

在胰腺癌肿瘤细胞增殖过程中发挥极其重要的作用,而化疗药物通过对 k267 因子的调节发挥其抗癌作用。诱导肿瘤细胞凋亡是药物治疗肿瘤的重要途径之一。利用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (TUNEL) 技术,对裸鼠肿瘤组织中的凋亡细胞进行观察和比较,在本实验中三氧化二砷处理组与模型组相比,凋亡细胞明显增多,提示三氧化二砷可诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤的发生、发展。李利等<sup>[9]</sup>研究发现三氧化二砷组中 TUNEL 细胞的阳性率较模型组明显增加,通过诱导 H1260 肿瘤细胞凋亡发挥其抗肝癌效应。

本研究主要证实了三氧化二砷的体内抗肿瘤作用,对其作用机制的研究只处于初步探讨阶段,也缺乏同期进行的体外对照研究,这有待于下一步研究实现。

综上所述,作为一种新型的抗癌药物,三氧化二砷与吉西他滨作用相当,且高剂量的三氧化二砷显示出更强的抗癌效应,此种作用主要通过抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞凋亡而实现,至于其具体的作用机制尚需进一步研究明确。

#### 参考文献:

[1] Grimwade D, Jovanovic J V, Hills R K, et al. Prospective

minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct preemptive arsenic trioxide therapy [J] J Clin Oncol, 2009, 27(22): 3652-3658

[2] Cheng B, Yang X, An L, et al. Arsenic trioxide induced apoptosis of Hep22 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level [J] Auris Nasus Larynx, 2009, 10(24): 1012-1016

[3] 钱晓萍,刘宝瑞,殷海涛,等. 氧化砷对 MR2 细胞耐药转运分子作用的研究 [J] 中华肿瘤杂志, 2004, 26(10): 6012-6051

[4] Monzen H, Griffin R J, Williams B W, et al. Study of arsenic trioxide-induced vascular shutdown and enhancement with radiation in solid tumor [J] Radiat Med, 2004, 22(4): 2052-2111

[5] Li X, Ding X, Adrian T El. Arsenic trioxide inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells [J] Anticancer Res, 2002, 22(4): 2202-2213

[6] Li X, Ding X, Adrian T El. Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression [J] Pancreas, 2003, 27(2): 174-179

[7] Xiao Y F, Liu S X, Wu D D, et al. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer [J] World J Gastroenterol, 2006, 12(36): 5780-5786

[8] Mohamad N A, Cricco G P, Sambuco L Al. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice [J] World J Gastroenterol, 2009, 15(9): 1062-1071

[9] 李利,孟凡义,扶云碧,等. 砷替佐米或联合三氧化二砷治疗 H1260 白血病细胞移植瘤裸鼠的实验研究 [J] 南方医科大学学报, 2007, 27(10): 1502-1506

## 制首乌总多糖对骨髓抑制贫血小鼠脾脏促红细胞生成素受体和转录因子 GATA21 mRNA 表达的影响

冯雪梅<sup>1</sup>, 祝彼得<sup>1</sup>, 吕 艳<sup>2</sup>

(1 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2 四川大学华西基础与法医学院, 四川 成都 610041)

**摘要:**目的 观察制首乌总多糖 (PPS) 对放、化疗所致骨髓抑制贫血小鼠脾脏促红细胞生成素受体 (EpoR) 及转录因子 GATA21 mRNA 表达的影响,探讨 PPS 补血作用的分子机制。方法 建立骨髓抑制贫血小鼠模型,提取 PPS,经 ip 给药,观察其对骨髓抑制贫血小鼠外周血及脾脏 EpoR 和 GATA21 mRNA 表达的影响。结果 PPS 能促进骨髓抑制贫血小鼠外周血象恢复,并明显上调脾脏 EpoR 和 GATA21 mRNA 的表达。结论 PPS 能通过促进 EpoR 和 GATA21 mRNA 的表达,从而促进骨髓抑制贫血小鼠造血功能的恢复。

