

## 实验研究

## 灯盏细辛注射液对 MCF-7 细胞凋亡及血管生成作用的实验研究

李 炜<sup>1</sup>, 孟艳冬<sup>2</sup>, 赵 玲<sup>3</sup>, 丁诗语<sup>4</sup>, 孙 莉<sup>5</sup>

(1 济南市中医医院, 山东 济南 250012; 2 山东省教育学术交流中心;

3 山东大学医学院; 4 菏泽市医学专科学校; 5 东营市胜利医院)

**摘要** 目的: 观察灯盏细辛注射液对人乳腺癌 MCF-7 细胞的作用, 并从凋亡及抗肿瘤血管生成角度探讨作用机制。方法: 将灯盏细辛注射液作用于体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞, 检测相关指标。结果: 灯盏细辛注射液对 MCF-7 细胞的增殖有抑制作用。流式细胞仪检测证明, 灯盏细辛注射液可抑制 MCF-7 细胞的 Caspase-3、VEGF 表达。结论: 灯盏细辛注射液具有抑制凋亡及抑制血管生成的双重作用, 对 MCF-7 细胞总的效果表现为抑制。

**关键词** 灯盏细辛注射液; 细胞凋亡; Caspase-3; VEGF; 血管生成

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-6852(2006)09-0047-03

在抗肿瘤治疗中, 对细胞凋亡及血管生成途径的研究是近年来的热点。中医药中活血化瘀药物被认为是具有抗肿瘤作用的药物, 其作用途径也渐渐被揭示。活血化瘀药物灯盏细辛注射液, 近年来被用于多种心脑血管疾病、风湿病及部分癌症的治疗。笔者通过实验观察验证灯盏细辛注射液对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长状态的抑制作用, 探讨了其对细胞凋亡及血管生成途径的影响。

### 1 实验方法

**1.1 实验药物** 灯盏细辛注射液, 云南生物谷灯盏花药业有限公司生产, 批号: 20040911, 规格: 10 mL/支。

**1.2 细胞培养及传代** 所购人乳腺癌细胞系 MCF-7, 生长于 50 mL 培养瓶中, 置于 37℃, 饱和湿度, 含 5% CO<sub>2</sub> 的 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中无菌培养。传代在无菌操作台中操作, 用吸管 1 吸去培养瓶中的旧培养液, 用吸管 2 吸取 0.25% 胰蛋白酶液 2 mL 加入细胞培养瓶, 以刚没过细胞层为度, 静置约 2~5 min, 并不时在倒置相差显微镜下观察, 当细胞出现小块脱落, 细胞界限模糊不清时, 取吸管 1 小心吸弃胰蛋白酶液, 用吸管 3 加入 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清), 用吸管 1 轻轻吹打瓶壁细胞, 使其脱离瓶壁形成单细胞悬

液, 并将此悬液分装入新培养瓶, 用吸管 3 添加培养液至 4 mL, 继续培养。细胞生长至 3~5 d 左右, 于倒置相差显微镜下观察细胞长满贴壁, 即可进行下一次传代。

**1.3 生长抑制作用实验** 采用 MTT 法<sup>[1]</sup>, 将细胞传代的方法获得的人乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞悬液, 接种于 96 孔平底培养板中, 以含灯盏细辛注射液的培养液(5 μL/mL), 经 MTT 及 DMSO 作用不同时间后, 上酶联免疫检测仪于波长 490 nm 处测各孔吸光度值(OD<sub>490</sub> 值), 计算细胞生长抑制率: 生长抑制率 = (对照组平均 OD<sub>490</sub> 值 - 实验组平均 OD<sub>490</sub> 值) / 对照组平均 OD<sub>490</sub> 值 × 100%。

**1.4 流式细胞仪检测** 异硫氨酸荧光素 (FITC) 标记的鼠抗人 Caspase-3、VEGF 单克隆抗体, 检测 Caspase-3、VEGF 表达。所用试剂为美国 Pharmingen 产品, 由北京岳泰生物公司提供。Caspase-3、VEGF 表达量以标记荧光强度 (mean) 表示。

