

临床上主要分为 1 型和 2 型糖尿病两种类型。现已证明,胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的主要发病机制之一^[7],胰岛素抵抗与胰岛素作用的相对不足是 2 型糖尿病患者体内天然免疫的激活因素,并产生高细胞因子血症,这些细胞因子作为免疫反应的中介者和调节者,在胰岛 β 细胞损伤中起重要作用^[8]。有学者认为 2 型糖尿病患者 HLA-DR 抗原频率增高,在诱发因素的作用下导致血糖升高,CD₄⁺/CD₈⁺ 比值下降,CD₄⁺ 细胞的活性增殖受到抑制,使 CD₄⁺ 细胞产生细胞因子(如 IL-2) 减少,协助 B 细胞产生抗体和辅助其他淋巴细胞功能减弱,IL-2R 由 CD₄⁺ 细胞膜上脱落入血液循环,抑制已活化的 T 细胞克隆性扩增,使机体的免疫功能受到抑制^[9]。长期高血糖状态又进一步使红细胞胰岛素受体糖基化,受体敏感性降低,粒细胞功能受损,其趋化性、吞噬及杀菌能力减低,细胞介导的免疫受损,T 淋巴细胞对有丝分裂原反应降低,致使 2 型糖尿病患者存在免疫功能缺陷,抵抗力较差,发生各种感染比正常人高数倍^[10]。因此,是否能改善胰岛素抗性,是早期预防和治疗 2 型糖尿病的重要措施,而调节机体免疫功能对于糖尿病的治疗亦显得尤为重要。新工艺金芪降糖片是在不改变主要原料配方的前提下,从生产工艺上应用超声冷冻技术制备而成,使现有药物生药含量增加 1 倍,大大降低药物生产成本。本实验结果表明,新工艺金芪降糖片可以使胰岛素抵抗性糖尿病模型小鼠在注射胰岛素后,血糖值降低幅度显著增加。对 ConA 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖转化影响有明显作用,并具有提高脾细胞产生 IL-2 的活性,增强免疫抑制小鼠脾细胞产生抗体的能力。同等生药剂量下作用与原工艺金芪降糖片

相当,基本达到了通过改变工艺降低成本而保证疗效不变的目的,同时减少患者药物服用量,方便使用。上述结果提示该药物可以明显改善氢化可的松诱发的胰岛素抵抗,不同程度地提高氢化可的松免疫抑制小鼠的脾细胞免疫功能。推测新工艺金芪降糖片在对改善胰岛素抵抗及调节脾细胞免疫功能方面具有一定作用,有益于增强机体免疫力,提高糖尿病患者的生活质量。

参考文献:

- [1] 申竹芳. 金芪降糖片抗糖尿病的药理作用基础 [J]. 国外医学:内分泌学分册, 2004, 5(24): 215-216.
- [2] Yamaguchi K, Matsuo A. Effect of pretreatment with hydrocortisone in isolated islets from rats fed with a high fat diet [J]. *Exp Clin Endocrinol*, 1983, 82: 304-308.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.
- [4] Seki H, Lwai K, Kanegane H, et al. Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocyte subpopulations [J]. *Cell Immunol*, 1995, 163(22): 30-36.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2001.
- [6] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术 [M]. 第四军医大学出版社, 2003.
- [7] Kernan W N, Inzuchi S E. Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance; Stroke prevention and management [J]. *Cure Treat Options Neurol*, 2004, 6: 443-450.
- [8] Gupta D, Varma S, Khandelwal R L. Long-term effect of tumor necrosis factor- α treatment on insulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(3): 593-607.
- [9] Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, et al. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 166(2): 387-394.
- [10] Zambad S P, Upganlawar S P, Umathe S N. A synergistic decline in humoral and cellular immunity of diabetic mice on exposure to polluted air [J]. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1999, 43: 474-478.

