表 3 计算机设计的 10 个方剂小鼠含药血清抑菌效果验证结果 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 3 Inhibition of ten Chinese herbal compounds designed by computer against S. aureus in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

方剂编号	含药血清培养基中的细菌量/ (cfu·mL^{-1})	方剂编号	含药血清培养基中的细菌量/ (cfu·mL^{-1})
对照	(2.76 + 0.13) ×10^7	6 号方	(8.61 + 0.46) ×10^6 **
1 号方	(8.67 + 0.59) ×10^6 **	7 号方	(1.15 + 0.08) ×10^7 **
2 号方	(1.27 + 0.07) ×10^7 **	8 号方	(1.22 + 0.05) ×10^7 **
3 号方	(7.67 + 0.42) ×10^6 **	9 号方	(1.33 + 0.05) ×10^7 **
4 号方	(8.81 + 0.40) ×10^6 **	10 号方	(2.19 + 0.07) ×10^7 **
5 号方	(8.49 + 0.52) ×10^6 **		

与对照组比较: ** $P < 0.01$

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

天然药物来治疗这一类疾病的中医药疗法正日益引起人们的重视,而以中医理论指导下由多味中药组成的复方则是该疗法的基础,往往具有独到的疗效优势,如注重机体的整体改善,不易形成耐药等。

本实验结果显示伤寒经方中部分方剂可以有效提高机体抗金黄色葡萄球菌感染的能力,表现在给药组小鼠含药血清抑菌能力相比、对照组有不同程度的提高。综合这 80 个方剂的组方特点来看,大部分具有高效抑菌作用的方剂都含有性味苦寒,祛热除湿的中药。

在由计算机基于大批动物实验提取得到的伤寒方组方规律基础上设计出的 10 个排名靠前的有效组方中,也能看到上述规律。经过"训练"以后的计算机在组方遣药时似乎也遵循了中医"寒病热治,热病寒治"的治法。计算机设计出的方剂疗效相当显著,小鼠含药血清中细菌数量与对照组比值平均在 30 %～40 %,最差的也有 80 %,总体抑菌水平超过伤寒方。也发现,计算机设计的部分方剂在药物配伍方面亦颇具特色,值得借鉴。例如 3 号方的组成:以祛除湿热药(黄连、黄柏可分治上、下湿热)为主,辅之以利水药(甘遂,可导水湿),宣肺散表药(桂枝,可导湿汽),保肝药(白芍,中医认为肝藏血并主疏泄,因此可以保持正常的气血运行和津液输布),可能更有助于细菌毒素解毒和排出。

综上所述,通过研究可以认为方剂中组成药物的药性特征与方剂的治疗效果之间有一定的对应关系存在。利用计算机信息技术将作为中医药理论的核心内容的中药药性特征与现代药理指标之间存在的对应关系提取出来,在两者之间搭起桥梁,并指导实践是可行的,当然这种对应关系可能非常复杂具有非线性特点。计算机辅助设计中药复方的优势在于,先用计算机进行模拟预试验。由于计算机具有高速运算能力,可以在短时间内完成大批候选复方的海量预筛选,减少后期药理实验验证工作的工作量,从而为寻找更有效的中药复方提供了捷径,也可为中医临床提供更多的基础方剂供化裁时参考,是对传统中医组方方法的有益补充。

参考文献:

[1] Watkins A, Timmis J, Boggess L. Artificial immune recognition system (AIRS): an immune inspired supervised machine learning algorithm [J]. *Gene Program Evol Mach*, 2004, 5(3): 291-317.

[2] 李顺保. 伤寒论版本大全 [M]. 北京:学苑出版社, 1996.

[3] 段富津. 方剂学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995.

[4] 黄兆胜. 中药学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001.

[5] 姚咏明, 林洪远. 脓毒症发病机制与诊治进展 [J]. 继续医学教育, 2006, 20(24): 35-40.

