

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

随着饮食结构和生活方式的改变,糖尿病发病率逐年上升,糖尿病及并发症已成为人类健康的第三大杀手^[1]。目前国内外临床普遍使用的治疗糖尿病的化学药物,大多仅以降低血糖为目标,作用机制较单一,且副作用较大,如导致低血糖、乳酸中毒等,对抑制糖尿病慢性并发症也无明显作用。越来越多的研究表明,过氧化与糖尿病的发生发展有密切联系,抗氧化剂在血糖长期控制及抑制并发症等方面具有化学药物不可替代的优势^[2]。天然抗氧化剂具有毒性低的特点,且能够通过清除自由基、提高机体抗氧化防御机能、抑制自由基激活的信号传导途径等方式保护各脏器,抑制各种并发症的发生和发展,同时可以保护胰腺细胞分泌胰岛素的功能,降低血糖,使血糖控制与并发症的防治进入一个良性循环,具有广泛的应用前景^[3]。

本研究以筛选得到的蔷薇科药用植物玫瑰花 *Rosa rugosa* Thunb. 和侧耳属食用真菌鲍鱼菇 *Pleurotus abalones* Han, Chen et Cheng 的抗氧化活性组分为研究对象,作用于实验性糖尿病小鼠,在前期研究确认这两种提取物的降血糖活性基础上^[4],检测其对糖尿病动物胰岛素、超氧化物歧化酶(SOD)、胰岛素激活因子(PDX-1)表达量的影响,从分子水平对两种提取物的降血糖机制进行进一步的研究,为其应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:玫瑰花干燥花蕾,产地福建,购于天津药店。鲍鱼菇,购自香港。四氧嘧啶(Alloxan),购自 Fluka 公司;RNAfixer 无液氮 RNA 样品储存液,购自百泰克生物技术司。昆明种小鼠(20~25 g),购自军事医学科学院,饲养于标准实验室条件[(21±2)℃,12 h/12 h 昼夜循环]下,喂食标准啮齿类食物。正式实验开始前,将动物随机分组,适应性饲养 1 周后进入正式实验。

1.2 玫瑰花和鲍鱼菇抗氧化活性提取物的制备^[5,6]:将干燥的玫瑰花花蕾粉碎,20~25℃下用蒸馏水浸泡过夜,回流提取 3 h,滤过,残渣再加入蒸馏水,继续回流煮沸 2 h,倾出提取液,合并滤液,减压浓缩后离心除残渣。与 4 倍体积的乙醇充分混匀,静置过夜,滤过,取滤液,上样大孔吸附树脂柱,去离子水洗脱未吸附物质后,70%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩后冷冻干燥,置于-20℃密封,备用,得率为 3.4%。

将鲍鱼菇子实体置于 35、45、60℃下分别烘烤 6、8、6 h 后粉碎,室温下用蒸馏水浸泡过夜,回流提

取 2 h 并滤过。将滤液减压浓缩后与 4 倍体积乙醇混合静置过夜。滤过沉淀,依次用 80%乙醇,无水乙醇,丙酮洗涤沉淀,溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 中,上样于 DEAE-纤维素柱(40 cm×3 cm)中,用 0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱,收集洗脱液,脱盐浓缩后过 Sephadex G-75 凝胶过滤色谱柱,去离子水洗脱,收集活性组分,冷冻干燥置于-20℃密封,备用,得率为 13.7%。

1.3 实验性糖尿病小鼠模型的建立^[7]:雄性小鼠禁食过夜(16~18 h,自由饮水),将适量四氧嘧啶溶于生理盐水中,立即以 200 mg/kg 小鼠 ip 给药。48 h 后检测小鼠的空腹血糖,以血浆葡萄糖浓度大于 11 mmol/L 为造模成功。

1.4 实验分组与药物处理:实验室前期对玫瑰花和鲍鱼菇提取物的降血糖作用研究表明,5 mg/kg 为其降血糖作用的最佳剂量。实验性糖尿病小鼠随机分成 3 组,每组 8 只,模型组每天 ig 等剂量生理盐水,玫瑰花和鲍鱼菇提取物组,每天以 5 mg/kg 剂量 ig 给药,连续 15 d。末次给药后禁食过夜,断颈处死小鼠,打开腹腔,迅速取出胰腺,立即置于 5 倍体积的 RNAfixer 溶液内,4℃过夜后转至-20℃冰箱内保存。

