

0.050mg/ml 时肿瘤细胞的 24h 存活率均高于 48h。

Annexin V-FITC/PI 凋亡检测结果显示,在提取物作用 SGC7901 细胞 48h 后,其凋亡率随着浓度的增加而升高,作用明显,说明蜂房提取物对 SGC7901 的生长抑制作用很可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。但由于高浓度的 C2、D2 区的细胞比例最高,说明在该浓度作用下,其存活率降低可能还存在其他原因导致肿瘤细胞进入凋亡晚期或坏死。其存活率的降低,很可能存在多种途径;其中 PI 染色的细胞周期检测结果显示,蜂房提取物可导致 SGC7901 发生 G1 期及 G2 期阻滞,诱导细胞凋亡的作用,其作用呈剂量依赖性。

作为蜂房的组分,蜂胶的抗肿瘤活性已被多篇文献报道,但对蜂房的研究相对较少。本实验结果显示,蜂房确有体外抗肿瘤的活性成分存在,对五种肿瘤细胞均具有生长抑制作用,并且存在部分的时效和量效关系,与上述蜂胶研究的结果相似。在其有效浓度范围内,不同肿瘤细胞 48h 的存活率均低于 24h,呈时效关系,说明其抗肿瘤物质并未因溶剂成分及温度的改变而失去活性,提示其粗提物所含有的抗肿瘤活性物质可能具有相对稳定的化学性质以及可溶于极性溶剂的性质;根据现有对蜂胶的研究,初步推断可能含有萜类及黄酮类的物质。

参考文献

- [1]蔡新.蜂房治疗肿瘤的临床应用[J].江苏中医,1993,14(6):33.
- [2]魏金荣,张坤,关一夫,等.蜂房提取物对荷瘤鼠放化疗的增效作用[J].贵阳医学院学报,2008,33(5):462-464.
- [3]赵维成,肖伟,于德泉,等.蜂房抗肿瘤成分的提取及分析检测[J].实用肿瘤学杂志,2000,14(1):14.
- [4]魏金荣,潘忠诚,张玉魁,等.蜂巢提取物抗肿瘤作用的研究.2003 年 8 月东北三省生物化学与分子生物学学会,会议

交流

- [5]赵维成,逯晓波,陈立群,等.蜂房挥发油的提取、分析及生物活性的检测[J].中国新医药,2003,2(3):10-11.
- [6]Wang CD, Chen P, Jin HJ, et al. Nidus vespaee protein inhibiting proliferation of HepG2 hepatoma cells through extracellular signal-regulated kinase signaling pathways and inducing G1 cell cycle arrest[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008,40(11):970-978.
- [7]Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities[J]. J Nat Prod, 1998,61(7):896-900.
- [8]Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, et al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis[J]. J Nat Prod, 2000,63(9):1277-1279.
- [9]Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, et al. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities[J]. J Nat Prod, 2002,65(5):673-676.
- [10]Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 80(1):67-73.
- [11]司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2006:190.
- [12]赵俊霞,袁广峰,徐瑞雅,等.草菇培养物中粗三萜和黄酮含量及抗氧化抗肿瘤活性研究[J].菌物学报,2007,26(3):426-432.
- [13]黄兆胜.中药学[M].北京:人民卫生出版社,2002:506-507.

* 中国医科大学生化与分子生物学教研室(110001)

首乌益智胶囊对血管性痴呆大鼠 Notch/Delta 信号通路 Notch1、Jagged1 基因表达的影响

李长生¹ 张志友² 杨晓妮¹ 王运满³

血管性痴呆(Vascular Dementia, VD)是因脑血管疾病所致的智能及认知功能障碍的临床综合征。其病理机制主要有脑梗死、小血管疾病、白质损伤、神经元损伤几方面。近来一些研究表明 Notch/Delta 信号通路可对神经干细胞增殖分化起非常重要的调控作用。Notch/Delta 信号通路上游基因的激活,可促使神经干细胞向星形胶质细胞、少突胶质细胞的分化、增殖和维持,分泌神经营养因子,修复受损神经元。Notch1 受体与 Jagged1 配体结合,经过三次切割,形成 NICD-CSL 转录复合体,启动神经祖细胞向神经中间细胞向神经干细胞向星形胶质细胞、少突胶质细胞分化、增殖、发育。首乌益智胶囊主要由制何首乌、黄芪、益智等药物组成,具有补肾填精、化瘀通窍的功能,临床治疗 VD 效果显著。本研究采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(4-VO)法制造 VD 大鼠模型,选

