

- 性休克血流动力学和氧代谢的影响 [J]. 中草药, 2006, 37 (10): 1547-1550
- [8] 汤东, 王英, 朱永泽. 心肌损伤动物模型的建立及应用 [J]. 解剖与临床, 2004, 9(2): 126-127
- [9] 姚震, 焦解歌, 冯建章. 心肌缺血再灌注损伤与细胞凋亡关系的实验研究 [J]. 海南医学院学报, 2000, 6(3): 129-133
- [10] Hearse D J. Reperfusion of the ischaemic myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1977, 9(8): 605-616
- [11] Morita Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, *et al*. Release of mitochondrial cytochrome c and DNA fragmentation after cold injury induced brain trauma in mice: possible role in neuronal apoptosis [J]. *Neurosci*, 1999, 267(3): 201-205
- [12] Pain T, Yang X M, Critz S D, *et al*. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals [J]. *Circ Res*, 2000, 87(6): 460-466
- [13] Murata M, Akao M, O'Rourke B, *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection [J]. *Circ Res*, 2001, 89(10): 891-893
- [14] Wakiyama H, Cowan D B, Toyoda Y, *et al*. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(3): 424-433
- [15] Wang Y, Kudo M, Xu M, *et al*. Mitochondrial K^+ (ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(11): 2037-2046

裙带菜多糖诱导人食管癌细胞 TE-13 凋亡的实验研究

商晓辉*

(河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056002)

摘要:目的 探讨裙带菜多糖诱导人食管癌细胞 TE-13 凋亡的作用及其机制。方法 采用 MTT 法分析裙带菜多糖 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别作用 24、48、72 h 后对 TE-13 细胞增殖的抑制作用; 用透射电镜观察 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖分别作用 48 h 后细胞的凋亡结构变化; 用流式细胞术分析 TE-13 细胞的凋亡率和检测 Survivin 蛋白的表达水平。结果 不同质量浓度的裙带菜多糖均可明显抑制食管癌 TE-13 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 其抑制作用呈质量浓度依赖性, 作用 24 h 后的 IC_{50} 为 44.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。不同质量浓度裙带菜多糖作用 48 h 后, 均可诱导 TE-13 细胞凋亡, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖可诱导 TE-13 细胞凋亡率达 70.51%, 导致 TE-13 细胞发生凋亡特征性超微结构改变, 并使 TE-13 细胞 Survivin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论 裙带菜多糖可抑制 TE-13 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 该作用与下调细胞 Survivin 蛋白表达有关。

关键词: 裙带菜多糖; 食管癌; 细胞凋亡; Survivin 蛋白

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1150-04

裙带菜 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur. 为多年生大型褐藻, 属于昆布纲, 与海带同属于藻类植物。裙带菜成分主要包括多糖类化合物^[1]、挥发油、类脂、固醇类、亚麻酸和花生四烯酸等不饱和脂肪酸。裙带菜多糖可用于防治缺碘性甲状腺肿、动脉硬化、高脂血症、高血压等。近年来关于海藻多糖的抗癌研究报道很多^[2-4], 但关于裙带菜多糖诱导食管癌细胞凋亡研究很少。本实验探讨裙带菜多糖抗食管癌的机制, 为研发抗肿瘤新药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 裙带菜多糖的提取和纯化: 采用传统的水提乙醇沉淀法。取裙带菜洗净, 捣碎后, 甲醛浸泡固色, 用 30 倍的 pH 8.0 的蒸馏水加热提取 5 h, 滤过, 浓缩, 浓缩液加入 3 倍量的乙醇, 静置过夜, 离

心, 收集沉淀物, 再进行一次加水溶解, 80% 乙醇沉淀, 离心, 收集沉淀物进行透析, 透析保存液再加入无水乙醇沉淀得裙带菜多糖。裙带菜多糖粗品含较多的水溶性蛋白, 60 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水溶解, 用 2% 三氯乙酸 (TCA) 使水溶性蛋白变性, 静置过夜, 6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 以 75% 乙醇沉淀, 离心收集沉淀。最后进行透析脱盐, 用蒸馏水对多糖粗品进行溶解, 使用相对分子质量为 12 000 透析袋, 每袋 5 mL, 蒸馏水搅拌透析过夜, 24 h 换一次蒸馏水, 收集透析液, 蒸发浓缩, 减压干燥, 得到多糖晶体 (收率 0.4%)。取裙带菜多糖晶体样品 200 g, 混合溶于 2 L 蒸馏水中, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液用 RPMI 1640 培养基稀释 (终体积分数小于 0.1%)。

