

在个别指标上出现的差异不足以引起三个复方的抗心肌缺血作用及其作用机理上的显著性差异,因此用土木香替换原方中的青木香或者去掉冠心苏合丸原方中的青木香都是合理的。

参考文献:

[1] 张金艳,马 瑩,李贻奎,等.冠心苏合丸系列组方对犬心肌梗死影响的比较药理学研究[J].中国中药杂志,2006 31(20): 1702

[2] 马 瑩,张金艳,李贻奎,等.冠心苏合丸系列组方的比较药理学研究[J].中国中药杂志,2006 31(16): 1353

[3] 李贻奎,宁可永,梁 嵘,等.大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进[J].中国新药杂志,2005 14(4): 99

[4] 成伶俐,马中富,马 虹.实验性急性心肌梗死中 Bax和 Bcl₂基因对心肌细胞凋亡的调控[J].岭南心血管病杂志,2002 8

(3): 206-209

[5] 朱妙章,袁文俊,吴博威,等.心血管生理学与临床[M].北京:高等教育出版社,2004 28-35

[6] 殷惠军,张 颖,蒋跃绒,等.西洋参叶总皂苷对急性心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2005 25(3): 232-235

[7] Ma X L, Cao F, Lopez B, et al. Peroxynitrite: a wounded sword in post-ischemic myocardial injury dichotomy of action in crystalloid versus blood-perfused hearts[J]. J Pharmacol Exp Ther 2000; 292(3): 912-920

[8] Hattori R, Hernandez TE, Zhu L, et al. An essential role of the antioxidant gene bcl₂ in myocardial adaptation to ischemia: an insight with antisense bcl₂ therapy[J]. Antioxid Redox Signal 2001; 3(4): 403-413.

龙胆多糖的体内抗肿瘤作用研究

江蔚新¹, 江 培², 张晓燕¹, 闫丽丽¹
(1.哈尔滨商业大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150076 2.沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016)

关键词: 龙胆多糖; 抗肿瘤; 增效减毒
中图分类号: R285.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-1528(2008)10-1530-02

当前肿瘤发病率很高。主要治疗手段化疗和放疗可导致强烈的毒副作用。开发具有增效减毒及抗癌双重作用的天然药物为目前研究热点。中药龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 (*Gentiana manshurica* Kitag)、龙胆 (*Gentiana scabra* Bge)、三花龙胆 (*Gentiana triflora* Pall)或坚龙胆 (*Gentiana rjescens* Franch)的干燥根及根茎^[1]。龙胆属于清热燥湿药,具有清湿热、泻肝火等功效,主治高血压、头晕、耳鸣、小儿高热抽搐、乙型肝炎、目赤肿痛、胸肋痛、胆囊炎、湿热黄疸、中耳炎、急性传染性肝炎、尿路感染、膀胱炎、阴部搔痒、小便淋痛、胃炎、消化不良等症。现代药理学研究表明,龙胆具有保肝、利胆、健胃、降压、抗炎、抗过敏、抗病原体、增强免疫功能以及对中枢神经系统功能的影响等多种药理作用。龙胆多糖是龙胆的有效成分之一,本试验主要对龙胆多糖的抗肿瘤作用及其对环磷酰胺的增效减毒作用进行研究。

1 材料

- 1.1 动物及瘤株
昆明种小鼠,体重(20±2)g小鼠肉瘤(S₁₈₀)购于黑龙江省肿瘤医院。
- 1.2 药品与试剂

龙胆购自哈尔滨市三棵树药品市场,由哈尔滨商业大学药学院江蔚新教授鉴定为龙胆科植物三花龙胆 (*Gentiana triflora* Pall)的干燥的根;阳性对照药:环磷酰胺(江苏恒瑞制药厂);其他试剂均为分析纯。

2 方法

- 2.1 龙胆多糖(GP)的制备及含量测定^[1]
称取一定质量的龙胆粉末,加入6倍量的石油醚,索氏提取两次,每次3h将粗粉中的溶剂挥干,加入6倍量的蒸馏水,超声提取两次,每次75min将提取液过滤并浓缩至1g/mL(按生药量计),加乙醇使其终浓度为85%,静置24h离心弃去上清液,将沉淀用2倍量蒸馏水溶解,save法除蛋白,离心弃去沉淀,反复多次。将水相溶液浓缩后再次醇沉过夜,沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,得到精制的龙胆多糖。苯酚一硫酸法测定多糖含量为206.42mg/g
- 2.2 龙胆多糖对小鼠S₁₈₀实体瘤的生长抑制作用^[2]
无菌条件下抽取接种7d生长良好的S₁₈₀荷瘤小鼠腹水,用无菌生理盐水1:4稀释,按0.2mL/只在小鼠右肢腋部皮下接种^[3]。接种后随机分组,每组12只。龙胆多糖剂量分别为20mg/kg(低剂量组)、40mg/kg(中剂量组)、80

收稿日期: 2008-01-16
课题来源: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(160219)。
作者简介: 江蔚新(1949—),男,硕士,教授,研究方向: 中药质量标准化,电话: 13504843857。

mg/kg高剂量组), 阳性对照组环磷酰胺剂量为 30 mg/kg (隔日给药, 共 4 次) 阴性对照组给相同体积的生理盐水。接种后 24 h 按剂量 ① 给药, 连续给药 8 d 末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死动物, 分别称体重, 分离腋下肿瘤并立即称瘤重, 计算肿瘤抑制率。

2.3 龙胆多糖对环磷酰胺治疗小鼠 S_{180} 实体瘤的增效作用 [4-5]

瘤株接种方法同上 2.2 项。接种后随机分组, 每组 12 只动物, 实验共分 6 组: ① 阴性对照组; ② 环磷酰胺组 (CTX) ③ 龙胆多糖 (GP) 40 mg/kg 组; ④ 环磷酰胺加龙胆多糖 (CTX + GP) 20 mg/kg 组; ⑤ 环磷酰胺加龙胆多糖 40 mg/kg 组; ⑥ 环磷酰胺加龙胆多糖 80 mg/kg 组。龙胆多糖腹腔注射, 每天 1 次, 连续给药 8 d 环磷酰胺腹腔注射 30 mg/kg 隔日给药, 给药 4 次。停药 24 h 后, 颈椎脱臼处死动物, 分别称体重, 分离腋下肿瘤并立即称瘤重, 计算肿瘤抑制率。

2.4 龙胆多糖对环磷酰胺治疗荷瘤小鼠的脾脏、胸腺重量的影响 [4-5]

瘤株接种方法同上 2.2 项。环磷酰胺按照 200 mg/kg 的剂量腹腔注射 1 次, 龙胆多糖以 20 40 80 mg/kg 剂量每天腹腔注射给药 1 次, 连续 8 d 停药 24 h 后处死动物, 称取脾脏及胸腺重量。

2.5 数据处理

结果均以 ($\bar{x} \pm s$) 数据统计分析采用方差分析, 以 SPSS 10.5 for window 统计软件, 判断有无显著性。

3 结果

3.1 龙胆多糖对小鼠 S_{180} 实体瘤的抑制作用

结果如表 1 所示, 龙胆多糖高、中、低各剂量组 S_{180} 小鼠平均瘤重均明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 抑瘤率分别为 49.13%、45.09% 和 31.21%, 抗肿瘤作用显著。

表 3 龙胆多糖对环磷酰胺治疗荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	每日剂量 (mg/kg)	n		胸腺重 /g	胸腺指数 / (mg/g)	脾脏重 /g	脾指数 / (mg/g)
		开始	结果				
Control	—	12	10	0.082 4 ± 0.017 6	2.75 ± 0.47	0.146 2 ± 0.016 2	4.88 ± 0.39
CTX	100	12	10	0.064 1 ± 0.013 2	2.21 ± 0.36	0.120 8 ± 0.018 7	4.17 ± 0.52
GP	20	12	12	0.081 3 ± 0.019 7	2.87 ± 0.52*	0.160 0 ± 0.012 7	5.64 ± 0.32*
	40	12	12	0.104 5 ± 0.011 43	3.36 ± 0.27*	0.180 6 ± 0.012 5	5.81 ± 0.28*
	80	12	11	0.074 9 ± 0.015 2	2.58 ± 0.41*	0.133 4 ± 0.015 1	4.60 ± 0.35*