龙葵碱调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 caspase-3 活性诱导 HepG2 细胞凋亡的研究

高世勇[1,2],徐丽丽[1,2],季宇彬[1,2]*

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076;
2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:**目的** 探讨龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的作用机制。**方法** 透射电镜观察凋亡细胞形态变化,原位缺口末端检测法 (TUNEL 法) 检测 DNA 断裂情况,流式细胞术检测细胞凋亡率,间接免疫荧光法激光共聚焦扫描显微术检测 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达,比色法检测 caspase-3 活性的变化。**结果** 在透射电镜下观察,龙葵碱组细胞出

* **收稿日期**:2009-06-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30400591);黑龙江省博士后基金资助项目;教育部博士点基金项目 (200802400001);哈尔滨市青年基金资助项目 (2004AFQXJ035)

作者简介:高世勇 (1975—),男,博士,副研究员,研究方向为肿瘤药理学。Tel: (0451) 84800297 E-mail: sygao2002@163.com

现细胞固缩,染色质致密,核凝聚固缩,染色体断裂形成核碎块,凋亡小体形成等细胞凋亡特征形态。TUNEL 法发现龙葵碱高、中、低剂量组 Hep G2 细胞均有绿色荧光,阴性对照组无荧光。流式细胞术分析表明 0.4、2、10 μmol/L 龙葵碱作用 Hep G2 细胞 24 h 凋亡率分别为 4.0%、8.5%、20.1%。同时,龙葵碱升高 caspase-3 活性,下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达。结论 龙葵碱通过降低 Bcl-2/Bax 的值,激活 caspase-3 酶活性诱导 Hep G2 细胞凋亡。

关键词:龙葵碱;细胞凋亡;caspase-3;Bcl-2;Bax
中图分类号:R286.91 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)10-1607-06

Induction of solanine on Hep G2 cell apoptosis by regulation of Bcl-2 / Bax expression and caspase-3 activity

GAO Shi-yong[1,2], XU Li-li[1,2], JI Yu-bin[1,2]
(1. Postdoctoral Program of Insititute of Materia Medica, Center for Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. MOE Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of solanine on apoptosis in Hep G2 cell. **Methods** Morphology of apoptosis was observed by electron microscope; TUNEL Assay was adopted to observe the DNA cleavage of apoptotic cells, apoptosis rate was analyzed by flow cytomety. Indirect immunofluorescence assay was adopted to study the Bcl-2/Bax protein by Laser Confocal Scan Microscope. Relative caspase-3 activity was determined by colorimetric assay. **Results** Characteristic morphology of apoptosis, such as shrinkage, chromatin dense, nuclear condensation pool, the nuclear fragments, and apoptotic bodies, *etc.* was found. By TUNEL assay, DNA fragmentation was found in solanine groups, but none in control group. The early apoptosis rates induced by 0.4, 2, and 10 mol/L solanine were 4.0%, 8.5%, and 20.1%, respectively. And solanine increased caspase-3 activity of Hep G2 cells and decreased the Bcl-2 protein expression, increased the Bax protein expression. **Conclusion** Solanine could induce the Hep G2 cell apoptosis by decreasing the Bcl-2 protein expression, increasing the Bax protein expression to activate the caspase-3 activity.

Key words: solanine; apoptosis; caspase-3; Bcl-2; Bax

龙葵碱 (solanine),别名茄碱,主要存在于茄科植物马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 的块茎及龙葵 *Solanum nigrum* Linn. 的全草中,在马铃薯的绿色果皮及芽中龙葵碱的量较高,毒性较大,是中毒的主要成分。龙葵全草及未成熟的果实中含澳洲茄边碱 β-澳洲茄边碱、澳洲茄碱、茄微碱及茄达碱等多种生物碱[1]。本课题组前期研究发现龙葵碱体内能够延长 H_{22} 荷瘤小鼠的生存时间[2],体外研究发现龙葵碱对人肝癌细胞 Hep G2 的细胞毒作用较强[3,4],机制研究表明龙葵碱通过诱导肿瘤细胞凋亡途径达到抗 Hep G2 人肝癌的作用[5],并且与细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和膜电位有关[6]。本研究主要是在前期工作的基础上,通过龙葵碱对 caspase-3 酶活性和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响进一步深入研究龙葵碱诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制。

1 材料与仪器

1.1 药品及试剂:龙葵碱,质量分数 99%,由黑龙江省药品检验所提供;RPMI 1640 培养基,美国 Gibco 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;Triton X-100,香港 Farco 公司;小鼠抗人 Bcl-2 一抗,小鼠抗人 Bax 一抗购自美国 Santa Cruz 公司;FITC-山羊抗小鼠 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司;caspase-3 活性检测试剂盒,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 肿瘤细胞株:人肝癌细胞株 Hep G2 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection),由黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所保种提供。