### 2 实验结果

**2.1 生长抑制作用检测结果** 在相同的作用时间, 灯盏细辛注射液对 MCF-7 细胞增殖有明显抑制作用, 与药物的作用时间无关。见表 1、表 2。

表 1 MTT 法测灯盏细辛注射液对人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h OD 值	48 h OD 值	72 h OD 值
对照组	2.093 ± 0.096	2.088 ± 0.082	2.064 ± 0.114
灯盏细辛组	1.230 ± 0.090	1.317 ± 0.146	1.304 ± 0.035

注: 方差分析, 与各时相处理组相比, P < 0.01, 各组不同时相相比, P > 0.05。

表 2 灯盏细辛对人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制作用

时间	抑制率 %
24 h	41.23
48 h	36.93
72 h	36.82

2.2 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞经以上各处理组培养 24 h, 对照组 Caspase-3、VEGF 荧光表达强度水平较高, 灯盏细辛组 Caspase-3、VEGF 荧光表达强度较对照组明显下降。Caspase-3、VEGF 荧光强度表达图显示: 经灯盏细辛注射液作用后 Caspase-3、VEGF 的荧光强度波峰较对照组显著左移, 见表 3、图 1、图 2。

表 3 各组对 Caspase-3、VEGF 的表达水平的影响

组别	Caspase-3 荧光强度	VEGF 荧光强度
对照组	14.12 ± 0.94	17.56 ± 1.81
灯盏细辛组	11.40 ± 0.60	7.52 ± 0.53

注: 方差分析, 较之对照组 P < 0.01。

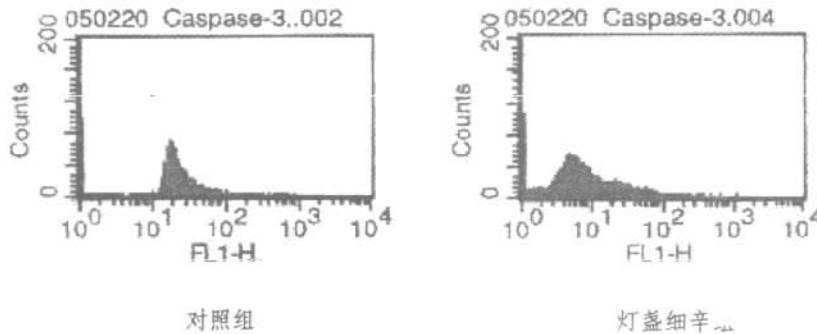


图 1 流式细胞仪检测 Caspase-3 荧光强度

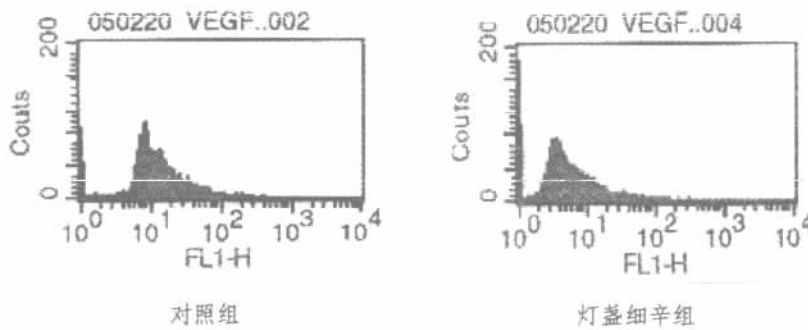


图 2 流式细胞仪检测 VEGF 荧光强度

### 3 讨论

近几十年来的研究表明, 肿瘤的快速生长有赖于新生血管的生成, 肿瘤微血管形成是实体瘤生长、浸润、转移及复发的前提, 诱导血管生成的能力在肿瘤发生的早期即表现出来, 是肿瘤固有的一种生物学特性。有关肿瘤血管形成活性因子方面的研究, 目前已分离纯化了 20 多种血管生成相关因子, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前所知作用最强、特异性最高的促血管内皮增殖的细胞调控因子, 在多种肿瘤中均有高表达, 是一个最具普遍意义的肿瘤微血管生成刺激因子。

