

- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [8] 郭青龙, 赵丽, 龙启冬, 等. 藤黄酸诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞的凋亡作用[J]. 天然药物杂志, 2004, 2(2): 106-110.
- [9] 刘静冰, 秦叔逵, 李进. 藤黄酸抗胰腺癌作用的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(3): 274.
- [10] 曲宝玺, 郝晓阁, 李德华. 藤黄 II 号抗癌作用的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 1991, 18(1): 50-52.

杜鹃花总黄酮对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制^①

范一菲¹, 王云海², 张建华³, 陈志武^{3*}

(1. 安徽医科大学 生理学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第一附属医院 普胸外科, 安徽 合肥 230032; 3. 安徽医科大学 药理学教研室, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 观察杜鹃花总黄酮 (TFRS) 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法 采用在体结扎大鼠心脏冠状动脉左前降支法, 观察心电图 ST 段和 T 波的变化, TTC 染色法测定心肌梗死面积并测定大鼠血清乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 活性, 血清丙二醛 (MDA) 及一氧化氮 (NO) 水平, 并应用逆转录酶链式反应 (RT-PCR) 方法测大鼠心肌中诱导型一氧化氮合酶 (NOS) mRNA 表达情况。结果 TFRS 100 mg/kg 对缺血 30 min 时 ST 段的抬高有明显抑制作用, TFRS 25、50、100 mg/kg 对再灌注 30 min 时 ST 段的抬高有明显抑制作用; TFRS 50 mg/kg 能显著的降低心肌梗死面积; TFRS 50、100 mg/kg 能不同程度降低血清中的 LDH、CK 的活性。TFRS 50 mg/kg 可降低血清中 MDA 的水平; TFRS 100 mg/kg 能显著提高心肌 NOS mRNA 的表达。结论 TFRS 对心肌和缺血再灌注损伤有一定的保护作用, 其作用机制可能与抗自由基和提高心肌 NOS 基因 mRNA 的表达及增加 NO 产生有关。

关键词: 杜鹃花总黄酮 (TFRS); 心肌缺血再灌注; 诱导型一氧化氮合酶 (NOS)

中图分类号: R 286.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)02-0240-05

Protection and mechanism of total flavones from *Rhododendron simsii* on myocardial ischemia-reperfusion injury rats

FAN Yi-fei¹, WANG Yun-hai², ZHANG Jian-hua³, CHEN Zhi-wu³

(1. Department of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Department of Chest Surgery, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of total flavone from *Rhododendron simsii* (TFRS) on myocardial ischemia-reperfusion injury rats and its mechanism. **Methods** The ischemic model was made by occluding the anterior descending of the left artery (LAD) in rats. The change of ST segment and T wave of electrocardiograph (ECG) were observed, and the activity of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), levels of the maleic dialdehyde (MDA), and nitric oxide (NO) in serum were measured. And by tetrazolium chloride (TTC) staining, the areas of myocardial infarction were observed. The expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in rats was detected by employing the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. **Results** On the myocardial infarction model by occluding the anterior descending of the LAD in rats, TFRS (100 mg/kg) obviously reduced the height of ST segment after occluding 30 min and TFRS (25, 50, and 100 mg/kg) obviously reduced the height of ST segment after reperfusion 30 min. TFRS (50 mg/kg) reduced by myocardial infarction area. TFRS (50 and 100 mg/kg) obviously reduced the activity of CK and LDH. TFRS (50 mg/kg) decreased the level of MDA in serum. By RT-PCR technique, it was found that the expression of NOS mRNA in myocardium in IR rats pretreated with TFRS (100 mg/kg) was higher than that in IR and normal groups. **Conclusions** TFRS has the significant protection against myocardial ischemia-reperfusion injury via atte-

① 收稿日期: 2007-05-11

基金项目: 安徽省科技攻关重点资助项目 (0613059A); 安徽医科大学科研基金资助项目 (2005Z031)

作者简介: 范一菲 (1977—), 女, 安徽宁国市人, 讲师, 在读博士, 研究方向为心脑血管药理学。

Tel: (0551) 5161132 E-mail: fanyifei100@yahoo.com.cn

* 通讯作者 陈志武 Tel: (0551) 5161133 E-mail: wzcxiang@mail.hf.ah.cn

nuating oxygen free radical and increasing the expression of NOS mRNA and NO production.

