

pathic pain. Neurosci Lett 2010; 480(2): 132~137

2009; 21(2): 58~60

15 王壮, 石钊, 于泳浩, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸转运体与疼痛. 天津药学,

## The effects of sophocarpine on the GABA signaling pathway in mice with neuropathic pain

Jin Shaoju<sup>1,2</sup>, Ren Liping<sup>1</sup>, Ma Benhui<sup>3</sup>, Guo Liucheng<sup>1</sup>, Wang Yanmei<sup>1</sup>, Wang Wenbao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Luohe Medical College, Luohe 462002; <sup>2</sup>Tumor Occurrence and Prevention Research Innovation Team of Luohe, Luohe 462002; <sup>3</sup>The Foreign Language Teaching Department, Luohe Medical College, Luohe 462002)

**Objective:** To investigate the analgesic effects and GABA signaling pathway mechanism of sophocarpine in mice with neuropathic pain induced by chronic constriction of sciatic nerve injury (CCI). **Methods:** The neuropathic pain mice model were induced by chronic constriction of sciatic nerve injury, using the Von Frey Filaments system, radiant heat test and cold-plate test to detect the effect of sophocarpine on paw withdrawal mechanical threshold (PWMT), thermal withdrawal latency (TWL) and cold withdrawal threshold (CWT); using the RT-PCR to assess the expressions of gamma aminobutyric acid (GABA), glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) and gamma-aminobutyric acid transporter-1 (GAT1) in the spinal cord of CCI mice. **Results:** Compared with the CCI model group, the sophocarpine (40, 20mg/kg) could increase the CCI mice's PWMT and TWL, decrease the CWT; the sophocarpine (40, 20mg/kg) could up-regulate the CCI mice's spinal cord tissue mRNA expression levels of GABA and GAD65, and down-regulate the GAT1 mRNA. **Conclusion:** Sophocarpine has anti-nociceptive effects on neuropathic pain induced by CCI, and its mechanisms is related to up-regulate the GABA and GAD65, down-regulate the GAT1.

**Key word** sophocarpine (槐果碱); neuropathic pain; anti-nociceptive; GABA; GAD; GAT

## 连翘苷对动脉粥样硬化模型大鼠的治疗作用及机制研究\*

周楠茜<sup>1</sup>, 李鹏<sup>2</sup>, 石卫东<sup>1\*\*</sup>, 白素平<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>吉林大学中日联谊医院超声科, 长春 130033; <sup>2</sup>新乡医学院药学院, 新乡 453003)

**摘要** 目的: 探讨连翘苷对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型大鼠的治疗作用及其机制。方法: 将48只清洁级SD大鼠随机分为6组: 正常组、模型组、洛伐他汀6mg/kg组、连翘苷50mg/kg组、连翘苷100mg/kg组、连翘苷150mg/kg组, 每组8只。实验采用高脂饲料+右侧颈总动脉球囊损伤+腹腔注射维生素D3的方法复制AS大鼠模型。4周后正常组用等量生理盐水ig, 洛伐他汀6mg/kg ig, 连翘苷50、100、150mg/kg, 1次/d, 10周后超声下观察右侧颈总动脉形态并计算AS斑块面积; 肉眼及光镜下观察右侧颈总动脉形态; 检测右侧颈总动脉血管舒缩功能; 检测血管组织中AS相关炎症因子和氧化性指标; 免疫组化和Western技术检测钠氢交换蛋白1(Sodium hydrogen exchange protein 1, NHE-1)的蛋白表达水平; PCR技术检测NHE-1的基因表达水平。结果: 150mg/kg连翘苷可以减小AS斑块面积; 提高动脉舒缩功能; 降低血管组织细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、血管细胞间粘附分子-1(VACM-1)、白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)含量, 增加大鼠组织中NO、SOD含量并减少MDA含量; 降低血管组织NHE-1的蛋白表达水平和基因表达水平。结论: 150mg/kg连翘苷有可能通过降低NHE-1的基因和蛋白表达减少机体氧化应激, 进一步降低AS相关炎症因子, 起到治疗AS的作用。

**关键词** 连翘苷; 动脉粥样硬化; 钠氢交换蛋白1

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2016.03.008

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多种心脑血管疾病的病理生理基础, 发病机制复杂, 临床上多以他汀类降血脂药物辅助治疗为主<sup>[1]</sup>。钠氢交换蛋白(Sodium hydrogen exchange protein)是一类存在于细胞膜表面的离子转运蛋白家族, 共有9个家族成员<sup>[2,3]</sup>, 其中NHE-1通过Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交换调节细胞内pH值, 维持细胞内pH值在中性或偏碱性<sup>[4,5]</sup>。研究表明,

NHE-1参与AS、高血压、心力衰竭等多种心脑血管疾病的发生<sup>[6,7]</sup>。连翘苷具有降血脂和抗氧化作用<sup>[8]</sup>, 本研究采用高、中、低剂量的连翘苷, 观察其对AS模型大鼠血管组织NHE-1表达的影响以及对AS治疗的作用, 并探讨其机制。

### 1 材料与方法

\* 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072552)

