

## • 药理与临床 •

## 积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞增殖活性的影响及其机制探讨

吕婷婷, 刘芳\*, 陈燕, 姜旭东

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨积雪草酸对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期的影响及其机制。方法 MTT 法检测积雪草酸对肿瘤细胞的抗增殖作用; Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡的形态学变化; 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡及细胞周期的变化; RT-PCR 法检测细胞 survivin 和 bcl-2 mRNA 表达水平的变化。结果 积雪草酸在浓度 10~70  $\mu\text{mol/L}$  显著抑制 RPMI 8226 细胞的增殖, 呈时间及浓度依赖性, 作用 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 (42.25 $\pm$ 4.57)、(24.88 $\pm$ 3.51)、(19.83 $\pm$ 2.88)  $\mu\text{mol/L}$ 。积雪草酸可诱导细胞发生凋亡, 出现典型的凋亡小体。积雪草酸诱导细胞发生早期凋亡, 并呈浓度依赖性。积雪草酸 25~40  $\mu\text{mol/L}$  能将 RPMI 8226 细胞阻滞在  $G_2$  期,  $G_2$  期细胞比例随积雪草酸浓度增大而逐渐增高。积雪草酸使 survivin 和 bcl-2 mRNA 表达下降, 并与细胞的凋亡程度呈负相关。结论 积雪草酸能通过调控细胞周期的进程和诱导细胞凋亡从而抑制 RPMI 8226 细胞增殖, 其诱导凋亡的机制可能与下调 survivin 和 bcl-2 的转录水平有关。

**关键词:** 积雪草酸; 多发性骨髓瘤; RPMI 8226; 细胞凋亡; survivin; bcl-2

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1484-05

## Effect of asiatic acid on proliferation of multiple myeloma cells and its mechanism

LÜ Ting-ting, LIU Fang, CHEN Yan, JIANG Xu-dong

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of asiatic acid on cell proliferation, apoptosis, and cells cycle of human multiple myeloma cells RPMI 8226, and its antitumor mechanism. **Methods** MTT Assay was used to assess the effect of asiatic acid on cells proliferation; Hoechst 33258 staining was studied to evaluate the morphological changes in RPMI 8226 cells induced by asiatic acid; Flow cytometry was used to analyze the induction apoptosis and cell cycle arrest of asiatic acid; RT-PCR was applied to detect the changes of survivin and bcl-2 mRNA expression levels. **Results** Asiatic acid significantly inhibited the cell proliferation of RPMI 8226 in  $\mu\text{mol/L}$  grade level, in a time- and dose-dependent manner. The  $\text{IC}_{50}$  values of RPMI 8226 cells were (42.25 $\pm$ 4.57), (24.88 $\pm$ 3.51) and (19.83 $\pm$ 2.88)  $\mu\text{mol/L}$  for 24, 48, and 72 h. Asiatic acid could induce apoptosis, and cell showed typical apoptotic features. Asiatic acid induced apoptosis in a dose-dependent manner. Cells treated with asiatic acid 25—40  $\mu\text{mol/L}$  were blocked in the  $G_2$  phase. The expression of survivin and bcl-2 mRNA was decreased in RPMI 8226 cells, and the extent of apoptosis was a negative correlation with the dose of asiatic acid. **Conclusion** Asiatic acid could inhibit the proliferation by inducing apoptosis and regulating cell cycle process. The mechanism of induction apoptosis is associated with up-regulation of survivin and bcl-2 transcription level.

**Key words:** asiatic acid; multiple myeloma; RPMI 8226 cell line; apoptosis; survivin; bcl-2

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 是骨髓浆细胞恶性增殖性疾病, 由于发病机制的复杂, 多药耐药的出现, 缓解率不高。因此, 研制低毒, 新型药物靶点的抗骨髓瘤药物, 具有重要的临床价值。研究表明三萜类化合物被认为是一种极具前景的抗肿瘤

药物<sup>[1]</sup>。积雪草酸 (asiatic acid) 是积雪草中量较高的五环三萜酸, 具有广泛的生物学活性。长期以来, 积雪草酸主要用于治疗皮肤创伤和慢性溃疡, 随着对其药理活性的研究, 发现积雪草酸还具有抗阿尔茨海默病、抗肝纤维化、抗肿瘤等作用<sup>[2-5]</sup>。目前

\* 收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472267)