Key words: total flavone of *Rhododendron simsii* Planch. (TFRS); myocardial ischemia-reperfusion; inducible nitric oxide synthase (NOS)

杜鹃花总黄酮 (total flavones of *Rhododendron simsii*, TFRS) 是从杜鹃科植物杜鹃 *Rhododendron simsii* Planch. 花中提取的有效部位, 其主要成分为槲皮素、金丝桃苷及映山红素等, 而金丝桃苷^[1]、槲皮素^[2]等对心肌缺血损伤有明显保护作用, 因此, 推测 TFRS 对心肌缺血性损伤可能也有保护作用, 本研究室前期研究也曾报道过 TFRS 对大鼠离体心脏的抗心肌缺血作用^[3]。本实验通过在体大鼠心肌缺血再灌注模型, 研究 TFRS 对心肌缺血及再灌注损伤的保护作用, 并对其可能的机制进行初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: TFRS 由安徽医科大学药理学教研室提供, 黄色粉末, 总黄酮质量分数达 80% 以上; 硝酸甘油, 北京益民药业有限公司, 批号 20050530; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、肌酸激酶 (CK) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、一氧化氮 (NO) 试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供。TRIZOL Reagent, 大连宝生物公司, 批号 BK502; 琼脂糖, 捷瑞生物工程 (上海) 有限公司, 批号 3211G25; PCR 试剂盒, 大连宝生物公司, 批号 BK3301; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 动物: Wistar 大鼠, 体重 250~300 g, 雄性, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 普通级。

1.3 方法: 大鼠随机分为 6 组, 分别为假手术组, 模型组, TFRS 25、50、100 mg/kg 3 个剂量组, 硝酸甘油 10 mg/kg 阳性药对照组。氨基甲酸乙酯 (1 g/kg) ip 麻醉后, 固定, 持续记录肢体导联心电图 (II 导, ECG)。气管插管, 连接小动物呼吸机, 呼吸频率为 70 次/min, 潮气量 12 mL。沿左锁骨中线切开皮肤 2 cm, 在第三四肋间打开胸腔, 暴露心脏, 剪开心包, 在动脉圆锥与左心耳之间冠状静脉处进针, 使左冠状动脉前降支 (LAD) 位于其上, 稳定 10 min 后, 套上双层塑料套管, 收紧扎线即完成左冠状动脉闭塞致心肌缺血。心肌缺血的判断标准为心电图出现心肌梗死表现 (ST 段抬高及 T 波高尖) 及心脏局部紫绀。心肌缺血 30 min 后抽出内层套管, 即松开线结实施再灌注 60 min。给药方法为造模前 3 d 尾静脉推注, 每日 1 次。

实验结束后, 腹主动脉取血, 并迅速取出心脏,

去除心脏内的瘀血, 重新结扎冠状动脉左前降支, 从主动脉注入 0.25% 伊文思蓝溶液, 立刻放入 -80 °C 冰箱冻存储备。血液离心取上清, 置 -20 °C 冰箱冻存。全部实验结束后严格按试剂盒操作测 LDH、CK、MDA、NO 等生化指标。将冷冻后的心脏取出, 将心脏从心尖到心基底部平行切成 2 mm 的小片, 置于 1% 氯化三苯基四氮 (TTC) 溶液中, 37 °C 温孵 30 min, 染色, 置 10% 福尔马林中固定并照相, 未缺血区为红色, 梗死区为白色, 在图像分析软件 (Image J) 下计算出梗死区 (IS) 的面积, 心肌梗死程度以 IS/AAR (梗死心肌面积/全心面积) 来表示。另设假手术组, 模型组, TFRS 大剂量组 (100 mg/kg), 每组各 3 只大鼠, 实验方法相同, 再灌注结束后迅速取心脏, 液氮保存, 待测诱导型一氧化氮合酶 (NOS) mRNA 基因的表达情况 (RT-PCR)。

1.4 统计学方法: 各项指标结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 配对 t 检验处理。所有数据分析均用 SPSS 11.5 统计软件分析处理。mRNA 表达量的比较采用核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统对电泳条带的灰度值进行测定, 以 NOS/ β -actin 灰度值作为半定量分析指标, 并做组间比较。

