

白首乌新苷 A 抗肿瘤及诱导肿瘤细胞凋亡作用的研究

王一奇¹, 刘玉兰², 张如松^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 养生堂有限公司, 浙江 杭州 310007)

摘要:目的 评价白首乌新苷 A (CA) 的体内外抗肿瘤活性及诱导肿瘤细胞凋亡的作用。方法 以 3 种人肿瘤细胞株为模型, 用 MTT 法检测药物对肿瘤细胞增殖的影响; 以小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 为模型, 检测药物对在体肿瘤生长的影响; 以人乳腺癌细胞株 MCF-7 为模型, 用 Wright-Giemsa 染色观察药物对细胞核形态的影响, 并用流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡率; 以体外培养的大鼠皮层神经元细胞为模型, 评价药物对正常细胞的毒性。结果 CA 对 3 种人肿瘤细胞株的生长呈浓度依赖性抑制, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 35.68~39.78 mg/L; CA 40、80、160 mg/kg 对 S₁₈₀ 内瘤生长的抑制率分别为 20.0%、28.0%、48.1%; CA 80 mg/L 处理后, MCF-7 细胞的凋亡率显著增高 ($P < 0.01$), 细胞核出现固缩、断裂; CA 100 mg/L 对体外培养 8 d 的神经元无毒性。结论 CA 有明显的体内外抗肿瘤活性, 诱导肿瘤细胞凋亡是其作用机制之一。

关键词: 白首乌新苷 A; 抗肿瘤; 凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0920-05

Antitumor activity of cynanauriculoside A and its effect of apoptosis induction in tumor cells

WANG Yi-qi¹, LIU Yu-lan², ZHANG Ru-song¹

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2. Yangshengtang CO., Ltd., Hangzhou 310007, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antitumor effect of cynanauriculoside A (CA) isolated from the root of *Cynanchum auriculatum* and its effect of apoptosis induction in tumor cells. **Methods** CA was evaluated for its cytotoxicity *in vitro* against MCF-7, BEL-7402, and HO-8910 cells by determining MTT assay and its antitumor effects *in vivo* on S₁₈₀ tumor-bearing mice by calculating tumor-inhibited rate. Measures of apoptosis including Wright-Giemsa staining and flow cytometry (FCM) assay were involved to explore the mechanism. And the toxicity of CA on normal cells was also evaluated on *in vitro* cultured rat cortical neurons. **Results** CA showed a definite cytotoxicity to three tumor cell lines with IC₅₀ in the range of 35.68—39.78 mg/L. And it significantly inhibited the tumor growth of S₁₈₀ tumor-bearing mice at the dose of 40, 50, and 160 mg/kg by *ig* administrated, the inhibitory rates were 20.0%, 28.0%, and 48.1%, respectively. At the concentration of 80 mg/L, CA induced obvious apoptosis in MCF-7 cells ($P < 0.01$) associated with marked morphological changes such as cytoplasm contraction and nuclear chromatin condensation, while it showed no toxicity to rat cortical neurons cultured 8 d *in vitro* at the concentration of 100 mg/L. **Conclusion** CA has significant antitumor effect *in vitro* and *in vivo*, and has moderate effect of inducing tumor cells apoptosis, which may be one of the mechanisms of CA antitumor activity.

Key words: cynanauriculoside A (CA); antitumor; apoptosis

白首乌系萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根, 是传统的补益中药。研究表明, C₂₁ 甾体苷是白首乌的主要活性成分, 它可以有效清除羟自由基和氧自由基, 调节免疫, 保护肝脏和神经细胞^[1,2]。近年来报道 C₂₁ 甾体总苷对体外培养的肿瘤细胞和小

鼠体内的移植肿瘤均具有确切的抑制作用^[3~6]。白首乌新苷 A (CA) 是本实验室从白首乌 C₂₁ 甾体总苷中首次分离得到的新单体化合物, 结构式见图 1^[7]。为较系统地研究 CA 的抗肿瘤活性, 本实验采用体外培养的人肿瘤细胞株和小鼠移植性肿瘤模型进一步评价 CA 的抗肿瘤作用, 并初步探讨其抗

* 收稿日期: 2008-10-31

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目资助 (ZD0016)

