

巴醌以及5,6-二羟基吲哚(DHI)氧化为5,6-吲哚醌3个步骤。其表达和活性决定着黑色素生成的量和速度。因此如果酪氨酸酶的活性受到抑制,就能使黑色素的合成减少,就能在一定程度上预防和治疗色素沉着。

本实验结果显示,妇科再造丸3个剂量组对黑色素细胞的增殖与细胞酪氨酸酶活性均有不同程度的抑制作用,且抑制率随剂量增加而增加。说明妇科再造丸能减少黑色素细胞增殖,其作用机制与抑制酪氨酸酶活性有关。提示妇科再造丸对于治疗皮肤色素沉着可能有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] Halaban R, Tyrrell L, Longley J, et al. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B light [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1993, 680: 290.
- [2] 雷铁池, 朱文元, 夏明玉, 等. 中药对黑色素生物合成影响研究 I. 82 味中药乙醇提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用 [J]. *中草药*, 1999, 30(5): 336-339.
- [3] 刘建文. 药理实验方法学-新技术与新方法 [M]. 北京: 化学

工业出版社, 2004.

- [4] 王大光, 朱文元. 淫羊藿苷抑制正常黑色素细胞黑色素合成的研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2004, 33(8): 460-462.
- [5] 赵 辨, 黄秋玲. 人正常黑色素细胞体外培养及其细胞生物学鉴定 [J]. *临床皮肤科杂志*, 1991, (5): 226-228.
- [6] Hunt G, Todd C, Cresswell J E, et al. α -melanocyte stimulating hormone and its analogue Nie⁴ Ophe⁷ α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes [J]. *Cell Sci*, 1997, 167: 204-211.
- [7] 胡大海, Hughes M A, 陈 璧, 等. 应用 MTT 法观察人皮肤培养细胞的形态学观察 [J]. *第四军医大学学报*, 1999, 20(11): 1009-1012.
- [8] Boyd M R, Bacon T H, Sutton D. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL-39123) in animals [J]. *Antimicro Agents Chemother*, 1988, 32: 358-363.
- [9] Takahashi H, Parsons P G. Rapid and reversible inhibitor of tyrosinase activity by glycosidase inhibitor in human melanoma cell [J]. *Invest Dermatol*, 1992, 98: 481-487.
- [10] Nakazawa K, Sahuc F, Damour O, et al. Melanocyte responses to UVB and heat [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110: 972-977.
- [11] 江志洁, 朱育新, 吴奇英, 等. 黑色素形成机理的新概念及复合美白剂的应用 [J]. *日用化学品科学*, 1998(4): 3-5.

氧化苦参碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

吕文伟¹, 张晓璐¹, 刘 芬², 韩丹丹¹, 陈 霞^{1*}

(1. 吉林大学白求恩医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学白求恩医学院 机能科学实验中心, 吉林 长春 130021)

摘 要:目的 探讨氧化苦参碱(OMT)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用及其初步机制。方法 采用结扎大脑中动脉的方法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型。实验大鼠随机分为假手术组、脑缺血再灌注模型组、路路通(31.25 mg/kg)组及 OMT (35、70、105 mg/kg) 组,以神经学评分及脑梗死面积作为观察指标,同时检测 OMT 对大鼠脑组织髓过氧化物酶(MPO)活性及环氧酶 2(COX-2)水平的影响。结果 与脑缺血再灌注模型组相比,OMT 105 mg/kg 组可降低神经学评分($P<0.05$),缩小脑梗死面积($P<0.05$);与脑缺血再灌注模型组比较,OMT 105 mg/kg 组大鼠脑组织中 MPO 活性降低($P<0.05$),COX-2 表达减少($P<0.01$)。结论 OMT 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用,OMT 抑制脑缺血再灌注所致炎症反应可能为其保护作用的机制之一。

关键词:氧化苦参碱; 脑缺血再灌注损伤; 髓过氧化物酶(MPO); 环氧酶 2(COX-2)

