

肿瘤的生长、浸润和转移均需依赖新生血管的形成。而 VEGF 为目前发现的最重要的促进肿瘤血管生成的细胞因子^[10], 其可通过促进血管内皮细胞增殖、增加微血管通透性及改变细胞外基质等途径促进肿瘤血管新生。VEGF 有多种亚型, 其中, VEGF₁₆₅和 VEGF₁₂₁在肿瘤血管新生中起主要作用。本研究通过 RT-PCR 及免疫荧光细胞化学实验表明, 白花丹醌干预肝癌 HepG2 细胞后, VEGF mRNA 及蛋白表达水平均随药物浓度增加而下调。

本研究结果表明, 白花丹醌体外可抑制肝癌 HepG2 细胞生长、克隆形成及 VEGF 表达, 其可能通过该途径抑制肿瘤生长、血管新生, 达到抗肿瘤作用。然而, 其在体内对肝癌生长、浸润等生物学行为的影响及其机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 郭晓庄. 有毒中草药大辞典 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992
 [2] 谭明雄, 王恒山, 陈振锋, 等. 白花丹化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 289-293
 [3] 刘园, 刘超. RP-HPLC 法测定不同采收期白花丹中白花丹醌 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1258-1259
 [4] Srinivas G, Annab L A, Gopinath G, *et al.* Antisense bloc-

king of BRCA1 enhances sensitivity to plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2004, 39(1): 15-25.
 [5] Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, *et al.* Plumbagin induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2 [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(6): 1461-1471.
 [6] 王辅林, 陈乐真, 韦立新, 等. 血管内皮生长因子在肺癌组织中表达的定量观察 [J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(4): 295
 [7] Sugie S, Okamoto K, Rahman K M, *et al.* Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane induced intestinal carcinogenesis in rats [J]. *Cancer Lett*, 1998, 127(1-2): 177-183
 [8] Sandur S K, Ichikawa H, Sethi G, *et al.* Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB regulated gene products through modulation of p65 and I-kappaB kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(25): 17023-17033
 [9] Nair S, Nair R R, Srinivas P, *et al.* Radiosensitizing effects of plumbagin in cervical cancer cells is through modulation of apoptotic pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(1): 22-33
 [10] Leung D W, Cachianes G, Ferrara N, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309

红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注模型心肌细胞凋亡及单核细胞趋化蛋白-1 与 NO 表达的影响

朱天民¹, 朱慧民², 李 辉³

(1 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2 台州市中心医院, 浙江 台州 318000;

3 成都大学医护学院, 四川 成都 610081)

摘要:目的 观察红豆杉多糖对 Beagle 犬心肌缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡及单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、NO 表达的影响。方法 将 30 只 Beagle 犬随机分为假手术组、模型组、红豆杉多糖 (89.5, 357 mg/kg) 组、卡维地洛 (1 mg/kg) 对照组, 每组 6 只, 分别给药 7 d 后, 建立心肌缺血再灌注模型。TUNEL 染色法标记缺血再灌注区凋亡心肌细胞, 计算凋亡指数 (AI); Western blotting 法检测缺血再灌注区心肌 MCP-1 蛋白表达; 硝酸还原酶法检测心肌组织中 NO 水平。结果 模型组、红豆杉多糖低剂量组心肌细胞 AI 较假手术组显著升高 ($P < 0.01$); 红豆杉多糖高剂量组、卡维地洛组心肌细胞 AI 显著低于模型组和红豆杉多糖低剂量组 ($P < 0.05$), 与假手术组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。模型组、红豆杉多糖低剂量组、卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), 红豆杉多糖低、高剂量组, 卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较模型组显著下降 ($P < 0.01$), 红豆杉多糖高剂量组 MCP-1 蛋白表达显著低于低剂量组和卡维地洛组 ($P < 0.01$)。模型组及各治疗组心肌组织 NO 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.01$), 红豆杉多糖高剂量组心肌 NO 显著低于模型组 ($P < 0.05$) 及低剂量组 ($P < 0.01$)。结论 红豆杉多糖可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡, 其机制可能与降低心肌组织 MCP-1 蛋白表达及 NO 水平、抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词: 红豆杉多糖; 心肌缺血再灌注; 细胞凋亡; 单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1); NO