1.5 两种提取物对小鼠胰腺基因表达的影响

1.5.1 小鼠胰腺组织总 RNA 的提取:将胰腺组织从 RNAfixer 溶液内取出后,用吸水纸吸干残存液体,迅速加入匀浆器中,加入 1 mL 预先配好的含 4%β-巯基乙醇的 Trizol,其他按照 Trizol 说明书提取总 RNA。取适量 RNA 样品并与上样缓冲液混匀,点样于 1%琼脂糖凝胶后,电泳 2 h,在紫外灯下观察其 28S rRNA 和 18S rRNA 的亮度比例是否能达到 2:1,以判断 RNA 样品是否有降解。

1.5.2 RT-PCR 反应:按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作,各基因引物见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Sequences of gene primers

基 因	引 物
GAPDH (参比基因)	上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
胰岛素	上游 5'-TTGTCAAGCAGCACCTTTG-3'
	下游 5'-TGGGTCTCTCACTTCACG-3'
SOD	上游 5'-GCAGGGAACCATCCACTT-3'
	下游 5'-TACAACCTCTGGACCCGT-3'
PDX-1	上游 5'-GGTGCCAGAGTTCAGTCTAA-3'
	下游 5'-CCAGGCTCGGTTCATTG-3'

1.6 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件包进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用配对 *t* 检

验,多组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 小鼠胰腺组织总 RNA 的提取及完整性测定: 由于胰腺细胞含有极为丰富的 RNA 酶,极易在提取过程中降解,因此本研究对 Trizol 一步法进行了改良,在研磨胰腺组织前向 Trizol 试剂中添加了一定量的 RNA 酶抑制剂 β-巯基乙醇以增强对内源性 RNA 酶的抑制。当添加巯基乙醇至 4% 时, RNA 提取效果最佳。由于 Triol 试剂中本身包含一定量的巯基乙醇,因此再向其中添加巯基乙醇不会造成污染。

从图 1 电泳结果可以看出,小鼠胰腺细胞的总 RNA 在琼脂糖凝胶上可以分出明显的两条带,且两条带之间没有拖尾,亮度、宽度比约为 2 : 1,可以判断出所提样品的完整性较好。

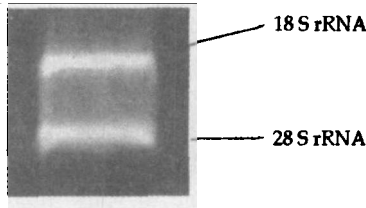


图 1 小鼠胰腺总 RNA 琼脂糖电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA in pancreas of mice

2.2 两种提取物对糖尿病小鼠胰腺相关基因表达的影响:本研究中以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为参比基因,应用终点定量法检测两种提取物对糖尿病小鼠胰腺胰岛素、PDX-1 及 SOD 表达量的影响。电泳结果见图 2,半定量结果见表 2。