中图分类号:R286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0579-04

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是苦豆子、苦参、广豆根等植物中生物碱的主要成分。近年来大量药理和临床研究发现,其具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、镇静、镇痛、解热、降温以及强心、降压、抗心律失常等多种药理作用^[1,2]。应用膜片钳技术研究显示,OMT 可剂量依赖性地抑制心室肌细胞的 Na⁺通道

电流^[3]。文献报道,Na⁺通道阻滞药具有神经保护作用^[4],但目前关于 OMT 对脑缺血再灌注损伤的保护作用尚未见报道。本实验旨在观察 OMT 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响,探讨 OMT 对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

收稿日期:2007-07-18

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20050144)

作者简介:吕文伟(1961—),男,吉林省长春市人,主要从事药理学研究与新药开发工作。

*通讯作者 陈 霞 Tel: (0431) 85619799 E-mail: xiachen616@yahoo.com.cn

1.1 动物:健康雄性 Wistar 大鼠,体重为 300~320 g,由长春高新医学动物研究中心提供。

1.2 药品及试剂:OMT (质量分数>99%) 由中国药品生物制品检定所提供;路路通注射液由吉林东北虎药业股份有限公司生产,批号 030501;髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒购自南京建成生物工程技术研究所;环氧酶 2 (COX-2) 抗体及 DAB 显色剂购自北京中杉生物技术有限公司;三苯基氯化四氮唑 (TTC) 由上海化学试剂公司提供。

1.3 仪器:722 s 分光光度计由上海第三分析仪器厂生产;恒温浴槽由南通科学仪器厂生产;高速电动匀浆器由江苏金坛县环保仪器厂生产;透射电子显微镜由日本 JEOL 公司生产;超薄切片机为日本日立公司产品。

1.4 动物分组及给药:大鼠随机分为 6 组,分别为假手术组、脑缺血再灌注模型组、阳性药路路通组 (LLT, 31.25 mg/kg 及 OMT 35、70、105 mg/kg 给药组。假手术组、脑缺血再灌注模型组均 ip 给予生理盐水,LLT 组和 OMT 组分别按上述剂量 ip 给药,每日 1 次,连续给药 5 d。

1.5 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的制备:根据文献报道方法^[5],采用线栓法制备脑缺血再灌注模型。大鼠 ip 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉后,在颈部做正中切口,暴露右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA)、颈外动脉 (ECA)。结扎 CCA 远心端和 ECA,将线栓经 CCA 插入 ICA,并继续插入线栓至大脑中动脉,固定,缝合切口。阻闭 2 h 后,将尼龙线缓慢拔出行再灌注。术后自由饮水和进食。再灌注 24 h 后动物断头取脑。假手术组大鼠,其他步骤同前,但线栓只插入 CCA 内约 1 cm,术后处理方法同其他组。

1.6 神经学评分及脑梗死面积测定:再灌注后 24 h,在断头取脑前采用 5 级神经缺陷评分法对大鼠进行神经学评分。评分标准如下:0 分,无神经缺损症状;1 分,不能伸展对侧前爪;2 分,行走时向偏瘫侧转圈;3 分,行走时向偏瘫侧倾倒;4 分,不能自发行走;意识丧失。脑梗死面积测定方法为取再灌注 24 h 后麻醉大鼠,快速断头取脑,做脑组织冠状切片,迅速置于 TTC 溶液中染色,放入 37 ℃ 恒温浴箱染色 5 min,用 10% 甲醛固定,摄片,通过图像分析软件测定各脑片梗死面积和总面积,计算梗死面积占全脑面积的百分率。

1.7 脑组织 MPO 测定方法:大鼠脑缺血再灌注 24 h 后断头取脑,分离左右两侧的大脑皮层和海

马,用 4 ℃ 的冷生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称质量,制成 10% 脑组织匀浆。按试剂盒说明书操作,应用 722 s 分光光度计于 460 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。计算 MPO 活力 [MPO 活力 (U/g) = (测定管 A 值 - 对照管 A 值) / 11.3 × 取样量 (mL) × 匀浆浓度]。