**关键词:**制首乌总多糖; 骨髓抑制; 贫血小鼠; 促红细胞生成素受体 (EpoR); GATA21

**中图分类号:** R286.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2010)01-0093-04

造血生长因子通过与造血细胞表面的受体结合,从而通过多种信号转导途径,影响靶基因在细胞中的表达,调控造血细胞的存活、增殖、分化与凋亡。

制首乌具有补肝肾、益精血的作用,既往研究表明,制首乌总多糖 (PPS) 能促进骨髓抑制贫血小鼠造血祖细胞增殖、增加骨髓有核细胞数<sup>[1]</sup>。本实验通

<sup>1</sup> 收稿日期: 2009-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271661)

作者简介: 冯雪梅 (1964), 女, 四川省成都人, 博士, 副教授, 主要从事中西医结合基础研究。

Tel: (028) 88046486 E-mail: fxmcd@yahoo.com.cn

过观察其对外周血及脾脏促红细胞生成素受体 (EpoR) 及转录因子 GATA21 mRNA 表达的影响, 进一步探讨其补血作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: Trizol RNA 提取试剂盒 (美国 Gibco 公司); 氯仿、异丙醇、乙醇 (分析纯, 成都光华化学试剂厂); TaqDNA 聚合酶、dNTP、RNA 逆转录试剂盒 (美国 MBI 公司); DNA Marker I (北京天为时代科技有限公司); DEPC、EB (美国 Sigma 公司)。环磷酸胺、氯霉素, 上海第十二制药厂产品。PPS 注射液: 制首乌经成都中医药大学中药鉴定教研室鉴定后, 参照文献方法<sup>[1]</sup>提取总多糖成分, 真空干燥, 经成都中医药大学基础化学与中药化学教研室测定, 其含 PPS 64.4%, 经除菌处理, 用生理盐水配制成质量浓度为 21.5 mg/mL 注射液, 用于体内 ip 给药。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

| 引物     | 正向引物                           | 反向引物                       | 片段长度/bp |
|--------|--------------------------------|----------------------------|---------|
| EpoR   | 5'-GCTACACCTTCGCTGTTCGA23-     | 5'-TGAAGGTCAGGTCAGCTA23-   | 111     |
| GATA21 | 5'-CAAGAAAGCGAATGATTGTCAACA23- | 5'-GTTCACTGATGGAGCTTGAA23- | 117     |
| GAPDH  | 5'-CTGGCATGGCCTTCCG23-         | 5'-CCCTAGGCCCTCCTGT23-     | 455     |

1.2 实验设计与分组: BALB/c 纯系小鼠 24 只, 雄性, 体质量 (20 ± 2) g, 8~12 周龄 (由四川大学华西医学实验动物中心提供), 随机分为 3 组, 每组 8 只, 分别是对照组、贫血组和 PPS 组, 贫血组与 PPS 组经 <sup>60</sup>Co 2.0 Gy 照射后第 4 日开始 ip 环磷酸胺 (40 mg/kg) 和氯霉素 (50 mg/kg), 每天 1 次, 连续 3 d 造模完成, 于造模完成后的第 1 天开始分别 ip 生理盐水 (0.4 mL/只) 和 PPS (25 mg/kg), 每日 1 次, 连续 6 d, 第 7 天取外周血后, 全部处死小鼠, 取脾脏 (无菌操作), -70℃ 冻存。

1.3 小鼠脾脏总 RNA 提取: 按试剂盒说明书操作。

1.4 小鼠脾脏 cDNA 制备: 制备 1% 的琼脂糖凝胶, 取 1 LL (6 @) 样品缓冲液加 5 LL RNA 混匀, 上样, 100 V 电泳 30 min, EB 染色, 于紫外透射反射仪上观察, 可见两条明显的 28 S RNA 和 18 S RNA 区带, 无拖尾现象, 表明无 RNA 降解, 可用于 cDNA 制备。cDNA 合成按试剂盒说明书操作。