1.3 仪器:CO—150 型二氧化碳培养箱,美国 NBS 公司;SW—CJ—2F 型超净工作台,苏净集团苏州净化设备厂;SP2 型激光共聚焦扫描显微镜,德国 Leica 公司;CKX—41—32 型倒置显微镜,日本 Olympus 公司;H—600 型透射电镜,日本日立公司;EPICS XL—MCL 流式细胞仪,美国 Beckman—Coulter 公司;6R 型台式冷冻离心机,美国 Beckman—Coulter 公司。

2 方法

2.1 细胞培养及给药:Hep G2 人肝癌细胞以适量浓度接种于培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清 RPMI

1640 的培养液中,置于 37 ℃恒温,5 % CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养,细胞贴壁生长,每 2～3 天传代 1 次,传代时首先倒出培养液,PBS 洗 3 次,胰酶消化后加入新鲜的培养液吹打均匀,调整细胞至适当浓度移入新的培养瓶中,添加培养液至适量。

给药时取指数生长期的 HepG2 人肝癌细胞,0.25 % 胰酶消化细胞后,用含 10 % 胎牛血清的培养基调整为浓度 3×10^5/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL。将 6 孔板置于 37 ℃、5 % CO_2 的二氧化碳培养箱中。培养 24 h 后加入龙葵碱,终浓度分别为 0.4、2、10 μmol/L,阳性对照组加入喜树碱,终浓度为 1.15 μmol/L,阴性对照组加相同体积的培养液。

2.2 透射电镜观察龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡:药物培养 24 h 后收集细胞,PBS 洗 3 遍,预冷的 2 % 戊二醛 4 ℃固定 2 h,1 % 锇酸后固定 1.5 h,常规系列丙酮脱水,环氧树脂 Epon 812 包埋,超薄切片,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染,透射电镜观察,拍照。

2.3 原位缺口末端标记技术(TUNEL)检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡:培养 24 h 后收集细胞,PBS 洗 3 次;4 % 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 洗 3 次;用含 0.1 % Triton X-100 的 PBS(TPBS)重悬细胞,冰浴孵育 2 min。2 min 后 PBS 洗 3 次,避光加入 50 μL TUNEL 检测(10 μL TdT 酶 + 240 μL 荧光标记液),37 ℃避光孵育 60 min。PBS 洗 3 次后,用 300 μL PBS 悬浮细胞,激光共聚焦扫描显微镜观察,激发波长 488 nm,发射波长 513～523 nm。

2.4 流式细胞仪检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞早期凋亡率:培养 24 h 后收集 1×10^5 个细胞,PBS 洗 3 次,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,然后加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置 15 min。1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,100 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,300 目尼龙网滤过后,在流式细胞仪上测定细胞凋亡率。激发波长 488 nm,检测细胞数为 10 000 个。

2.5 龙葵碱对 HepG2 细胞内 caspase-3 活性的影响:按试剂盒方法进行,过程如下,培养 24 h 后收集细胞,小心吸除上清,PBS 洗 3 次。按照每 2×10^6 个细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液,冰浴裂解 15 min。4 ℃、16 000 × g 离心 15 min。把上清转移到冰浴的离心管中。取少量样品采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。将样品加入 96 孔板中,每孔 10 μL,每个样品设 4 个平行孔,取 10 μL 检测缓冲液做空白,随后每个孔再分别加入 80 μL 检测缓冲液和 10 μL Ac-DEVD-pNA (2 mmol/L),充分混匀。37 ℃避光孵育 120 min 后酶标仪测定 405 nm 处吸光度(A_{405})值。同时将试剂盒提供的 pNA (10 mmol/L) 标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100、200 μmol/L,作为标准品,每个浓度取 100 μL 用酶标仪测定 A_{405},并绘制标准曲线。样品的 A_{405} 扣除空白对照的 A_{405},即为样品中 caspase-3 催化产生的 pNA 产生的吸光度。通过标准曲线的对比计算出样品中催化产生的 pNA 量计算 caspase-3 活性。

2.6 龙葵碱对 HepG2 细胞内 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响:收集细胞,PBS 洗细胞 3 次,4 % 多聚甲醛 2 mL 固定 30 min,弃上清。PBS 洗涤细胞 3 次,加入 TPBS 重悬细胞,放置 15 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤细胞 3 次。加入小鼠抗人一抗(1 ∶200 稀释),4 ℃孵育过夜。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。PBS 洗涤细胞两次。加入稀释的 FITC-山羊抗小鼠 IgG (1 ∶100),室温孵育 2 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。PBS 洗细胞 3 次,并重悬细胞,激光共聚焦扫描显微镜检测荧光强度,激发波长 488 nm,发射波长 513～523 nm。