与生理盐水组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

4 讨论

本实验观察到龙胆多糖组荷瘤鼠生存质量明显高于阴性对照组, 表现为肿瘤生长缓慢, 瘤体较小, 反应及活动均较敏捷, 食欲较好, 实验结束时亦无明显恶液质状态。而模型对照组小鼠瘤体生长快, 毛色暗淡, 反应迟钝, 食欲不振, 后期消瘦明显。说明龙胆中多糖毒副作用较小, 对肿瘤治疗有一定的意义, 值得进一步深入研究。

在增效实验的研究中, 单用环磷酰胺, 肿瘤抑制率为 58.75%, 单用龙胆中多糖中剂量组, 肿瘤抑制率为 46.09%, 当两药联用时, 环磷酰胺加龙胆中多糖中剂量组的肿瘤抑制

表 1 龙胆多糖对小鼠 S_{180} 实体瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	每日剂量 (mg/kg)	n		实体瘤重 /g	抑制率 /%
		开始	结果		
Control	—	12	12	1.73 ± 0.22	—
GTX	30	12	10	0.78 ± 0.29**	54.91
GP	20	12	11	1.19 ± 0.18*	31.21
	40	12	12	0.95 ± 0.21*	45.09
	80	12	12	0.88 ± 0.16**	49.13

与生理盐水比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.2 龙胆多糖对环磷酰胺治疗小鼠 S_{180} 实体瘤的增效作用

实验结果如表 2 所示, 环磷酰胺与龙胆多糖联用各组与 GP 或 CTX 单用相比抑瘤作用有所提高, 分别达到 59.32%、66.67% 和 70.06%, 与环磷酰胺组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 2 龙胆多糖对环磷酰胺治疗小鼠 S_{180} 实体瘤的增效作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	每日剂量 (mg/kg)	n		实体瘤重 /g	抑制率 /%
		开始	结果		
Control	—	12	11	1.77 ± 0.10	—
CTX	30	12	10	0.73 ± 0.06	58.75
GP	40	12	11	0.79 ± 0.04	46.09
CTX + GP	30 + 20	12	11	0.72 ± 0.08*	59.32
	30 + 40	12	12	0.59 ± 0.09*	66.67
	30 + 80	12	11	0.53 ± 0.06*	70.06

与 CTX 组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.3 龙胆多糖对环磷酰胺治疗荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数的影响

结果如表 3 所示, 环磷酰胺可降低小鼠的胸腺和脾脏重量, 而龙胆多糖可不同程度地升高化疗后荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数。

率为 66.67%, 环磷酰胺与龙胆中多糖联用, 其效应大于各自单独使用, 小于相加, 表现为次相加作用。在减毒的实验中, 治疗组药物可以明显增加模型小鼠的胸腺、脾脏指数。

由上述结论我们可以看出, 龙胆多糖是一种具有抗肿瘤和增效减毒双重作用的天然药物, 这对癌症的治疗具有重要的意义。本实验仅对龙胆中多糖的抗肿瘤作用进行了浅层研究, 龙胆中多糖具体通过那条途径发生了抗肿瘤作用尚未明确, 需要对龙胆中多糖的抗肿瘤作用机制进行深层的研究。

参考文献:

[1] 江蔚新,朱正兰. 超声波提取龙胆多糖的研究[J]. 中草药, 2005 36(6): 862-864

[2] 赵永娟.半夏多糖抗肿瘤作用研究[J]. 中国药理学通报, 2006 30(3): 368-371

[3] 陈 奇主编. 中药药理学研究方法学, 第 2版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006 1006-1030

[4] 苏富琴. 复合多糖抗肿瘤增效减毒作用的实验研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2007

[5] 胡志力, 等. 灵芝菌合剂抗肿瘤及增效减毒作用研究[J]. 山东中医药大学学报, 2003 27(6): 466-468

青蒿琥酯抑制血管新生作用的实验研究

李世辉, 潘 峻, 薛 芳
(河北医科大学第二附属医院血液科, 河北石家庄 050000)

关键词: 青蒿琥酯; 多发性骨髓瘤; 血管内皮细胞生长因子; 血管新生
中图分类号: R258.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-1528(2008)10-1532-02