王不留行提取物抑制血管生成的药效学研究

冯磊¹, 花慧¹, 邱丽颖¹, 张莲芬², 金坚^{2*}

(1. 江南大学医药学院 天然药物研究室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:目的 探讨王不留行提取物对肿瘤新生血管生成的抑制作用。方法 采用鸡胚尿囊膜血管生成模型分析王不留行提取物对新生血管生成的影响, 用免疫组化染色法检测荷瘤小鼠 C51 结肠癌细胞中 CD31 表达的变化。

收稿日期: 2009-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772586)

作者简介: 冯磊 (1974—), 男, 江苏省无锡人, 博士生, 副教授, 主要研究方向为天然药物的新药研究与开发、生物制药等。

Tel: (0510) 85327353 E-mail: feng2000lei@yahoo.com.cn

* 通讯作者 金坚 E-mail: jinjian31@126.com

观察王不留行提取物对小鼠 Lewis 肺癌转移模型的影响。结果 王不留行提取物具有明显抑制鸡胚尿囊膜血管新生成的作用,能够明显降低荷瘤小鼠 C51 结肠癌细胞中的 CD31 表达,显著抑制 Lewis 肺癌肿瘤细胞的生长、转移,稳定病灶。结论 王不留行提取物具有明显抑制肿瘤新生血管生成的作用,提示其有可能成为新的血管生成抑制剂。

关键词:王不留行;血管生成;肿瘤

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1949-04

血管新生与实体瘤的生长和发展密切相关,肿瘤新生血管不仅给肿瘤组织输送充足的营养物质,同时也为肿瘤的进一步恶性生长和转移提供条件。国内外学者已经提出并且施行抗血管疗法(也称“肿瘤饿死”疗法),希望特异性抑制肿瘤血管的新生,切断肿瘤组织的营养供给和转移通道,造成其缺血、缺氧、大面积死亡,从而延缓肿瘤生长,延长患者的生存期^[1~4]。此类药物的社会效益和经济效益都十分可观。

王不留行是一味常用中药,系石竹科麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的种子,主要含有黄酮苷、环肽、三萜皂苷、类脂和脂肪酸、单糖等化合物^[5~7],临床上多用于一些妇科疾病的治疗。曾有临床报道,王不留行及其中药组方可以治疗乳腺癌、甲状腺癌等疾病,但其抑制肿瘤生长的药效机制是否与其抑制肿瘤新生血管有关,迄今为止国内外还未发现此类报道。因此本实验对王不留行提取物抗肿瘤血管生成的作用进行了初步研究,探讨其是否有可能开发成为新型的血管生成抑制剂。

1 材料

1.1 药品与试剂:王不留行药材购自江苏省无锡市山禾药业股份有限公司,南京中医药大学陈健伟教授鉴定分别为石竹科麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的种子的干燥树皮。MTT (Sigma 公司);RPMI 1640 细胞培养基 (Gibco BRL 公司);胰酶、小牛血清、L-谷氨酰胺 (华美生物工程公司);CD31 单克隆抗体及免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物:BALB/c-nu/nu 裸小鼠 (4~6 周龄,体质量 18~22 g);C57BL/6 小鼠 (7 周龄,体质量 18~20 g),中国科学院动物研究所提供。受精白皮种蛋购自无锡马山养鸡场。

1.3 实验细胞系:C51 结肠癌细胞、Lewis 肺癌细胞由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法

2.1 王不留行提取物的制备:王不留行药材用水煎煮提取两次 (1.5、1 h),合并提取液,滤过,减压浓缩成浸膏,经冷冻干燥后得到王不留行提取物粉末,

得率为 12.14%,相当于生药材 121.4 mg/g。

2.2 细胞培养:RPMI 1640 细胞培养基、10% (体积分数) 小牛血清和 0.01% L-谷氨酰胺配制成细胞培养液。培养的细胞株置于 37℃、5% (体积分数) CO₂ 饱和湿度下常规培养传代,观察细胞生长状况,并确保细胞生长良好。实验均用处于对数生长期的细胞。

2.3 鸡胚绒毛尿囊膜 (chick embryo chorioallantoic membrane, CAM) 血管生成形态学检测:受精白皮种蛋,参考文献方法^[8]制备鸡胚尿囊膜。用打孔器制备直径为 6 mm 的微孔滤膜圆片,湿热高压消毒。设置王不留行提取物给药组 (10 μL、生药 1 g/mL) 和生理盐水阴性对照组。将药物滴于滤纸上,制成药膜,吹干备用。鸡胚培养 3 d 后分组,将药膜贴于 CAM 的部位。加药 48 h 后,观察药膜周围的血管数,并摄影记录。在后续验证实验中,平行设置王不留行提取物的 3 个质量浓度 (生药材 0.8、4.0、8.0 mg/mL),观察在低质量浓度下王不留行提取物的活性以及是否存在剂量依赖关系。