作者简介: 王一奇 (1978—), 女, 浙江省台州市人, 讲师, 在读博士, 主要研究方向为中药药理。

Tel/Fax: (0571) 86613798 E-mail: wangyiqi@263.net

*通讯作者 张如松 Tel/Fax: (0571) 86613798 E-mail: zrs789@hotmail.com

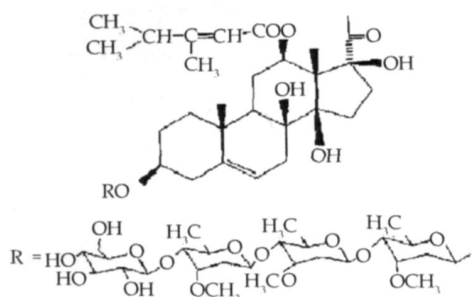


图 1 白首乌新苷 A 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of CA

肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物的提取、分离及配制:白首乌总苷 B 部分 (CGB) 及单体化合物 CA 由本实验室从白首乌中提取分离纯化。提取分离工艺:白首乌药材 (经浙江中医药大学张如松教授鉴定为耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根) 80 kg 粉碎后,以甲醇提取,再经氯仿提取,氯仿可溶部分投入正己烷,得正己烷不溶部分,干燥,得到白首乌总苷 (CG) 约 2.4 kg (3%),CG 先后用 100 目和 200~300 目硅胶经柱色谱分离纯化,上样用硅胶与样品的质量之比为 8~10 1,洗脱剂为氯仿和甲醇的混合溶剂,其体积比例在分离过程中视分离情况依次调整为 40 1→30 1→25 1→20 1→15 1→5 1,薄层色谱分析,取薄层板上的中部斑点的流分,减压回收,所得的白首乌苷 B 部分 (CGB) 65 g (0.08%)。65 g CGB 样品以流动相溶解,平均质量浓度为 50 mg/L,进样量约 3 mL,流动相为甲醇和水,其体积比为 7 3,体积流量 6 mL/min,检测波长 222 nm,柱温为 35℃。进样后,经制备型 HPLC 分离,得到 CA (质量分数 99%) 约 2.0 g (0.0025%)。体外试验时 CGB、CA 以二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 400 mg/L 的贮存液,试验前用培养基稀释至相应浓度;体内试验时 CA 先以纯净水溶解,加少量聚山梨酯和植物油助溶并研磨使之分散,再用蒸馏水稀释至相应浓度,4℃冷藏保存。

1.2 试剂:100 目和 200~300 目硅胶,青岛海洋化工厂;硅胶柱色谱用甲醇、氯仿为分析纯,液相用甲醇为色谱纯;DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶, Gibco 公司产品;新生小牛血清,杭州四季青生物材料公司产品;MTT, Sigma 公司。

1.3 动物与瘤株:清洁级 ICR 雄性小鼠,体质量 18~22 g,由浙江中医学院实验动物中心提供,许可

证号:220010004。S₁₈₀ 肉瘤瘤株,由浙江省医学科学院提供。人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 BEL-7402 和人卵巢癌细胞 HO-8910,均购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。

1.4 主要仪器:制备型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Thermo Forma 细胞培养箱,生命科学国际有限公司;DMIRB 型倒置生物显微镜,德国 Leica 公司;Elx800 型酶标仪,美国 Biotech 公司;FACSCalibur 型流式细胞仪,美国 Becton Dickson 公司;AB104-N 型电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;Sony P71, 日本 Sony 公司。

1.5 药物对体外肿瘤细胞增殖的抑制作用:常规细胞培养法培养肿瘤细胞。在 96 孔培养板中以 3×10^7 /L 的密度接种对数生长期的单细胞悬液,每孔 0.1 mL,设只加培养液、不加细胞和药物的空白调零孔和不加药、加细胞及培养液的对照孔,均设 4 个复孔,预培养 1 d 后分别加入 CGB 和 CA,使药物终质量浓度为 15、30、60、120 mg/L,继续培养至第 4 天,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL,孵育 4 h,吸净孔内液体,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪于 570 nm 处测各孔吸光度 (A) 值,按下面的公式计算各用药组细胞生长抑制率,NDST 统计软件进行数据处理计算抑制细胞生长达 50% 的各药物浓度,以 IC₅₀ 值表示。