2 结果

2.1 TFRS 对缺血再灌注后 ECG 的影响: 如表 1 和 2 所示。假手术组大鼠在整个实验期间的各个时间点 ST 段均无明显偏移, 模型组大鼠在心肌缺血 2、30 min 及再灌注时 ST 段抬高 (Δ ST) 明显, 与假手术组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。TFRS 50、100 mg/kg 组对缺血 2 min 时 ST 段的抬高有明显的抑制作用, 硝酸甘油与 TFRS 100 mg/kg 处理组对缺血 30 min 时 ST 段的抬高有明显的抑制作用。硝酸甘油与 TFRS 25、50、100 mg/kg 组对再灌注 30 min 时 ST 段的抬高有明显的抑制作用, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。

从表 2 可以看出, 假手术组大鼠在心肌缺血及再灌注的各个时间点 T 波高度均无明显变化, 模型组大鼠在心肌缺血 2、30 min 及再灌注时 T 波抬高 (Δ T) 明显, 与假手术组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。TFRS 100 mg/kg 对缺血 30 min 时 T 波的抬高有明显的抑制作用。硝酸甘油与 TFRS 25、50

表 1 TFRS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心电图 Δ ST 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Table 1 Effect of TFRS on Δ ST of ECG in myocardial ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Δ ST/mV				
		缺血 2 min	缺血 30 min	再灌注 5 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min
假手术	-	0.029 $\pm$ 0.013	0.021 $\pm$ 0.011	0.014 $\pm$ 0.005	0.016 $\pm$ 0.010	0.015 $\pm$ 0.006
模型	-	0.115 $\pm$ 0.026 [#]	0.092 $\pm$ 0.035 [#]	0.096 $\pm$ 0.032 [#]	0.089 $\pm$ 0.029 [#]	0.051 $\pm$ 0.026 [#]
TFRS	100	0.078 $\pm$ 0.021 [*]	0.046 $\pm$ 0.015 ^{**}	0.072 $\pm$ 0.021	0.050 $\pm$ 0.026 [*]	0.036 $\pm$ 0.018
	50	0.044 $\pm$ 0.023 [*]	0.050 $\pm$ 0.025 [*]	0.069 $\pm$ 0.019	0.058 $\pm$ 0.020 [*]	0.045 $\pm$ 0.017
	25	0.099 $\pm$ 0.032	0.085 $\pm$ 0.031	0.083 $\pm$ 0.027	0.069 $\pm$ 0.018 [*]	0.059 $\pm$ 0.020
硝酸甘油	10	0.082 $\pm$ 0.039	0.042 $\pm$ 0.020 ^{**}	0.066 $\pm$ 0.026	0.042 $\pm$ 0.016 ^{**}	0.028 $\pm$ 0.013 [*]

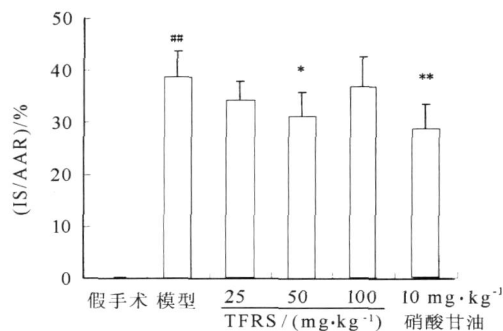
与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group表 2 TFRS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心电图 Δ T 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Table 2 Effect of TFRS on Δ T of ECG in myocardial ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Δ T/mV				
		缺血 2 min	缺血 30 min	再灌注 5 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min
假手术	-	0.129 $\pm$ 0.025	0.132 $\pm$ 0.021	0.129 $\pm$ 0.028	0.127 $\pm$ 0.024	0.129 $\pm$ 0.027
模型	-	0.289 $\pm$ 0.108 [#]	0.268 $\pm$ 0.116 [#]	0.248 $\pm$ 0.095 [#]	0.251 $\pm$ 0.109 [#]	0.169 $\pm$ 0.048
TFRS	100	0.283 $\pm$ 0.113	0.138 $\pm$ 0.049 [*]	0.183 $\pm$ 0.056	0.173 $\pm$ 0.062	0.163 $\pm$ 0.047
	50	0.196 $\pm$ 0.056	0.226 $\pm$ 0.075	0.175 $\pm$ 0.069	0.123 $\pm$ 0.067 [*]	0.145 $\pm$ 0.050
	25	0.234 $\pm$ 0.075	0.159 $\pm$ 0.076	0.182 $\pm$ 0.086	0.133 $\pm$ 0.057 [*]	0.126 $\pm$ 0.048
硝酸甘油	10	0.238 $\pm$ 0.079	0.128 $\pm$ 0.032 ^{**}	0.168 $\pm$ 0.052	0.129 $\pm$ 0.047 [*]	0.128 $\pm$ 0.039

