

来提高 ApoA1/ ApoB 的值。表明复方贞术调脂胶囊可以调节 AS 兔模型的脂代谢异常。

中医理论认为,AS 属本虚标实、血瘀痰浊之范畴,“肝肾亏虚、痰瘀阻络”是其基本病机,治从补益肝肾、健脾益气、滋阴养血、活血化瘀、祛痰降浊等法^[10]。复方贞术调脂胶囊由女贞子、白术、黄连、三七、丹参等药味组成,方中女贞子滋补肝肾,白术益气健脾,与女贞子相配,则脾肾双补;三七与丹参均具有活血化瘀之功效,配伍使用,使瘀浊更易祛除;黄连兼具清热燥湿解毒之功效,诸药合用,集“调肝降脂、健脾补肾、祛瘀解毒”功效于一方。现代药理学研究表明,女贞子能降低喂饲胆固醇和猪油家兔的血清 TC 及 TG,可预防和消减动脉粥样硬化斑块,减轻斑块厚度,减少冠状动脉粥样硬化病变数,降低血管的阻塞程度^[11]。白术可使自发性高血压脑卒中大鼠甘油三酯(TG)明显降低,体质量增长受到抑制,脂肪沉着量减少。三七能降低血清总胆固醇,对主动脉壁的总胆固醇和总脂质也有减少作用,致使斑块消退^[12]。丹参所含的丹参素能降低血液中的甘油三酯和总胆固醇的量,抑制低密度脂蛋白的形成^[13]。黄连的主要成分为小檗碱,研究表明,它能明显地降低血清 TG、TC 及极低密度脂蛋白(VLDL-C)的量^[14,15]。

本研究通过动物实验对复方贞术调脂胶囊抗 AS 的作用进行了初步探讨,结果表明,复方贞术调脂胶囊除了可以调节 AS 家兔模型的血脂水平外,还能够降低主动脉中脂质的量,抑制主动脉脂质斑块形成,改善主动脉病变情况,提示复方贞术调脂胶囊具有抗 AS 的作用。今后将从抗炎、抗氧化、影响内皮功能等方面进一步对复方贞术调脂胶囊抗 AS

的作用机制进行研究,为其进一步开发利用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 唐春萍,郭 姣,杨超燕,等. 调脂灵对高脂血症大鼠脂质过氧化、血液流变学的影响[J]. 中药材, 2007, 30(7): 837-839.
- [2] 唐春萍,郭 姣,杨超燕,等. 调脂灵对高脂血症大鼠脂代谢酶及载脂蛋白的影响[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(2): 175-177.
- [3] 郭 彤,郭 姣,梁颖瑜,等. 复方降脂灵胶囊对高脂血症患者血流变学的调节作用[J]. 江西中医药, 2006, 37(7): 24-25.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2002.
- [5] 王建英. 动脉粥样化斑块染色技巧[J]. 实验室研究与探索, 1999(3): 90-100.
- [6] 张均田. 现代药理实验方法学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [7] 李世英,刘 斌,刘 昊. 急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块与相关危险因素关系的研究[J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(8): 977-980.
- [8] 于 红,张冬霞,徐传和,等. 血清脂类测定在诊断老年动脉粥样硬化及冠心病中的意义[J]. 中国实用医药, 2007, 17(2): 32-33.
- [9] 何 杨,张 威,赵益明,等. 黄金血康治疗兔高脂血症和动脉粥样硬化的疗效研究[J]. 苏州大学学报:医学版, 2007, 27(6): 859-861.
- [10] 薛文集,吴国忠. 中药抗动脉粥样硬化的药理学研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2003, 7(37): 58-60.
- [11] 孙玉文,张英杰. 女贞子治疗高脂血症及其实验研究[J]. 中医杂志, 1993, 34(8): 493-494.
- [12] 王 楠,万建波,李铭源,等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(5): 787-790.
- [13] 胡小戎,曹凤梅. 丹参的药理、临床应用与制剂研究[J]. 中国新医药, 2003, 2(6): 54-56.
- [14] 郑洪艳,徐为人. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(6): 708-711.
- [15] 勾祥辉. 黄连素治疗高血脂 59 例[J]. 人民军医, 1995(2): 35.