生长抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100 %

1.6 药物对小鼠移植性 S₁₈₀ 肉瘤的作用:取处于对数生长期的 S₁₈₀ 细胞,计数后用无菌生理盐水调为 1×10^{10} /L 浓度,接种于小鼠右腋窝皮下,每只 0.2 mL,即 2×10^6 个细胞,接种 1 d 后,随机分为模型组 (NS),阳性对照组 (环磷酰胺 40 mg/kg),CA 低、中、高剂量 (40、80、160 mg/kg) 5 组。环磷酰胺组 ip 给药,于接种后第 1、5 天两次给药,其余组均 ig 给药,每天 1 次,连续 9 d。第 10 天处死小鼠,称体质量、瘤质量,按下列公式计算抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 药物组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 × 100 %

1.7 肿瘤细胞形态学观察:MCF-7 细胞按 1×10^8 /L 接种于预置盖玻片的 6 孔培养板或培养皿中,预培养 1 d 后分别加入质量浓度为 80 mg/L 的 CA,设不加药、只加培养液的细胞对照,继续培养 2~4 d,以 D-hank's 液洗涤,充分晾干,95% 乙醇室温固定约 2 min, Wright's-Giemsa 染液染色 6~7 min,蒸馏水轻轻漂洗,晾干,95% 乙醇分色 10~30 s,无水酒精脱水 10~30 s,二甲苯透明,中

性树脂封片,光镜观察,数码相机拍照。

1.8 肿瘤细胞凋亡率检测:数量为 7×10^4 的 MCF-7 细胞于 50 mL 培养瓶中预培养 1 d 后,加入质量浓度为 80 mg/L 的 CA,继续培养 1、2、3、4、5 d。蛋白酶消化收集约 1×10^6 个细胞, PBS 洗涤 2 次,预冷的 70 % 乙醇 4 固定保存 24 h 以上, RNA 酶消化,碘化丙啶染色,流式细胞仪 (FCM) 测定细胞凋亡百分率。

1.9 药物对体外神经细胞生长的作用:参照文献方法^[8],培养大鼠皮层神经元细胞。神经元体外培养至第 8 天,加不同质量浓度的 CA 作用 24、48、72 h,观察药物的直接作用。培养结束后于倒置显微镜下观察细胞形态,并以 0.5 g/L MTT 在 37 染色 2 h 后,用二甲亚砜 100 μ L 溶解结晶,振荡 10 min,在酶标仪测定波长 570 nm 处测吸光度值。

1.10 数据统计:各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验进行组间差异显著性比较。

2 结果

2.1 CA 对人肿瘤细胞增殖的抑制作用:CA 对 3 种人肿瘤细胞均有明显抑制作用,且呈剂量依赖性 (图 2);对 3 种肿瘤细胞作用 96 h 的 IC_{50} 值为 35.68 ~ 39.78 mg/L,与 CGB 比较明显降低 ($P < 0.05$),见表 1。

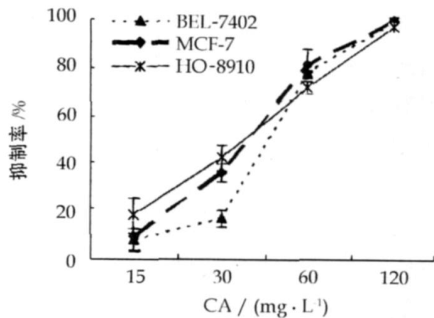


图 2 不同质量浓度 CA 处理 96 h 对 3 种人肿瘤细胞株生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig.2 Inhibition on three human tumor cell lines treated with CA at various concentration for 96 h ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

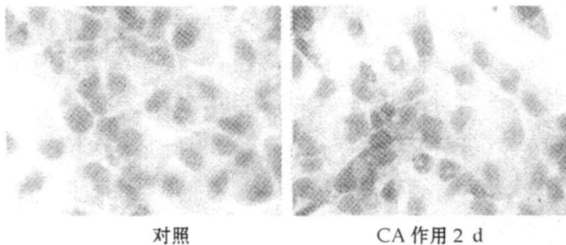


图 3 CA (80 mg/L) 处理 MCF7 细胞后的形态学改变

Fig.3 Morphological changes of MCF-7 cells treated with CA (80 mg/L)

表 1 CGB 和 CA 对 3 种人肿瘤细胞的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 IC_{50} Values of CGB and CA on three human tumor cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	IC_{50} 值/ (mg $\cdot$ L $^{-1}$)		
	MCF-7	Bel-7402	HO-8910
CGB	50.2 $\pm$ 2.2	69.7 $\pm$ 5.4	47.5 $\pm$ 1.5
CA	37.0 $\pm$ 3.4 *	39.8 $\pm$ 3.5 **	35.7 $\pm$ 2.3 **

