

表 1 桑黄云芝胶囊对 Lewis肺癌荷瘤小鼠

全血黏度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	全血黏度 ($\eta / \text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$)	
		低切 (1s^{-1})	高切 (180s^{-1})
肿瘤模型组	4	67.14 ± 5.56	4.97 ± 1.01
阳性对照组	5	48.77 ± 2.95	3.56 ± 0.38
桑黄云芝胶囊高剂量组	4	$58.12 \pm 2.07^*$	4.33 ± 0.50
桑黄云芝胶囊中剂量组	4	$56.84 \pm 1.50^*$	4.23 ± 0.49
桑黄云芝胶囊低剂量组	4	$59.59 \pm 0.73^*$	4.36 ± 0.15

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

3.3 对 Lewis肺癌荷瘤小鼠抑瘤率的影响

表 2 示,与肿瘤模型组比较,顺铂及高、中、低 3 个剂量桑黄云芝胶囊均具有明显抑制 Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的作用 ($P < 0.05$), 抑瘤率分别为 26.9%、21.2%、21.0%、24.6%。

表 2 桑黄云芝胶囊对 Lewis肺癌荷瘤小鼠瘤重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
肿瘤模型组	9	7.65 ± 1.00	
阳性对照组	10	$5.62 \pm 1.05^{**}$	26.9
桑黄云芝胶囊高剂量组	9	$6.03 \pm 1.11^*$	21.2
桑黄云芝胶囊中剂量组	9	$6.04 \pm 1.41^*$	21.0
桑黄云芝胶囊低剂量组	8	$5.77 \pm 1.32^*$	24.6

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 对 Lewis肺癌荷瘤小鼠肺转移的影响

表 3 桑黄云芝胶囊对 Lewis肺癌荷瘤小鼠

肺转移灶数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	转移灶数目	抑制率 (%)
肿瘤模型组	9	17.3 ± 5.4	
阳性对照组	10	$9.1 \pm 7.2^*$	47.4
桑黄云芝胶囊高剂量组	10	$9.9 \pm 5.9^*$	42.8
桑黄云芝胶囊中剂量组	9	11.3 ± 5.9	34.7
桑黄云芝胶囊低剂量组	8	10.5 ± 4.2	39.3

注:与模型组比较, * $P < 0.05$

表 3 示,顺铂组及桑黄云芝胶囊高剂量组荷瘤小鼠肺转移灶数目明显少于模型组 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 47.4%、42.8%,桑黄云芝胶囊中、低剂量组荷瘤小鼠

平均肺转移灶数均少于模型组,抑制率分别为 34.7%、39.3%,但都无统计学意义。

4 讨论

侵袭、转移是恶性肿瘤最本质的生物学特征,血液黏度诸因素的升高,可直接促进癌栓的滞留与转移。曾有报道证明肿瘤的浸润与血黏度有一定相关性^[2]。亦有报道称肿瘤的浸润、生长和转移与血液流变指标改变呈正相关,并证实活血化瘀中药治疗肿瘤,不仅可改善血液流变指标,亦可抑制肿瘤转移^[3]。

本实验研究结果显示,桑黄云芝胶囊均具有明显抑制 Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的作用 ($P < 0.05$), 抑瘤率分别为 26.9%、21.2%、21.0%、24.6%。且桑黄云芝胶囊高剂量组荷瘤小鼠肺转移灶数目明显少于模型组 ($P < 0.05$), 抑制率为 42.8%,表明桑黄云芝胶囊具有抑制肿瘤转移的作用,以高剂量最为明显。在低切 (1s^{-1}) 状态下各治疗组荷瘤小鼠平均全血黏度均低于肿瘤模型组,与肿瘤模型组比较均具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 表明桑黄云芝胶囊具有可以降低血液黏度。

由此可见,桑黄云芝胶囊对 Lewis肺癌荷瘤小鼠具有抑制肿瘤生长的作用,对肺转移具有抑制作用,可降低肺转移率,并可改善荷瘤小鼠的血液流变指标,降低血液黏度,改善血液高凝状态,这可能是其抑制肿瘤生长、转移的机理之一。

参考文献

- [1]徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:1769-1770.
- [2]高进.小鼠前胃癌(FC)皮下移植后肿瘤发展过程中血液流变学的研究[J].中华肿瘤杂志,1989,11(6):429.
- [3]李萍萍,孙红,史桂芝,等.移植瘤的血液流变学与活血化瘀中药作用的研究[J].肿瘤,2000,20(3):234-235.