取 Notch/Delta 通路上 Notch1、Jagged1 基因作为研究对象,利用实时荧光定量 PCR 检测上述基因的表达,了解中药首乌益智胶囊对 Notch/Delta 通路的调控作用,进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 清洁级健康老龄大鼠 100 只(月龄>15 个月),雌雄各半,体重 300~400g。山东大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号:010281。

1.1.2 药物与试剂 首乌益智胶囊(药物组成:制何首乌、黄芪、益智、天麻、丹参、地龙、川芎等,0.5g/粒,相当于含生药 1.6g)由济南钢铁职工医院制剂室生产。脑复康片由济南东风制药有限公司生产(0.4g/片,批号 0307043)。用蒸馏水配置成相应浓度的混悬液,4℃保

存,备用。

1.1.3 仪器与试剂 主要仪器:Mx3000Preal-time PCR 仪(STRATAGENE 公司),微量高速离心机(Eppendorf 公司),超净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司),紫外分光光度计(GeneQuant 公司),电泳仪、电泳槽(北京东方仪器厂),凝胶紫外分析仪(北京赛志创业科技有限公司);主要试剂:Trizol(invitrogen 公司),M-MuLV 反转录酶(Promega 公司),RNase inhibitor(TAKARA 公司),SYBR Real-time PCR 试剂盒(GenePharma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 迷宫学习训练 大鼠购进,室温 20~24℃,相对湿度 45%~55%,饲养 1 周后,Morris 水迷宫法进行大鼠行为学训练。水迷宫为一不锈钢圆形水池,直径 100cm,高 50cm,内置一平台,平台高 40cm,底面为 15cm×15cm。水深 41cm,水温 22℃。在水池壁标明 4 个入水点,由此将水池等分为 4 个象限,任选一象限正中放置平台,没于水下 1cm。方法:定位航行试验(placetest),每天下午 4 次,将受试大鼠按顺时针方向顺序面向池壁放入水中。记录 2min 内找到平台的时间(逃避潜伏期)。共学习 6 天。根据 Morris 水迷宫实验筛选学习记忆良好的大鼠 90 只。

1.2.2 VD 大鼠模型的制备 用 4-VO 法制造 VD 大鼠模型。大鼠于术前禁食 12h,不禁水。10%水合氯醛按 0.3~0.35ml/100g 腹腔麻醉,将大鼠俯卧固定,行背侧颈正中切口,逐层钝性分离,暴露双侧第 1 颈椎横突翼小孔,用直径约 0.5mm 的电凝针灼烧双侧翼小孔内的椎动脉,造成永久性闭塞,再将大鼠仰卧固定,行腹侧颈正中切口,钝性分离双侧颈总动脉,以 4 号丝线穿线备用。24h 后,用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5min,间隔 1h 后再夹闭 5min,共夹闭 3 次,局部伤口缝合前,以庆大霉素局部喷洒处理防止感染,术后 3 天给予青霉素 2U/kg 肌肉注射抗感染。假手术组步骤同上,不做缺血处理。在造模过程中保持动物肛温在 37℃左右。

1.2.3 造模后水迷宫测试 造模术后 7 天,对大鼠进行水迷宫测试。定位航行试验:历时 6 天,每天下午 4 次,将受试大鼠按顺时针方向顺序面向池壁放入水中。记录 2min 内找到平台的时间。前 5 天学习,第 6 天测试,记录测试成绩。空间探索试验:第 6 天下午定位航行试验后撤除平台,将大鼠从任意一点放入水中,拍摄游泳过程 1min,分析循行路径,统计其在原平台所在象限内外循行路径之比,和在该象限内外停留的时间之比,统计跨越原平台位置的次数。

评价造模成功的标准:以假手术组大鼠隐匿平台逃避潜伏期的平均值作为参照值,计算术后成活模型大鼠各时段隐匿平台逃避潜伏期平均值与参照值之差占该鼠隐匿平台逃避潜伏期的比值,若该值>20%为痴呆大鼠。