青蒿琥酯对骨髓瘤 RPMI 8226 细胞增殖、凋亡及对 Survivin、Caspase-3、Caspase-7 的影响

王素云^{1,2},杨晓阳¹,邓 凯¹,成志勇¹,陈 浩¹,杨静慈¹,尚银涛¹,潘 峻^{1*}

(1. 河北医科大学第二医院,河北 石家庄 050000; 2. 河北省人民医院 血液科,河北 石家庄 050051)

摘 要:目的 探讨青蒿琥酯对体外培养的人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 的增殖、凋亡及对凋亡相关基因 survivin 及 caspase-3、caspase-7 表达的影响。方法 采用 MTT 法检测青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞增殖的抑制作

①收稿日期:2009-08-11

基金项目:河北省科技攻关计划项目(072761130)

作者简介:王素云(1974—),女,河北人,博士,副主任医师,研究方向为恶性血液病微小残留病变的诊治与信号转导。

Tel: 13831198857 E-mail: suyunwcn@163.com

*通讯作者 潘 峻 E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

用,光镜下观察细胞形态学变化,流式细胞仪分析细胞凋亡率,荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测 survivin 和 caspase-3、caspase-7 mRNA 表达水平变化,Western blotting 检验 Survivin 蛋白表达变化,应用 Caspase-3/7 试剂盒检测 Caspase-3、Caspase-7 蛋白活性。结果 青蒿琥酯质量浓度从 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,青蒿琥酯体外对 RPMI8226 细胞的抑制率由 33.55% 增加到 74.71%。细胞凋亡率呈剂量依赖性增加,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯诱导 RPMI8226 细胞最大凋亡率达 (68.1 $\pm$ 5.9) %。不同质量浓度青蒿琥酯干预 48 h 后 Survivin mRNA 及蛋白表达水平明显降低,Caspase-3、Caspase-7 mRNA 及蛋白活性明显升高 ($P < 0.01$)。结论 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞有生长抑制和诱导凋亡作用,其机制可能与增强 Caspase-3、Caspase-7 活性,抑制抗凋亡分子 survivin 表达有关。

关键词:青蒿琥酯;多发性骨髓瘤;细胞增殖;细胞凋亡;Survivin;Caspase

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)05-0785-05

青蒿琥酯 (artesanate) 是青蒿素的一种衍生物,是我国首创的高效低毒新型抗疟药,具有抗疟、抗血吸虫等功能。近年来许多学者发现青蒿琥酯具有抗肿瘤作用^[1]。李世辉等^[2]发现青蒿琥酯对小鼠骨髓瘤细胞株有增殖抑制、促凋亡作用,可使 SP2/0 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。本实验进一步体外验证青蒿琥酯对人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 增殖、凋亡的影响,并对青蒿琥酯的抗肿瘤作用进行分子机制探讨,为青蒿琥酯治疗多发性骨髓瘤的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226 为本实验室长期保存细胞系,用含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) RPMI1640 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度环境孵育。青蒿琥酯购于上海复星医药有限公司,规格为 60 mg/支,批号 071114,溶于 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中,配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,超滤除菌,以 RPMI1640 稀释青蒿琥酯质量浓度至 5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液。逆转录反应体系购自美国 Promega 公司;SYBR Green Real Master Mix 购自北京天根生化科技有限公司;Survivin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的山羊抗鼠二抗购自北京鼎国生物技术有限公司;Caspase-3/7 活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 MTT 法测定细胞增殖:取对数生长期的 RPMI8226 细胞,调整密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μL 。青蒿琥酯的终质量浓度为 0、2.5、12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。设 2 个复孔,实验重复 6 次。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 48 h 后加 10 μL MTT (0.5 mg/mL),继续培养 4 h 后离心弃上清,每孔加入 200 μL DMSO,振荡数分钟终止反应,应用全自动酶标仪测 490 nm 处的吸光度 (A) 值。计算增殖抑制率。

抑制率 = (对照组 A 值 - 药物组 A 值) / 对照组 A 值 $\times 100\%$

1.3 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞形态学变化的影

响:取对数生长期的 RPMI8226 细胞,调整密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,接种于 6 孔培养板中,每孔 1.5 mL。每孔加入 RPMI1640 培养基 1.5 mL 或青蒿琥酯工作液 1.5 mL,终质量浓度分别为 0、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,设两个复孔,重复 3 次。处理 48 h 后,倒置显微镜下计数细胞数量及观察细胞形态。