* 山东中医药大学 (250355)

黄芪的抗氧化研究

丁瑞恒¹ 廖蕴华²

黄芪始载于《本经》,列为上品^[1]。古人用其“主治肌表之水也,故能治黄汗、盗汗、皮水。又旁治身体肿或不仁者。”经芪芍桂枝苦酒汤、防己茯苓汤、黄芪桂枝五物汤等验证,其对“身体、四肢肿,水气在皮肤中,汗出恶风,汗沾衣,色正黄如蘗汁,身体不仁,暮盗汗,腰骭弛痛”^[2]有较好疗效。为充分开发、利用我国丰富的药用植物资源,本实验分析了黄芪提取物清除自由基的效果,发现它们均具有一定的抗氧化性能。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

黄芪浸膏为广州康臣药业有限公司提供(批号 07-0611),取黄芪浸膏适量,加入计算量的纯净水,3000r/min离心 10min 取上清液,加入适量纯净水使浓度用“g 生药表达形式”为 0.6g 生药/ml 4℃ 储存备用;其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器

AnalystAD 酶标仪;美国 MD 公司。LDZ4-1.2 低速离心机;北京精力离心机有限公司。Sartorius BS224S/CB-

25A电子分析天平;北京赛多利斯仪器系统有限公司。雷磁 PHSJ-4A/JFP-8酸度计;上海精密科学仪器有限公司。DK2/CB253电热恒温震荡水槽;上海一恒科技有限公司。

2 实验方法

2.1 药物及试剂的配置

黄芪:0.6g生药/ml组织溶度:100g/L匀浆,红细胞浓度:5%。

2.2 方法与结果

2.2.1 对牛的肝、肾自发性脂质过氧化的影响 新生小牛处死后,迅速取肝脏、肾脏,装入冰盒带回实验室,在 0~4℃下用生理盐水制成 100g/L的组织匀浆。实验分为空白组、模型组、5个剂量的实验组、维生素 E组,每组平行 5管,每管加组织匀浆 1ml不同浓度药液 0.2ml混匀。37℃温育 2h按硫代巴比妥酸 (TBA)法^[3]测丙二醛 (MDA)含量。结果见表 1,空白组肝、肾匀浆不加诱发剂 H₂O₂溶液,模型组加 100mmol/L H₂O₂ 0.1ml 模型组肝、肾匀浆经 H₂O₂溶液诱发后 MDA含量较空白组显著升高 (P<0.01),黄芪提取物能剂量依赖性地抑制牛的肝、肾自发性 MDA生成,并呈量效关系,高浓度黄芪组的牛肝、肾中的 MDA含量与维生素 E组相近,均显著低于模型组。

表 1 各组对牛的肝、肾自发性脂质过氧化的影响

组别	终质量浓度 (mg/ml)	肝 (A530) ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	肾 (A530) ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白组	—	0.113±0.0021	—	0.115±0.0017	—
模型组	—	0.404±0.0022	100	0.506±0.0023	100
维生素 E组	0.2	0.130±0.0012**	32.17	0.14±0.0014**	27.68
黄芪组	0.156	0.144±0.0024**	35.64	0.165±0.0014**	32.61
	0.078	0.193±0.0018**	47.77	0.206±0.0025**	40.71
	0.039	0.251±0.0014**	62.13	0.282±0.0007**	55.73
	0.018	0.314±0.0022**	77.72	0.353±0.0022**	69.76
	0.009	0.393±0.0025*	97.28	0.415±0.0022**	82.01

注:与模型组比较, * P<0.01, ** P<0.05

表 2 各组对 H₂O₂ 诱导牛肝脂质过氧化的影响

组别	终质量浓度 (mg/ml)	肝 (A530) ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	肾 (A530) ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白组	—	0.106±0.0018	—	0.116±0.002	—
模型组	—	0.436±0.0025	100	0.542±0.0017	100
黄芪组	0.156	0.120±0.0018*	27.52	0.153±0.0012*	28.23
	0.078	0.176±0.0027*	40.37	0.197±0.0023*	36.35
	0.039	0.207±0.0018*	47.48	0.276±0.0025*	50.92
	0.018	0.287±0.0028*	65.82	0.337±0.0017*	62.18
	0.009	0.331±0.0014*	75.92	0.404±0.0022*	74.54

注:与模型组比较, * P<0.01

2.2.2 对 H₂O₂ 诱导牛肝脂质过氧化的影响 同前法制备 100g/L肝匀浆,分组同上。先在各管中加入 100g/L肝匀浆 1ml各浓度药液 0.2ml 37℃温育振荡反应 15min再向各管中加入 100mmol/L H₂O₂ 0.1ml继续温育反应 30min各管加入 200g/L三氯乙酸 1.5ml终止反应,

以 10000r/min离心 10min取上清液,加入 P=6.7g/L的 TBA 1.5ml并于沸水中水浴 15min同上测定 MDA的含量。结果见表 2。H₂O₂ 诱导大鼠肝组织匀浆 MDA的生成,作用 30min使 MDA的含量明显升高。黄芪提取物对 H₂O₂ 诱导大鼠肝组织匀浆 MDA的生成均明显的抑制作用,且量效关系明显。

2.2.3 对 H₂O₂ 诱导红细胞氧化溶血的影响 取小牛全血,用肝素抗凝,用生理盐水 (5min 2000r/min)离心洗涤后,配成 5%的红细胞悬液,分组同上,将红细胞悬液 1.0ml加入各浓度给药组和对照组的试管中,对照组给予等量生理盐水,将试管 37℃温育 10min后,加 50mmol/L H₂O₂ 0.5ml继续温育 1h 稀释 5倍后离心 (5min 2000r/min),取上清液在 530nm处测吸光值,以红细胞在对照组中的溶血率为 100%,计算红细胞溶血率。结果见表 3,黄芪提取物能显著抑制 H₂O₂ 诱导的红细胞氧化溶血。随着提取液浓度的增加,抑制溶血的效果增大。

表 3 各组对 H₂O₂ 诱导红细胞氧化溶血的影响

组别	终质量浓度 (mg/ml)	(A530) ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
空白组	—	0.117±0.0015	—
模型组	—	0.403±0.0014	100
维生素 E组	0.2	0.246±0.0029*	61.04
黄芪组	0.156	0.256±0.0024*	63.52
	0.078	0.274±0.0020*	67.99
	0.039	0.310±0.0015*	76.92
	0.018	0.352±0.0024*	87.34
	0.009	0.384±0.0014*	95.28

注:与模型组比较, * P<0.01

3 讨论

自由基,化学上也称为“游离基”,是含有一个不成对电子的原子团。自由基因为带有单数电子,具有高度的氧化活性,它们极不稳定,活性极高,它们攻击细胞膜、线粒体膜,与膜中的不饱和脂肪酸反应,造成脂质过氧化增强。脂质过氧化产物又可分解为更多的自由基,如此一再重复,引起自由基的连锁反应。MDA和 SOD、CAT、GSH-Px是目前公认的反应氧化应激水平的指标^[4]。人体新陈代谢会不断产生自由基,适量自由基对细胞的分裂、生长、消炎、解毒等起积极作用,但过剩会损伤细胞膜,使 DNA断裂、蛋白质变性、酶失活,最后导致细胞解体和死亡。空气污染、日光、辐射、药物或不当饮食,也会使身体产生自由基。自由基已知和诱发炎症、免疫失调、恶性肿瘤等多种疾病有关^[5]。脂质过氧化是氧自由基损伤组织的重要方式,其损伤途径为:氧自由基+细胞膜脂质→脂质过氧化反应→过氧化脂质→丙二醛。可见,脂质过氧化与氧自由基密切相关^[6]。氧自由基也是肝肾缺血性损伤的重要因素^[7]。因此,寻找利于人体吸收的抗氧化剂及自由基清除剂,目前正成为人们关注的重点。

体外诱导脂质过氧化损伤模型为观察药物清除自由基提供了有效的手段。体外诱导试验中 H_2O_2 为反应提供了大量活性氧化剂,诱发多不饱和脂肪酸氧化,形成过氧化脂质或引起红细胞膜脂质氧化、膜蛋白发生聚集,导致红细胞溶血。MDA是脂质过氧化的主要产物,所以能够通过测定 MDA和红细胞溶血程度可判断自由基的多少。本实验结果证实,黄芪可以有效地抑制牛的肝、肾匀浆自发性脂质过氧化、 H_2O_2 诱发的肝、肾匀浆脂质过氧化反应和 H_2O_2 所致红细胞溶血。同时在对脂质过氧化产物丙二醛 (MDA)的研究中,证实黄芪可以有效的降低体外组织的 MDA的生成。为临床运用黄芪进行抗氧化治疗疾病提供了理论依据。

参考文献

[1]《中华本草》编委会·中华本草[M]·上海:上海科学技术出版社,1995:341—355.

[2]曹炳章·中国医学大成(十)[M]·北京:中国中医药出版社,1997:256—257.

[3]陈奇·中药药理研究方法学[M]·北京:人民卫生出版社,1993:941.

[4]Elena A Iano·Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A over-expressed in brain tumors[J]·Cancer RES 1999; 2570—2576.

[5]Marx III·Oxygen free radical linked to many disease[J]·Science 1987, 235(4788): 529.

[6]邓柯玉,辛洪波,张宝恒·云南干草总皂苷清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]·中国药理学通报,1993,9(5): 350.

[7]Hess ML, Manson NH·Molecular oxygen: friend or foe·The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury[J]·J Mol Cell Cardiol 1984, 16(11): 969—985.

1 广西医科大学(530021)

2 广西医科大学第一附属医院肾内科

中药对环境内分泌干扰物染毒大鼠下丘脑 GnRH 及其受体、垂体 GH、FSH、LH mRNA 和蛋白表达的影响

乔丽丽* 孙春美* 沈伟勤* 樊志荣* 张小丽*

近年来随着环境污染的日益严重,环境内分泌干扰物(EEDs)导致的内分泌、生殖系统的疾病已越来越受到重视,这些大多具有拟雌激素活性,如果进入儿童体内,可与生殖器官上的雌激素受体结合,导致性早熟。大量临床研究已经证实了滋阴泻火中药对性早熟患儿具有显著疗效。为进一步探讨中药的作用机制,我们选择了两种具有代表性的 EEDs 辛基酚(OP)和双酚 A(BPA)复制染毒动物模型,并用中药进行实验干预,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 21天龄 Sprague-Dawley大鼠共 30只,体重(52±3)g 购自上海斯莱克凯实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。

1.1.2 药物 滋阴泻火中药方由生地黄 15g 炙龟甲 12g 知母 9g等组成,由复旦大学附属儿科医院中药制剂室煎制成浓缩合剂,每毫升约含生药 2.5g。

1.1.3 试剂及主要仪器 OP、BPA均购自国药集团化学试剂有限公司,促性腺激素释放激素(GnRH)及其受体、垂体生长激素(GH)、FSH、LH即用型 SABC试剂盒,DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。Real time PCR Master Mix(ToYoBo公司),上下游引物:上海生工公司合成。Olympus BH2型显微镜(日本)Panasonic MV-CP410型摄像机(日本),采用 MS细胞图像分析系统(上海中腾信息技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 未成年 SD雌性大鼠 30只随机分为染毒组、治疗组、对照组,每组 10只。染毒组(喂饲 OP100mg/kg+BPA100mg/kg)、治疗组(喂饲 OP100mg/kg+BPA100mg/kg+中药 40ml/kg)、对照组(喂饲玉米油),每天灌胃 1次,连续 14天,给药期间每天称重,根据体重调整药量,于末次给药后 24h 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,动物断头取脑,迅速分离下丘脑和垂体,并作免疫组化和 RT-PCR。

1.2.2 免疫组化 采用即用型 SABC试剂盒,阴性对照为不加一抗。Panasonic MV-CP410型摄像机采集图像入计算机,图像分析采用 MS细胞图像分析系统医学图像分析软件,分析电压为 4.18V,放大倍数为 200倍,测定阳性细胞面积。每张切片均随机选取 4个视野,取平均值。

1.2.3 RT-PCR 总 RNA 抽提采用 TRIZOL 试剂(In-vitrogen公司产品)提取制备总 RNA,经紫外分光光度计测定, A260 进行准确定量。利用计算机辅助设计软件 Primer5.0 进行引物设计。RT-PCR 取 2μg 总 RNA 经逆转录酶 MMLV 催化合成 cDNA,采用 SYBRgreen I 和实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行扩增。测定 GnRH 及其受体、GH、FSH、LH mRNA,其中 β-actin 作为模板质控。

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS 11.5 统计软件,用(±s)表示,RT-PCR 实验数据作对数转换后,组间比较采用单因素方差分析方法。