* 收稿日期: 2009-11-27

基金项目: 邯郸市科技厅资助项目 (0823108062-2)

作者简介: 商晓辉 (1976—), 女, 山东省聊城人, 硕士, 讲师, 研究方向是肿瘤免疫学、抗肿瘤中药研究。E-mail: geer345@sina.com

1.2 试剂: RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品, MTT、碘化丙啶 (PI)、二甲基亚砜 (DMSO) 及兔抗人 Survivin 单克隆抗体为美国 Sigma 公司产品。

1.3 细胞株及其培养: 人食管癌细胞 TE-13 由河北医科大学第四医院科研中心提供。用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养。

1.4 实验方法

1.4.1 MTT 法检测裙带菜多糖对 TE-13 细胞增殖的影响^[5]: 取对数生长期 TE-13 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L (含细胞数为 1×10^4 个)。实验组加入含不同质量浓度裙带菜多糖 (25、50、100 μ g/mL) 的培养基 100 μ L, 阴性对照组加入 RPMI 1640 培养基 100 μ L, 阳性对照组加入含羟基喜树碱 (30 μ g/mL) 的培养基 100 μ L, 每组均设 3 个复孔, 置饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48、72 h, 每天用倒置显微镜观察细胞形态学变化, 实验终止前每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min, 待结晶溶解后, 用酶标仪于 570 nm 波长测定吸光度 (A) 值。计算细胞生长抑制率, 用 POMS 软件计算 IC₅₀ 值。

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

1.4.2 透射电镜观察细胞凋亡的超微结构: 调节 TE-13 细胞浓度为 1×10^5 /mL, 移至六孔培养板, 板底面放入无菌玻片, 实验组在 TE-13 细胞悬液中加入含不同质量浓度的裙带菜多糖 (25、50、100 μ g/mL) 的培养基 100 μ L, 对照组加入等量 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C 培养 48 h 后, 收集 TE-13 细胞, PBS 洗涤后, 2.5% 戊二醛固定, 梯度酒精脱水, 树脂包埋, 超薄切片, 铀铅双重染色, 透射电镜观察细胞超微结构变化^[6]。

1.4.3 流式细胞术测定细胞凋亡率: 收集经不同质量浓度裙带菜多糖 (25、50、100 μ g/mL) 作用 48 h 后的 TE-13 细胞, PBS 洗涤 3 次, 70% 乙醇固定, PI 染色, 用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.4.4 流式细胞术检测 Survivin 蛋白表达: 细胞分组及处理方法同 1.4.3 项。将细胞经 70% 乙醇固定后加入兔抗人 Survivin 单克隆抗体, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤, 加入 PE-羊抗兔 IgG 二抗, 37 °C 孵育 50 min, PBS 洗涤, 流式细胞仪检测, 以 X-

mode 值表示 Survivin 相对量。

1.4.5 统计学方法: 应用 SPSS 11.5 软件对所有数据进行统计学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对 TE-13 细胞增殖的抑制作用: 25、50、100 μ g/mL 的裙带菜多糖均可抑制 TE-13 细胞增殖, 且随裙带菜多糖质量浓度的增加和作用时间延长抑制作用增强, 抑制率最高达 70.51%, 作用 72 h 的 IC₅₀ 为 18.3 μ g/mL, 与阴性对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 裙带菜多糖对 TE-13 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of polysaccharides from [WTHX] U. pinnatifida [WTHZ] on proliferation of TE 13 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	ρ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 / %		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0	0	0
羟基喜树碱	30	42.82 $\pm$ 2.35 *	68.14 $\pm$ 1.10 *	74.07 $\pm$ 0.88 *
裙带菜多糖	25	40.88 $\pm$ 1.52 *	59.98 $\pm$ 1.52 *	63.91 $\pm$ 0.36 *
	50	56.17 $\pm$ 3.25 *	60.64 $\pm$ 2.06 *	68.46 $\pm$ 0.37 *
	100	59.49 $\pm$ 2.12 *	68.98 $\pm$ 2.94 *	70.51 $\pm$ 0.97 *