1.2.4 分组与给药 将术后造模成功的 42 只大鼠,按水迷宫定位航行测试成绩,随机分为 3 组,每组 14 只。并设假手术组 14 只。术后 7 天,给大鼠用灌胃器灌胃。灌胃液体温度为 20℃。首乌益智胶囊组,首乌益智溶液

灌胃,灌胃浓度 0.08g/ml。脑复康组,脑复康溶液灌胃,灌胃浓度 0.02g/ml。盐水组、假手术组,生理盐水灌胃。按 1ml/100g 体重供每天灌胃使用,每天下午灌 1 次,共灌胃 20 天。

1.2.5 荧光实时定量 PCR 检测 大鼠断头处死,快速暴露大脑,在冰盒上分离出右侧大脑皮质,取皮质 50mg,用 Trizol 法提取组织总 RNA。提取的总 RNA A260/A280≥1.8,且琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 条带清晰,说明所提取的 RNA 无降解。以每种总 RNA 样品 2μg 为模板,Random primer 0.5μg 为引物,42℃进行反转录反应 2hr,70℃ 5min 中止反应进行 cDNA 反转录。目的基因及 actin 的基因序列通过基因库(GeneBank)获得,引物采用 Primer Premier 4.10 软件设计,由 invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。参照试剂盒说明书,反应体系为 80μl,其中 2×SYBR Real-time PCR mix 40μl,样本 cDNA 2μl,上、下游引物各 1μl,ddH₂O 36μl。实时定量 PCR 反应在 STRATAGENE 公司 Mx3000Preal-time-PCR 仪上进行。反应程序为:95℃预变性 10min,然后 95℃变性 30s,58℃退火 1min,72℃延伸 40s,共 40 个循环。

当荧光信号强度超过基线时,其域值循环数(Ct 值)被记录下来。在实时定量 PCR 中,Ct 值被认为与被扩增基因的初始浓度密切相关。对于数据的处理,采用文献方法,将 Ct 值转换为相对倍数,ΔCt=Ct 目的基因-Ct GAPDH。

表 1 各基因引物序列

基因名称	引物类别	序列	扩增产物大小
Jagged1	Forward Primer	5'-AGACAGGCAG-GCGATCTGTGAC-3'	394bp
	Reverse Primer	5'-TTCCTGGGCTCCGTG-GTGA-3'	
Notch1	Forward Primer	5'-TGTTTCAGGGCGGT-GCTCA-3'	343bp
	Reverse Primer	5'-GCAGACACTGCTTC-CCAAAAGG-3'	
β actin(内参)			317bp

1.3 统计学方法

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计软件 SPSS 11.5 进行统计学分析,组间数据比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织 Notch1 mRNA 效应表达的比较

表 2 各组大鼠脑组织 Notch1 mRNA 效应表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Notch1mRNA 相对表达
假手术组	6	1.1±0.48*▲
模型组	5	2.32±0.86☆
脑复康组	6	2.57±0.10☆☆
首乌益智胶囊组	6	3.42±0.45☆☆*

与假手术组比较,*P<0.05;☆☆P<0.01;与模型组比较,*P<0.05;与脑复康组比较,▲P<0.01

表 2 示,首乌益智胶囊组 Notch1 基因相对定量较脑复康组和模型组明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明首乌益智胶囊可明显提高 Notch1 基因表达。

2.2 各组大鼠脑组织 Jagged1 mRNA 效应表达的比较

表 3 示,首乌益智胶囊组 Jagged1 基因相对定量较脑复康组和模型组增高,但无统计学意义($P>0.05$)。可能与用药时间短有关,一个神经干细胞或祖细胞经多次有丝分裂才能生成一个神经元。

表 3 各组大鼠脑组织 Jagged1 mRNA 效应表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	jagged1mRNA 相对表达
假手术组	6	1.08 $\pm$ 1.16
模型组	5	1.20 $\pm$ 0.68
脑复康组	6	1.16 $\pm$ 1.37
首乌益智胶囊组	6	1.49 $\pm$ 0.89

3 讨论

VD 属中医“呆病”范畴,其病性为本虚标实,肾精亏虚为本,瘀血阻络为标,治疗当以补肾填精、化瘀通窍为法。首乌益智胶囊方中何首乌补益肝肾、益精生髓,为君药。黄芪功专补气升阳;益智补肾阳,温肾经;天麻,富含液质滋补之性,能养液开郁化痰。三药合用鼓舞肾气以生精,助阳以化阴,共为臣药。丹参、地龙共为佐药,与君