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0778-04

红豆杉多糖为本课题组首次以极性梯度提取技术从红豆杉科红豆杉属植物南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu 中发现、提纯的一种全新多糖。红豆杉 *T. chinensis* (Pilger) Rehd 又名紫杉、赤柏松等, 现代药理学研究发现红豆杉茎叶皮内富含多种化合物, 如紫杉醇、紫杉酚、紫杉碱等^[1], 具有良好的抗白血病、抗肿瘤和降血糖作用^[2-4]; 近年来本课题组在临床应用南方红豆杉基地种植的南方红豆杉水煎剂抗肿瘤治疗时, 发现其对伴发冠心病及心肌梗死的肿瘤患者能够明显改善心肌缺血症状; 实验研究发现其水提物可缩小冠状动脉结扎急性心肌梗死大鼠的心肌梗死范围, 有很好的心脏保护效果, 且其剂量远低于其含有的紫杉醇所要求的剂量 (10~30 mg/m²)。因此, 本课题组对红豆杉枝叶提取物的成分进行了研究, 发现其主要成分为国内外文献尚未报道的多糖类物质, 进而采用离子交换色谱提纯、非线性优化控制模拟移动床纯化等, 得到高纯度红豆杉多糖; 同时应用核磁共振等进行了多糖分子结构鉴定, 已获得国家专利 (专利号: ZL03129421.9)。本实验进一步研究该多糖对心肌缺血再灌注 Beagle 犬的心脏保护作用及其作用机制, 为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物: 实验用 Beagle 犬, 一级, 30 只, 雌雄各半, 体质量 8.0~10.5 kg, 8~12 月龄, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (川) 2004-15。

1.2 主要药品与试剂: 卡维地洛片 (上海罗氏制药有限公司, 批号: MH6600908), TUNEL 检测试剂盒 (瑞士 Roche 公司), 兔抗犬单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 羊抗兔 IgG (Beyotime 公司), ECL Plus (Beyotime 公司), NO 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), MFV-3200 电磁流量计 (日本光电公司生产), HX-300S 动物呼吸机 (成都泰盟科技有限公司生产)。

2 方法

2.1 红豆杉多糖的提取与分析: 应用极性梯度提取技术从红豆杉枝叶中分离多糖组分, 并对其化学组成和结构进行分析鉴定。红豆杉多糖初提采用极性递减的溶剂进行分步抽提, 纯化符合《中国药典》要求的多糖采用模拟移动床 (SMB) 连续逆流色谱对有效组分进行纯化, 并采取非线性控制软件对电磁阀的运动进行优化控制 提纯分离出相对分子质量

约 70%。

2.2 分组和给药: 将 30 只 Beagle 犬随机分为假手术组、模型组、红豆杉多糖 (低、高剂量) 组、阳性对照组, 每组 6 只。假手术组、模型组不给药; 红豆杉低、高剂量组分别 ig 给予红豆杉多糖 89.5、357 mg/kg, 阳性对照组 ig 卡维地洛 1 mg/kg, 共 7 d。给药结束后建立心肌缺血再灌注模型。

2.3 模型的建立: Beagle 犬经 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后, 仰卧位固定, 气管插管, 接 HX-300S 动物呼吸机, 以呼吸比 5:4, 呼吸频率 18~20 次/min, 潮气量 120~135 mL 行机械通气。于 5、6 肋间开胸, 暴露肺和心脏, 用撑胸器撑开胸腔, 做心包摇篮, 充分暴露手术野, 在左冠状动脉前降支 (LAD) 中下段游离约 1 cm, 于 LAD 的中下 1/3 处确定夹闭点, 并在夹闭部位上缘附近套上合适直径的电磁流量计卡式探头, 接 MFV-3200 电磁流量计, 夹闭已分离的 LAD 主干 60 min (在电磁流量计监控下使 LAD 血流量降低约 80%), 然后开放再灌注 120 min。假手术组手术方法同上, 但仅分离 LAD, 不夹闭。

