

钉螺肝脏的作用机制提供了重要线索,也为来源于血水草的生物碱作为植物杀螺剂提供科学依据。

参考文献:

- [1] 周天达,周雪仙. 血水草中一个抗菌成分的化学结构研究[J]. 中草药, 1981, 12(1): 1-3.
- [2] 黄琼瑶,彭飞,刘年猛,等. 血水草生物碱杀灭钉螺及日本血吸虫尾蚴的实验研究[J]. 实用预防医学, 2003, 10(3): 289-291.
- [3] 黄琼瑶,彭飞,刘年猛,等. 血水草生物碱杀灭钉螺的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2004, 16(1): 55-57.
- [4] 彭飞,黄琼瑶,刘年猛,等. 血水草生物碱对钉螺肝脏超微结构的影响[J]. 实用预防医学, 2007, 14(6): 1675-1677.
- [5] 刘年猛,黄琼瑶,彭飞,等. 血水草生物碱对钉螺肝脏酶活性的影响[J]. 中药材, 2005, 28(1): 42-44.
- [6] 杨华中,黄琼瑶,刘年猛,等. 血水草杀螺成分——生物碱的提取[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(6): 450-451.
- [7] Singh K, Singh A, Singh D K. Molluscidal activity of *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss.) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 52(1): 35-40.
- [8] 罗钊,李桂玲. 不同产地黄果茄灭螺效果及增效研究[J]. 中草药, 2004, 35(增刊): 155-157.
- [9] 吴向阳,仰榴青,张联恒,等. 灭螺药物的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(6): 474-476.
- [10] 杨华中,黄琼瑶,彭飞,等. 血水草生物碱对鱼类毒性实验的观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(4): 276-278.
- [11] Ang H L, Duester G. Stimulation of premature retinoic acid synthesis in *Xenopus* embryos following premature expression of aldehyde dehydrogenase ALDH1 [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 260(1): 227-234.
- [12] 张延平,杜晨宇,黄志华,等. 醛脱氢酶基因敲除对克氏肺炎杆菌合成 1,3 丙二醇的影响[J]. 化工学报, 2006, 57(11): 2686-2692.
- [13] 熊安秀,金润铭. 锚蛋白的研究进展[J]. 国外医学:儿科学分册, 2003, 30(3): 159-161.
- [14] Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(10): R381-R384.
- [15] Yang E S, Lee J H, Park J W. Ethanol induces peroxynitrite-mediated toxicity through inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and superoxide dismutase [J]. *Biochimie*, 2008, 90: 1316-1324.
- [16] Yang E S, Park J W. Antioxidant enzyme inhibitors enhance nitric oxide-induced cell death in U937 cells [J]. *Biochimie*, 2006, 88(7): 869-878.
- [17] Mónica Martínez-Fernández M, Rodríguez-Piñero A M, Oliveira E, et al. Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation [J]. *Proteome Res*, 2008, 7(11): 4926-4934.
- [18] Bouchut A, Sautiere P E, Coustau C, et al. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach [J]. *Acta Trop*, 2006, 98(3): 234-246.
- [19] Jannotti-Passos L K, Andrade H M, Caldeira R L, et al. Proteome analysis of the cardiac and pericardial tissue of *Biomphalaria tenagophila* populations susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection [J]. *Acta Trop*, 2008, 105(3): 229-234.

半边旗活性物质 5F 对非小细胞肺癌 NCF H460 细胞 IK K β 、IK B、p65 及 p50 mRNA 表达的影响

刘义¹, CHEN George G², 吕应年¹, HSIN Michael K Y², UNDERWOOD Malcolm J², 梁念慈^{1,3}

(1. 广东医学院 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023; 2. 韦尔斯亲王医院 香港中文大学外科系, 香港 新界 沙田; 3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

摘要:目的 从 NF- κ B 信号通路着手探讨半边旗活性物质 5F 诱导非小细胞肺癌 NCF H460 细胞凋亡发生的机制。方法 MTT 法检测 5F 对 NCF H460 细胞的生长抑制作用; 用半定量 RT-PCR 方法检测 NCF H460 细胞 IK K β 、IK B、p65 及 p50 mRNA 表达水平的变化。结果 5F 抑制 NCF H460 细胞的生长, 其效果与 5F 的质量浓度和作用时间相关, 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为: 21.40、4.52、1.02 μ g/mL; 100 μ g/mL 5F 作用 NCF H460 细胞 6 h 后能引起 IK K β 和 IK B mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); p65 和 p50 mRNA 水平在作用 3 h 就发生明显减少 ($P < 0.05$)。结论 5F 诱导 NCF H460 细胞凋亡的机制可能是通过抑制核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路来实现的。