青蒿素是从传统中草药黄花蒿中分离得到的高效、低毒的抗疟药物, 具有广泛抗癌活性, 李世辉^[1]等报道青蒿琥酯对骨髓瘤细胞具有显著的增殖抑制及凋亡促进作用, 本文拟对青蒿琥酯抗骨髓瘤作用机制进行深一步探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 青蒿琥酯, 购于桂林南药股份有限公司, 规格为 60 mg/支, 批准文号为 H10930195 使用前, 溶于磷酸盐缓冲液 (PBS)中配成 1 000 μ g/mL母液, 超滤除菌, -20℃保存。荧光 PCR检测试剂盒购于上海轩昊生物工程有限公司。VEGF β -Actin—抗、二抗为美国 Santz产品。四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、RPMI640培养液、小牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO) 均为美国 Biowares公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养 小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 由河北医科大学生物科技总公司提供。用含 10%小牛血清的 RPMI640培养液, 加入 NaHCO_3 2.2 g/L青霉素 100 U/mL和链霉素 100 g/mL, 置 37℃、5% CO_2 温箱培养中传代培养, 所有实验均在细胞处于对数生长期时进行。

1.3 青蒿琥酯对 SP2/0细胞的增殖抑制作用 试验当天, 细胞用胰酶消化后用 Hank's液将细胞洗下、离心; 用台盼兰染色, 镜下计数活细胞数, 用 RPMI640培养基调细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 将细胞接种于 96孔培养板中, 每孔加细胞悬液 200 μ L, 每组 3个复孔, 共设 5个组。加入青蒿琥酯, 其终浓度分别为 0 10 20 40 μ g/mL, 置温箱中培养。分别于 24 48 72 h后, 每孔加 MTT(5 mg/mL)20 μ L, 37℃培养 4 h后, 离心去上清, 加入酸化异丙醇 200 μ L使颗粒溶解, 用酶标仪测 570 nm处吸光度。计算抑制率, 抑制率 (%) = (1—试验孔 OD₅₇₀/对照孔 OD₅₇₀) \times 100%。

1.4 迁移试验 三维血管新生模型的构建: 将内皮细胞和微载体混合后置于 5% CO_2 37℃培养箱中摇摆培养 72 h, 在 24孔培养板的每孔中加 250 μ L含不同浓度青蒿琥酯的 1.0 mg/mL的纤维蛋白原, 用 1.5 μ L的凝血酶诱导聚合。数分钟后, 再加入 250 μ L含约 250个包被有内皮细胞的微载体于纤维蛋白原溶液中, 同法诱导聚合。加入 1.0 mL含 10%成人血清的含药培养液。

结果判断: 在规定观察时间上, 每个培养孔在倒置显微镜下, 随机取 3个视野, 然后测量出每条直线上“出芽”的长度, 并计算每孔中所有微载体上出芽长度的总和, 再计算出每个微载体上的平均出芽长度。

1.5 鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM)体内血管生长试验 将鸡受精卵去壳孵化, CAM通过一小窗口暴露部分, 不同浓度青蒿琥酯预先置入凝胶或纤维素膜中, 并在血管生长高峰 (第 7天)植入 CAM, 考察其抗毛细血管生长能力。72 h后解剖鸡胚, 将薄片周围 3 mm直径区域内的尿囊膜剪下, 镜下观察薄片周围毛细血管生长情况, (+)指无血管区超出甲基纤维素薄片覆盖范围, 直径达 6 mm或更多。 (+)占总数的比例为血管生成抑制率。

1.6 荧光定量 PCR检测 VEGF mRNA的表达 收集 10 μ g/mL青蒿琥酯作用 24 48 72 96 h后的 SP2/0细胞, 按实验室常规操作提取总 RNA, 各取 2 μ g制备 cDNA。按荧光 PCR试剂盒说明进行体系配置, 每个样本重复 3次。PCR反应及数据采集在 GeneAmp 5700 software 4.0系统进行分析。分别同时对 VEGF及内参照 GAPDH进行实时荧光定量 PCR扩增, 退火过程中搜集荧光信号, PCR完成后, 在 ABI Prism SDS2.1软件上分析 C_t值, 并计算相应的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行统计分析, $\Delta\Delta C_t$ = (试验组目的基因 C_t—试验组对照基因 C_t)—