作者简介: 吕婷婷 (1983—), 女, 湖北人, 华中科技大学协和医院血液科在读硕士研究生, 研究方向为恶性血液病, 现于湖北省襄樊市中心医院血液科工作。Tel: 13886256502 E-mail: vict558@sohu.com

\* 通讯作者 刘芳 E-mail: liufang1@medmail.com.cn

国外学者陆续报道了积雪草酸对肝癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤等具有显著的抑制作用<sup>[6-9]</sup>,但对血液病肿瘤的作用,国内外文献均未见报道。本实验以多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226 为研究对象,观察积雪草酸对细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期的影响,并探讨可能的作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 药品与试剂:积雪草酸(购于 Sigma-Aldrich),溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,配成 50 mmol/L,等量分装,置于 -20 °C 保存,临用前解冻。MTT、DMSO、核酸核糖酶 A (RNase A)、碘化丙啶 PI (Sigma 公司),RPMI 1640 培养液、Trizol 试剂 (Invitrogen 公司),新生胎牛血清(杭州四季青公司),Annexin/PI 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),Hoechst 33258 (武汉凌飞公司),RNA 酶反转录试剂盒 (Toyobo 公司),mastermix、marker (天根公司),PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 仪器和设备:CO<sub>2</sub>培养箱(德国 Heraeus 公司),XDS-1 倒置相差显微镜(Olympus 公司),BH-2 型荧光显微镜(Olympus 公司),酶标仪(美国 Biotech Instruments 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),TC-3000 PCR 仪(英国 Techne),GDS-8000 型凝胶电泳分析系统(英国 UVP 公司)。

1.3 细胞培养:多发性骨髓瘤细胞 RPMI 8226 (本所常规保存)置于含有 10% 新生胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 更换培养基,取对数生长期细胞进行实验。

1.4 MTT 试验:将处于对数生长期 RPMI 8226 细胞,以  $3 \times 10^5$  /mL 密度接种于 96 孔板。分成对照组(不加药物处理)和实验组共 8 个组,实验组积雪草酸浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70  $\mu$ mol/L。每孔 200  $\mu$ L,每个浓度设 5 个复孔。置 CO<sub>2</sub> 培养箱处理 24~72 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20  $\mu$ L,孵育 4 h,终止培养,弃去孔内培养液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min,使结晶充分溶解。在 490 nm 波长下用酶标仪测定各孔吸光度(A)值。计算抑制率。

抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%

1.5 流式细胞术检测:取对数生长期细胞,分为对照组(积雪草酸浓度为 0  $\mu$ mol/L)和实验组,实验组积雪草酸浓度分别为 35、40、45  $\mu$ mol/L,每组细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /mL,处理 24 h 后,用 Annexin/PI

双标法检测细胞凋亡。

取对数生长期细胞,分为对照组(积雪草酸浓度为 0  $\mu$ mol/L)和实验组(积雪草酸为 25、35、40  $\mu$ mol/L)共 4 个组,各组细胞用 70% 冷乙醇固定 24 h 后,磷酸缓冲液(PBS)洗涤,加入 PBS 440  $\mu$ L,RNase A 10  $\mu$ L 孵育 30 min,加入 PI 染色液 50  $\mu$ L,4 °C 避光 30 min 后进行流式细胞术检测,用 cell modifit 软件分析细胞周期。

1.6 Hoechst 33258 染色法检测:将细胞分为对照组(积雪草酸浓度为 0  $\mu$ mol/L)和处理组(积雪草酸浓度为 35、40  $\mu$ mol/L),积雪草酸干预培养 24 h。收集细胞离心,PBS 洗涤一次,用 -20 °C 预冷乙醇固定 4 °C 过夜。离心后 PBS 洗涤一次,200  $\mu$ L PBS 重悬,将细胞滴片于经 10% 多聚赖氨酸预处理的玻片上。待细胞干燥后加 10  $\mu$ g/mL Hoechst 33258 40  $\mu$ L,室温避光孵育 30 min 后,在显微镜下观察细胞的形态变化。