1.4 Annexin V/PI 标记染色测定细胞凋亡率:取对数生长期的 RPMI8226 细胞,调整密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 12 孔培养板中,每孔各加入细胞悬液 2 mL,不同质量浓度的青蒿琥酯工作液各 1.5 mL,终质量浓度为 0、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理 24 h 后,调整待测细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 1 mL 细胞悬液,400 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 冷 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,400 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清,重复 2 次,将细胞用 200 μL 结合缓冲液重悬,加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μL 结合缓冲液,立即用流式细胞仪进行检测。

1.5 实时荧光定量 PCR:收集未用药组及 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯组干预 48 h 后 RPMI8226 细胞,Trizol 提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 并定量,逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 反应:SYBR 反应体系共 25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,30 个循环,设空白对照,记录循环阈值 (Ct 值)。根据 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$ 计算目的基因与 $\beta\text{-actin}$ 相对表达量。PCR 引物由北京赛百盛生物公司合成,检测基因序列如下: survivin 正向: 5'-GACCACCGCATCTCTACATTC-3',反向: 5'-TGCTTTTATGTTCCTCTATGGG-3'; caspase-3 正向: 5'-TTCA-GAGGGGATCGTTGTAGAAAGTC-3',反向: 5'-CAAGCTTGTCGGCATACTGTTTCAAG-3'; caspase-7 正向: 5'-TGACCTATCCTGCCCTCA-3',反向: 5'-TCTCCTGCCTCACTGTCCG-3'; $\beta\text{-actin}$ 正向: 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAAT-3',反向: 5'-AATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'。

1.6 Western blotting 检测 Survivin 蛋白表达:收集未用药组及 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯组作用 48 h 后 RPMI8226 细胞,每组收集 1×10^7 个细胞,加入 200 μL 预冷的蛋白裂解液 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h,冰浴下超声裂解 15 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清,用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度,分装后置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定各组蛋白浓度,取 80 μg 样品蛋白加入等体积上样缓冲液,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。经 5% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,分别加入 1:500 稀释的小鼠抗人单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 培育过夜。TBS 漂洗 5 min $\times 3$ 次,加入山羊抗小鼠 HRP 标记二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,TBS 漂洗 5 min $\times 3$ 次。化学发光检测后分析结果。对蛋白条带灰度进行相对定量分析,并以 β -actin 条带作为参照。取目的蛋白条带与相应的 β -actin 相对灰度比值进行半定量分析。

1.7 Caspase-3/7 蛋白活性检测:应用 Caspase-3/7 活性检测试剂盒检测 Caspase-3/7 蛋白活性。将 RPMI8226 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板上,每孔 100 μL ,设 3 个复孔,并设对照组。加入青蒿琥酯工作液,使青蒿琥酯终质量浓度为 0、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 体积分数的条件下培养 24 h 后,每孔加入混合后的 Caspase-3/7 试剂 100 μL ,再孵育 3 h 后,取出 96 孔板,检测酶标仪测波长 405 nm 处的吸光度值,空白孔作对照,计算处理组吸光度值与对照组吸光度值的比值,确定活化程度。

1.8 统计学方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较应用 t 检验,多样本均数比较应用单因素方差分析,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞的增殖抑制作用:不同质量浓度青蒿琥酯作用 48 h 后,体外对 RPMI8226 细胞增殖均有一定的抑制作用,质量浓度从 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,青蒿琥酯体外对 RPMI8226 细胞的抑制率由 33.55% 增加到 74.71%,呈现剂量依赖性。经 Logit 方法计算青蒿琥酯的 IC_{50} 为 36.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1)。

表 1 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞增殖的抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

青蒿琥酯/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
0(对照)	1.193 $\pm$ 0.350	0
2.5	0.793 $\pm$ 0.426 **	33.55
12.5	0.772 $\pm$ 0.485 **	35.31
25	0.662 $\pm$ 0.389 **	44.51
50	0.302 $\pm$ 0.194 **	74.71

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.2 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞形态学的影响:终质量浓度为 0、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青蒿琥酯处理 RPMI8226 细胞 48 h 后,在普通光学显微镜下观察可见 RPMI8226 细胞数明显减少、细胞体积缩小、细胞碎裂等改变;而对照组细胞数量多,细胞核较大,胞浆丰富(见图 1)。