1.5 EpoR、GATA21 mRNA PCR 扩增和凝胶电泳分析: 反应体系组成为 10 @反应缓冲液 3 LL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 LL, 10 mmol/L dNTP 0.9 LL, EpoR/GATA21F 引物 (50 pmol/L) 0.2 LL, EpoR/GATA21R 引物 (50 pmol/L) 0.2 LL, Taq DNA polymerase 0.3 LL, cDNA 产物 2.3 LL,

DH<sub>2</sub>O 15.1 LL, 总体积 25 LL, 混匀, 离心, 梯度 PCR 仪扩增。反应条件: 94℃、20 min 后, 90℃、20 s, 53℃、30 s, 60℃、40 s, 45 个循环, GAPDH 作内参照。取扩增的 DNA 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 30 min; 取电泳后琼脂糖凝胶, EB 染色, 在凝胶成像系统分析仪上进行灰度分析, 读取靶基因与内参照灰度值的比值。

1.6 统计学分析: 实验数据用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析, 组间比较采用 t 检验。

2 实验结果

2.1 PPS 对骨髓抑制贫血小鼠外周血的影响: 结果显示 (表 2), 放、化疗后小鼠外周血白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (Hb)、血小板 (PLT) 均明显低于对照组 (P<0.01), 说明骨髓造血受到明显抑制, PPS 对外周血 RBC、Hb、PLT 有明显的促进恢复的作用 (P<0.05、0.01), 对 WBC 有升高的趋势, 但无统计学意义。

表 2 PPS 对贫血小鼠外周血象的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Table 2 Effect of PPS on WBC, RBC, Hb, and PLT of peripheral blood cells in anemic mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

| 组别  | WBC/( $\times 10^9$ # L <sup>-1</sup> ) | RBC/( $\times 10^{12}$ # L <sup>-1</sup> ) | Hb/(g # L <sup>-1</sup> ) | PLT/( $\times 10^9$ # L <sup>-1</sup> )  |
|-----|-----------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------|
| 对照  | 81.42 ± 11.85                           | 111.49 ± 0.65                              | 163.7 ± 61.2              | 8991.5 ± 1041.9                          |
| 贫血  | 11.92 ± 0.82**                          | 81.26 ± 0.72**                             | 128.9 ± 101.7**           | 5951.4 ± 951.4**                         |
| PPS | 21.33 ± 0.99**                          | 91.24 ± 0.89** <sup>v</sup>                | 143.7 ± 61.6**            | 8171.9 ± 881.2 <sup>v</sup> <sup>v</sup> |

与对照组比较: \*\* P<0.01

与贫血组比较: <sup>v</sup> P<0.05 <sup>v</sup><sup>v</sup> P<0.01

\*\* P<0.01 vs control group

<sup>v</sup> P<0.05 <sup>v</sup><sup>v</sup> P<0.01 vs anemic group

2.2 PPS 对骨髓抑制贫血小鼠脾脏 EpoR 和 GATA21 mRNA 表达的影响: 结果 (表 3, 图 1 和 2) 显示, 放、化疗后所致贫血小鼠脾脏 EpoR 和 GATA21 mRNA 表达量明显降低 (P<0.01), PPS 能明显上调贫血小鼠 EpoR 和 GATA21 mRNA 的表达 (P<0.01)。

3 讨论

近年来, 关于中药活性成分中多糖的研究有较表 3 PPS 对贫血小鼠脾脏 EpoR、GATA21 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Table 3 Effect of PPS on expression of EpoR and GATA21 mRNA in spleen of anemic mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

| 组别  | EpoR/GAPDH                              | GATA21/GAPDH                            |
|-----|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 对照  | 0.673 ± 0.050                           | 0.561 ± 0.044                           |
| 贫血  | 0.442 ± 0.067**                         | 0.404 ± 0.203**                         |
| PPS | 0.656 ± 0.072 <sup>v</sup> <sup>v</sup> | 0.486 ± 0.051 <sup>v</sup> <sup>v</sup> |