2.7 数据处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理,样本比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 龙葵碱对 HepG2 细胞形态的影响:透射电镜观察结果见图 1。阴性对照组肿瘤细胞有小突起,核仁明显,有粗面内质网,线粒体丰富且脊、膜清晰;阳性对照组细胞呈凋亡的形态改变,细胞突起减少,胞质浓缩,细胞核深染,染色质浓缩成块并边聚,线粒体空泡变,出现凋亡小体;龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后,高、中、低剂量组均出现典型的凋亡细胞形态改变,电镜下表现为细胞固缩,染色质致密、边缘化;核凝聚固缩,染色体断裂形成核碎块,胞质气泡产生,凋亡小体形成,线粒体脊消失且肿胀明显,部分线粒体空泡变,随着龙葵碱浓度升高,凋亡细胞数量增多。

3.2 TUNEL 检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡:TUNEL 染色阳性物质为绿色荧光,位于细胞核内,

散在分布,即阳性着色的凋亡细胞表现为细胞核呈绿色,部分细胞质也可因核 DNA 碎片的逸出而呈阳性着色。固缩的绿色圆形小体为凋亡小体。正常非凋亡细胞无荧光。

实验结果表明不同浓度龙葵碱及阳性药物作用 24 h 后,部分细胞的细胞核内均呈散在绿色,阳性对照组也出现明显凋亡形态,阴性对照组无荧光。见图 2。

3.3 流式细胞仪检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞早期凋亡率:用 Annexin V-FITC 和 PI 染色后,正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色 (如图 3 左下角);凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,PI 染色呈阴性 (如图 3 右下角);坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色 (如图 3 右上角)。0.4、2、10 μmol/L 龙葵碱分别作用 HepG2 细胞 24 h 后早期凋亡率分别为 4.0%、8.5%、20.1%,即龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡呈一定的剂量依赖性,见图 3。

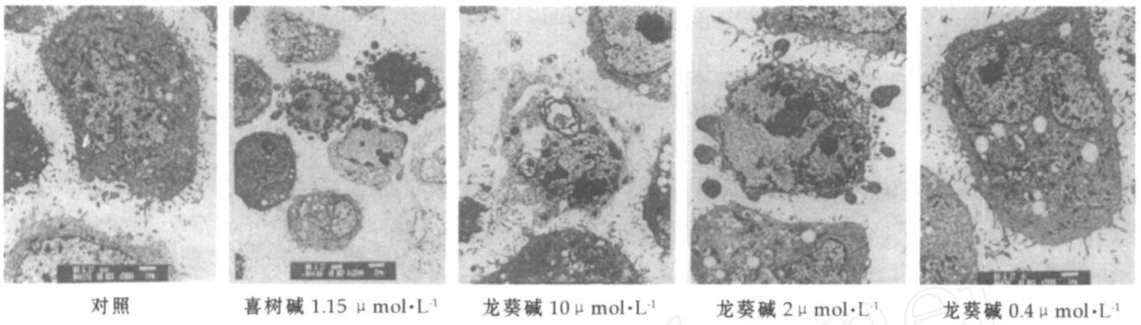

图 1 透射电镜观察 HepG2 细胞形态

Fig. 1 HepG2 Cell morphology observed by electron microscope

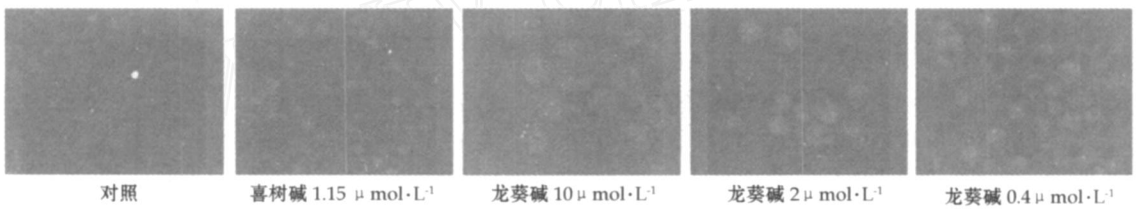

图 2 TUNEL 法检测龙葵碱对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of solanine on apoptosis in HepG2 cell by TUNEL assay

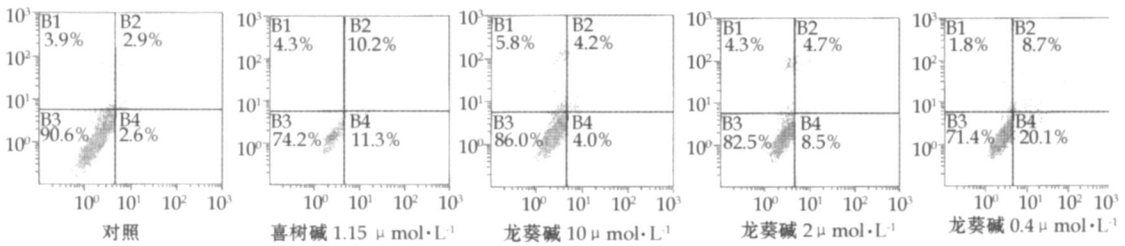

图 3 流式细胞术检测 HepG2 细胞早期凋亡率

Fig. 3 Earlier apoptosis rate determined by flow cytometry in HepG2 cell

3.4 龙葵碱对 HepG2 细胞内 caspase-3 活性的影响:在龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后,细胞内的 caspase-3 活性随龙葵碱剂量的增大而升高,并均显著高于阴性对照组,且升高 caspase-3 活性的强度具一定的剂量依赖性。见表 1。

3.5 龙葵碱对 HepG2 细胞内 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

3.5.1 龙葵碱作用肝癌细胞 HepG2 24 h 后细胞内 Bcl-2的变化:实验结果表明,龙葵碱作用于 HepG2

表 1 龙葵碱对 HepG2 细胞 caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 1 Effect of solanine on caspase-3 activity in HepG2 cell ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组 别	C/ (μmol·L⁻¹)	caspase-3 酶活性/ (U·mg⁻¹)
对照	-	1.37 ± 9.96
喜树碱	1.15	5.23 ±12.37**
龙葵碱	0.4	3.47 ±17.28**
	2	4.72 ±13.55**
	10	5.45 ±14.25**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

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

24 h 后,细胞内的 Bcl-2 显著低于阴性对照组,0.4、2、10 μmol/L 龙葵碱组与阴性对照组比较均具有统计学差异 ($P < 0.01$),且龙葵碱 3 个剂量组降低 Bcl-2 的强度具一定的剂量依赖性,见表 2。

3.5.2 龙葵碱作用肝癌细胞 Hep G2 24 h 后细胞内 Bax 的变化:实验结果表明,龙葵碱作用于 Hep G2 24 h 后,细胞内的 Bax 显著高于阴性对照组,2、10 μmol/L 龙葵碱组与阴性对照组比较均具有显著统计学差异 ($P < 0.01$),0.4 μmol/L 龙葵碱组与阴性对照组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$)。且 3 个剂量组升高 Bax 的强度具一定的剂量依赖性。见表 2。

表 2 龙葵碱对 HepG2 细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

Table 2 Effect of solanine on Bcl-2 and Bax protein expression in HepG2 cell

组 别	C/(μmol·L^{-1})	细胞数	Bcl-2 (FI)	Bax (FI)
对照	-	20	36.84 ±10.17	7.28 ± 9.56
喜树碱	1.15	20	6.94 ±13.47 **	36.31 ± 6.57 **
龙葵碱	0.4	20	27.40 ±11.45 **	15.55 ±14.28 *
	2	20	12.25 ±15.16 **	25.27 ±10.96 **
	10	20	5.78 ±12.28 **	45.47 ± 9.34 **

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

4 讨论

龙葵碱对 Hep G2 人肝癌细胞具有很好的细胞毒作用,本课题组前期对其进行了广泛的研究,发现龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡与调控细胞内第二信使 —Ca^{2+} 浓度,细胞膜电位[6],钙泵等因素有关。但这些均为细胞凋亡启动及执行过程中的信号系统,龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡的直接靶点或者是诱导 Hep G2 细胞凋亡的始动部位是哪里,是本研究的主要内容。