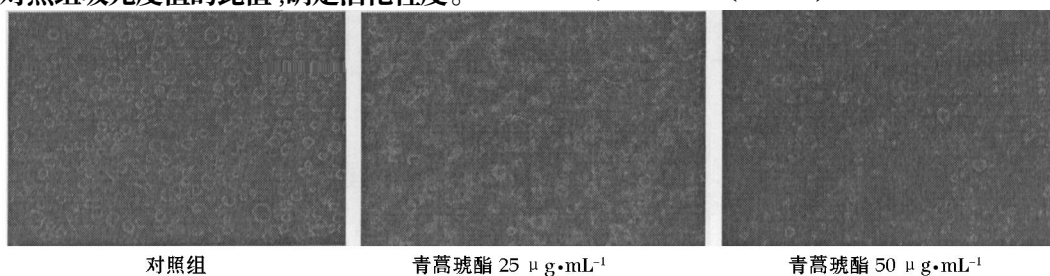


图 1 青蒿琥酯干预 48 h RPMI8226 细胞形态学改变

Fig. 1 Morphologic change of RPMI8226 cells after treatment with artesunate for 48 h

2.3 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞凋亡的影响:Annexin V/PI 双染检测法检测细胞凋亡率结果显示,终质量浓度为 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青蒿琥酯各作用 24 h 后的细胞与对照组细胞相比,细胞凋亡率呈剂量依赖性增加(见图 2)。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯诱导 RPMI8226 细胞凋亡的作用最明显,最大凋亡率达 (68.1 $\pm$ 5.9)%,明显高于对照组(见表 2)。

2.4 青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞 survivin、caspase-3、caspase-7 mRNA 的影响:不同质量浓度青蒿琥酯作用 48 h 后,survivin、caspase-3、caspase-7 mRNA 表达水平见表 3。青蒿琥酯减弱 survivin mRNA 的表达,而增强 caspase-3、caspase-7 mRNA 的表达。

2.5 青蒿琥酯 48 h 对 RPMI8226 细胞 Survivin

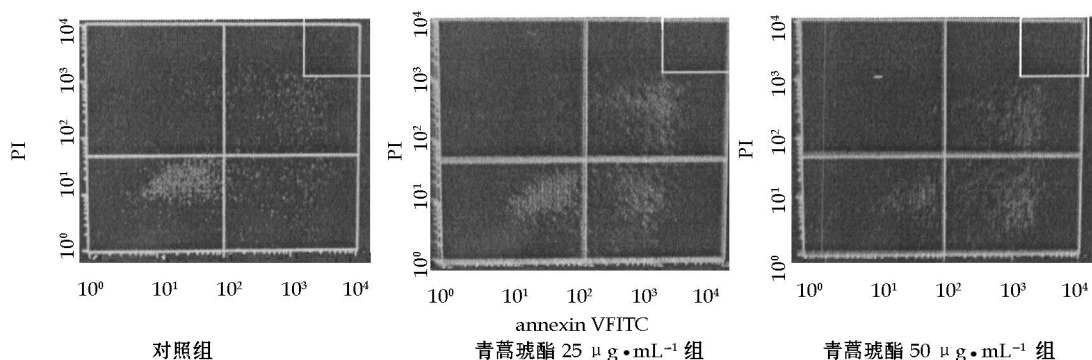


图 2 青蒿琥酯干预 24 h RPMI8226 细胞早期凋亡

Fig. 2 Early apoptosis rate of RPMI8226 cells after treatment with artesunate for 24 h

表 2 青蒿琥酯干预 24 h RPMI8226 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 2 Apoptosis rate of RPMI8226 cells treated with artesunate for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

青蒿琥酯/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	早期凋亡率/ %	中晚期凋亡率/ %	总凋亡率/ %
0(对照)	4.5 ± 2.1	4.3 ± 1.7	8.8 ± 2.7
25	$19.6 \pm 6.8^{**}$	$17.9 \pm 4.3^{**}$	$37.5 \pm 6.1^{**}$
50	$39.7 \pm 6.1^{***}$	$28.4 \pm 3.8^{***}$	$68.1 \pm 5.9^{***}$

与对照组比较: $^{**} P < 0.01$ 与青蒿琥酯 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较: $^{##} P < 0.01$ $^{**} P < 0.01$ vs control group $^{##} P < 0.01$ vs 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ artesunate group表 3 青蒿琥酯干预 48 h 后 RPMI8226 细胞 survivin、caspase-3、caspase-7 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 3 Expression levels of survivin, caspase-3, and caspase-7 mRNA in RPMI8226 cells after treatment with artesunate for 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