2.4 体内荷瘤模型小鼠分析血管内皮细胞中 CD31 分子表达的影响:用 PBS 制成 C51 结肠癌细胞悬液,以 2×10^6 个、200 μL 接种至 BALB/c-nu/nu 裸鼠的右股部皮下。待瘤体生长至 5 mm×5 mm 大小时,随机分成两组:生理盐水对照组,王不留行提取物用药组 (0.4 mL、生药 1 g/mL),每组 5 只。连续 ig 给药 60 d,每天记录瘤体的长径和短径。用药期间,小鼠未出现不良反应。处死小鼠后,取出肿瘤,称质量后计算抑瘤率 [抑瘤率 = (对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量 × 100%]。并把肿瘤组织制成冰冻切片,应用 SABC 法对冰冻切片进行 CD31 免疫组织化学染色,显微镜 (×200) 下观察并选择 3 个不同视野计数,取 3 个视野的均值作为微血管密度 (MVD) 值。

2.5 Lewis 肺癌转移模型小鼠分析王不留行提取物对体内肿瘤的抑制作用:选取体质量为 14~18 g 的雄性近交系 C57BL/6 小鼠 10 只,将制备好的 Lewis 肺癌细胞悬液以 0.2 mL/只接种于小鼠右腋皮下 (约含活细胞数 1×10^6 个)。随机分为 2 组,每

组 5 只;生理盐水对照组、王不留行提取物用药组 (0.4 mL、生药 1 g/mL)。在接种 Lewis 肺癌细胞 4 d 后,每天 ig 给药 1 次,共治疗 4 周。第 28 天将所有小鼠断颈处死,将肺部及肿瘤完整取下,取部分肿瘤组织,常规石蜡切片或冰冻切片,HE 染色,光镜 (×100) 下观察,每个样品取不连续 3 张切片计数肺转移灶平均数。

3 结果

3.1 王不留行提取物抑制 CAM 新生血管的形成:前期实验结果表明生理盐水组的 CAM 血管生成发育正常,整体呈鲜红色,血管粗大,血流量充盈,在药膜下方新生血管呈放射状分布,血管分支比较多,毛细血管丰富。而王不留行提取物能够明显抑制这种血管新生成,血管整体色淡浅黄,血管细小,血管数目明显减少,呈零星分布,毛细血管分支显著减少,特别是在药膜片下及周围局部鲜有血管区。后续验证实验发现药物质量浓度稀释 1 000 倍后其活性依然存在,特别是在抑制新生小血管数量方面与对照组相比差异具有显著性,且这种抑制作用与药物剂量呈正相关,结果见图 1 和表 1。

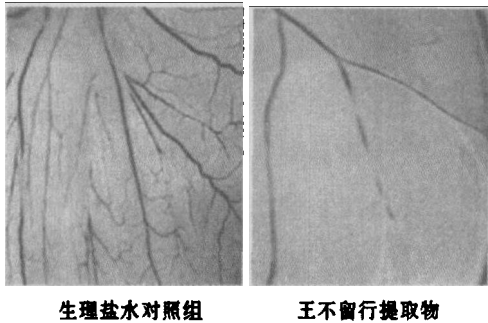


图 1 王不留行提取物对 CAM 新生血管生成的影响

Fig. 1 Effect of *V. segetalis* extracts on neovascularization in CAM

表 1 王不留行提取物对 CAM 新生血管生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of *V. segetalis* extracts on neovascularization in CAM ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	大血管数	中血管数	小血管数
对照	0	2.5 ± 0.20	3.5 ± 0.67	19.7 ± 0.47
王不留行提取物	0.8	2.2 ± 0.12	4.1 ± 0.88	12.6 ± 0.35
	4.0	3.1 ± 1.22	3.3 ± 1.91	$10.1 \pm 0.22^*$
	8.0	2.7 ± 0.53	2.5 ± 1.11	$6.3 \pm 0.32^{**}$

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

3.2 王不留行提取物对荷瘤模型小鼠的血管内皮细胞中 CD31 分子表达的影响:王不留行提取物用药组的抑瘤率高达 $(58.3 \pm 3.21)\%$ 。免疫组化染色实验发现生理盐水对照组的肿瘤微血管非常丰