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.2 对 TE-13 细胞超微结构的影响: 经不同质量浓度裙带菜多糖作用 48 h 后, TE-13 细胞发生细胞凋亡特征性超微结构改变, 表现为细胞体积缩小, 胞浆浓缩, 核不规则, 核染色质固缩浓聚呈块状, 边集于核膜下, 胞浆空泡化, 出现凋亡小体等改变。而对照组细胞体积大, 核仁大而明显, 核浆比例大, 微绒毛和内质网丰富, 细胞器结构正常, 未发现凋亡征象。见图 1。

2.3 对 TE-13 细胞凋亡的影响: 经 25、50、100 μ g/mL 裙带菜多糖作用 48 h 后, 流式细胞术分析结果显示, TE-13 细胞发生了明显的凋亡现象, 随药物质量浓度增加凋亡率增加, 细胞凋亡率分别为 39.01%、50.39%、68.23%, 与对照组 (凋亡率 21.99%) 相比差异显著 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 对 TE-13 细胞 Survivin 蛋白表达的影响: 经 25、50、100 μ g/mL 裙带菜多糖处理 48 h 后, TE-13 细胞 Survivin 蛋白表达 (X-mode 值) 分别为 16.967 $\pm$ 0.456、9.328 $\pm$ 0.356、6.006 $\pm$ 0.224, 随药物剂量增加 Survivin 蛋白表达逐渐降低。50、100 μ g/mL 处理组显著低于对照组 (17.917 $\pm$ 0.504) ($P < 0.01$), 25 μ g/mL 处理组蛋白表达低于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

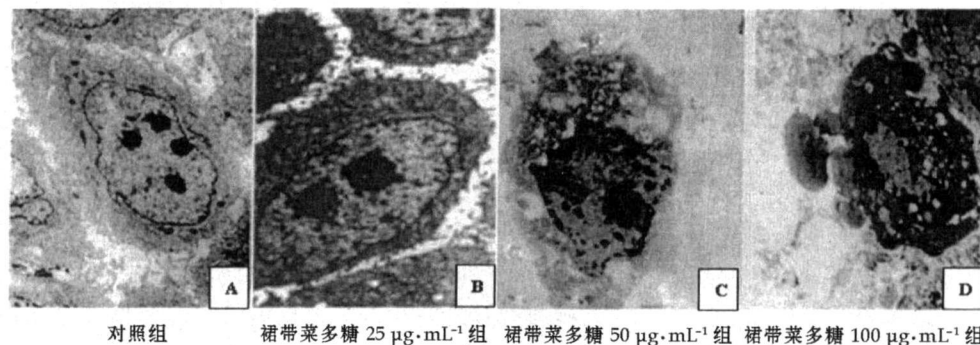


图 1 裙带菜多糖对 TE-13 细胞超微结构的影响

Fig. 1 Effect of polysaccharides from *U. pinnatifida* on ultrastructure of TE-13 cells