青蒿琥酯/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	survivin	caspase-3	caspase-7
0(对照)	0.811 ± 0.310	0.310 ± 0.201	0.556 ± 0.137
25	$0.439 \pm 0.176^{*}$	0.423 ± 0.245	$0.717 \pm 0.188^{*}$
50	$0.264 \pm 0.122^{**}$	$0.891 \pm 0.345^{***}$	$0.921 \pm 0.221^{***}$

与对照组比较: $^{*} P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ 与青蒿琥酯 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: $^{#} P < 0.05$ $^{##} P < 0.01$ $^{*} P < 0.05$ $^{**} P < 0.01$ vs control group $^{#} P < 0.05$ $^{##} P < 0.01$ vs 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ artesunate group

蛋白表达水平的影响:不同质量浓度青蒿琥酯干预 48 h 后, Survivin 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见图 3。

2.6 Caspase-3/7 酶活性检测结果:对照组的 RPMI8226 细胞 Caspase-3/7 的吸光度比值为 0.336 ± 0.041 , 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯处理组为 0.451 ± 0.042 , 两组相比差异显著 ($P < 0.01$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯处理组为 0.612 ± 0.051 ($P < 0.01$)。表明青蒿琥酯能增强 Caspase-3/7 的活性, 从而促进细胞凋亡, 并呈剂量依赖性增加 Caspase 活性。

3 讨论

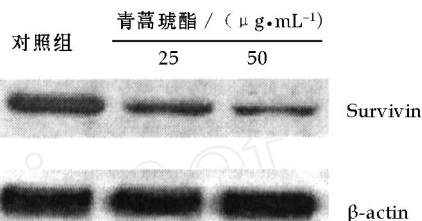


图 3 青蒿琥酯干预 48 h 后 RPMI8226 细胞 Survivin 蛋白表达

Fig. 3 Expression of Survivin protein in RPMI8226 cells after treatment with artesunate for 48 h

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 是浆细胞呈恶性克隆增殖性肿瘤, 约占所有恶性疾病的 1%, 血液系统恶性疾病的 10%, 临床上出现贫血、骨髓破坏及肾功能损害等。我国大多数患者由于各种原因不能接受治疗效果较好的自体造血干细胞移植, 也负担不起硼替佐米的高额费用。青蒿琥酯是一类高效、低毒的抗疟药物, 已广泛应用于临床。近年许多研究发现青蒿琥酯具有抗肿瘤活性。因此, 在本研究中, 观察青蒿琥酯对人骨髓瘤细胞株 RPMI8226 的增殖、凋亡的影响, 探讨青蒿琥酯的抗骨髓瘤机制, 以为多发性骨髓瘤患者提供治疗选择。

青蒿琥酯抑制增殖、促进凋亡的作用在多种肿瘤中已得到证实^[3~6]。本研究应用 MTT 法检测细胞增殖情况, 当青蒿琥酯质量浓度从 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 RPMI8226 细胞的抑制率由 33.55% 增加到 74.71%。通过普通光镜观察其形态, 可见青蒿琥酯处理 RPMI8226 细胞 48 h 后, RPMI8226 细胞数明显减少、细胞体积缩小、细胞碎裂等改变; 而对照组细胞数量多, 细胞核较大, 胞浆丰富。为了进一步证实青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞的增殖抑制与细胞凋亡的关系, 采用 Annexin V/PI 双染方法对青蒿琥酯作用后的 RPMI8226 细胞进行凋亡的定量检测, 结果表明细胞凋亡率呈剂量

依赖性增加,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯诱导 RPMI8226 细胞凋亡的作用最明显,最大凋亡率达 $(68.1 \pm 5.9)\%$,明显高于对照组。以上结果均表明青蒿琥酯对 RPMI8226 细胞的增殖有显著的抑制作用,并呈现剂量依赖性。