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

mg/kg 对再灌注 30 min 时 T 波的抬高有明显的抑制作用, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 TFRS 对缺血再灌注后心肌梗死面积的影响: 图 1 表明心脏缺血再灌注损伤后, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌梗死面积 (IS/AAR) 明显增加, 表明模型成功。与模型组比较, 硝酸甘油及 TFRS 各组均能不同程度地降低 IS/AAR, 其中 TFRS 50 mg/kg 组的降低梗死面积与模型组比较有显著意义 ($P < 0.05$)。

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$ 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs Sham group^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group图 1 TFRS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠 (IS/AAR) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig 1 Effect of TFRS on IS/AAR in myocardial ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

义 ($P < 0.05$)。

2.3 TFRS 对缺血再灌注损伤大鼠血清 LDH、CK 活性及 NO、MDA 水平的影响: 从表 3 可以看出, 模型组大鼠血清中 LDH、CK 的活性明显升高, 与假手术组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 硝酸甘油和 TFRS 100 mg/kg 能够显著减少 CK 的漏出, 差异显著 ($P < 0.01$); TFRS 100、50 mg/kg 及硝酸甘油能够显著减少 LDH 的漏出, 差异显著 ($P < 0.05$)。经缺血再灌注后, 模型组大鼠血清中

表 3 TFRS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 LDH、CK 活性及 NO、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Table 3 Effect of TFRS on activities of CK and LDH, and level of NO and MDA in serum in myocardial ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	CK/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LDH/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术	-	0.59 $\pm$ 0.10	4.016 $\pm$ 0.679	81.4 $\pm$ 30.3	8.5 $\pm$ 2.1
模型	-	1.22 $\pm$ 0.21 [*]	6.665 $\pm$ 0.670 [*]	50.0 $\pm$ 20.1 [*]	13.5 $\pm$ 3.8 [*]
TFRS	100	0.79 $\pm$ 0.10 ^{△△}	5.652 $\pm$ 0.680 [△]	91.7 $\pm$ 26.8 ^{△△}	12.6 $\pm$ 1.8
	50	1.01 $\pm$ 0.14	5.788 $\pm$ 0.673 [△]	83.2 $\pm$ 25.9 [△]	9.3 $\pm$ 1.9 [△]
	25	1.23 $\pm$ 0.15	6.377 $\pm$ 0.772	75.4 $\pm$ 29.8	13.7 $\pm$ 2.4
硝酸甘油	10	0.72 $\pm$ 0.10 ^{△△}	4.122 $\pm$ 0.497 ^{△△}	82.7 $\pm$ 34.5 [△]	9.5 $\pm$ 2.1 ^{△△}

与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs Sham group[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

NO 水平显著低于假手术组,与模型组相比,TFRS 100、50 mg/kg 与硝酸甘油均可显著增加 NO 的生成量($P < 0.05$)。另外模型组大鼠血清中MDA 水平显著高于假手术组,与模型组相比,TFRS 50 mg/kg 及硝酸甘油可显著减少MDA 的生成量($P < 0.05$)。

2.4 TFRS 对缺血再灌注大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达的影响:采用 RT-PCR 技术半定量检测了 100 mg/kg TFRS 对缺血再灌注大鼠心肌组织中 NOS mRNA 的表达量的影响,结果见图 2。结果表明假手术组大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达很低,模型组大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达有所增强;100 mg/kg TFRS 大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达显著增强,提示 TFRS 能显著促进 NOS mRNA 的表达,见表 4。