与 CGB 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CGB

2.2 CA 对小鼠移植性肉瘤 S_{180} 生长的抑制作用:阳性药环磷酰胺明显降低小鼠移植性肉瘤 S_{180} 的瘤质量,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。CA 80、160 mg/kg 剂量组也明显降低瘤质量,与模型比较,差异显著 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 CA 对 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of CA on tumor growth of S_{180} tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg $\cdot$ kg $^{-1}$)	体质量(开始/ 结束)/ g	瘤质量/ g	抑瘤率/ %
模型	-	18.3/25.3	2.35 $\pm$ 0.48	-
环磷酰胺	40	19.7/19.2	0.34 $\pm$ 0.19 **	85.5
CA	40	19.1/26.5	1.88 $\pm$ 0.70	20.0
	80	18.6/24.8	1.69 $\pm$ 0.52 **	28.0
	160	18.2/24.7	1.22 $\pm$ 0.37 **	48.1

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

2.3 CA 作用不同时间对 MCF-7 细胞核形态的影响:见图 3。MCF-7 细胞经 Wright's-Giemsa 染色后,正常细胞胞质染色均一,细胞间隙不明显,核大,呈圆形或椭圆形。MCF-7 细胞经 CA 80 mg/L 作用 2 d 后,细胞质浓聚、胞核开始固缩变小,出现少量环状或马蹄状核;细胞经 CA 80 mg/L 作用 3 d 时,上述改变加重,表现为细胞间隙增大、胞体急剧缩小,细胞核明显固缩呈现环状、马蹄状,但胞膜完整;细胞经 CA 80 mg/L 作用 4 d,细胞除以上改变外,还出现了核断裂现象,细胞膜皱缩、破裂,胞质出现空泡样变化。

2.4 CA 作用不同时间对 MCF-7 细胞凋亡率的影响

响:80 mg/L CA 处理 1、2、3、4、5 d 后的细胞,其凋亡细胞率与正常细胞相比均有极显著性差异 ($P < 0.001$),其中作用 1~3 d 的细胞凋亡率随药物作用时间延长而逐渐增加,到第 3 天达到最大,至第 4 天后又逐渐下降,见表 3。

2.5 CA 对神经细胞生长的作用:CA 12.5~100 mg/L 作用 24 h 后,体外培养 8 d 的神经元形态无明显改变,神经元 MTT 染色吸光度值不下降,见表 4。

表 3 CA (80 mg/L) 处理 MCF-7 细胞不同时间的凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Apoptosis rate of MCF-7 treated with CA (80 mg/L) at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞凋亡率/%				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	0.63 ± 0.16	1.70 ± 0.30	2.05 ± 0.54	2.39 ± 0.61	2.32 ± 0.13
CA	3.47 ± 0.04 *	8.24 ± 0.00 **	23.14 ± 0.95 **	15.78 ± 0.12 **	11.26 ± 0.27 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.001$ vs control group

表 4 不同质量浓度 CA 对体外培养 8 d 的原代皮层神经元活性的影响 (MTT 染色) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of CA at different concentration on viability of primary cortical neurons of 8 d in vitro cultures (MTT assay) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

CA/ (mg · L ⁻¹)	A 值		
	24 h	48 h	72 h
0(对照)	0.77 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.69 ± 0.09
12.5	0.75 ± 0.07	0.56 ± 0.04	0.65 ± 0.08
25	0.82 ± 0.02	0.71 ± 0.01 **	0.80 ± 0.15
50	1.04 ± 0.02 ***	0.78 ± 0.02 ***	0.83 ± 0.03 *
100	1.04 ± 0.07 ***	0.78 ± 0.07 ***	0.97 ± 0.08 ***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

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

3 讨论

CA 是本实验室从白首乌甙体总苷中首次分离得到的新单体化合物。本实验在前期实验基础上,更系统地评价了化合物 CA 的体内外抗肿瘤活性。结果显示,CA 对人乳腺癌细胞株 MCF-7,人肝癌细胞株 Bel-7402,人卵巢癌细胞株 HO-8910 的增殖均有明显抑制作用,对这些细胞增殖抑制的 IC_{50} 在 35.68~39.78 mg/L,明显小于总苷 (CGB) ($P < 0.05$),表明 CA 有确定的体外抗肿瘤活性,且作用强度高于总苷。体内抗肿瘤实验结果显示,CA 40、80、160 mg/kg 剂量 ig 给药对 S_{180} 肉瘤生长的抑制率分别为 20.0%、28.0%、48.1%,表明 CA 有较高的体内抗肿瘤活性。本实验中药物体外 MTT 实验结果 IC_{50} 值与其他高活性细胞毒类药物比较似乎较大,但是体内抑瘤实验表明,药物对小鼠体内生长的