2.4 心肌细胞凋亡的检测: 犬处死后, 于心尖附近取灌注区心肌组织, 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋切片, 然后参照 TUNEL 检测试剂盒说明书进行凋亡细胞染色。镜下观察, 凋亡细胞核为棕黄色或黄色, 阴性细胞核呈蓝色。每例切片随机选取 5 个 400 倍视野, 计数凋亡细胞与总细胞数, 计算细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI, AI= 凋亡细胞数/总细胞数×100%)。

2.5 Western blotting 法检测 MCP-1 蛋白表达: 在超净工作台无菌条件下取心尖附近再灌注区心肌组织 100 mg, 经预冷的 PBS 洗涤 2 次, 剪碎, 加入 1 mL SDS 裂解液, 同时加入 100 mmol/L 甲基磺酰氟 (PMSF) 10 μL 冰上匀浆, 充分裂解约 20 min。4 °C、12 000 r/min 高速离心 20 min, 小心吸取上清液, BAC 法测定蛋白浓度。取各样本蛋白各 100 μg 与等体积的上样缓冲液混合均匀, 沸水浴 5~10 min, 自然冷却后行 12% SDS-PAGE 电转膜, 用 1:200 的兔抗犬 MCP-1 多克隆抗体进行杂交, 用 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗标记, 利用 ECL 法进行显色, 以 GADPH 为内参照, 凝胶自动成像系统扫描, 以指标条带蛋白的荧光强度/内参蛋白条带的荧光强度表示蛋白相对表达水平。

2.6 心肌组织 NO 检测: 每例样本取心尖附近缺血

水冰浴匀浆后,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,参照 NO 检测试剂盒说明书硝酸还原酶法测定。

2.7 统计学分析:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件分析,采用单因素方差分析和重复测量数据的方差分析。

3 结果

表 1 各组犬冠状动脉左前降支血流量 (CBFLAD) ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Left anterior descending coronary artery blood flow of dog in groups (CBFLAD) ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/ 只	CBFLAD/(mL·min ⁻¹)			
			缺血前	缺血 60 min	再灌注 60 min	再灌注 120 min
假手术	-	6	21.87±1.81	22.15±1.65	22.12±1.58	22.10±1.73
模型	-	5	22.00±1.71	4.36±0.36 ^{△△##}	11.32±1.64 ^{△△##}	17.98±1.54 ^{△△##}
红豆杉多糖	89.5	6	21.83±1.45	4.35±0.21 ^{△△##}	10.92±1.06 ^{△△##}	18.15±1.30 ^{△△##}
	357	6	22.10±1.56	4.28±0.15 ^{△△##}	14.53±1.09 ^{△△##}	21.58±1.42 ^{##}
卡维地洛	1	6	22.75±1.63	4.47±0.22 ^{△△##}	15.73±1.32 ^{△△##}	22.43±1.38 ^{##}

与假手术组比较: ^{△△}*P* < 0.01; 与模型组比较: ^{**}*P* < 0.01

与红豆杉多糖 89.5 mg·kg⁻¹组比较: ^{***}*P* < 0.01; 与缺血前比较: ^{##}*P* < 0.01

^{△△}*P* < 0.01 vs Sham group; ^{**}*P* < 0.01 vs model group

^{***}*P* < 0.01 vs taxus polysaccharide 89.5 mg·kg⁻¹ group; ^{##}*P* < 0.01 vs pre ischemia group

3.2 各组心肌凋亡指数 (AI) 比较:模型组、红豆杉多糖低剂量组心肌细胞 AI 较假手术组显著升高 (*P* < 0.01);红豆杉多糖高剂量组、卡维地洛组心肌细胞 AI 显著低于模型组和红豆杉多糖低剂量组