富、密集,多呈棕褐色条状分布,MVD 值为 (31.60 ± 2.89) ;而王不留行提取物给药后,肿瘤组织的微血管密度 (11.2 ± 0.54) 明显减少,与对照组相比具有显著性差异 ($P<0.05$),结果见图 2。

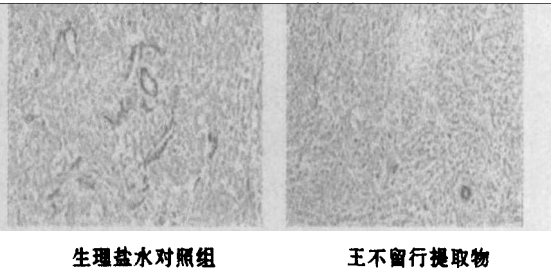


图 2 各组荷瘤小鼠结肠癌细胞中 CD31 的免疫组化染色
Fig. 2 CD31 Immunohistochemistry staining in colon cancer cells from tumor bearing mice in different groups

3.3 王不留行提取物对 Lewis 肺癌转移模型小鼠体内肿瘤的抑制作用:生理盐水组的肿瘤区域很大,肿瘤细胞移行性显著,转移病灶非常明显,可见瘤巨细胞,转移灶数为 4.6 ± 6.6 ;王不留行提取物给药后,能够明显改善和减少转移病灶,转移灶数为 0.3 ± 1.1 ($P<0.05$),移行性受到抑制,肺部几乎观察不到肿瘤组织病变,肺泡组织基本正常。结果见图 3。

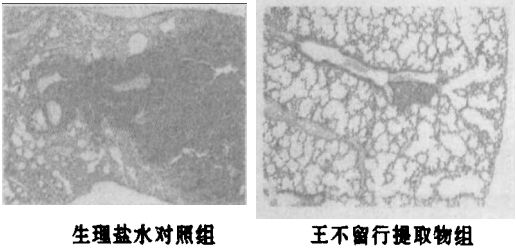


图 3 王不留行提取物对 Lewis 肺癌转移模型小鼠体内肿瘤的抑制作用

Fig. 3 Antitumor effect of *V. segetalis* extracts in mice implanted with Lewis lung carcinoma

4 讨论

现代研究表明,血管生成抑制剂通过选择性地抑制肿瘤新生血管形成,能有效地抑制肿瘤生长与转移,它具有抗瘤谱广、不易耐药等优点,因此开展以抑制新生血管发生为基础的抗肿瘤新药研究是非常有意义的。世界各国目前已经开发出许多血管生成抑制剂,如血管生成抑素、内皮抑素等生物制剂。虽然这些生化药物疗效很好,但是它们都属于多肽类药物,体内稳定性欠佳,只能静脉给药,这类药用前体的应用效果都是剂量依赖性的和需持续长期给予,其结果必然是不良反应增加,治疗费用非常昂贵,给病人带来巨大的精神负担和经济负担。因此开发口服有效的血管生成抑制剂具有广阔的市场需求。

我国的传统中药以其独特的优点:口服有效、不良反应小,日益受到药物研究者的重视,从中药中寻找抗肿瘤血管生成的药物已成为国内外药物研究的一个重要策略。本研究室在建立了多种适于评价药用植物干扰肿瘤血管发生和生长的体内外模型系统的基础上,以抑制血管生成活性作为切入点,长期致力于相关中药新药的筛选、机制研究与开发。在大量的药物筛选过程中发现王不留行水提取物具有抑制肿瘤新生血管生成的活性,且口服有效,可以解决现有药物必须 iv 给药的缺点。国内外文献调研也发现王不留行在抑制肿瘤新生血管生成的领域尚处于空白阶段。本实验通过多种体内动物模型重点阐述了王不留行提取物抑制肿瘤新生血管的作用。