1.7 RT-PCR 检测:取对数生长期细胞,分为对照组(积雪草酸浓度为 0  $\mu$ mol/L)和实验组(积雪草酸浓度分别为 35、40、45  $\mu$ mol/L)共 4 个组。各组处理 24 h 后,离心收集细胞。按 Invitrogen 公司的试剂盒说明书规定的操作步骤提取总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 纯度,并进行 RNA 的定量。逆转录反应,按照逆转录试剂盒说明书的步骤。PCR 引物通过 Oligo6 软件设计,由上海生工生物工程公司合成。survivin 上游序列:5'-TCCCTGGCTCCTCTACTGTT-3',下游序列 5'-GGCAGGCTAGGGACGAG-3',扩增产物 645 bp; $\beta$ -actin 上游序列:5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游序列 5'-ATGTCACGCACGATTTTCG-3',扩增产物 218 bp。bc12 上游序列:5'-GCCGGCGACGACTTCT-3',下游序列 5'-AGGTGCCGGTTCAGGTA CTG-3',扩增产物 257 bp; $\beta$ 2 actin 上游序列:5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3',下游序列 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3',扩增产物 426 bp。25  $\mu$ L 反应体系(survivin, bc12,  $\beta$ -actin): mastermix 12.5  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 208.5  $\mu$ L。survivin 反应条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,扩增 35 个循环。72 °C 总延伸 7 min。bc12 反应条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,扩增 30 个循环。72 °C 总延伸 7 min。以  $\beta$ -actin 为内参。 $\beta$ -actin 反应条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变

性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环。β-actin 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 30 个循环。取 PCR 产物 5 μL 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外线凝胶成像系统上观察摄影, 用 Band Scan 4.0 软件进行灰度扫描。用总灰度表示各条带的 RNA 表达量, 比较各泳道的目的条带和内参 β-actin 的灰度比, 作为目的条带的 mRNA 的相对水平。

1.8 统计学方法: 每个实验均重复 3 次, 应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞增殖的影响: MTT 结果显示积雪草酸对 RPMI 8226 细胞增殖有明显的抑制作用, 呈浓度及时间依赖性 (图 1)。积雪草酸实验组的细胞活力均低于对照组, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且随着积雪草酸的浓度增大, 细胞活力降低, 说明积雪草酸抑制 RPMI 8226 的增殖作用呈浓度依赖性; 在同一药物浓度下, 处理 24、48、72 h 后细胞活力不同, 差别显著 ( $P < 0.05$ ), 说明具有时间依赖性。积雪草酸作用 24、48、72 h 的  $IC_{50}$  值分别为 ( $42.25 \pm 4.57$ )、( $24.88 \pm$

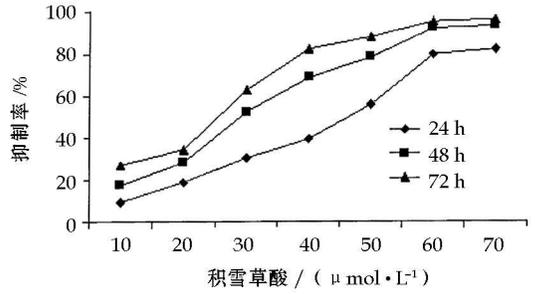
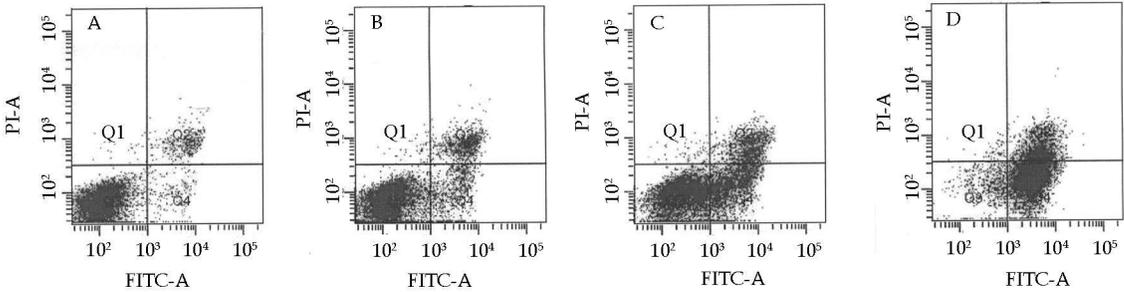


图 1 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig 1 Inhibition of asiatic acid on proliferation of RPMI 8226 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3.51)、( $19.83 \pm 2.88$ ) μmol/L。