凋亡 (Apoptosis, APO) 一词源于希腊语, 原意为秋天树叶脱落的景象。1972 年英国学者 Kerr 等率先将 Apoptosis 一词引入生物界, 提出了生物学中 Apoptosis 的概念, 认为凋亡是有核细胞在某些生理或病理条件下接受到某种信号的刺激, 启动其自身内部机制, 主要是通过内源性 DNA 内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程。因而又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)。它不仅细胞的发育、分化、成熟、死亡等过程中起着重要作用, 而且在肿瘤的发生、生长、细胞损伤反应、信息传递、抗肿瘤药物治疗的应用等方面, 具有重要意义。通过 APO 机体能及时地清除过多的、受损伤的或“危险的”细胞, 介导肿瘤细胞发生“自杀”死亡。

半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族是直接导致细胞凋亡的蛋白酶系统, Caspase-3 (cysteine protease p32 Yama, 又称 CPP32, Apoptin) 是细胞凋亡的关键蛋白酶。Caspase-3 以酶原形式合成, 激活后的 Caspase-3 作用于细胞骨架蛋白、核蛋白等, 使细胞碎裂, 产生形态学上可观察到的改变。有证据表明, 细胞凋亡的某些特征性标志, 如染色体凝聚和 DNA 片段化等, 均与 Caspase-3 有直接的关系<sup>[1]</sup>, Caspase-3 介导的蛋白水解还能使凋亡抑制物的功能灭活, 从而促进凋亡<sup>[3]</sup>。

活血化瘀药物是临床常用的抗癌治疗用药。灯盏细辛又名灯盏花, 性温味辛、微苦, 能散寒解表, 祛风除湿, 活络止痛, 消积。现代制剂用于治疗脑血管疾病<sup>[4-5]</sup>、心血管疾病<sup>[6-7]</sup>, 有学者认为其能明显减轻缺血再灌注损伤及其后继发的细胞凋亡<sup>[8]</sup>, 在对某些癌症的治疗中还可通过保持血管壁的完整性和血管的正常空间构形和形态而达到抗癌作用<sup>[9]</sup>。研究表明, 许多病理生理过程, 如创伤愈合、炎症、糖尿病视网膜病变、类风湿性关节炎等, 都与细胞凋亡或血管生成有关, 理论上考虑能够影响细胞凋亡及血管生成的药物对癌症或肿瘤也可产生正性或负性作用。

以上研究证实, 灯盏细辛注射液对抑制 MCF-7 细胞的增殖有效, 其可通过抑制 Caspase-3 的表达而表现出抑制凋亡的作用, 还可通过抑制 VEGF 的表达而表现出抑制血管生成的作用。这种相矛盾的综合作用效果仍表现为抑制, 提示活血化瘀药物在抗肿瘤治疗中的双重作用, 如果能够抑制或逆转其抑制凋亡的作用, 将更有益于发挥抗肿瘤作用。

#### 参考文献

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 M. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 250.
- [2] Poter Aglani eke RU Enerji ng,

- role of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.
- [3] Hshikawa K, Nakaki T, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase-3 in cultured human aortic smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 392(1/2): 19-22.
- [4] 吴育彬, 郑璇, 吴映华, 等. 灯盏细辛注射液治疗缺血性脑血管病的研究进展[J]. 汕头大学医学院学报, 2005, 18(1): 63-64.
- [5] 彭华, 温仙红. 灯盏细辛注射液治疗脑梗死的疗效观察[J]. 临床神经病学杂志, 2005, 18(1): 73.
- [6] 周文斌, 尹克春, 陈力, 等. 灯盏细辛注射液治疗冠心病心绞痛35例临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3): 261-262.
- [7] 林林. 灯盏细辛注射液对急性心肌梗死溶栓治疗后左心功能的影响[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(3): 358-359.
- [8] 刘华. 灯盏细辛对大鼠肾冷缺血再灌注损伤的保护作用及肾小管上皮细胞凋亡的影响[D]. 2004年硕士学位论文, 武汉: 武汉大学, 2004.
- [9] 周曾同, 张水龙, 华丽, 等. 灯盏细辛抗白斑癌变的功效及其血管生成机制的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2001, 36(2): 149-151.
- (收稿日期 2006-01-25)

## 糖脉康对实验糖尿病性自主神经病变大鼠心率变异性分析的影响

张宁宁<sup>1</sup>, 牟淑敏<sup>1</sup>, 孙蓉<sup>2</sup>, 王平<sup>2</sup>

(1 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011; 2 山东省中医药研究院)

**摘要** 目的: 观察糖脉康颗粒对糖尿病性自主神经病变模型大鼠的治疗作用, 探讨其作用机理。方法: 利用链脲佐菌素造成糖尿病自主神经病变, 并以糖脉康颗粒治疗 60 d, 观察其对血糖、血脂、血液流变学及心率变异性指标的影响。结果: 糖脉康颗粒能降低糖尿病大鼠血糖、血脂及全血黏度, 改善血液流变学; 明显提高心率变异性分析的 SD、MSDD 指标, 降低 LF/HF、RR-25 比值。结论: 糖脉康颗粒能提高糖尿病大鼠交感及迷走神经张力, 改善两者的平衡关系, 该作用可能与有效控制血糖, 改善微循环障碍等因素有关。

**关键词** 糖脉康颗粒; 糖尿病性自主神经病变; 心率变异性; 血糖; 血脂; 血液流变学

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-6852(2006)09-0049-02

糖脉康颗粒是临床治疗糖尿病的常用药物之一, 笔者用于治疗糖尿病合并神经病变取得良好疗效, 为了研究其治疗机理, 利用链脲佐菌素造成糖尿病自主神经病变大鼠模型, 观察中药复方糖脉康颗粒对心率变异性分析 (heart rate variability, HRV)<sup>[1]</sup> 的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 wistar 大鼠, 体重(150±20) g, 山东大学实验动物中心提供, 合格证号为鲁动质字 200001003 号。

1.1.2 药物和试剂 糖脉康颗粒 (下称糖脉康), 由黄芪、生地黄、丹参、黄精、牛膝等药物组成, 由中国中医研究院中汇制药公司提供, 批号: 990705, 用蒸馏水配成溶液, 每毫升含生药量 4.5 g; 血糖测试试剂为日本京都产品; 总胆固醇、甘油三酯测定试剂为浙江温州东鸥生化试剂公司产品; 弥可保片, 日本卫材株式会社生产, 批号: 990022,

500 μg/片。

1.1.3 仪器与设备 Gilcocard 血糖仪 (日本); QL-7200 型全自动生化分析仪 (日本); Low shear-30 黏度仪 (瑞士); 心电图率变异分析工作站 (南京)。

#### 1.2 方法

1.2.1 模型建立 按文献方法造模<sup>[2]</sup>, 链脲佐菌素 (STZ) 0.1 mol/L, pH4.5 柠檬酸缓冲液在冰域中新鲜配置, 大鼠尾静脉注射 STZ 溶液, 50 mL/(kg·d), 共 10 d, 抽测空腹血糖 >13.8 mmol/L 者为糖尿病模型 (STZ-DM) 复制成功大鼠, 每月注射 STZ 溶液, 15~30 mL/(kg·次), 注射 2 次, 4 个月注射 STZ 溶液 1 次, 35~45 mg/(kg·次), 维持空腹血糖 >13.8 mmol/L。分笼自然饲养, 室温 22℃, 相对湿度 50%。

1.2.2 实验分组及给药方法 STZ-DM 大鼠 40 只, 随机分为模型组 (STZ-DM)、糖脉康组 (STZ-DM+糖脉康 5.4 g/kg), 每组 10 只。成模 6 个月后, 治疗组按 0.01 mL/kg 给药 (按

第一作者简介: 张宁宁 (1952—), 女, 副主任医师。研究方向: 心血管内科疾病的研究。