1.8 脑组织 COX-2 的检测:大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,将大鼠深麻醉,用 37 ℃ 生理盐水及 10% 多聚甲醛溶液经大鼠心脏灌流固定,取缺血侧及对侧大脑,置于固定液中固定 24 h 后,用冰冻切片机作脑组织的冠状切片;石蜡切片,常规脱蜡、水化, PBS 冲洗,加入 COX-2 一抗 (1:60), 37 ℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗,滴加生物素标记的二抗工作液 37 ℃ 孵育 18~20 min,充分漂洗后 DAB 室温下显色;苏木精复染,脱水、透明、封片。

1.9 统计学处理:实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 OMT 对神经学评分及脑梗死面积的影响:脑缺血再灌注模型及 OMT 给药组大鼠在麻醉清醒后均不同程度地出现精神状态低靡、对侧前肢不能伸展以及走路向对侧旋转或倾倒等症状,但与模型组比较,OMT 各组的神经行为学评分均明显降低,具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,OMT 高剂量组可明显缩小脑缺血再灌注大鼠的脑梗死面积 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 OMT 对脑缺血再灌注大鼠神经学评分及脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of OMT on neurological scores in focal cerebral ischemia reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	神经学评分	脑梗死面积/%
模型	—	2.9 ± 0.6	0.52 ± 0.11
LLT	31.25	2.5 ± 0.5*	0.43 ± 0.14
OMT	35	2.5 ± 0.7	0.62 ± 0.08
	70	2.4 ± 0.6	0.50 ± 0.11
	105	2.3 ± 0.5*	0.37 ± 0.18*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

2.2 OMT 保护局灶性脑缺血再灌注大鼠脑损伤的机制

2.2.1 OMT 对脑组织 MPO 活性的影响:采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,缺血 2 h 再灌注 24 h 后,取缺血侧脑组织测定 MPO 活性。结果显示,与假手术组相比较,脑缺血再灌注模型组 MPO 活性明显升高 ($P < 0.001$);而 OMT 105 mg/kg 给药组

在缺血再灌注后 MPO 活性明显降低,具有显著的统计学意义 ($P<0.05$),结果见表 2。

表 2 OMT 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 MPO 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of OMT on activity of MPO focal cerebral ischemia reperfusion of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MPO 活性/(U·g ⁻¹)
假手术	—	0.27±0.08
模型	—	0.52±0.12△△△
LLT	31.25	0.42±0.11△△*
OMT	105	0.43±0.14△△*

与假手术组比较: △△△ $P<0.001$ △△△ $P<0.001$;

与模型组比较: * $P<0.05$

△△△ $P<0.001$ △△△ $P<0.001$ vs Sham group

* $P<0.05$ vs model group

2.2.2 OMT 对脑组织 COX-2 表达的影响:应用免疫组织化学方法检测局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织中 COX-2 的表达。结果显示,COX-2 在假手术组缺血的脑组织中未见表达,但在脑缺血再灌注模型组大鼠的脑组织中则呈大量表达 ($P<0.01$),且主要表达于神经元;与模型组相比较,OMT 给药组大鼠脑组织中 COX-2 的表达均明显降低 ($P<0.01$)。结果提示,OMT 可降低缺血再灌注脑组织中 COX-2 的表达,结果见表 3。

表 3 OMT 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 COX-2 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of OMT on expression of COX-2 in focal cerebral ischemia reperfusion of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	COX-2 表达量
假手术	—	0
模型	—	12.52±1.05△△△
LLT	31.25	8.01±2.67△△△**
OMT	105	7.83±1.61**