关键词: 半边旗; 5F; NCF H460 细胞; 核因子- κ B (NF- κ B)

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0435-05

收稿日期: 2009-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870900); 粤港合作课题 (GHP/022/06); 湛江市科技计划项目资助 (2008C01006)

作者简介: 刘义 (1978—), 男, 贵州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事抗肿瘤及抗骨质疏松药物的研究。

Tel: (0759) 2388405 E-mail: plliu78@sina.com

Effects of 5F on IKK β , IKK α , p65, and p50 mRNA expression of non-small lung cancer NCI H460 cells

LIU Yi¹, CHEN George G², LÜ Ying-nian¹, HSIN Michael K Y²,
UNDERWOOD Malcolm J², LIANG Nian-ci^{1,3}

(1. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Nature Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Surgery, The Chinese University of Hong Kong, Prince of Wales Hospital, Hong Kong, China; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract : Objective To investigate the inhibitory mechanism of 5F isolated from *Pteris semipinnata* on the proliferation and apoptosis induction of NCI H460 cells. The roles of NF- κ B pathway in the apoptosis were explored in this study. **Methods** NCI H460 Cell growth inhibition mediated by 5F was detected by MTT assay. RT-PCR was Applied to examining the mRNA levels of IKK β , IKK α , p65, and p50. **Results** 5F Showed the growth inhibitory activity against NCI H460 cells with IC₅₀ values of 21.40, 4.52, and 1.02 μ g/mL for 24, 48, and 72 h, respectively. The mRNA expression levels of IKK β and IKK α were significantly decreased after 5F treated cells for 6 h ($P < 0.05$); The mRNA expression levels of p65 and p50 were significantly decreased after 5F treated cells for 3 h ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism for 5F induction of NCI H460 cells apoptosis could be mediated by the inhibition of NF- κ B pathway.

Key words: *Pteris semipinnata* L.; 5F; NCI H460 cells; NF- κ B

11 α -羟基-15-氧-16-烯-对映贝壳杉烷-19-酸 (ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, 5F) 是从生长在我国南方的传统中草药半边旗 *Pteris semipinnata* L. 中分离得到的一种具有抗肿瘤活性的化合物^[1,2], 其为二萜类化合物。前期的研究证实 5F 在体外能抑制非小细胞肺癌 NCI H460 生长且诱导其凋亡^[3]。5F 在体外可诱导人的多种癌细胞凋亡, 包括结肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、早幼粒白血病及甲状腺癌细胞^[4], 并显示其机制是通过线粒体途径诱导的凋亡^[5~8]。许多文献表明, 线粒体介导的凋亡与核因子- κ B (NF- κ B) 活性密切相关^[9~11]。通过对已临床应用的抗癌药的研究, 目前认为 NF- κ B 抑制剂是治疗肿瘤的药物之一^[12,13]。因此本研究拟从 NF- κ B 信号通道着手, 探讨 5F 引发非小细胞肺癌 NCI H460 凋亡的机制, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料: 5F 由本课题组从植物半边旗中提取, 质量分数为 100%, 使用前溶于 DMSO。MTT 为 Sigma 公司产品; 超级无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司; RPMI 1640 购自美国 Hyclone 公司; 胰酶购自美国 Gibco 公司; SYBR Premix Ex Taq 为 TaKaRa 公司产品; SuperScript TM RT、Trizol 为 Invitrogen 公司产品; 阿霉素 (ADM) 为浙江海正药业有限公司产品 (批号 080102), 其余试剂均为国产分析纯。非小细胞肺癌 NCI H460 细胞由本室传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: NCI H460 细胞培养于含 10% 小牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测 5F 对 NCI H460 细胞的生长抑制作用: 取对数生长期的 NCI H460 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, RPMI 1640 完全培养液调成 2.0×10^4 / mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μ L (含 2.0×10^3 个细胞)。培养过夜后, 吸出培养液, 加入新培养液 90 μ L 及不同质量浓度的 5F 药液 10 μ L, 使终质量浓度分别为 5、10、20、40、80 μ g/mL。同时设置空白及 ADM 阳性对照组, 对照组加入相同体积的培养液, 每一质量浓度设 8 个平行孔。继续培养 24、48、72 h。每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 继续培养 4~6 h。每孔加入 DMSO 100 μ L。在微型振荡器上摇匀 15 min, 结晶溶解后, 立即比色, 用 ELX800 型酶标仪在主波长为 570 nm、参比波长为 630 nm 处测量吸光度 (A) 值, 以空白孔调零。计算抑制率, Bliss 方法计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。实验重复 3 次。

抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) $\times$ 100 %

1.2.3 细胞 RNA 的提取: 取对数生长期的 NCI H460 细胞, RPMI 1640 完全培养液调制成 5.0×10^5 / mL 细胞悬液, 接种于培养瓶中。培养过夜后, 吸出培养液, 加入新培养液及 5F 药液, 使 5F 终质量浓度为 100 μ g/mL。药物作用细胞 0、3、6、12、24

h 后倒掉培养液,用 PBS 清洗 2 次,加入 1 mL Trizol,充分震荡混匀。室温放置 10 min 后,加入 200 μ L 氯仿,剧烈振荡 1 min,静置 2~5 min,12 000 $\times g$ 冷冻离心 15 min。吸出最上层 RNA 样品到 600 μ L 冷冻异丙醇中,20 放置 10 min,12 000 $\times g$ 冷冻离心 10 min,去上清。加入 500 μ L 冷冻的 75 % 乙醇,吹散沉淀后于 12 000 $\times g$ 冷冻离心 5 min,去上清,风干沉淀,加入 DEPC 水 30 μ L。用 A_{260}/A_{280} 检测 RNA 浓度。

1.2.4 cDNA 的合成:反应体系总体积 25 μ L。取 Oligo-dT 1 μ L,每一 RNA 样品取 1 μ g,Rnase 抑制剂 1 μ L,dNTP 终浓度 1 mmol/L,5 $\times$ RT 反应缓冲液 5 μ L,M—MLV RTase 终浓度为 1 U/ μ L,加 DEPC 水至 2.5 μ L。50、60 min,70、15 min,进行逆转录。

1.2.5 SYBR Green 定量 PCR 实验:反应体系中加入 2 $\times$ SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L,PCR 正向引物 0.4 μ L,PCR 反向引物 0.4 μ L,cDNA 10 μ L,ddH₂O 8.2 μ L,反应条件见表 1。

表 1 PCR 反应条件

Table 1 Reaction conditions of PCR			
循环数	步骤	温度/	时间/s
1	预变性	95	300
	变性	95	10
	退火	57	20
	延伸	72	15

1.2.6 引物设计与合成:基因的引物合成使用引物设计软件 primer3,上海 Invitrogen 公司合成。引物序列见表 2。

1.2.7 统计分析:采用 EXCEL 数据库录入数据。SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。采用单因素方差分析进行组间比较。

表 2 引物序列

Table 2 Sequence of primers		
基 因	引物序列	片段长度/ bp
IKK β	5'-CGCTGGAAGTGTGCCC-3' (正向引物)	146
	5'-ACTGACAGGACACGGACC-3' (反向引物)	
IKB	5'-ACGGGAGCCTATCTCAGTG-3' (正向引物)	174
	5'-TTCGTTTCA TCATGATCAGC-3' (反向引物)	
p65	5'-GTCCTTCTCTCATCCCACTCT-3' (正向引物)	139
	5'-TGTCCTCTTTCTGCACCTTG-3' (反向引物)	
p50	5'-ACCGCTTGGGTAAGTCTG-3' (正向引物)	154
	5'-CTATTGCTCATCATGGCTAG-3' (反向引物)	

2 结果

2.1 5F 对 NCF-H460 细胞生长的抑制作用:结果见图 1。可以看出,5F 能明显抑制 NCF-H460 细胞的生长,其效果与时间和质量浓度相关。5、10、20、40、80 μ g/mL 5F 在作用细胞 48 h 后效果与阳性对照药 ADM 相近。5F 作用 NCF-H460 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为:21.40、4.52、1.02 μ g/mL。