细胞内外的许多信号刺激可以诱导细胞发生凋亡。研究表明,细胞凋亡后期的共同途径是 Caspase 的激活。Caspase 酶是凋亡过程的主要调控蛋白,Caspase-3 是 Fas/ Apo-1 介导的凋亡信号转导途径的关键效应分子,又是多种凋亡途径共同作用的因子,其表达水平的高低决定着细胞凋亡程度^[7]。Survivin 也称生存素,是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子。Survivin 抗凋亡作用已被研究证实,它不仅通过阻断线粒体细胞色素 C 的释放,与下游凋亡效应因子 Caspase-3 和 Caspase-7 结合而对其活性产生直接抑制效应,而且还通过与纺锤体的结合,间接抑制 Caspase 对纺锤体的水解作用,有利于保护有丝分裂细胞的完整性,从而抑制细胞凋亡^[8,9]。

本实验发现,25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯作用 RPMI8226 细胞 24 h 后,survivin mRNA 表达受抑和 caspase-3 mRNA 表达上调,Caspase-3/7 酶的活性增高,Survivin 蛋白表达降低,并呈现剂量依赖性,提示青蒿琥酯诱导 RPMI8226 细胞凋亡与上调 Caspase-3/7 和下调 Survivin 基因表达有关,可能通过抑制 RPMI8226 细胞 Survivin 基因表达,解除原先 Survivin 对 Caspase-3/7 活性的抑制,进而激

活细胞凋亡程序,诱导癌细胞凋亡。总之,青蒿琥酯在一定剂量范围内呈剂量依赖性抑制 RPMI8226 细胞增殖,诱导其凋亡,提示青蒿琥酯在多发性骨髓瘤中具有潜在治疗价值,但其详细分子机制尚待深入研究。

参考文献:

- [1] 陈立军,靳秋月,于利人,等. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展 [J]. 中草药,2005,36(11):1754-1755.
- [2] 李世辉,潘峻,薛芳. 青蒿琥酯对骨髓瘤细胞 SP2/0 的作用观察机制的初步探讨 [J]. 中华肿瘤杂志,2008,30(1):16-20.
- [3] Sieber S, Gdynia G, Roth W, et al. Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(1):149-158.
- [4] Youns M, Efferth T, Reichling J, et al. Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(3):273-283.
- [5] Efferth T, Gaisi M, Merling A, et al. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(1):e693.
- [6] 陈立军,姚丽,靳秋月,等. 基因芯片技术分析青蒿琥酯抑癌作用机制 [J]. 中草药,2008,39(9):1359-1364.
- [7] Tormanen, Napankangas U. Expression of caspase-3,-6 and -8 and their relation to apoptosis in non-small cell lung carcinoma [J]. *Inter J Cancer*, 2001, 93(2):192-198.
- [8] Andrade F, Roy S, Nicholoso D, et al. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implication for CTL-induced apoptosis [J]. *Immunity*, 1998, 8(4):451-460.
- [9] Sally P, Wheatley and Iain A, McNeish. Survivin: A protein with dual roles in mitosis and apoptosis [J]. *Inter Rev Cytol*, 2005, 247:35-38.

复方鹿茸健骨胶囊抗骨质疏松作用

李凤才¹,谢海泉¹,邸琳²,刘新宇²

(1. 白求恩医科大学制药厂,吉林 长春 130012; 2. 吉林省中医中药研究院,吉林 长春 130021)

摘要:目的 观察复方鹿茸健骨胶囊的抗骨质疏松作用。方法 采用去卵巢或 ig 给予维甲酸造成大鼠骨质疏松模型,ig 给予复方鹿茸健骨胶囊治疗,观察其对骨质疏松大鼠骨质量、骨长、骨密度、骨强度、骨钙、血钙、骨形态学改变的影响。结果 复方鹿茸健骨胶囊 3.2、1.6、0.8 g/kg ig 给药可明显增加去卵巢或维甲酸所致骨质疏松大鼠骨质量、骨长、骨密度、骨强度;对去卵巢大鼠血钙及骨钙水平有明显增加作用;肱骨组织病理学结果显示,给予复方鹿茸健骨胶囊大鼠骨小梁增粗,骨皮质厚度增加,软骨细胞增生活跃,骺板变宽,成骨细胞明显活跃,破骨细胞减少。结论 复方鹿茸健骨胶囊有明显的抗骨质疏松作用。

关键词:鹿茸健骨胶囊;骨质疏松;去卵巢;维甲酸

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)05-0789-03

①收稿日期:2009-11-27

作者简介:李凤才(1965—),男,吉林长春人,高级工程师,主要从事新药研究与开发工作。

Tel: (0431) 85888045 E-mail: xiehaiquan2003@163.com