肿瘤抑制率较高,提示该药物可能不仅仅是通过对外肿瘤细胞的细胞毒性作用而发挥抗肿瘤作用,其他的机制如抑制血管生成、增强免疫等作用也有可能参与,而这些机制还有待进一步研究。药物对体外细胞的作用是非常直接的,给药的浓度就是药物作用于细胞的浓度。而药物口服给药,可能存在首过消除效应,使药物利用率降低。本实验中 CA 口服给药抑制肿瘤生长的浓度明显高于其 IC_{50} ,推测胃肠道、肝脏对该药物的代谢转化作用较强。

有文献报道,白首乌提取物及 C_{21} 甙体总苷可通过增加 bcl-2 基因表达诱导小鼠移植性肿瘤细胞凋亡^[5,6]。推测 C_{21} 甙体苷类单体化合物 CA 抗肿瘤作用机制也可有是诱导肿瘤细胞凋亡。故本实验在评价 CA 体内外抗肿瘤活性的基础上,进一步在细胞水平评价了 CA 诱导肿瘤细胞凋亡的作用。结果表明,CA 处理的 MCF-7 细胞经 Wright-Giemsa 染色后,细胞质浓聚、胞核固缩变小呈环状、马蹄状,甚至出现了核断裂现象,符合细胞凋亡的形态学特征。流式细胞仪结果也表明,CA 处理后 MCF-7 细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$),证明诱导细胞凋亡是 CA 体外抗肿瘤的机制之一。在观察 CA 对 MCF-7 细胞核形态的影响的过程中,发现药物作用第 1 天核形态没有明显改变,第 2 天开始出现变化,第 3 天开始变化非常明显,第 4 天虽然核形态变化仍很明显,但仔细观察已伴随细胞膜破裂的改变。结合细胞凋亡率在第 3 天最高,而第 4 天下降的结果,推测到达第 4 天,细胞损伤的机制不仅仅是凋亡(凋亡时细胞膜是完整的)。另外,在本实验前期摸索浓度的过程中,发现较低浓度的 CA 不能引起肿瘤细胞形态明显改变,肿瘤细胞凋亡率也不高,最后采用较高的质量浓度 (80 mg/L) 诱导细胞凋亡。从药物诱导凋亡的浓度较高,以及形态学损伤的严重程度与凋亡率不一致这两点结果,推测诱导凋亡机制不是 CA 体外抗肿瘤的主要机制,其他机制有待进一步研究。

本实验还利用体外培养的大鼠皮层神经元细胞来研究药物对神经细胞的毒性。实验结果表明,不同质量浓度 CA 作用 72 h 对体外培养 8 d 的大鼠皮层神经元形态无影响,MTT 染色吸光度不下降,证明 CA 对肿瘤细胞的毒性有选择性。值得注意的是,在较高质量浓度时,CA 还可以使神经元细胞 MTT 染色吸光度显著增加 ($P < 0.001$)。这一现象在白首乌 C_{21} 甙体总苷中也有发现。但是在显微镜下观察神经元的形态数量并无明显改变,故初步

推断 CA 使神经元细胞 MTT 染色吸光度显著增加的原因是药物增强了活细胞对染料的摄取。

综上所述,本实验证明了从白首乌 *C₂₁* 甙体总苷中分离得到的单体化合物 CA 具有确定的体内外抗肿瘤活性,并初步证实诱导凋亡是 CA 体外肿瘤细胞毒机制之一,但不是最主要机制。本实验研究了 CA 的体内外抗肿瘤作用及作用机制,同时也为 CA 作用机制的进一步研究提供了线索,为白首乌 *C₂₁* 甙体总苷类抗肿瘤药物的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lee M K, Yeo H, Kim J, *et al.* Protection of rat hepatocytes exposed to CCl₄ *in vitro* by cynandione A, a biacetophenone from *Cynanchum wilfordii* [J]. *Pharm Pharmacol*, 2000, 52(3): 341-345.
- [2] Lee M K, Yeo H, Kim J, *et al.* Cynandione A from *Cynan-*

chum wilfordii protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H₂O₂, L-glutamate, and kainate [J]. *Neurosci Res*, 2000, 59(2): 259-264.