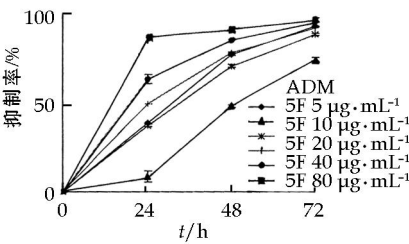
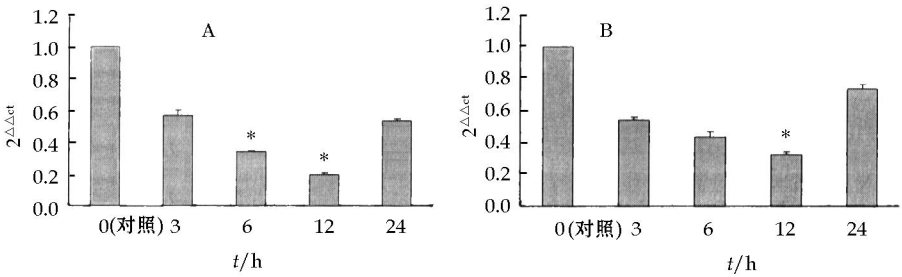


图 1 5F 对 NCF-H460 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=24)

Fig.1 Inhibition of 5F on NCF-H460 cell growth ($\bar{x} \pm s$, n=24)

2.2 5F 对 NCF-H460 细胞 IKK β 、IKB、p65 及 p50 mRNA 表达水平的影响:100 μ g/mL 5F 作用 NCF-H460 细胞后能明显引起 IKK β 、IKB、p65 及 p50 mRNA 表达水平发生变化,结果见图 2、3。IKK β 和 IKB mRNA 表达水平在 5F 作用 6、12 h 后与对照组相比显著降低 ($P<0.05$),但在作用 3、24 h 时其表达无显著差异;5F 以 p65 mRNA 的影响在作用

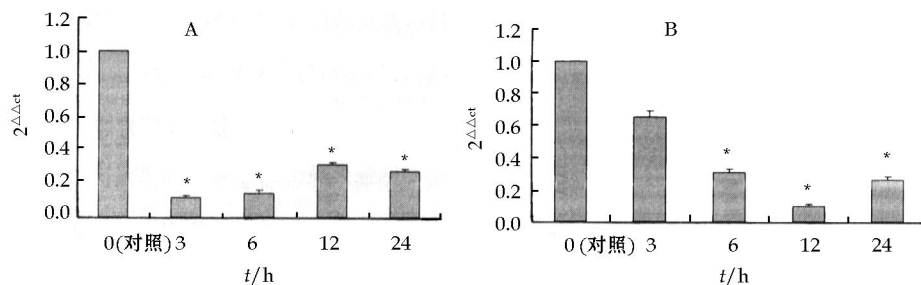


与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

图 2 5F 对 NCF-H460 细胞 IKK β (A) 和 IKB (B) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig.2 Effects of 5F on mRNA expression of IKK β (A) and IKB (B) in NCF-H460 cells ($\bar{x} \pm s$, n=3)



与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图 3 5F 对 NCF H460 细胞 p65 (A) 和 p50 (B) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effects of 5F on mRNA expression of p65 (A) and p50 (B) in NCF H460 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 h 就发生明显改变,其表达随着作用时间的逐渐延长而增加,但与对照组相比仍显著降低 ($P < 0.05$),当作用时间延长到 24 h 时,p65 的表达又降低;p50 在 5F 作用 12 h 内表达呈下降趋势,且从 6 h 开始与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$),作用 24 h 其表达出现增加,但仍具有统计学意义。

3 讨论

肺癌是全球范围内最常见和最致命的恶性肿瘤之一。其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 占肺癌患者总数的 80%,手术是传统的根治手段之一,但多年来手术本身疗效提高并不明显,近年来寻找有效的靶向药物已经成为 NSCLC 研究的热点。

在前期研究中发现,从我国岭南民间中草药半边旗中提取分离得到的二萜类化合物 5F 在体外能显著抑制非小细胞肺癌 NCF H460 细胞的生长,通过形态学和 TUNEL 检测发现其抑制癌细胞生长的原因是诱导了 NCF H460 细胞发生凋亡^[3],但对其作用机制还未做进一步的研究。

5F 在体外可通过线粒体途径诱导人的多种癌细胞凋亡^[5-8],线粒体介导的凋亡与 NF- κ B 活性密切相关^[9-11],且由于 NF- κ B 在肺癌、肝细胞癌中持续激活^[14-16],因此,本研究从 NF- κ B 信号传导通路着手,探讨 5F 诱导 NCF H460 细胞凋亡的机制。