2.2 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞凋亡的影响: Annexin/PI 双标检测法显示, 随着积雪草酸浓度的增大, RPMI 8226 细胞发生凋亡, 主要表现为早期凋亡率的增加。35、40、45 mol/L 积雪草酸作用 RPMI 8226 细胞 24 h 后, 其早期凋亡率分别上升为 ( $7.22 \pm 2.77$ )%、( $20.37 \pm 3.46$ )%、( $66.68 \pm 5.21$ )%, 与对照组细胞的早期凋亡率 [ $(1.58 \pm 0.38)\%$ ] 比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。从 35 mol/L 开始积雪草酸对 RPMI 8226 细胞的促凋亡作用明显增强。结果见图 2。



A ~ D: 0, 35, 40, 45 μmol · L<sup>-1</sup> 积雪草酸

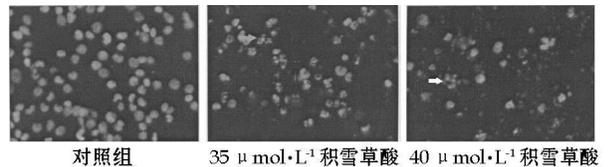
A ~ D: 0, 35, 40, and 45 μmol · L<sup>-1</sup> asiatic acid

图 2 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of asiatic acid on apoptosis of RPMI 8226 cells

2.3 Hoechst 33258 染色结果: 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞有促凋亡作用。35、40 μmol/L 积雪草酸处理细胞 24 h 后, 经 Hoechst 33258 染色后, 在荧光显微镜下观察, 细胞核呈现明显的晚期凋亡特征, 染色质浓缩, 核碎裂成大小不等的圆形小体, 并被细胞核膜所包裹, 即凋亡小体。随着药物浓度的增加, 凋亡特征越显著, 细胞核裂解为碎块, 具有正常细胞形态的细胞越少。见图 3。

2.4 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞周期的影响: 不



对照组 35 μmol · L<sup>-1</sup> 积雪草酸 40 μmol · L<sup>-1</sup> 积雪草酸

⇨ 凋亡小体

⇨ apoptotic body

图 3 积雪草酸作用 RPMI 8226 24 h 的细胞形态学变化

Fig 3 Morphological changes of RPMI 8226 cells treated by asiatic acid for 24 h

同浓度的积雪草酸作用于 RPMI 8226 细胞 24 h 后,细胞周期发生改变,主要阻滞在 G<sub>2</sub> 期。35、40 μmol/L 的积雪草酸作用显著 (P < 0.05), G<sub>2</sub> 期细胞比例在 25 μmol/L 浓度下变化不明显,见表 1。

表 1 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of asiatic acid on cell cycles of RPMI 8226 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	C (μmol·L <sup>-1</sup> )	细胞周期/%		
		G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	S
对照	0	46.01 ± 1.89	5.21 ± 2.37	48.78 ± 2.08
积雪草酸	25	49.64 ± 2.88	7.31 ± 3.78*	43.05 ± 3.67
	35	29.09 ± 2.45	26.55 ± 3.89*	44.35 ± 3.03
	40	44.63 ± 4.32	54.05 ± 5.66*	1.32 ± 0.34

与对照组比较: \* P < 0.05

\* P < 0.05 vs control group

2.5 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞 survivin 和 bcl-2 mRNA 表达的影响: 积雪草酸作用于 RPMI 8226 细胞 24 h 后,可使 survivin 和 bcl-2 mRNA 表达下降。随着药物浓度的增加, survivin 和 bcl-2 mRNA 表达也下降,呈剂量依赖性。35、40、45 μmol/L 积雪草酸组 survivin 与 β-actin 的比值分别为 0.756 ± 0.044、0.592 ± 0.034、0.125 ± 0.018,显著低于对照组的比值 1.121 ± 0.049 (P < 0.05)。bcl-2 与 β-actin 的比值为 0.369 ± 0.051、0.121 ± 0.037、0.053 ± 0.011,与对照组的比值 0.736 ± 0.057 比较显著降低,见图 4。说明积雪草酸能下调 survivin 和 bcl-2 的基因表达。

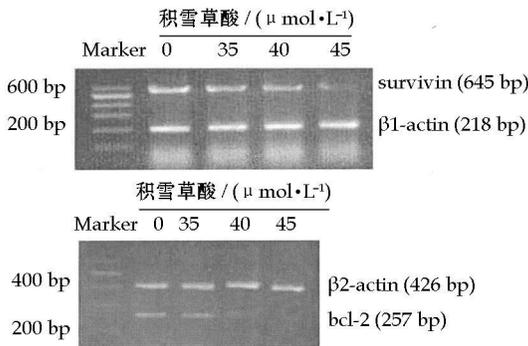


图 4 积雪草酸对 RPMI 8226 细胞 survivin 和 bcl-2 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of asiatic acid on expression of survivin and bcl-2 mRNA of RPMI 8226 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