- [3] 张如松,叶益萍,刘玉兰. 白首乌甙体总苷的体外抗肿瘤作用 [J]. *中草药*, 2000, 31(8): 599-601.
- [4] 张如松,叶益萍,沈月毛,等. 白首乌体外抑制肿瘤细胞的成分研究 [J]. *药学报*, 2000, 35(6): 431-437.
- [5] 王冬艳,张洪泉,李心. 白首乌 *C₂₁* 甙体总苷诱导肝癌细胞凋亡的作用及其机制 [J]. *药学报*, 2007, 42(4): 366-370.
- [6] 毕芳,陶文沂,陆震鸣. 白首乌提取物对小鼠肝癌细胞 H22 的抑制作用 [J]. *中药材*, 2007, 29(11): 1586-1590.
- [7] Zhang R S, Ye Y P, Shen Y M, *et al.* Two new cytotoxic *C₂₁* steroidal glucosides from the root of *Cynanchum auriculatum* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(24): 3875-3879.
- [8] De C J, Candenias A, Lizasoain I, *et al.* Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation [J]. *Stroke*, 2002, 33(1): 261-267.

羟基红花黄色素 A 缓解大鼠心肌细胞凋亡作用的研究

金 鸣,董宁宁,吴 伟,李金荣,臧宝霞,童 静*

(首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 药理研究室,北京 100029)

摘要:目的 以整体和离体实验观察羟基红花黄色素 A (HSYA) 缓解心肌细胞凋亡的作用。方法 以异丙肾上腺素 (ISO) 造成大鼠急性心肌梗死,以 TUNEL 法检测心肌组织细胞凋亡,免疫组化法和 RT-PCR 法观察心肌组织中 bax、bcl-2 基因表达的变化;用缺血缺氧/再复氧模型诱导原代培养心肌细胞凋亡,以 PI 流式细胞法观察凋亡情况,以 Rhodamine 123 荧光法考察线粒体膜电位的变化。结果 60、120、240 mg/kg HSYA ip 给药可以减轻心肌梗死大鼠的线粒体肿胀、核凝集及固缩,降低心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$),下调心肌组织 Bax 蛋白 ($P < 0.05$) 及 bax mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。0.64、1.3、2.5 mmol/L HSYA 可减少缺血/再复氧造成的细胞凋亡 ($P < 0.05$),且可缓解该损伤造成的心肌线粒体膜电位下降 ($P < 0.05$)。结论 抑制心肌细胞凋亡是 HSYA 缓解心肌缺血的重要机制。

关键词:羟基红花黄色素 A (HSYA); 凋亡; 心肌缺血; 线粒体

中图分类号:R286.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)06-0924-07

Inhibition of hydroxysafflor yellow A against rat cardiomyocyte apoptosis

JIN Ming, DONG Ning-ning, WU Wei, LI Jin-rong, ZANG Bao-xia, TONG Jing

(Department of Pharmacology, Beijing Anzhen Hospital of Capital University of Medical Sciences-Beijing Institute of Heart, Lung, and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) against cardiomyocyte apoptosis. **Methods** Rat myocardial apoptosis was induced by ip isoproterenol (ISO) and then HSYA was ip given to alleviate the apoptosis. Rat neonatal cardiomyocyte apoptosis was triggered by oxygen/ glucose-deprivation/ reperfusion (OGDR) injury. Cardiac tissue was observed by transmission electron microscopy (TEM) and cardiac cell apoptosis was assayed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. Bcl-2 and bax gene expression was observed by immunohistochemical staining and RT-PCR. The effect of HSYA to inhibit cardio myocyte apoptosis was assayed with the Flow Cyto Meter. Rhodamine 123 staining was used to measure the change of mitochondrial membrane potential. **Results** TEM showed that mitochondrion swelling and nucleus pyknosis were alleviated by

* 收稿日期:2008-10-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30171146); 北京市中医局科技资助项目 (JJ-2006-26)

作者简介:金 鸣(1957—),男,北京人,首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所药理研究室主任,研究员,医学博士,研究方向为中药红花活血化瘀作用机制。Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn