

道的 CCI^[8] 模型特点相吻合。本实验采用该模型进行 GV 对神经病理性疼痛的镇痛作用研究, 结果表明, GV 具有抗神经病理性疼痛所致热痛敏作用。

综上所述, GV 具有显著对抗小鼠神经病理性疼痛作用与炎性疼痛作用。GV 的结构与钩吻素甲、*N*-甲基钩吻素甲极为相似, 因此推测 GV 的半数致死量可能与钩吻素甲、*N*-甲基钩吻素甲相近 (钩吻素甲和 *N*-甲基钩吻素甲对小鼠的 LD₅₀ 分别为 56.2、63.1 mg/kg^[10])。但本实验研究表明, GV 抗炎性疼痛第二相痛反应与抗神经病理性痛反应的 ED₅₀ 分别为 4.59、3.84 mg/kg, 提示 GV 用于治疗慢性疼痛的治疗指数远大于钩吻总生物碱, 安全性强, 具有开发应用前景。其作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 赵序利, 赵松云, 王瑞楠. 慢性疼痛的治疗 [J]. 中国临床医生, 2005, 33(9): 6-7.

- [2] 刘浩, 俞昌喜. 钩吻的研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(5): 469-472.
- [3] 谭建权, 邱成之, 郑林忠. 钩吻碱的镇痛作用和无依赖性 [J]. 中药药理与临床, 1988, 4(1): 24-28.
- [4] 周名璐, 黄聪, 杨小平. 钩吻总碱的镇痛、镇静及安全性研究 [J]. 中成药, 1998, 20(1): 35-36.
- [5] 沈洁, 苏燕萍, 许盈, 等. 高速逆流色谱分离纯化钩吻中钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1392-1395.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理试验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 227-228.
- [7] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response [J]. *Pain*, 1989, 38(3): 347.
- [8] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33: 87-107.
- [9]Coderre T J, Katz J, Vaccarino A L, et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence [J]. *Pain*, 1993, 52(3): 25.
- [10] 任引津. 实用急性中毒全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的影响

郭斌¹, 申洪波², 李智³

(1 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000; 2 辽宁医学院附属第二医院, 辽宁 锦州 121000;

3 中国医科大学天然药物研究室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 研究苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的作用, 并初步探讨其作用机制。方法 建立小鼠 Lewis 肺癌模型, 实验分为模型组、不同剂量苦参碱组、环磷酰胺组, 计算原发瘤抑制率及肺转移灶数; 采用 Western blotting 检测原发瘤组织基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 蛋白表达。结果 苦参碱各剂量组小鼠原发瘤抑制率、肺转移灶数与模型组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 苦参碱各剂量组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 苦参碱明显抑制小鼠 Lewis 肺癌原发瘤的生长和转移, 可能与其抑制肿瘤组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达有关。

关键词:苦参碱; Lewis 肺癌; MMP-2; MMP-9

中图分类号: R286.91; R979.1 文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2037-03

苦参碱 (matrine) 是从苦豆子中提取的一种生物碱。多年来的研究证明, 苦参碱具有广泛的药理学作用, 除了具有抗心律失常、抗炎、抗病毒等作用外, 体内外的抗肿瘤活性受到极大关注^[1-4]。研究表明, 苦参碱能抑制人肺癌 SPC-A-1 细胞的生长和人肺癌 A549 细胞的增殖, 抑制作用呈浓度依赖性^[5-7], 但仅局限于体外研究。本实验研究了苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用, 进一步研究其对

Lewis 肺癌原发瘤组织基质金属蛋白酶 2 (Matrix metalloproteinases 2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达的影响, 以探讨苦参碱对实体瘤的抑制作用, 并初步揭示其体内抗癌作用的分子机制, 为苦参碱应用于肺癌临床治疗提供实验基础及理论依据。

1 材料

1.1 试药: 苦参碱 (自制, 质量分数 98.3%); 环磷

收稿日期: 2010-04-09

基金项目: 辽宁省科技厅第二批药物源头创新研究课题 (200622603F-217)

作者简介: 郭斌 (1969—), 男, 辽宁锦州人, 副主任药师, 博士, 硕士生导师, 辽宁医学院附属第一医院药学部主任, 主要从事药用资源开发和筛选研究, 已发表论 5 篇。Tel: (0416) 4197079 E-mail: jyguobin@126.com

酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药公司, 批号 07041721; 兔抗鼠 MMP-2、MMP-9 单克隆抗体, 羊抗兔 IgG, 购自武汉博士德生物工程有限公司; 显色剂, Sigma 公司。

1.2 动物与瘤株: C57BL/6J 小鼠, 清洁级, 体质量 18~22 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 动物合格证号 SCXK (京) 2004-0001; 瘤株: 小鼠 Lewis 肺癌细胞株, 由中国医学科学院药物研究所提供。

1.3 仪器: PVDF 膜, Millipore 公司; 滤纸, Whatman 公司; 电泳仪, 美国 EC 公司。

2 方法

2.1 小鼠 Lewis 肺癌模型制备及分组: 将接种 Lewis 肺癌 10~14 d 的 C57BL/6J 荷瘤小鼠, 脱颈椎处死, 无菌冰浴条件下剥离瘤组织, 选取生长良好的肿块, 按肿瘤组织与生理盐水 1:3 比例匀浆, 筛网滤过, 调细胞数为 1×10^7 。另取 50 只小鼠, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 模型组, 苦参碱高、中、低剂量 (150、100、50 mg/kg) 组, 环磷酰胺 (20 mg/kg) 组。各组小鼠于右腋皮下接种肿瘤匀浆液, 0.2 mL/只, 接种后第 2 天开始 ip 给药, 隔日给药 1 次, 连续 21 d。末次给药 24 h 后脱颈椎处死各组小鼠, 取右腋皮下肿块, 并称质量, 计算抑瘤率 [抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 $\times 100\%$]。完整取出双肺, 苦味酸固定, 解剖显微镜下计数双肺表面的转移灶数。

2.2 Western blotting 检测 Lewis 肺癌组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达: 将各组 Lewis 肺癌原发瘤组织粉碎研磨成匀浆, 提取总蛋白, 加碱性铜测吸光度, 定量蛋白, 统一调整样品蛋白质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取 20 μL 样品液经 SDS-PAGE 电泳后转膜, 脱脂奶粉封闭过夜, 一抗 (1:200)、二抗 (1:2000) 各孵育 3 h; 显色剂显色, β -actin 作为内参进行检测。以条带的大小和深浅判定 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达量, Chem Imager 5500 凝胶成像图像分析系统测定各条带灰度值, 各组产物灰度值与 β -actin 灰度值比值作为各组产物的相对值^[8]。

2.3 统计分析: 采用 SPSS 13.0 软件统计包, 样本均数比较采用方差分析 ANOVA。

3 结果

3.1 苦参碱对 Lewis 荷瘤小鼠瘤质量及肺转移的影响: 用药 21 d 后, 苦参碱各剂量组瘤质量均显著低于模型组 ($P < 0.01, 0.05$); 高、中、低剂量组抑瘤率分别为 39.44%、22.65%、11.45%。模型组肺转

移灶大面多, 甚至形成融合灶; 苦参碱各剂量组肺转移灶小而少, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 苦参碱对 Lewis 荷瘤小鼠瘤质量及肺转移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of matrine on weight of tumor and number of lung metastasis focuses in Lewis tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	瘤质量/g	抑瘤率/%	肺转移灶数
模型	-	9	3.93 ± 0.57	-	13.68 ± 1.96
苦参碱	150	10	2.38 ± 0.51**	39.44	5.45 ± 2.56**
	100	10	3.04 ± 0.49**	22.65	7.80 ± 2.93**
	50	9	3.48 ± 0.56*	11.45	9.76 ± 1.98**
环磷酰胺	20	9	1.54 ± 0.42**	60.81	0.17 ± 0.41**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 苦参碱对 Lewis 荷瘤小鼠瘤组织 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响: 与模型组比较, 随着苦参碱质量浓度的增加, Lewis 肺癌肿瘤组织 MMP-2、MMP-9 蛋白条带逐渐变窄, 颜色逐渐变淡, 提示蛋白表达逐渐变弱 (图 1); 与模型组比较, 苦参碱各剂量组 MMP-2、MMP-9 相对灰度值明显减少 ($P < 0.01$), 见表 2。结果表明, 苦参碱对 Lewis 肺癌瘤组织 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达具有抑制作用。

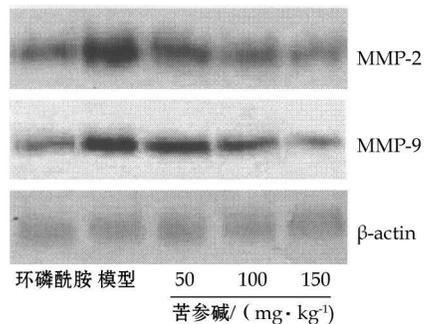


图 1 苦参碱对 Lewis 荷瘤小鼠瘤组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of matrine on MMP-2 and MMP-9 protein expression in Lewis tumor bearing mice

表 2 苦参碱对 Lewis 荷瘤小鼠瘤组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of matrine on MMP-2 and MMP-9 protein expressions of Lewis tumor bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MMP-2	MMP-9
模型	-	1.67 ± 0.08	1.39 ± 0.09
苦参碱	150	0.48 ± 0.12**	0.43 ± 0.07**
	100	0.72 ± 0.04**	0.96 ± 0.11**
	50	1.21 ± 0.10**	1.18 ± 0.08**
环磷酰胺	20	0.68 ± 0.09**	0.84 ± 0.09**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

本实验结合动物模型,研究苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑瘤作用,并初步探讨其抗肿瘤作用机制,为苦参碱治疗肺癌的临床应用提供实验基础及理论依据。结果表明,苦参碱可抑制荷 Lewis 肺癌的 C57BL/6J 小鼠原发瘤生长,使肿瘤肺转移灶减少,且具有剂量依赖性。

癌细胞从原发灶脱落后,必须突破细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基膜组成的结构屏障,才能向周围组织侵袭或进入血液循环及淋巴系统,进一步向远处转移^[9]。许多研究表明, MMPs 在正常组织没有或仅有较弱的表达,恶性肿瘤细胞中 MMP 的表达明显高于良性肿瘤和正常组织。一般认为与肿瘤浸润和转移关系最密切的是 MMP-2 和 MMP-9^[10]。此两种酶以酶原形式合成,在分泌出细胞的过程中被激活,能够降低、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质中的 IV 型、V 型胶原和明胶,然后肿瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润,最终导致肿瘤的侵袭和转移^[11]。应用 Western blotting 技术检测苦参碱对 Lewis 肺癌 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的实验结果表明,苦参碱能够显著抑制 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌原发瘤组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达,并有明确的量-效关系,可能是苦参碱抑制 C57BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌增长和转移的

机制之一。

参考文献:

- [1] 王磊,李庆林.苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展[J].安徽医药,2009,13(4):360-363
- [2] 张丽华,陈邦恩,潘明佳.苦参碱药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(6):1000-1003
- [3] 皇甫超申,刘彬,马永超,等.苦参碱诱导人肝癌细胞 BEL-7402 自吞噬性死亡[J].中草药,2008,39(9):1347-1350
- [4] 顾关云,肖年生,蒋昱.苦参的化学成分、生物活性和药理作用[J].现代药物与临床,2009,24(5):265-271
- [5] 龙发,王云,张永昶,等.苦参碱对人肺癌 SPG A-1 细胞作用的研究[J].实用医学杂志,2006,22(13):1483-1485
- [6] 钟梁,刘北忠,郝坡,等.苦参碱诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡及对人端粒酶逆转录酶表达的影响[J].中草药,2008,39(10):1507-1510
- [7] 雷怀定,刘先军,涂明利,等.苦参碱对体外人肺癌 A549 细胞的抑制作用[J].实用医学杂志,2006,22(15):1717-1719
- [8] 孙鹏,张清,韩继媛,等.体外模拟缺血再灌注条件下 BV-2 细胞 TLR4 信号途径对 TLR2 表达的影响[J].中国科学 C 辑:生命科学,2009,39(11):1013-1018
- [9] Stephanie C, Graeme I. Matrix metalloproteinase expression in tumor invasion and metastasis [J]. J Pathol, 1999, 189(3): 300-308
- [10] 宋牧,倪多,朱丽萍. VEGF、MMP-2 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(1): 57-59.
- [11] 王晨宇,王玉杰. MMP-2、MMP-9 及 P53 在膀胱移行细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(1): 57-59

胃肠安丸对腹泻型肠易激综合征大鼠的止泻作用及其机制研究

胡瑞¹,张桐茂²,唐方¹

(1 天津医科大学总医院 中医科,天津 300052; 2 天津医科大学第二医院 中医科,天津 300211)

摘要:目的 探讨胃肠安丸对腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 大鼠止泻作用及其机制。方法 采用高乳糖饲料喂饲与束缚应激相结合的方法制备 IBS-D 大鼠模型,通过比较各组大鼠体质量增长率、腹泻指数,确定最佳用药周期;硝酸还原酶法检测血清 NO 水平,紫外分光光度计检测小肠黏膜 LDH、MDH 活性,从而确定最佳剂量;胃肠安丸以最佳剂量、最佳用药周期作用于 IBS-D 大鼠,利用高效液相色谱法检测大鼠尿液中果糖、甘露醇水平,并计算两者比值 (L/M),利用生理信号采集处理系统采集在体空肠平滑肌运动波,比较各组平滑肌运动振幅。结果 胃肠安丸组与模型组体质量增长率均低于对照组,但胃肠安丸组体质量下降幅度小于模型组,用药后 4 d 两组间差值最大,且腹泻指数差异显著 ($P < 0.05$),确定最佳用药周期为 4 d;模型组血清 NO 水平、小肠黏膜 LDH、MDH 活性降低,尿液 L/M 值、平滑肌运动振幅增大,与对照组比较有统计学意义,中剂量胃肠安丸组血清 NO 升高、小肠黏膜 LDH、MDH 活力增强,与模型组比较差异显著 ($P < 0.01, 0.05$),确定中剂量为最佳剂量;中剂量胃肠安丸组尿液 L/M 值下降、空肠平滑肌运动振幅减小,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结论 胃肠安丸具有止泻作用,通过增加 NO 水平、提高 LDH 和 MDH 活性、降低尿液 L/M 值及降低空肠平滑肌运动幅度,从而发挥对 IBS-D 的整体性调节作用。

收稿日期:2010-02-27

基金项目:天津市科技创新专项基金项目 (06FZZDSH 00405)

作者简介:胡瑞 (1970—),女,天津市人,副主任医师,医学硕士,从事消化系统、心血管系统疾病医疗、教学及科研工作。

Tel: 18602612998 E-mail: hur0219@126.com