Bcl-2 属于一类癌基因家族,其结构主要由两大结构域组成,即位于羧基端的跨膜结构域和数量不等的 Bcl-2 同源结构域 (Bcl-2 homology, BH),根据其所具有的 BH 结构域以及在凋亡中发挥的生物学效应的不同可被大致分为抗凋亡类蛋白、促凋亡类蛋白和只具有 BH3 结构域的凋亡蛋白 3 大类,分别以 Bcl-2,Bax 和 Bid 为代表[7]。细胞凋亡的发生取决于促凋亡与抑凋亡成员间的相对浓度[8]。Bcl-2 和 Bax 是两类典型的抑凋亡和促凋亡蛋白,有研究表明,在促凋亡因素的刺激下,Bcl-2/Bax 的值决定了细胞凋亡或存活。大量研究表明,Bcl-2/Bax 值是决定细胞是否凋亡的重要因素。在正常情况下,Bcl-2/Bax 保持一定值,并以 Bcl-2、Bax 异源二聚体形式存在。当 Bcl-2 增加时,Bcl-2/Bax 值增加,Bcl-2 同源二聚体增多,细胞则趋于存活;而 Bax 增加,Bcl-2/Bax 值下降,Bax 同源二聚体增多,细胞则趋于凋亡。

Bcl-2 蛋白是一个线粒体内膜蛋白,线粒体上的 Bcl-2 多位于线粒体通透性改变孔道 (permeability transition, PT) 处,具有抑制线粒体通透性变化的能力,进而影响细胞内 Ca^{2+} 浓度和膜电位的变化。鉴于本课题组前期对 Hep G2 细胞内 Ca^{2+} 浓度和膜电位变化的考察,为了深入研究龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡的作用靶点或者始动部位,在本研究中进一步观察龙葵碱对 Hep G2 细胞 Bcl-2/Bax 值的影响。另外,有文献报道,Bcl-2 是 caspase-3 的上游基因,调控 caspase-3 的活化[9]。而 Caspase 家族又是诱导细胞凋亡的最终执行者,因此,本实验在前期研究基础上,重点观察了龙葵碱对 Hep G2 细胞 Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白表达量和 caspase-3 活性的影响,在原来研究的基础上更深入一层揭示龙葵碱作用机制。

首先通过电子显微镜和 TUNEL 法从形态学上和生化特征上验证龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡作用。电子显微镜发现相对于阴性对照组肿瘤细胞有小突起,核仁明显,有粗面内质网,线粒体丰富且脊、膜清晰[10]的特征,龙葵碱各剂量组均出现典型的凋亡细胞形态改变,电镜下表现为细胞固缩,染色质致密,边缘化,核凝聚固缩,染色体断裂形成核碎块,胞质气泡产生,凋亡小体形成,随着龙葵碱浓度增高,凋亡细胞数量增多。细胞凋亡的一个显著特征是细胞染色体的 DNA 降解,这种断裂是个渐进的分阶段的过程。原位缺口末端检测法 (TUNEL 法) 是一种快速和便捷的检测凋亡细胞 DNA 断裂的手段之一。本实验采用 TUNEL 法检测龙葵碱作用 Hep G2 细胞 24 h 后,发现细胞染色体 DNA 的断裂。本实验结果再次验证了龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡的事实。

采用激光共聚焦扫描显微术检测龙葵碱作用 Hep G2 细胞 24 h 后,对细胞内 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响。发现龙葵碱能下调 Hep G2 细胞内 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 的表达,使 Bcl-2/Bax 的值下降。结合前期结果发现龙葵碱对 Hep G2 细胞内 Ca^{2+} 和膜电位的影响,推断出 Bcl-2/Bax 值的下降,是其上游影响因素。

同时 Bcl-2/Bax 值又直接调控着 caspase 家族的激活,因此观察了不同浓度龙葵碱作用 Hep G2 细胞 24 h 后对细胞内 caspase-3 相对活性的影响,

发现龙葵碱能够升高 Hep G2 细胞内 caspase-3 相对活性。提示龙葵碱对 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的调控是龙葵碱诱导 Hep G2 凋亡的相对于细胞内 Ca^{2+} 和 caspase 家族的上游因素。

参考文献:

[1] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇. 龙葵活性成分的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2004, 20 (6): 638-641.

[2] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H_{22} 肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 79-81.

[3] Ji Y B, Gao S Y, Ji C F, *et al*. Induction of apoptosis in Hep G2 cells by solanine and Bcl-2 protein [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 115(2): 194-202.