(*P* < 0.05);红豆杉多糖高剂量组、卡维地洛组心肌细胞 AI 虽较假手术组升高,但无显著差异 (*P* > 0.05)。结果见图 1 和表 2。

3.3 对 MCP-1 蛋白表达的影响:模型组、红豆杉

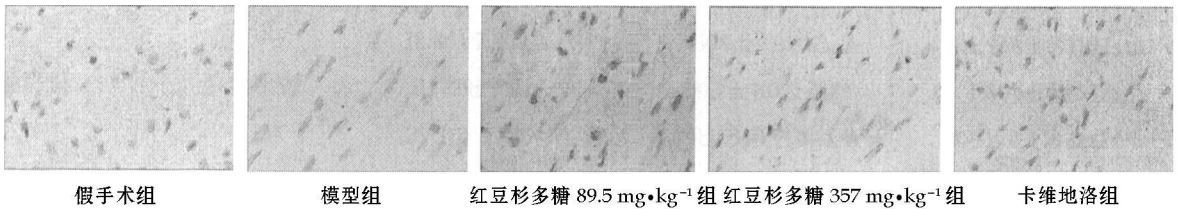


图 1 心肌细胞 TUNEL 染色结果

Fig. 1 Results of myocardial TUNEL staining

多糖低剂量组、卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较假手术组显著升高 (*P* < 0.05);红豆杉多糖低、高剂量组及卡维地洛组 MCP-1 蛋白表达较模型组显著下降 (*P* < 0.01);红豆杉多糖高剂量组 MCP-1 蛋白表达显著低于红豆杉多糖低剂量组和卡维地洛组 (*P* < 0.01),与假手术组比较无显著差异 (*P* > 0.05)。见图 2 和表 2。

豆杉多糖高剂量组心肌 NO 显著低于模型组 (*P* < 0.05) 及低剂量组 (*P* < 0.01)。见表 2。

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤是心肌缺血后在一定时间内恢复血供,缺血心肌发生的更严重的损伤。细胞凋亡是由局部环境生理或病理性变化引起的、自身内部机制调节的一种主动的、按一定程序进行的细胞自发性死亡方式。心肌细胞凋亡是多种心血管疾病发生与演变的细胞学基础,缺血再灌注可导致心肌细胞凋亡,凋亡是急性心肌缺血和再灌注过程中心肌细胞死亡的重要机制之一。抑制心肌细胞凋亡可减少心肌缺血再灌注损伤。本研究选择 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡情况,结果显示红豆杉多糖高剂量组心肌细胞 AI 显著低于模型组和低剂量组

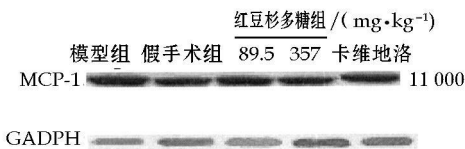


图 2 心肌组织 MCP-1 蛋白表达

Fig. 2 Expression of MCP 1 protein in myocardial tissue

3.4 对心肌 NO 的影响:模型组及各治疗组心肌组

表 2 红豆杉多糖对心肌缺血再灌注犬心肌细胞凋亡指数、MCP 1 蛋白表达、心肌 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of taxus polysaccharide on myocardial apoptosis index, MCP 1 protein expression, and myocardial cells NO content of Beagle dogs ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	AI/%	MCP-1 蛋白表达	心肌 NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
假手术	6	-	23.981 ± 6.037	7.103 ± 0.526	1.010 ± 0.103
模型	5	-	38.861 ± 7.969 ^{△△}	11.608 ± 1.080 ^{△△}	1.958 ± 0.219 ^{△△}
红豆杉多糖	6	89.5	37.917 ± 9.019 ^{△△}	8.473 ± 1.021 ^{△*△}	1.898 ± 0.153 ^{△△}
	6	357	29.100 ± 3.346 ^{*#}	6.248 ± 0.994 ^{*##▲▲}	1.573 ± 0.179 ^{△△*##}
卡维地洛	6	1	30.403 ± 2.731 ^{*#}	8.378 ± 1.122 ^{*##}	1.756 ± 0.173 ^{△△}

与假手术组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

与红豆杉多糖 89.5 mg·kg⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与卡维地洛组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs taxus polysaccharide 89.5 mg·kg⁻¹ group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs carvedilol group