与假手术组比较: △△△ $P<0.001$

与模型组比较: ** $P<0.01$

△△△ $P<0.001$ vs Sham group

** $P<0.01$ vs model group

3 讨论

近年研究发现,脑缺血后血流的恢复在某些情况下可导致进一步的组织损伤和功能障碍,即引起缺血再灌注损伤。因此,抑制脑缺血再灌注损伤已成为目前治疗缺血性脑卒中的关键环节。本实验通过局灶性脑缺血再灌注大鼠模型证实,OMT 可降低由脑缺血再灌注所致神经行为学改变,减少脑梗死面积,对脑缺血再灌注所致脑组织损伤具有保护作用。

MPO 主要存在于中性粒细胞嗜天青颗粒中,

研究证明,MPO 可作为中性粒细胞的标记物,是反映中性粒细胞在组织中浸润程度和分布的可靠指标。因此,测定 MPO 活性已成为研究炎症反应中白细胞浸润的常用方法。脑缺血再灌注实验中,缺血 2 h 再灌注后 15 min 即可在缺血区发现白细胞聚集,4~6 h 后白细胞聚集于毛细血管及微静脉,24 h 后浸润脑实质,造成机械性堵塞使血流一过性受阻,导致无复流现象,并与内皮细胞黏附,释放毒性代谢产物及磷脂酶代谢产物等,使微血管通透性增加,引起血管收缩,导致微循环障碍^[6]。本实验中脑缺血再灌注模型大鼠的脑组织中 MPO 活性明显高于假手术组,与文献报道相一致;而 OMT 给药组与模型组相比较则显著降低 MPO 活性,提示 OMT 通过抑制 MPO 活性,降低中性粒细胞浸润,对抗脑缺血再灌注所致的炎症反应。

在大脑受到缺血、缺氧刺激时,可使神经元的 COX-2 表达上调。对局灶性缺血再灌注大鼠的研究显示,缺血后 30 min 时 COX-2 mRNA 在半暗带和未受损的扣带回表达增强,而较长时间缺血 (90 min) 或大脑中动脉永久闭塞,COX-2 mRNA 在缺血中心却未见表达,而在半暗带和邻近皮质区表达强烈。半暗带内缺血早期表达 COX-2 mRNA 的大多数神经元在缺血再灌注后 24 h 时均已死亡,说明 COX-2 可能引起组织损伤和脑水肿。COX-2 本身并未发现有直接的致神经损伤作用,而与 COX-2 活性相关的促炎性花生四烯酸产物可能是导致脑缺血后损伤持续加重的主要原因^[7,8]。一些 COX-2 抑制剂可改善实验型脑缺血后的再灌注损伤,减少和抑制 COX-2 的过度产生可能是防止脑缺血性损伤的有效途径。本实验中,假手术组的脑组织未见 COX-2 表达,模型组和 OMT 给药组在大脑缺血侧皮质区均有 COX-2 表达,但给药组 COX-2 的表达明显减少,并呈现剂量依赖性,说明 OMT 能明显保护脑缺血再灌注损伤,显著减少 COX-2 的过度产生可能为其保护脑缺血再灌注损伤的机制之一。

本实验证实 OMT 对脑缺血再灌注性损伤具有保护作用,并通过与炎症直接和间接相关的指标测定探讨 OMT 保护作用的机制。OMT 抑制了 MPO 活性以及减少 COX-2 表达,提示 OMT 抑制脑缺血再灌注所致的炎症反应,可能是其保护脑组织的机制之一。但 OMT 具有多方面的药理作用,因此其作用机制尚有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 张凤玲,唐永,张景梅. 苦参碱、氧化苦参碱的药理作用

- 及其制剂的研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(3): 84-86.
- [2] 刘芬, 刘洁, 陈霞, 等. 氧化苦参碱的抗炎作用及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(5): 728-730.
- [3] 陈霞, 李英骥, 张文杰, 等. 氧化苦参碱对豚鼠心肌细胞钠电流的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(1): 41-43.
- [4] Hemmings H C J. Neuroprotection by Na^+ channel blockade[J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2004, 16(1): 100-101.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity[J]. *Brain Res*, 2003, 971(1): 90-94.
- [7] Batone F C, Hillegass L M, Price W J, et al. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification[J]. *J Neuros Res*, 1991, 29: 336-345.
- [8] Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E T, et al. Expression of *c-fos*, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate[J]. *Neurotrauma*, 2001, 18(4): 435-445.