鸡胚尿囊膜血管实验是一种被广泛应用的体内血管抑制模型,实验结果表明,王不留行提取物对 CAM 血管新生模型有明显的抑制作用,且具有剂量依赖关系。CD31 是介导内皮细胞黏附的重要分子,在新血管形成过程中,CD31 可能参与了黏附和/或信号转导,CD31 的同源结合亦可促进内皮细胞间的稳定连接,它促使内皮细胞相互间产生黏附形成血管^[9,10]。C51 结肠癌肿瘤模型小鼠实验表明王不留行提取物抑瘤率可达 58.3%,可以显著地降低肿瘤组织周围的血管内皮细胞的 CD31 表达,明显减少肿瘤组织中的微血管密度。Lewis 肺癌转移小鼠模型分析结果证实王不留行提取物能有效抑制 Lewis 肺癌细胞向肺部的转移,并且能够改善肿瘤

病灶,使得肺部组织基本恢复正常。

综合上述药效学实验,王不留行提取物抗肿瘤血管生成的作用是多方面的,多途径的。它能明显抑制胚胎发育过程中的新生血管,降低肿瘤中微血管密度,有效抑制肿瘤细胞在体内的转移,其机制可能与其降低 CD31 的表达有关。因此,提示王不留行提取物可能成为一个新型的口服有效的肿瘤血管形成抑制剂。

参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, rheumatoid and disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1:27-31.
- [2] Timár J, Döme B, Fazekas K, *et al*. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy [J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7(2): 85-94.
- [3] Arbiser J L. Angiogenesis and the skin: primer [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1996, 34(3): 486-497.
- [4] D'Amato R J, Adamis A P. Angiogenesis inhibition in age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 1995, 102(9): 1261-1262.
- [5] Sang S M, Lao A N, Wang H C, *et al*. A Phenylpropanoid Glycoside from *Vaccaria segetalis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 569-574.
- [6] Sang S M, Lao A N, Wang H C, *et al*. Triterpenoid Saponins from *Vaccaria segetalis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 1999, 1(3): 199-211.
- [7] Mazza G. Compositional and morphological characteristics of cow cockle (*Saponaria vaccaria*) seed, a potential alternative crop [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(9): 1520-1533.
- [8] 张树成, 吴志奎, 王 蕾, 等. 研究中药血管生成活性和作用的鸡胚绒毛尿囊膜试验模型的应用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 1999, 5(5): 16-19.
- [9] 高 媛, 高建恩, 孙启鸿. 血小板内皮细胞黏附分子-1 (PECAM-1) 的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21:40-42.
- [10] Cao G, O'Brien C D, Zhou Z, *et al*. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and *in vitro* endothelial cell migration [J]. *Physiol Cell Physiol*, 2002, 282 (5): C1181-C1190.

玫瑰花和鲍鱼菇提取物降血糖作用机制研究

陈容容¹, 王常荣¹, 侯 军¹, 刘 峰¹, 陈芝慧¹, 张 聘¹, 温廷益², 刘 方¹

(1. 南开大学生命科学学院 微生物学系 应用微生物学与分子生物学实验室, 天津 300071;

2. 中国科学院微生物研究所 工业微生物和生物工程研究室, 北京 100101)

摘 要:目的 研究玫瑰花和鲍鱼菇具有抗氧化活性的提取物对实验性糖尿病小鼠的降血糖作用机制。方法 RT-PCR 方法检测玫瑰花和鲍鱼菇提取物对糖尿病小鼠胰腺胰岛素、超氧化物歧化酶 (SOD)、胰岛素激活因子 (PDX-1) 基因表达水平的影响。结果 两种提取物均能够明显提高各基因的表达水平, 玫瑰花和鲍鱼菇提取物的胰腺胰岛素基因表达分别比糖尿病模型组提高 22.2% 和 17.6%, SOD 基因表达提高 20.1% 和 9.3%, PDX-1 分别提高 19.1% 和 27.4%。结论 玫瑰花和鲍鱼菇提取物均能够明显提高各基因的表达水平, 通过提高胰腺的抗氧化能力发挥降血糖作用, 但降血糖作用机制不同。

关键词: 玫瑰花; 鲍鱼菇; 糖尿病; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1952-04

收稿日期: 2009-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870061); 国家重大新药创制科技重大专项课题 (2008ZX09401-05)

作者简介: 陈容容 (1981—), 女, 天津市人, 硕士, 助理实验师, 主要从事天然产物生物活性的研究。

Tel: (022) 23507658 E-mail: chenrongrong@nankai.edu.cn