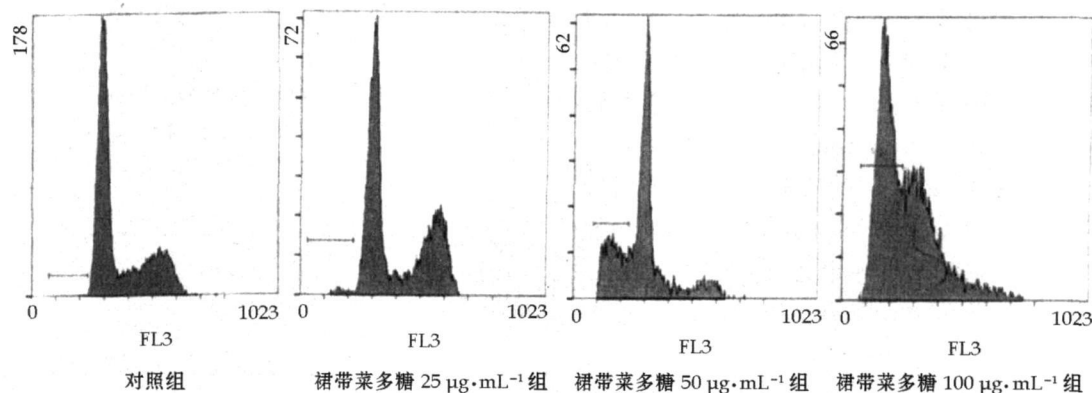


图 2 裙带菜多糖对 TE-13 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of polysaccharides from *U. pinnatifida* on apoptosis of TE-13 cell

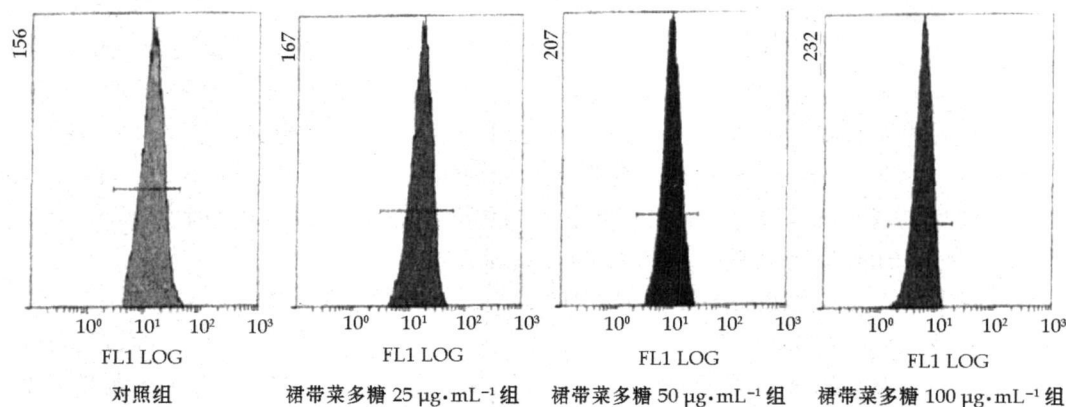


图 3 裙带菜多糖对 TE-13 细胞 Survivin 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of polysaccharides from *U. pinnatifida* on protein expression of Survivin in TE-13 cells

3 讨论

目前肿瘤的预防还十分困难,而海藻多糖近年来成为抗肿瘤新药开发的研究方向。本实验 MTT 结果显示,25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖对 TE-13 细胞增殖具有明显的抑制作用,作用 72 h 对肿瘤细胞增殖抑制率可达 70.51%。

细胞凋亡不仅与肿瘤的发生、发展及退化有密切的关系,而且是肿瘤治疗的主要目标。诱导细胞

凋亡已成为目前抗肿瘤药物研究的热点。本研究电子透镜观察结果表明,25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 裙带菜多糖分别作用于 TE-13 细胞 48 h 后,可诱导细胞发生典型的凋亡结构改变,凋亡率与裙带菜多糖质量浓度成正比。

为了进一步探讨裙带菜多糖诱导 TE-13 细胞凋亡机制,本实验采用不同质量浓度裙带菜多糖 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 TE-13 细胞 48 h,发现

用药后 Survivin 蛋白的表达水平显著降低。Survivin 是细胞凋亡抑制基因,编码的蛋白属于凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族成员, Survivin 在成人体内除胸腺、生殖腺中有微量表达外,所有分化成熟的组织,均无表达,但在许多人类肿瘤组织中表达水平升高^[6]。Survivin 通过直接抑制 caspase 3 和 caspase 7,使二者分离,抑制 caspase 蛋白酶活性^[7],从而抑制其诱导肿瘤细胞凋亡。本实验结果显示,裙带菜多糖作用后 TE-13 细胞的 Survivin 蛋白表达明显减少,提示裙带菜多糖诱导 TE-13 细胞凋亡的机制与 Survivin 有关。