与对照组比较: \*\* P<0.01; 与贫血组比较: <sup>v</sup><sup>v</sup> P<0.01

\*\* P<0.01 vs control group; <sup>v</sup><sup>v</sup> P<0.01 vs anemic group

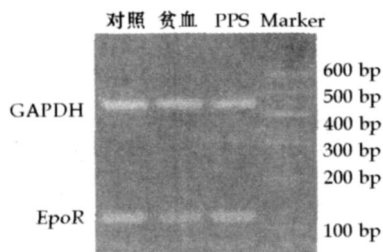


图 1 EpoR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 EpoR cDNA Agarose gel electrophoresis

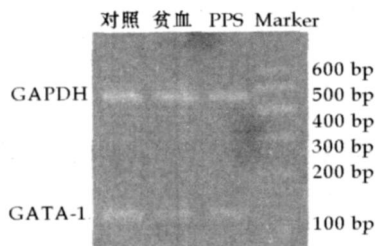


图 2 GATA-1 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 GATA-1 cDNA Agarose gel electrophoresis

多的报道,其在提高机体免疫力、促进造血方面的作用,越来越受到重视,如人参多糖、当归多糖、地黄多糖、黄芪多糖、香菇多糖、枸杞多糖等。据5本草纲目6记录,制首乌能/养血益肝,固精益肾0。研究发现,用何首乌提取物(水煎醇沉粗提物)能增加CFU2S、BFU2E、CFU2E和CFU2GM集落产率<sup>[2]</sup>。本实验结果显示,PPS能显著升高骨髓抑制贫血小鼠外周血中RBC、Hb、PLT的数量。既往研究表明,PPS体内ip给药能促进骨髓抑制贫血小鼠红系、巨核系、粒系造血祖细胞的增殖,并提高骨髓有核细胞数,说明PPS对放、化疗所致骨髓抑制有促进恢复的作用<sup>[1]</sup>。

促红细胞生成素(Epo)是红系特异性细胞因子,通过与其受体EpoR结合激活JAK2STATs和Ras等信号途径,刺激红系造血。缺乏EpoR的小鼠表现严重贫血并在胚胎期的第13.5天死亡。这种现象可以被人EpoR(hEpoR)转基因消除<sup>[3]</sup>。有实验研究证明,EpoR可以被诱导表达。Yonekura等<sup>[4]</sup>用化学诱导剂二甲亚砜预处理小鼠Epo反应性红白血病细胞系,导致了Epo特异性血红蛋白明显增加。这种放大的Epo生物反应伴随着有明显正协同作用的新的密度受体(大约每个细胞20000)的诱导产生。Chern等<sup>[5]</sup>用二甲亚砜预处理Rauscher小鼠红白血病细胞系,同样诱导Epo特异性血红蛋白的明显增加,认为二甲亚砜引发EpoR受体密度的明显增加,特点是产生明显的新受体和表现出受体间的正协同作用。

GATA21是转录因子GATA蛋白家族成员之一,这些(A/T)GATA(A/G)蛋白家族均含有两个锌指(zinc finger)结构(N2锌指和C2锌指),它们能与基因启动子区域的GATA序列结合,从而激活基因转录。GATA21基因的突变导致红系造血异常<sup>[6]</sup>。GATA21在HSCs和多系祖细胞转换点被激活<sup>[7]</sup>。在定向红系造血过程中,Epo首先诱导转录因子GATA21和EpoR表达,GATA21随着红系的分化和成熟而上调<sup>[8]</sup>。GATA21可激活EpoR的转录,GATA21和EpoR又共同促进珠蛋白的表达,最终使红系分化成熟。GATA21的极限浓度是决定红细胞成熟的最后阶段的机制之一<sup>[9]</sup>。GATA21促进巨核系分化和巨核细胞发育成熟的机制,主要表现为能够激活巨核系特异性基因的表达,包括MPL<sup>[10]</sup>、血小板因子4(platelet factor 4, PF4)<sup>[11]</sup>、血小板糖蛋白IIb(glycoprotein platelet IIb, GPIIb)<sup>[12]</sup>、血小板糖蛋白V(glycoprotein platelet V, GPV)<sup>[13]</sup>等。这些巨核系特异性基因的启动子或增强子中含有GATA模序,能与GATA21结合,从而促进巨核系细胞的分化和成熟。