药、臣药共达益气活血、化瘀通络、推陈致新、填精益脑、开窍益智之功。川芎辛温香窜,血中之气药,走而不守,为使药。全方配伍共奏补肾填精,化瘀通窍之功能。现代药理研究表明,何首乌能降低血脂、抗动脉粥样硬化,益智能清除自由基、对抗脂质氧化活性,黄芪能扩张脑血管、增加脑血流量,上述三药均有抗衰老的作用;丹参、地龙、川芎均可增加脑血流,降低脑血管阻力,改善脑代谢。本研究结果表明,首乌益智胶囊可能通过激活 Notch/Delta 信号通路,Notch1 受体与 Jagged1 配体结合,激活了 NICD-CBF 复合体基因,促进神经干细胞向星形胶质细胞分化,从而使得星形胶质细胞增殖活化,分泌众多神经营养因子,发挥神经保护作用。这为中医药防治脑 VD 提供了新思路、新方法,有重要的使用价值和理论意义。但是星形胶质细胞的发生发育可能有多种信号途径和机制参与了这一复杂的过程,首乌益智胶囊是否仅通过 Notch/Delta 信号通路其作用还需进一步研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672744)

1 山东省千佛山医院中医科(250014);

2 泰安医学院预防医学系;

3 同济大学附属医院分院内科

通讯作者:李长生,lichangsheng@sdhospital.com.cn,13791120858

温阳法对 SMMC-7721 和 Hepa1-6 肝癌细胞周期的影响

陈嘉璐* 李湧健*

以肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为主的原发性肝癌是世界第六大常见恶性肿瘤,近年来世界各地肝癌发病率均有上升趋势。HCC 病因涉及多因素、多步骤、多基因、多突变。实验证明:几乎所有的癌基因,抑癌基因的功能效应最终都会聚到细胞周期上来,许多癌基因、抑癌基因直接参与细胞周期的调控,或者本身就是细胞周期的调控机制的主要成分。肝癌组织中也发现多种细胞周期调节因子的异常。将作用于不同细胞周期时相应的药物联合使用,是肿瘤联合治疗的基础。但是当前的化疗模式存在明显副作用和剂量限制性毒性,肿瘤细胞对化疗药物存在天然耐药和获得性耐药,使用细胞毒性抗癌药物化学疗法治疗晚期恶性肿瘤,其生存益处微小。因此恶性肿瘤的多学科综合治疗中,中医药疗法已成为治疗恶性肿瘤的重要方法之一。

本实验以温阳的代表方四逆汤为研究对象,对扶正法治疗肝癌进行初步、系统的实验观察研究,以此探讨中医温阳法在肝癌治疗中的作用和机制,为临床应用提供理论依据,并在辨证基础上的合理选择有效方药提供临床基础。

1 实验材料

1.1 细胞株

SMMC-7721 肝癌细胞和 Hepa1-6 肝癌细胞由苏大生命科学院提供。

1.2 实验用药

1.2.1 注射用顺铂(冻干型)(齐鲁制药有限公司批号:8040051DB);取 5mg 顺铂干粉溶解于 5ml 完全培养液中,0.22 μ m 的微孔滤器除菌。

1.2.2 温阳方为四逆汤,制附子 10g,干姜 6g,炙甘草 6g。所有药物来自苏州春晖堂中药饮片厂。取附子 50g、干姜 30g、炙甘草 30g,加 3 倍量水,浸泡 0.5h,再加入 2 倍量水,回流提取 0.5h,过滤。取药渣再加入 3 倍量水,回流提取 0.5h,合并两次滤液。滤液浓缩适量,使得得到浓度为 1g 生药/ml 的浓缩液(110ml)。4℃冰箱保存。

1.2.3 实验分组 空白对照组顺铂阳性对照组:0.5mg/ml,0.075mg/ml。温阳组各剂量组:低剂量(10mg/ml)、中低剂量(25mg/ml)、中剂量(50mg/ml)、中高剂量(75mg/ml)、高剂量(100mg/ml)。以上中药提取物,生药浓度为 1g/ml,由苏州中医医院中药研究所提供。

1.3 试剂与配剂

1.3.1 培养基 DMEM 培养液(美国 GIBCO 公司,批号 1136820),三蒸水配制,用 HEPE(华义生物工程公司)