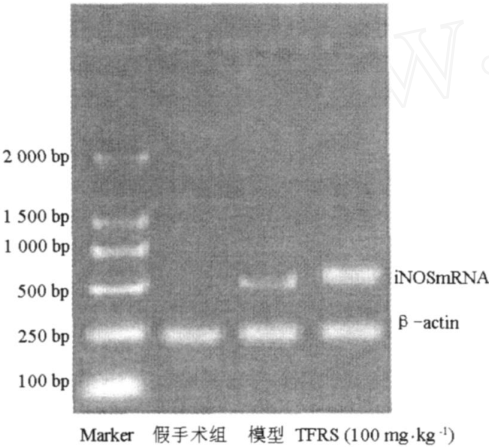


图 2 TFRS 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织 iNOS mRNA 表达的影响

Fig 2 Effect of TFRS on expression of iNOS mRNA in myocardium of myocardial ischemia-reperfusion injury rats

表 4 TFRS 对缺血再灌注损伤大鼠心肌组织中 iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Table 4 Effect of TFRS on expression of iNOS mRNA in myocardium of myocardial ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	NOS/βactin
假手术	-	0.337 ± 0.035
模型	-	0.450 ± 0.056 [#]
TFRS	100	0.800 ± 0.089 ^{**}

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
[#] $P < 0.05$ vs Sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是心血管临床中溶栓术、经皮腔内冠状动脉成形术、冠脉搭桥术等治疗的严重并发症之一。结扎 LAD 致大鼠心肌缺血及再灌

注是一种常用的心肌缺血动物模型^[4],可致大鼠心电图 ST 段及 T 波的抬高。并且由于心脏缺血缺氧,心肌细胞膜的损伤,可致细胞内 LDH、CK 等酶的外漏。本研究发现,TFRS 可明显抑制大鼠 ECG 中 ST 段和 T 波的抬高。本研究还发现 TFRS 可显著抑制缺血再灌注所致的血清中 LDH、CK 活性的升高,也提示 TFRS 对大鼠心肌缺血损伤有一定的保护作用。

急性心肌梗死后,各项心功能指标的改变及其恢复的程度与速度均与心肌梗死面积呈负相关。因而缩小心肌梗死面积可作为抗心肌缺血药物的主要疗效指标。在实验中发现心脏缺血再灌注损伤后,模型组大鼠心脏左室 IS/AAR 明显增加,说明结扎 LAD,中断了左室壁的血供,左室心肌出现严重缺血。与模型组相比较,TFRS 各组均能不同程度地降低 IS/AAR,TFRS 50 mg/kg 降低梗死面积与模型组相比较有显著意义,提示 TFRS 对心肌缺血具有保护作用。以上结果表明 TFRS 对在体大鼠心脏缺血再灌注损伤有一定的保护作用,这与文献报道 TFRS 中两种活性成分金丝桃苷^[1]和槲皮素^[2]的抗心肌缺血作用是一致的。

自由基在心肌缺血及再灌注损伤中占有十分重要的作用。MDA 系自由基的脂质过氧化产物,可反映自由基对生物膜过氧化程度。本研究发现 TFRS 能显著抑制 MDA 水平的升高,提示 TFRS 的抗心肌缺血作用与其抗自由基有关。

本实验还发现假手术组大鼠心肌组织中 NOS 基因 mRNA 呈低水平表达,符合 NOS 在生理情况下很少表达这一特性;模型组大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达有所增强,这可能对缺血刺激的一种应激性反应;大剂量 TFRS 组大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达显著增强,即大剂量 TFRS 能显著提高 NOS mRNA 的表达。有文献报道 NOS 的基因治疗可在基因转移后 3 d 预防心肌梗死的发生^[5],这也支持 TFRS 可通过促进 NOS mRNA 表达产生抗心肌缺血再灌注损伤的作用。但是本研究模型组大鼠心肌组织中测得 NO 水平较假手术组显著下降,似乎与模型组大鼠心肌组织中 NOS mRNA 表达有所增强这一点矛盾。根据文献报道,心肌缺血时其对结构型 NOS (cNOS) 表达的抑制作用明显强于其促进 NOS mRNA 表达的作用,因此总体结果是模型组血浆中 NO 水平显著下降^[6]。