[4] 高世勇, 季宇彬. 龙葵碱对人肝癌 Hep G2 细胞 N-乙酰基转移酶活性的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1688-1691.

[5] 高世勇, 邹 翔, 汲晨锋, 等. 龙葵碱诱导 Hep G2 细胞凋亡的观察 [J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2007, 23 (6): 644-650.

[6] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in Hep G2 cell and $[Ca^{2+}]_i$ in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 21(6): 3359-3367.

[7] Flangea C, Potencz E, Anghel A, *et al*. Bcl-2 expression in Hodgkin's lymphoma progression [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2008, 49(3): 357-363.

[8] Mohammad R M, Goustin A S, Chen B, *et al*. Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 2226-2235.

[9] Ashutosh Shrivastava, Meenakshi Tiwari, Rohit A, *et al*. Molecular iodine induces caspase independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria mediated pathway [J]. *Biol Chem*, 2006, 281: 19762-19771.

[10] Szuts D, Krude T. Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage [J]. *Cell Sci*, 2004, 117: 4897-4908.

藏药多舌飞蓬不同提取物抗炎镇痛活性及急性毒性研究

张志锋[1], 吴春蕾[1], 刘 圆[1], 张 浩[2]*

(1. 西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘 要:**目的** 比较藏药多舌飞蓬不同提取物的抗炎镇痛活性及急性毒性的差异。**方法** 样品经水提取, 采用大孔吸附树脂纯化工艺, 制备多舌飞蓬不同提取物 (EM1、EM2 和 EM3); 运用角叉菜胶致小鼠足肿胀和二甲苯致耳肿胀复制炎症模型, 冰醋酸和甲醛致疼痛小鼠模型, 观察 EM1、EM2、EM3 的抗炎镇痛活性, 并比较各提取物的急性毒性。**结果** 多舌飞蓬不同提取物均能减轻二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀度以及角叉菜胶诱导的小鼠足肿胀程度, 均具有抑制冰醋酸所致小鼠扭体反应和甲醛所致小鼠足痛反应, 表明多舌飞蓬不同提取物均有抗炎镇痛作用; 小鼠 ig 给药 EM1 的 LD_{50} 为原生药 137.24 g/kg, 给予 EM2 的 LD_{50} 为原生药 287.60 g/kg, 给予 EM3 最大剂量 (原生药 1 960 g/kg) 后无动物死亡。**结论** 大孔吸附树脂能够有效富集多舌飞蓬中具有抗炎镇痛作用的黄酮类成分, 并去除其毒性成分。

关键词:多舌飞蓬; 抗炎作用; 镇痛作用; 急性毒性

中图分类号:R285.5 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2009)10-1612-03

多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Wall.) Benth. 为菊科飞蓬属多年生草本植物, 主要分布于我国西藏、四川西部和云南西北部高原地区[1]。在藏医药中以全草入药, 其藏药名为"美多罗米",《晶珠本草》记载:"美多罗米, 味苦, 清热解毒, 治瘟病时疫"[2];《藏药志》云:"美多罗米, 苦、寒、无毒; 清热解毒; 治瘟病时疫、头痛、眼病等"[3]。本课题组先前研究主要集中在多舌飞蓬的资源分布、化学成分方面[4,5], 为了进一步筛选多舌飞蓬中的活性物质, 对多舌飞蓬总黄酮部位进行了初步的药效学和急性毒性试验, 发现多舌飞蓬具有一定的抗炎镇痛活性, 但具有较强的急性毒性, 因此, 本课题组采用大孔树脂纯化得到不同的多舌飞蓬提取物, 运用化学法诱导小鼠炎症及疼痛等模型和急性毒性的研究方法[6], 比较多舌飞蓬不同提取物的抗炎镇痛作用及急性毒性的差异, 为多舌飞蓬的进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材及受试药品:多舌飞蓬药材于 2006 年 7 月采自四川省甘孜藏族自治州炉霍县罗锅梁子, 经笔者鉴定为多舌飞蓬 *Erigeron multiradiatus* (Wall.) Benth. 的干燥全草, 标本保存于四川大学

* **收稿日期**:2009-01-19

基金项目:西南民族大学青年重点项目 (26701601)

作者简介:张志锋(1973—), 男, 四川成都人, 博士, 从事药用植物的资源研究及品质评价。

Tel: (028) 85522322 Fax: (028) 85522315 E-mail: zhangzhf99@gmail.com