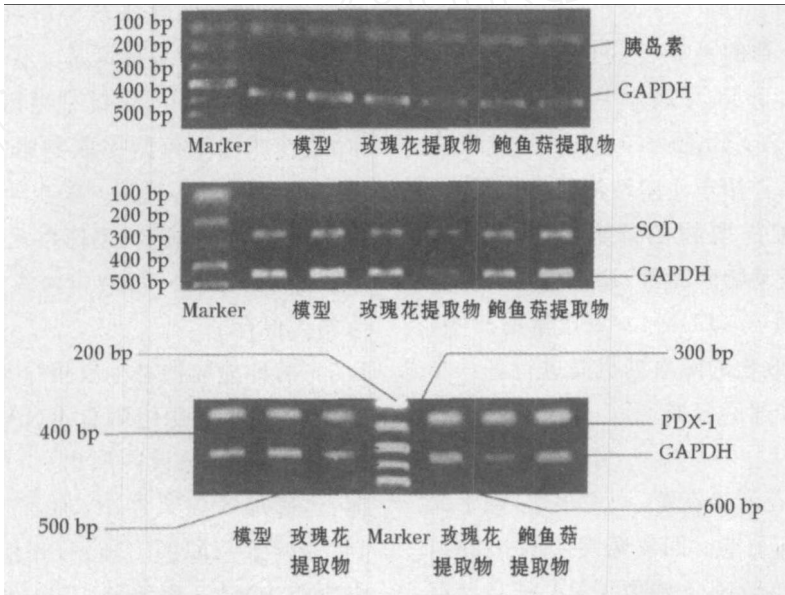


图 2 各组糖尿病小鼠胰腺胰岛素、SOD、PDX-1 基因表达电泳图谱
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of gene expression of insulin, SOD, and PDX-1 in pancreas of diabetic mice

表 2 玫瑰花和鲍鱼菇提取物对糖尿病小鼠胰腺胰岛素、PDX-1、SOD 基因表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 2 Effect of extracts from *R. rugosa* and *P. abalones* on gene expression of insulin, SOD, and PDX-1 in pancreas of diabetic mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胰岛素/GAPDH	SOD/GAPDH	PDX-1/GAPDH
模型	—	4.96±0.10	0.75±0.04	2.15±0.16
玫瑰花提取物	5	6.06±0.47*	0.91±0.13*	2.56±0.23*
鲍鱼菇提取物	5	5.84±0.32*	0.82±0.03*	2.74±0.19*

与模型组比较: * $P<0.05$
* $P<0.05$ vs model group

可以看出,玫瑰花和鲍鱼菇提取物均可以提高糖尿病小鼠胰腺胰岛素、SOD 和 PDX-1 的基因表达。从分子水平说明玫瑰花和鲍鱼菇中抗氧化活性物质通过提高胰岛素基因表达,从而促进胰岛素分

泌功能的恢复;并能够抵抗过量自由基造成的 PDX-1 表达量下降,从而促进了胰岛素合成;同时两种提取物可以明显提高 SOD 的基因表达水平,提高糖尿病小鼠胰腺的抗氧化能力,发挥降血糖活性。

3 讨论

在前期研究中发现,玫瑰花提取物能够提高糖尿病小鼠组织的过氧化氢酶 (CAT) 活性,一定程度上改善高血糖带来的过氧化水平升高,并能显著降低血糖。本研究进行提取物降血糖作用机制的分子水平研究,初步揭示了玫瑰花和鲍鱼菇提取物降低血糖的机制。有研究证实,胰腺是体内抗氧化能力最弱的器官,β 细胞受到自由基的损伤后会导致胰岛素转录激活因子 PDX-1、MafA 表达量和活性下降,使胰岛素基因表达受到抑制,胰岛素生物合成

减少^[8]；自由基还可激活多种信号传导途径影响 β 细胞的生长和分化，诱导 β 细胞凋亡，使其合成胰岛素的能力下降^[9]。玫瑰花提取物可以提高胰腺细胞 SOD、PDX-1 基因的 mRNA 表达，因此，可以推测玫瑰花提取物可能是通过清除自由基，加强抗氧化酶的活力使细胞受到保护，间接增强了胰岛素的分泌，从而发挥降血糖作用。本实验室前期研究中已从鲍鱼菇中分离到槲皮素和没食子酸^[10]，槲皮素能够保护实验性糖尿病动物的胰岛细胞，降低氧化压力的损伤，增加胰岛素的分泌，降低血糖^[11]。由此推测玫瑰花提取物的降血糖作用可能与槲皮素有关。

本实验室前期研究已证明鲍鱼菇提取物具有一定的体外和体内抗氧化能力，且其体外清除自由基的活性远远低于玫瑰花提取物，对四氧嘧啶诱导的实验性糖尿病动物模型的抗氧化能力也没有明显影响，但其降血糖能力却较玫瑰花提取物强，说明鲍鱼菇提取物主要是通过抗氧化以外的途径发挥降血糖作用。分子水平的研究结果显示鲍鱼菇提取物可以提高糖尿病小鼠胰腺的 SOD 基因表达，说明鲍鱼菇提取物对糖尿病小鼠的抗氧化水平是有促进作用的，但可能是由于剂量小，给药时间短尚未表现到酶活水平。可以肯定的是，鲍鱼菇提取物决不是单纯通过此途径来增加胰岛素的表达，原因是鲍鱼菇提取物处理组胰岛素基因表达提高的幅度较玫瑰花提取物还要大，而 SOD 表达提高的幅度较玫瑰花提取物低得多，因此，鲍鱼菇提取物还可能通过促进胰

