₁期阻滞, 是拮抗肿瘤细胞发展的一个重要机制^[4]。本研究, 在研究了抑瘤率和凋亡指数基础上, 用流式细胞术和免疫组织化学技术观察了赤芍总苷对肿瘤细胞周期及细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。结果显示, 赤芍总苷能明显阻滞肿瘤细胞 G₀/G₁期细胞向 S 期细胞的转化。一定剂量的赤芍总苷诱导肿瘤细胞凋亡, 凋亡率为 45.57%。细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。许多人体基因 Bcl-2、p53 及相关基因 Bcl-2、Bax、Bad 等参与凋亡的调控^[5]。Bcl-2 家族成员可分为抑制凋亡和促进凋亡两类, Bcl-2 和 Bax 为其重要代表。Bcl-2 在肝癌组织中异常表达通过抑制细胞凋亡而延长细胞寿命, 从而增加了肿瘤发生的机会并促进肿瘤发展。Bax 则具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用, 可促进线粒体内细胞色素 c 的释放, 促进细胞凋亡的产生。最近的资料提示 Bcl-2 能与几种 Bcl-2 相关蛋白, 尤其是 Bax 形成异二聚体, Bcl-2 的效应有赖于和 Bax 的相互作用, 二者的比值决定细胞接受刺激信号是凋亡还是存活。Bax 过量表达, 细胞凋亡; Bcl-2 过量表达, 细胞存活。本研究结果显示, 模型组肿瘤细胞中 Bcl-2 表达较对照组有所增加, 而 Bax 表达明显减少, 赤芍总苷能降低肿瘤细胞中 Bcl-2 的表达。同时, 赤芍总苷也能明显提高肿瘤细胞中 Bax 的表达, 表明赤芍总苷可以通过影响 Bcl-2 和 Bax 的调节表达来促进肿瘤细胞凋亡, 抗

肿瘤机制与凋亡有密切关系。本研究显示赤芍总苷具有明显的抑瘤作用,有效诱导肿瘤细胞凋亡。

References:

- [1] Hua D, Wu M Y, Yu X H, et al. The influence of the total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* on immunological function in tumor-bearing mice [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2004, 32(1): 47-48.
- [2] Xu H Y, Wang G Y, Chen Z W. The influence of the total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* on the expression of Bcl-2, c-myc gene and apoptosis mechanisms in tumor cell [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2005, 10(21):

778-780.

- [3] Chen Z W, Xu H Y, Yan S C, et al. Morphologic experimental study on antitumor effect of total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2005, 23(7): 1229-1230.
- [4] Dong L F, Liu J S, Miao Z H, et al. Antineoplastic effect of monkshood polysaccharide on mice transplanted with tumor lines of H₂₂ and S₁₈₀ [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2003, 9(9): 14-16.
- [5] Lu J P, Sun H, Ou Z L. Apoptosis of ovarian cancer cell line SKOV3 induced by arsenic trioxide [J]. *Curr Adv Obstet Gynecol* (现代妇产科进展), 2003, 12(2): 93-96.

蝙蝠葛酚性碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

张晓娟, 罗宇芬, 杨 敏

(广东省人民医院 药理学部, 广东 广州 510080)

摘 要:目的 研究蝙蝠葛酚性碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻断局灶性脑缺血模型,缺血 2 h 后再灌注 24 h,观察蝙蝠葛酚性碱(5、10、20 mg/kg,再灌注开始时 ip 给药)对神经功能评分、脑梗死范围、脑水肿和血脑屏障通透性的影响,测定脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果 蝙蝠葛酚性碱能明显减轻大鼠的神经功能缺陷、缩小脑梗死体积、减轻脑水肿和血脑屏障通透性,显著增加 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 水平。结论 蝙蝠葛酚性碱对脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与降低血脑屏障通透性、抗脂质过氧化有关。

关键词:蝙蝠葛酚性碱;脑缺血再灌注损伤;血脑屏障;脂质过氧化

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1367-03

Protection of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHANG Xiao-juan, LUO Yu-fen, YANG Min

(Department of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Key words: phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* (PAMD); cerebral ischemia-reperfusion injury; blood brain barrier (BBB); lipid peroxidation

蝙蝠葛酚性碱(phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum*, PAMD)是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 根茎中提取的多种脂溶性生物碱的混合物。其主要成分为蝙蝠葛碱(dauricine)和蝙蝠葛苏林碱(daurisoline),两者均为双苄基异喹啉类生物碱,脂溶性高,易通过血脑屏障(BBB),在脑组织中有较高的浓度分布。经研究证明 PAMD 对大鼠脑缺血再灌注继发的炎性损伤具有抑制作用^[1],本实验进一步研究 PAMD 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:PAMD(含蝙蝠葛碱约 83%,含蝙蝠葛苏林碱约 15%),本实验室自制,用 1 mol/L HCl 溶解后,再用 1 mol/L NaOH 调 pH 值 6.4。水合氯醛、红四氮唑(TTC),国药集团化学试剂有限公司;伊文思蓝(EB),Fluka 进口分装;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物、分组及给药方法:SD 大鼠(中山大学医学院实验动物中心提供),雄性,体重 200~250 g,随机分为 5 组:假手术组(除了不插尼龙线外,其余操

收稿日期:2006-10-22

作者简介:张晓娟(1975—),女,山东文登人,主管药师,硕士,主要从事临床药学及脑血管药理学研究。

Tel: (020) 83827812 E-mail: xiaojuanzhang@yahoo.com.cn