为了进一步了解PPS促进造血的作用机制,本实验观察了PPS对骨髓抑制贫血小鼠脾脏组织EpoR和GATA21 mRNA表达的影响。脾脏是小鼠的终身造血器官,本实验由于经造模以后的贫血小鼠,其骨髓细胞大量减少,细胞来源受到限制,因此选用小鼠的另一造血器官脾脏作为观察对象,结果表明,PPS能明显诱导骨髓抑制贫血小鼠脾脏组织EpoR mRNA的表达上调,从而增强造血细胞对Epo的反应性,同时上调转录因子GATA21 mRNA的表达,提示其促进造血作用机制与诱导造血组织EpoR及GATA21 mRNA的表达有关。

#### 参考文献:

- [1] 冯雪霁,吕艳,祝彼得,等1制首乌总多糖对贫血小鼠造血祖细胞增殖的影响[J]中草药,2006,37(11):1695-1697
- [2] 周志文,周金黄,邢善田1何首乌提取物对正常小鼠造血功能的影响[J]中药药理与临床,1991,7(5):192-194
- [3] Yu X, Lin C S, Costantini F, et al. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse[J] Blood, 2001, 98(2): 475-477
- [4] Yonekura S, Chern Y, Donahue K A, et al. Erythropoietin receptors induced by dimethyl sulfoxide exhibit positive cooperativity associated with an amplified biologic response[J] Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(6): 2532-2539
- [5] Chern Y, Yonekura S, Sytkowski A J. Potentiation of the erythropoietin response by dimethyl sulfoxide priming of erythroleukemia cells: evidence for interaction of two signaling pathways[J] Blood, 1990, 76(11): 2202-2209
- [6] Freson K, Matthijs G, Thys C, et al. Different substitutions at residue D218 of the X2-linked transcription factor GATA1

- lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation [J] Hum Mol Genet, 2002, 11(2): 14721521
- [7] Ashihara E, Vannucchi A M, Migliaccio G, et al. Growth factor receptor expression during in vitro differentiation of partially purified populations containing murine stem cells [J] J Cell Physiol, 1997, 171(3): 342356
- [8] Leonard M, Brice M, Engel J D, et al. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation [J] Blood, 1993, 82(4): 107121079
- [9] Dalyot N, Fibach E, Ronchi A, et al. Erythropoietin triggers a burst of GATA21 in normal human erythroid cells differentiating in tissue culture [J] Nucleic Acids Res, 1993, 21(17): 403124037
- [10] Scicchitano M S, McFarland D C, Tierney L A, et al. In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression [J] Exp Hematol, 2003, 31(9): 762769
- [11] Deveaux S, Filipe A, Lemarchand V, et al. Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes [J] Blood, 1996, 87(11): 46724685
- [12] Minami T, Tachibana K, Imanishi T, et al. Both Et21 and GATA21 are essential for positive regulation of platelet factor 4 gene expression [J] Eur J Biochem, 1998, 258(2): 8792889
- [13] Martin F, Prandini M H, Thevenon D, et al. The transcription factor GATA21 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene [J] J Biol Chem, 1993, 268(29): 2160221612

## 萆薢醇提物对胰岛素抵抗综合征大鼠模型的防治作用研究

万春平, 包# 照日格图, 却 翎, 宋娜丽, 唐志国

(云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650200)