综上所述,TFRS 对心肌缺血再灌注损伤有明显的保护作用,其机制可能与减轻细胞膜脂质过氧

化、抗自由基、提高 NOS mRNA 的表达和增加 NO 合成有关。

参考文献

- [1] 汪为群, 张艳, 方志炼, 等. 金丝桃苷对心肌脂质过氧化物的影响 [J]. 中国药理学通报, 1995, 11(2): 123-125.
- [2] 曹文军, 陈瑞芬, 刘国贞. 槲皮素对缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(3): 311-313.
- [3] 范一菲, 孔德虎, 陈志武, 等. 杜鹃花总黄酮对心肌缺血损伤的保护作用及其机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41(2): 157-160.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [5] Li Q, Guo Y, Tan W, et al. Gene therapy with NOS provides long-term protection against myocardial infarction without adverse functional consequences [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(2): 584-589.
- [6] Engelman D T, Watanabe M, Engelman R M, et al. Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 110(4 Pt 1): 1047-1053.

小檗碱对 HeLa 细胞凋亡及其凋亡相关蛋白表达的影响^①

来丽娜¹, 赵娜², 郭春花¹, 张晓一¹, 范毅敏¹

(1. 长治医学院 药理教研室, 山西 长治 046000; 2. 天津医科大学总医院 外科研究所, 天津 300052)

摘要: 目的 研究小檗碱对人宫颈癌 HeLa 细胞株增殖及凋亡的影响及其发生机制。方法 采用 MTT 法观察小檗碱对 HeLa 细胞增殖的影响, DNA ladder, 流式细胞仪等方法进行细胞凋亡检测, 用 Western blotting 方法检测凋亡过程中相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的变化。结果 小檗碱在体外试验中能明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 在一定的时间、剂量范围内呈时间-剂量依赖关系。20、40 mg/L 小檗碱作用 48 h 后, 细胞 DNA 片段分析可看到凋亡时降解形成的梯带, 流式细胞仪检测到了细胞凋亡峰, 各组的凋亡率分别是 (16.7±2.8)%、(29.6±4.4)%, 与对照组 (1.9±0.6)% 和 5 mg/L 小檗碱组 (2.3±0.8)% 相比差异显著 ($P < 0.01$)。在凋亡过程中, Bax 蛋白表达明显增高, 而 Bcl-2 蛋白表达下调。结论 小檗碱体外能抑制 HeLa 细胞增殖并诱导其发生凋亡, 其机制可能与 Bax 蛋白表达明显增高, 而 Bcl-2 蛋白表达下调有关。

关键词: 小檗碱; HeLa 细胞; Bcl-2; Bax

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0244-04

Effect of berberine on apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 proteins in HeLa cells

LA IL i-na¹, ZHAO Na², GUO Chun-hua¹, ZHANG Xiao-yi¹, FAN Yim in¹

(1. Department of Pharmacology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. Institute of Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of berberine on growth and apoptosis of human cervical cancer cell line HeLa and its possible mechanism. **Methods** The effect of berberine on growth of HeLa cells was studied by MTT assay. Apoptosis of HeLa cells exposed to berberine was observed by flow cytometry and DNA gel electrophoresis. The expression of Bax and Bcl-2 was studied by Western blotting analysis. **Results** Berberine markedly inhibited the proliferation of HeLa cells in a time- and dose-dependent manner. After incubation of HeLa cells with 20 and 40 mg/L berberine for 48 h, DNA Ladder can be observed. A typical "sub-G₁ peak" was checked by flow cytometry. There was a very low rate of natural apoptosis (1.9±0.6)%, while in 5 mg/L berberine group, the apoptosis rate was (2.3±0.8)%. After exposing HeLa cells for 48 h to 20 and 40 mg/L berberine, the apoptosis rate reached (16.7±2.8)% ($P < 0.01$) and (29.6±4.4)% ($P < 0.01$), respectively. Western blotting showed the expression of Bax protein increased in HeLa cells, at the same time, the expression of Bcl-2 decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** *In vitro* berberine could inhibit the proliferation of HeLa cells and induce the apoptosis by promoting Bax and inhibiting Bcl-2 expression in a dose-dependent manner.

Key words: berberine; HeLa cell; Bcl-2; Bax

小檗碱是从毛茛科黄连属植物黄连、黄柏的根茎中提取的主要成分, 属异喹啉类生物碱, 也称黄连

① 收稿日期: 2007-06-25

作者简介: 来丽娜(1974—), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药药理学。

Tel: (0355) 3151442 E-mail: lailina@126.com