糖可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡。

MCP-1 又称单核细胞趋化活化因子 (monoc chemotactic and activating factor, MCAF) 是一种含有 76 个氨基酸残基的低相对分子质量可溶性碱性蛋白质, 隶属于 C-C 趋化因子超家族 (β 亚族)。MCP-1 在静息状态并不表达, 但内皮细胞、平滑肌细胞、单核/巨噬细胞等许多细胞活化后均能产生。近来研究发现, MCP-1 在心、肾等器官缺血再灌注中有不同程度的表达^[5,6], MCP-1 主要引起单核细胞的趋化及其内皮下间隙的募集, 诱导单核细胞钙离子内流, 产生大量的活性氧 (ROS)。研究发现, ROS 与细胞凋亡的关系密切, 细胞内产生的 ROS 可通过多途径诱导细胞凋亡^[7]。Zhou 等^[8] 研究发现, MCP-1 能诱导一种新型的转录因子单核细胞趋化蛋白诱导蛋白 (MCP-1IP), 而这种因子能导致心肌细胞的凋亡和心室结构的异常。此外, MCP-1 可诱导单核细胞和内皮细胞表达黏附分子, 促进白介素 (IL-1、IL-6) 的释放^[9]。IL-1 可与肿瘤坏死因子 (TNF) 协同作用, 促进心肌细胞内诱导型 NO 合酶 (iNOS) 的表达, 产生大量 NO^[10]。近年研究证实 NO 与心肌缺血再灌注导致的细胞凋亡有密切关系。心肌缺血再灌注时 NO 升高是诱导心肌细胞凋亡, 加重心肌细胞缺血再灌注损伤的重要原因之一^[11,12]。

本研究结果显示模型组心肌组织 MCP-1 蛋白及 NO 较假手术组显著升高 ($P < 0.01$), 提示缺血再灌注时心肌组织 NO 升高可能与 MCP-1 表达升高有关。经高剂量红豆杉多糖治疗后, MCP-1 蛋白及 NO 较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。提示红豆杉多糖可能通过降低心肌组织 MCP-1 及 NO, 减轻缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡。

总之, 本研究首次证实红豆杉多糖可抑制缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡, 其机制可能与其降低心肌组织 MCP-1 及 NO 有关, 该多糖有进一步研究的价值, 这将为开发红豆杉多糖为主原料的天然心脏保护药物打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] 李存芳, 刘勇, 董玫, 等. 南方红豆杉化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1121-1132
- [2] 唐朝晖, 钟德珩. 紫杉醇抗肿瘤的分子机制 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 125-127
- [3] 鲁翠涛, 赵应征, 梅兴国. 红豆杉细胞提取物抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 1013-1015
- [4] 赵锐, 赵玮玮. 抗癌植物药紫杉醇研究进展与动态 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1172-1172 附 2
- [5] Kakio T, Matsumori A, Ono K, et al. Roles and relationship of macrophage and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 in the ischemic and reperfused rat heart [J]. Lab Invest, 2000, 80(7): 1127-1136
- [6] Sung F L, Zhu T Y, Au-Yeung K K, et al. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidativestress and NF-kappaB [J]. Kidney Int, 2002, 62(4): 1160-1170
- [7] 孙涛, 苏全生. 自由基与心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 实用医院临床杂志, 2006, 3(4): 94-96
- [8] Zhou L, Azfer A, Niu J, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction [J]. Circ Res, 2006, 98(9): 1177-1185.
- [9] 彭彬. 单核细胞趋化蛋白-1 与心力衰竭的关系研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2007, 28(4): 570-572
- [10] 张艳芳. 白细胞介素 1, 8, 10 与心肌缺血-再灌注损伤 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(2): 210-212
- [11] 吴青, 王峻, 游敏, 等. 一氧化氮对大鼠模拟缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华医药杂志, 2005, 10(5): 925-926
- [12] 裴荣, 侯波. 一氧化氮在大鼠模拟心肌缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. 中国药物与临床, 2007, 7(3): 197-199