本实验结果表明,裙带菜多糖可显著抑制 TE-13 细胞增殖,该作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关,这些作用的进一步研究,可为裙带菜多糖抗肿瘤作用

的开发和利用奠定基础。

参考文献:

- [1] 门晓媛,王飞,朱艳梅,等.裙带菜多糖的研究[J].中草药,2006,37(3):362-365
- [2] 季宇彬,姜艳华,高世勇.昆布多糖分离纯化及其抗肿瘤活性的研究[J].中草药,2009,40(增刊):132-135
- [3] 陈新美,梅兴国.螺旋藻多糖和藻胆蛋白的肿瘤防治作用及机制[J].中草药,2004,35(1):100-103
- [4] 张洪建,杨琳,李劲平.海带多糖药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2009,24(4):217-219
- [5] 傅体辉,谢之荣,邓碧芳,等.MTT 比色法检测肿瘤患者的淋转功能及其条件分布[J].中国实验临床免疫学杂志,1994,6:30-32
- [6] Kawasaki H, Toyoda M, Shinobara H, et al. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis [J]. Cancer, 2001, 91(11): 2026-2032
- [7] Amdrosini G, Adida C, Altieri D. A novel anti apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921

沙棘提取物对麻醉开胸犬血流动力学的影响

李路平¹,岳海涛²,吕铭洋³,陈霞^{4*},祁乐⁵

(1 吉林大学中日联谊医院 药剂科,吉林 长春 130031; 2 白求恩医科大学制药厂,吉林 长春 130012;

3 吉林大学珠海学院 化学与药学院,广东 珠海 519041; 4 吉林大学白求恩医学院 药理学教研室,

吉林 长春 130021; 5 吉林大学第三临床学院,吉林 长春 130012)

摘要:目的 研究沙棘提取物对麻醉开胸犬血流动力学的影响。方法 24 只犬随机分为 4 组,沙棘按 4、16 mg/kg 2 个剂量静脉滴注给药;阳性对照药舒血宁注射液组静脉滴注 2.3 mg/kg;模型组静脉滴注生理盐水,记录给沙棘提取物后犬血流动力学各参数。结果 与模型组比较,沙棘 4、16 mg/kg 组犬的心输出量(CO)、心肌血流量(MBF)、心脏指数(CI)、心搏指数(SI)增加($P < 0.05, 0.01$),总外周阻力、冠脉阻力降低($P < 0.05, 0.01$)。结论 沙棘提取物具有明显改善麻醉开胸犬血流动力学的作用。

关键词:沙棘;血流动力学;心输出量

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)07-1153-04

沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 是胡颓子科落叶灌木,在我国资源丰富,具有相当高的药用价值^[1]。国内外对沙棘的化学成分及其功效进行了大量研究,发现其含有丰富的维生素、脂肪酸、微量元素及黄酮类物质,在抗凝血、防止血管栓塞、抗衰老、抗疲劳、增强机体活力和免疫力等方面都显示出独特的治疗效果^[2,3]。本课题组前期研究了沙棘对犬心肌氧代谢的作用^[4],证明了沙棘能明显降低心肌氧摄取率。但沙棘对犬血流动力学则较少见系统研究,因此,本实验研究沙棘提取物对麻醉开胸犬血流动力学的影响,深入探讨其药理作用,为临床合理、安全用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物:健康杂种犬,雌雄兼用,体质量 12~16 kg,由吉林大学实验动物中心提供。

1.2 药品:沙棘提取物(含异鼠李素和槲皮素 10 mg/100 g)由吉林大学白求恩医学院药理教研室提供;舒血宁注射液由山西银湖制药有限责任公司生产,批号 2005071401。

1.3 仪器:RM-6000 型多导生理记录仪、MFV-1200 型电磁流量计,日本光电公司生产。SC-3 电动呼吸机,上海医疗器械厂生产。

1.4 方法:健康成年杂种犬 24 只,随机分为 4 组(每组 6 只),分别为模型组(NS),沙棘提取物 4、16

* 收稿日期:2010-01-05

作者简介:李路平(1962—),男,吉林长春人,主管药师,主要从事新药开发研究。

* 通讯作者:陈霞