腺 β 细胞的修复和增殖，或是直接刺激 β 细胞分泌胰岛素等途径增加胰岛素的合成。

本研究从分子水平初步揭示了玫瑰花和鲍鱼菇提取物的降血糖机制，为其进一步的研究奠定了基础，其更具体的降血糖机制及活性成分结构的鉴定仍需进一步探索。

参考文献：

- [1] 沈洁，谷卫．新发现的 1 型糖尿病相关基因 [J]．国际内分泌代谢杂志，2006，26(1)：40-42.
- [2] 刘国安，李正军，李昌．糖尿病中医药治疗进展 [J]．2007，25(4)：123-125.
- [3] 李健，张令文，黄艳，等．苦瓜总皂苷降血糖及抗氧化作用的研究 [J]．食品科学，2007，28(9)：518-520.
- [4] 陈容容，江筠，牛洪江，等．玫瑰花和鲍鱼菇中抗氧化成分的降血糖作用研究 [J]．南开大学学报，2009，2(42)：87-91.
- [5] Ng T B, Gao W, Li L. Rose (*Rosa rugosa*) flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation [J]. *Biochem Cell Biol*, 2003, 83(8)：78-85.
- [6] Li L, Ng T B, Zhao L, et al. Correlation of antioxidant activity with content of phenolics in extracts from the culinary-medicinal Abalone mushroom *Pleurotus abalones* Han, Chen et Cheng (Agaricomycetidae) [J]. *Int J Med Mush*, 2005, 7：237-242.
- [7] Vats V, Yadav S P, Grover J K. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats [J]. *Ethnopharmacology*, 2004, 90：155-160.
- [8] Miriam C, Nils W, Jean C J, et al. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2005, 54：97-107.
- [9] Pilkington K, Stenhouse E, Kirkwood G, et al. Diabetes and complementary therapies: Mapping the evidence [J]. *Pract Diab Int*, 2007, 24(7)：371.
- [10] 牛淑敏，李魏，李乐，等．玫瑰花中两种抗氧化活性成分的分鉴定与活性测定 [J]．南开大学学报，2006，39(1)：90-112.
- [11] Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2003, 135：357-364.

蛭蛇通栓浸膏抗脑缺血药效学研究

岳南，只德广，赵益桂，苏雅

(天津药物研究院 新药评价中心，天津 300193)

摘要：目的 观察蛭蛇通栓浸膏对脑缺血的防治作用。方法 采用阻断大鼠大脑中动脉实验模型，麻醉犬颈内动脉血流量模型、大鼠血小板聚集模型、大鼠颈动脉血栓形成及大鼠高黏滞血症实验模型，观察测定相应的实验指标。结果 蛭蛇通栓浸膏明显减少脑梗死组织百分比，明显改善脑梗死大鼠的行为障碍；明显抑制血小板聚集；抑制血栓形成；抑制全血黏度及血浆比黏度的升高；明显增加麻醉犬颈内动脉血流量，降低脑血管阻力。结论 蛭蛇通栓浸膏对脑缺血有明显的防治作用。

关键词：蛭蛇通栓浸膏；脑缺血；血小板聚集；血栓形成；高黏滞血症

中图分类号：R285

文献标识码：A

文章编号：0253-2670(2009)12-1955-07

蛭蛇通栓浸膏由黄芪、人参、水蛭、乌梢蛇等中药组成，具有益气活血、息风通络、化痰开窍的功效，

临床主要用于中风经络恢复期，根据该药的功能主治，本实验对其进行主要药效学研究，为临床研究提

收稿日期：2008-12-24

作者简介：岳南(1964—)，男，江苏人，主要从事新药临床前药效学研究。Tel：(022) 23006886 E-mail：ynantj@163.com