NF- κ B 是一种具有多种功能的转录因子,在哺乳动物细胞中 NF- κ B 家族由 RelA (p65)、c-Rel、RelB、NF- κ B1 (p50 和其前体 p105) 和 NF- κ B2 (p52 和其前体 p100) 组成。NF- κ B 在多种肿瘤的发生发展中发挥了重要作用,NF- κ B 的组成性活性存在于多种实体瘤中,如肝癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌等^[17]。有活性的 NF- κ B 以二聚体形式存在,以 p50/p65 二聚体多见且研究最多。在非激活条件下,NF- κ B 与 κ B 抑制因子 (IKB) 形成三聚体 p50/p65/IKB 以无活性的形式存在于胞浆中。

IKB 家族包括 IKB α 、IKB β 、IKB γ 和 IKB δ ,能抑制 NF- κ B 发生核易位发挥转录活性而滞留在胞浆中^[18]。NF- κ B 活化通常需要 IKB 解离。IKB 受 IKB 激酶 (IKK) 的调节,IKK 由两个激酶亚基 IKK α 、IKK β 和一个调节亚基 IKK γ 组成。目前研究表明,NF- κ B 主要通过 3 种途径活化,其中两种途径是 IKK 依赖性的。较为经典的途径为通过转化生长因子 β 激活性激酶 1 活化 IKK α /IKK β /IKK γ 三聚体,使 IKB 磷酸化和降解,p50/p65 发生核易位,实现快速、强烈的 NF- κ B 信号通路激活。在这个过程中 IKK β 发挥主要作用。

抗肿瘤药物诱导细胞凋亡呈现出一定的特点:药物作用启动细胞凋亡过程后,在一定的时间范围内,细胞凋亡指数随药物作用时间的延长而增加,呈现一定的时间效应关系;药物作用时间继续延长,细胞凋亡指数会下降。因此本实验选择用高质量浓度的 5F 短时间作用细胞来检测其基因表达的变化。结果显示,100 μ g/mL 5F 作用 NCF H460 细胞后能明显地引起 IKK β 、IKB、p65 及 p50 mRNA 表达水平发生变化。结果说明 5F 作用细胞后抑制了 IKK β 活化,而 IKK β 的抑制又导致 IKB 磷酸化和降解的减少;5F 对 p65 mRNA 的影响在作用 3 h 就明显降低,其表达随着作用时间的逐渐延长而增加,但与对照相比仍显著减少 ($P < 0.05$);p50 在 5F 作用 12 h 内的表达呈下降趋势,且从 6 h 开始与对照组相比有明显改变 ($P < 0.05$),作用 24 h 其表达出现增加,但仍具有统计学意义。5F 作用 24 h 后出现不同趋势的结果可能与细胞的不同生长时相有关。由于 IKB 磷酸化和降解的减少使 p50/p65/IKB 仍然以三聚体的状态存在于胞浆中而未发生核易位来实现活化。大量的研究结果显示,抑制 NF- κ B 活性可以诱导多种肿瘤细胞凋亡或使细胞恢复凋亡^[19]。在肿瘤的早期形成阶段,NF- κ B 在抗凋亡方面发挥

了主要作用并参与肿瘤的形成和转移。应用化学致癌剂对小鼠结肠诱导建立损伤和炎症模型,当除去结肠上皮细胞中特异的 IKK β 后,由于 IKK 不能降解而导致 NF- κ B 活化受限,最终引起肿瘤发生率下降。因此,半边旗提取物 5F 在体外引起非小细胞肺癌细胞凋亡可能是与抑制 NF- κ B 活性有关。

参考文献:

- [1] 邓亦峰,梁念慈. 半边旗中二萜类化合物的超临界 CO₂萃取及 HPLC-MS 分析[J]. 中草药, 2004, 35(2): 145-148.
- [2] 张晓,崔燎,田中信寿,等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(1): 37-38.
- [3] 刘义,吴科锋,李立,等. 半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 9-12.
- [4] 李立,吕应年,刘义,等. 半边旗提取物 5F 诱导 HepG2 细胞凋亡与 p53 活化及血管内皮生长因子抑制有关[J]. 中草药, 2010, 41(2): 241-245.
- [5] Li J H, He C W, Liang N C, et al. Effects of antitumor compounds isolated from *Pteris semipinnata* L. on DNA topoisomerases and cell cycle of HL-60 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20: 541-545.
- [6] Chen G G, Liang N C, Lee J F, et al. Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L.-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF- κ B-related pathway[J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 619-627.
- [7] Liu Z, Ng E K, Liang N, et al. Cell death induced by *Pteris semipinnata* L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 1477-1487.
- [8] 何太平,陈杰,莫丽儿,等. 半边旗二萜类化合物 5F 对高转移卵巢癌细胞系 HO-8910 PM NF- κ B (p65)、Smad3 蛋白和 NF- κ B (p65)、ETS-1 mRNA 表达的影响[J]. 中草药, 2005, 36(4): 545-548.
- [9] Guseva N V, Taghiyev A F, Sturm M T, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-associated nuclear factor- κ B in prostatic carcinoma cell lines[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2: 574-584.
- [10] Yang J, Amiri K I, Burke J R, et al. BMS-345541 targets inhibitor of κ B kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor κ B and mitochondria pathways[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 950-960.
- [11] Kim J S, Lee J M, Chwae Y J, et al. Cisplatin-induced apoptosis in Hep3B cells: mitochondria-dependent and independent pathways[J]. *Biochem Pharm*, 2004, 67: 1459-1468.
- [12] Olivier S, Robe P, Bours V. Can NF- κ B be a target for novel and efficient anti-cancer agents?[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 1054-1068.
- [13] Sharma V, Hupp C D, Tepe J J. Enhancement of chemotherapeutic efficacy by small molecule inhibition of NF- κ B and checkpoint kinases[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 1061-1074.
- [14] Kawakami S M, Ito M, Kawakami S. Induced apogamous sporophytes in *Pteris dispar* and *P. semipinnata*, and the meiotic behavior in their sporocytes[J]. *J Plant Res*, 1996, 109: 369-373.
- [15] Kim H J, Hawke N, Baldwin A S. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 738-747.
- [16] Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression[J]. *Nature*, 2006, 441: 431-436.
- [17] Radhakrishnan S K, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF- κ B: implications for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1766: 53-62.
- [18] Chen L F, Greene W C. Shaping the nuclear action of NF- κ B[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 17(5): 392-401.
- [19] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs[J]. *Nat Rev Canc*, 2005, 5: 297-309.

附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究

杨洁红,张宇燕,万海同*,朱振洪,李金辉

(浙江中医药大学,浙江 杭州 310053)

摘要:目的 观察附子生物碱与甘草活性物质(三萜皂苷和黄酮等)组合对大鼠佐剂性关节炎(AA)模型的抗炎效应,研究两者配伍的抗炎作用机制,探讨两者配伍的意义。方法 设对照组、模型组、附子组(即附子生物碱组)、附子甘草配伍组(即附子生物碱与甘草活性物质配伍组)、雷公藤组,观察各组大鼠足肿胀程度和关节炎指数(AI)变化;检测大鼠血清和关节浸液内细胞因子如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及前列腺素 E₂(PGE₂)水平;用 RT-PCR 检测踝关节组织 IL-1 β 基因表达;观察踝关节组织病理改变。结果 与对照组比较,AA 模型组大鼠关节肿胀严重,AI 明显升高,血清和关节浸液内 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 水平显著升高,踝关节组织 IL-1 基因表达明显增加,并发生明显病理改变;与模型组相比,附子组、附子甘草配伍组大鼠关节肿胀得到改善,AI 降低,血清和关节浸液内 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 水平降低,踝关节组织 IL-1 β 基因表达减弱,病理组织改善,且附子甘草配伍组优于附子组。结论 附子生物碱与甘草活性物质配伍组合能有效抗炎,缓解 AA 症状,改善 AA 大鼠免疫功能和组织结构,两者配伍作用优于单用附子生物碱,体现了附子生物碱、甘草活性物质是附子甘草两者配伍抗炎效应的重要物质基础。

关键词:附子生物碱;甘草活性物质;佐剂性关节炎;抗炎;细胞因子

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0439-06

收稿日期:2009-06-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873430,30973933);浙江省自然科学基金资助项目(Y207759);教育部高校博士点基金资助项目(20093322110001)

作者简介:杨洁红(1969—),女,广东揭西人,副教授,医学博士,主要从事方剂配伍研究。

Tel: (0571) 86613711 E-mail: yannoo7376@sina.com

*通讯作者 万海同