积雪草酸是从药用植物积雪草中提取的三萜酸,属于五环三萜酸类化合物中的乌苏烷型。有报道证实积雪草酸对实体瘤具有显著的增殖抑制作用,如肝癌细胞、乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞、结肠癌

细胞等<sup>[10]</sup>。本实验结果表明积雪草酸对骨髓瘤细胞也具有明显的增殖抑制作用,有效浓度在 μmol/L 级,这与积雪草酸对实体瘤的有效作用浓度级别相同。而且积雪草酸对骨髓瘤细胞增殖抑制作用呈剂量及时间依赖性,作用 24、48、72 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 (42.25 ± 4.57)、(24.88 ± 3.51)、(19.83 ± 2.88) μmol/L。本实验研究发现积雪草酸能够诱导骨髓瘤细胞凋亡,主要表现为早期凋亡率的增加。当积雪草酸达 45 μmol/L,总凋亡率为 (89.27 ± 5.18)%,说明其是一种强效的抗肿瘤药物。

肿瘤细胞的周期与细胞增殖密切相关,主要表现在 G<sub>1</sub>/S、G<sub>2</sub>/M 两个检测点的调控。本实验结果显示,积雪草酸在 25~40 μmol/L,随着药物浓度的增加,G<sub>2</sub> 期的细胞比例由 (5.21 ± 2.37)% 上升为 (54.05 ± 5.66)%,可将 RPMI 8226 细胞阻滞在 G<sub>2</sub> 期。积雪草酸对肿瘤细胞周期的 G<sub>2</sub>/M 期检测点的调控在其他肿瘤细胞系中也有报道。Hsu 等<sup>[7]</sup>研究表明积雪草酸可以将乳腺癌细胞阻滞在 S-G<sub>2</sub>/M 期,其具体的机制与增强 P21/Cdc2 的相互作用,降低 Cdc2、Cdc25c、cyclinB1、cyclinA 的表达有关。

细胞凋亡是细胞自身调节的主动性死亡过程,细胞凋亡过程受到抑制是肿瘤发生、发展机制之一。因此细胞凋亡成为肿瘤治疗研究的一个重要领域,凋亡相关基因也成为抗肿瘤药物机制研究的重点。survivin 基因是近年发现的人类凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis family, IAPs) 的新成员,具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂增殖的功能。survivin 基因的组织分布具有明显的细胞选择性:胚胎组织和绝大多数肿瘤细胞都表达,而在分化正常成熟组织细胞中几乎不表达。临床研究发现,骨髓瘤细胞高表达 survivin,骨髓瘤患者表达率和表达水平显著高于正常人<sup>[11]</sup>。由于 survivin 基因的肿瘤细胞选择性和骨髓瘤细胞中的高表达性,因此 survivin 有可能成为多发性骨髓瘤治疗研究中的一个新的分子靶点。survivin 的调控机制复杂,能在多个水平进行调控,野生型 p53 在转录水平进行负调控,能抑制 survivin 表达<sup>[12]</sup>。在积雪草酸的抗肿瘤文献中,p53 表达是否增强存在争议。Yong 等<sup>[6]</sup>研究发现积雪草酸能通过升高细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的水平,从而增强 p53 的表达诱导肝癌细胞发生凋亡。而积雪草酸诱导乳腺癌细胞凋亡中,p53 水平没有明显变化<sup>[7]</sup>。原癌基因 bcl-2 是 bcl-2 家族中一种常见的凋亡抑制基因。bcl-2 不仅能通过调节线粒体通路抑制凋亡,而且过度表达可抑制放射线、化疗药等

诱导的细胞凋亡,也是肿瘤细胞耐药的主要机制<sup>[1]</sup>。总之,IAP 家族 survivin 和抗凋亡蛋白家族 bcl-2 是细胞凋亡的重要调控基因,分别作用于凋亡调节的不同层次。survivin 作用于 bcl-2 的下游,直接抑制蛋白酶 caspase-9、caspase-7、caspase-3 的活性,抑制细胞凋亡。bcl-2 通过调节引起线粒体破裂的离子失衡干扰细胞色素从线粒体的释放从而阻断蛋白酶连锁反应的激活。本实验结果显示,积雪草酸能下调 survivin 和 bcl-2 mRNA 水平,从而发挥促凋亡作用。但是否与增强 caspase-9、caspase-7、caspase-3 的活性,是否与调控 survivin、bcl-2 表达的 p53、Ca<sup>2+</sup> 的水平有关,尚需进一步的证实与研究。