**摘要:**目的 观察萆薢醇提物 (AEPL) 对实验性胰岛素抵抗综合征 (IRS) 大鼠模型的防治作用, 探讨其可能的作用机制。方法 采用高脂、高糖、高盐膳食制备 IRS 大鼠模型, 喂养 4 周后预防性给予 AEPL, 12 周后测定空腹血糖 (FBG)、胰岛素水平 (FINS)、口服葡萄糖耐量、游离脂肪酸 (FFA) 水平、甘油三酯 (TG) 和肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 水平, 并计算胰岛素敏感指数 (ISI)。结果 AEPL 明显增加 IRS 模型大鼠胰岛素敏感指数, 改善糖耐量, 降低 TNF $\alpha$  水平 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 防止 FFA、TG 水平的上升 ( $P < 0.05, 0.01$ )。结论 AEPL 具有改善实验性 IRS 的作用, 其机制可能与抑制 TNF $\alpha$  水平有关。

**关键词:** 萆薢醇提物; 胰岛素抵抗综合征; 糖耐量; 胰岛素敏感指数; 肿瘤坏死因子 $\alpha$

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2010)01-0096-03

胰岛素抵抗综合征 (insulin resistance syndrome, IRS) 是包括高胰岛素血症、糖耐量异常、脂代谢紊乱和高血压等疾病和症状的总称。萆薢为胡椒科植物萆薢 *Piper longum* L. 的干燥近成熟或成熟果穗, 是中蒙医习用药材, 功能温中散寒、行气止痛。蒙医认为萆薢具有调理体素、分清化浊的功效。前期研究表明萆薢油非皂化物能显著抑制高脂血症模型总胆固醇水平<sup>[1]</sup>; 萆薢有效成分萆薢宁能显著调节血脂代谢紊乱<sup>[2]</sup>; 国外也报道其有效成分显著提高药物和营养物质的生物利用度<sup>[3]</sup>。本研究采用高脂、高糖、高盐饲养制备实验性 IRS 大鼠模型, 观察萆薢醇提物 (AEPL) 对实验性 IRS 大鼠模型胰岛素敏感指数、糖耐量、血脂及 TNF $\alpha$  水平的影响。

### 1 实验材料

1.1 动物与饲料: Wistar 大鼠, 60 只, 雄性, 体质量 180~200 g, 由四川省医学科学院实验动物研究所

提供, 合格证号: SCXK(川)2004)16。标准饲料: 蛋白质 23%, 碳水化合物 53%, 脂肪 5%。高脂饲料: 基础饲料 51%, 猪油 23%, 蔗糖 24%, 食盐 2%, 由昆明医学院动物实验中心加工成颗粒。

1.2 药品与试剂: 萆薢醇提取物 (AEPL) 采用 70% 乙醇提取 3 次, 回收溶剂浓缩至浸膏, 每克浸膏相当于原生药 81.75 g, 4℃ 保存备用, 临用前以生理盐水按照设定浓度稀释。罗格列酮, 成都恒瑞制药有限公司 (批号 070201); TG 试剂盒、FFA 试剂盒、血糖度试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (批号 0906111、20071114、20070718); TNF $\alpha$  试剂盒购自北京邦定公司 (批号 20070915); 胰岛素浓度由昆明医学院第一附属医院核医学科采用放免法检测。

1.3 仪器: 756 型紫外-可见分光光度计 (上海光谱仪器厂); DNM 9062G 型酶标仪 (北京普朗新

收稿日期: 20090325

基金项目: 云南省自然科学基金项目 (2005C0014R)

作者简介: 万春平 (1981), 汉族, 江西南昌人, 硕士研究生, 主要研究方向: 临床中药学和药理学。

Tel: 13816430570 E-mail: wanchunping1012@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 包# 照日格图 Tel: (0871) 5918133 E-mail: rigdan@126.com