桂皮醛对小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞碱性成纤维细胞生长因子及转化生长因子 β_1 表达的影响

赵京霞^{1,2}, 李萍^{1*}, 张玮^{1,2}, 黄启福², 刘欣¹, 盛巡¹

(1. 北京市中医研究所, 北京 100010; 2. 北京中医药大学 病理教研室, 北京 100029)

摘要:目的 研究桂皮醛刺激小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞后碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白在不同时相点表达的规律,探讨桂皮醛促进成纤维细胞增殖及胶原合成的机制。方法 采用MTT法观察不同质量浓度桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的影响;利用羟脯氨酸(Hyp)测试法测定细胞上清中胶原水平;利用免疫细胞化学技术检测桂皮醛对 NIH3T3 细胞 bFGF、TGF- β_1 蛋白表达的影响。结果 桂皮醛作用 NIH3T3 细胞 48 h 后,细胞增殖速度和细胞上清中的胶原量均较对照组明显增加。桂皮醛刺激后,bFGF 和 TGF- β_1 蛋白表达增加,其中 bFGF 蛋白表达高峰在 18 h,TGF- β_1 蛋白在刺激后 12 h 达到峰值。结论 桂皮醛可以上调内源性生长因子 bFGF、TGF- β_1 蛋白的表达,这可能是桂皮醛体外促进 NIH3T3 细胞增殖及胶原合成,以及在创伤愈合、组织修复方面发挥作用的分子生物学机制。

关键词:桂皮醛; 创伤愈合; bFGF; TGF- β_1

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0582-03

创伤修复的现代概念认为,创伤修复是由多种细胞、生长因子和细胞外基质相互作用的动态过程^[1]。在创伤愈合过程中,由修复细胞自分泌和旁分泌的多种生长因子起着重要的调控作用。创伤愈合的基本病理生理过程均是由生长因子参与和调控的。在慢性皮肤溃疡时,成纤维细胞增殖障碍以及细胞外基质生长减少可能与生长因子及其相关因素发生异常改变(或其本身的量、活性降低,或其受体及所涉及的信号转导途径出现异常)有关。桂皮醛是肉桂的主要有效成分,肉桂是回阳生肌类中药的代表药,其治疗慢性皮肤溃疡愈合方面具有重要的作用。本实验以小鼠成纤维细胞瘤 NIH3T3 细胞为模型,观察桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖及胶原合成的影响,并采用免疫细胞化学技术探讨桂皮醛刺激

后 NIH3T3 细胞内源性生长因子碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白的表达规律,进一步阐明桂皮醛促进成纤维细胞增殖及胶原合成的机制,为中药促进创伤愈合的机制提供分子水平依据。

1 材料

1.1 主要试剂和仪器:DMEM 培养基(Gibco);胎牛血清(天津 TBD);胰蛋白酶(北京中杉金桥生物技术有限公司);磷酸盐缓冲液(福州迈新生物技术开发有限公司);MTT(Sigma);羟脯氨酸(Hyp)测试盒(南京建成生物工程研究所);甲醇、丙酮(分析纯,北京化学试剂公司);Triton X-100(Sigma);兔抗碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)多克隆抗体、兔抗转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)多克隆抗体

收稿日期:2007-06-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472258)

作者简介:赵京霞(1981—),女,硕士,研究实习员,主要从事中医药治疗皮外科常见病的机制研究。

*通讯作者 李萍 Tel: (010) 52176679 E-mail: liping411@yahoo.com.cn