综上所述,积雪草酸能通过调控细胞周期的进程和诱导细胞凋亡来抑制 RPMI 8226 细胞增殖。表明积雪草酸作为一种新型的抗肿瘤药物,在多发骨髓瘤治疗中具有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] Haridas V, Hanasek M, Nishimura G, *et al.* Triterpenoid electrophiles (avicins) activate the innate stress response by redox regulation of a gene battery [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(1): 65-73
- [2] 汤丽霞,杨光,谭家驹.积雪草酸诱导大鼠肝星状细胞凋亡[J].*中草药*,2009,40(增刊):230-232
- [3] Jew SS, Yoo CH, Lim DY, *et al.* Structure-activity relationship study of asiatic acid derivatives against beta-amyloid

- (A beta)-induced neurotoxicity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10(2): 119-121
- [4] 汤丽霞,杨光,谭家驹.积雪草酸抑制 HSG-T6 细胞 I 型胶原蛋白表达 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(13): 1178-1180
- [5] 陈军,华维一,孙宏斌.积雪草酸及其衍生物的生物活性研究概况 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 458-460
- [6] Lee Y S, Jin D Q, Kwon E J, *et al.* Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 186(1): 83-91
- [7] Hsu Y L, Kuo P L, Lin L T, *et al.* Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(1): 333-344
- [8] Park B C, Bosire K O, Lee E S, *et al.* Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(1): 81-90
- [9] Cho C W, Choi D S, Cardone M H, *et al.* Glioblastoma cell death induced by asiatic acid [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22(6): 393-408
- [10] Bunpo P, Kataoka K, Arimochi H, *et al.* Inhibitory effects of asiatic acid and CPT-11 on growth of HT-29 cells [J]. *J Med Invest*, 2005, 52(1): 65-73
- [11] 李娟,赵莹,张殿宝,等. Survivin 在多发骨髓瘤患者骨髓细胞中的表达及临床意义 [J]. *癌症*, 2005, 24(12): 1522-1526
- [12] Mirza A, McGuirk M, Hockenberry T N, *et al.* Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 2002, 21(17): 2613-2622
- [13] Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, *et al.* Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(1): 51-58

## 黄芪提取物对糖尿病大鼠冠状小动脉平滑肌张力的影响

李湘晖<sup>1,2</sup>, 航鹏洲<sup>1</sup>, 郭薇<sup>1</sup>, 杜智敏<sup>1,2\*</sup>

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院 临床药学药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 黑龙江省普通高校药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**目的 研究黄芪醇提取物对糖尿病大鼠冠状小动脉平滑肌张力的影响。方法 通过 ip 小剂量链脲佐菌素 (STZ) 及高脂饮食的方法诱导 2 型糖尿病大鼠模型,应用离体小动脉灌注技术研究去除血管内皮后,累积浓度黄芪醇提取液对正常大鼠和糖尿病大鼠冠状小动脉平滑肌基础张力的影响;观察黄芪醇提取物对苯肾上腺素 (PE) 或 KCl 预收缩的微血管环的作用。结果 STZ 和高脂饮食可致 Wistar 大鼠形成 2 型糖尿病,模型大鼠体重与对照组比较明显减少,模型组大鼠与对照组大鼠相比血清胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和游离脂肪酸 (FFA) 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),糖化血红蛋白 (HbA<sub>1c</sub>) 和空腹血糖值明显增高,并出现高脂血症 ( $P < 0.05$ )。黄芪醇提取物对糖尿病大鼠冠状小动脉环有舒张作用;对 PE 和 KCl 预收缩的去内皮冠状小动脉产生浓度依赖性舒张作用。结论 黄芪醇提取物对糖尿病大鼠冠状小动脉有舒张作用。

**关键词:**黄芪;糖尿病;冠状小动脉;血管舒张

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1488-05

\* 收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371647)

作者简介: 李湘晖 (1975-), 女, 黑龙江人, 主管药师, 硕士, 研究方向为临床药学。

Tel: (0451) 86605835 E-mail: xianghui@sina.com

\* 通讯作者 杜智敏 Tel: (0451) 86605353 Fax: (0451) 86665559 E-mail: dzm1956@126.com