\*\* 通讯作者

1.1 试验药物 连翘苷,中国药品生物制品检定所,HPLC $\approx$ 100% 批号:110821-200609);洛伐他汀,江苏苏中药业集团股份有限公司,批号:H19990033。

1.2 动物 清洁级雄性SD大鼠,4~5月龄,体质量为200~300mg(由河南省试验动物中心提供,许可证号SYXK-豫-005-0012)。动物房温度18℃~22℃,环境洁净度4000~6000级,相对湿度45%~55%,换气次数25次/h,气流速度0.15~0.25m/s,多级定向控制空气压差15%~20%,自动定时器控制7:00~19:00为光照期,19:00~07:00为黑暗期,常规SD大鼠及二次净化水饲养。

1.3 试剂 NHE-1多克隆一抗,美国Sigma公司,批号:SBP4379;VACM-1 Elisa检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,批号:024344\_96T;IACM-1 Elisa检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,批号:027688\_96T;IL-1 Elisa检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,批号:028611\_96T;IL-6 Elisa检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,批号:002828\_96T;NO Elisa检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,批号:002811\_96T;SOD检测试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:30655\_96T;MDA检测试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:30688\_96T。

1.4 仪器 Vevo 770小动物超声成像系统,加拿大Visual Sonics公司;四通道离体血管张力测定系统,丹麦DMT公司;Synergy H4多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;实时荧光定量PCR仪,美国Thermo Fisher科技有限公司。

1.5 方法 将大鼠随机分为8组:①正常组;②模型组;③洛伐他汀6mg/kg组灌胃;④连翘苷50mg/kg组;⑤连翘苷100mg/kg组;⑥连翘苷150mg/kg组(150mg/kg灌胃)。采用高脂饲料+右侧颈总动脉球囊损伤+腹腔注射维生素D3方式混合造模。VitD3针30万单位/200mg腹腔注射,1次,然后给予高脂饲料。大鼠高脂饲料配方:基础饲料(81.5%)、猪油(10%)、胆酸钠(0.5%)、胆固醇(3%)、白糖(5%)。高脂饮食按照150g/d进食。4周后实施颈总动脉内膜损伤手术,将直径为2mm的球囊插入至右侧颈总动脉中段,扩张球囊,反复牵拉3次,导致右侧颈总动脉内膜损伤。继续以高脂饲料喂养,总时长10周。

1.5.1 超声形态学观察 大鼠在2%异氟烷吸入麻醉下仰卧位固定于37℃恒温加热板上,颈部脱毛并涂上耦合剂。在Visual Sonics的Vevo 770高分辨小动物超声成像系统下,选用MS-550D探头及B超模式,探头方向为90°,频率24MHz,脉冲40KHz。对准气管位置,缓慢移动探头到颈部,直到获得清晰图像,以气管强回声光影为标志,微移动探头,即可获得颈动脉的图像。

1.5.2 病理形态学观察 动物麻醉取血后,取颈主动脉1.5cm肉眼观察,拍照后置于10%的中性甲醛液中固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋并制成石蜡切片,行苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)组织学染色,在显微镜下观察。

1.5.3 血管舒缩功能检测 动物麻醉取血后,迅速取颈动脉或主动脉标本,置于氧饱和的Krebs-ringer液的培养皿内,分离血管周围组织,清除血管内血液,切成4~5mm固定长度的血管环,观察不同浓度药物对血管张力的影响。

1.5.4 Elisa 取颈总动脉,按照Elisa试剂盒说明进行操作,包被→加样→加酶标抗体→加底物液显色→终止反应,在450nm

波长处测定各孔的OD值。以吸光度OD值为纵坐标,相应的试剂盒标准品浓度为横坐标,做得相应的曲线,计算出标准曲线方程。将样品的OD值代入到标准曲线方程中,分别计算出VACM-1、IACM-1、IL-1、IL-6、NO、SOD、MDA含量。

1.5.5 免疫化学 血管组织匀浆,PBS(pH 7.4)液洗涤3次,每次1min→95%乙醇固定20min,PBS液洗涤2次,每次1min→0.01mol/L的枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)进行抗原修复→加过氧化酶阻断内源性过氧化物酶活性→正常非免疫动物血清室温封闭30min→滴加1:200的NHE-1多克隆一抗稀释液,4℃过夜→滴加1:1000辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗稀释液,室温孵育40min→滴加酶及显色液→Mayer苏木精复染,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片→显微镜下观测、拍照→使用光密度分析软件处理分析。

1.5.6 Western blot 血管组织匀浆,加入预冷的细胞裂解液,收集蛋白样品,用ABC法检测蛋白浓度→在收集的蛋白样品中加入8%SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,100℃或沸水浴加热3~5min,以充分变性蛋白→冷却到室温后,每条泳道以60μg蛋白上样到SDS-PAGE胶加样孔,SDS-PAGE电泳液→转膜加入1:200的NHE-1多克隆抗体稀释液,4℃孵育过夜→TBST洗膜3次,再加入1:1000辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗稀释液,置室温2h显色→使用光密度分析软件处理分析。

1.5.7 qPCR 血管组织匀浆,加入1ml Trizol溶液,混匀,室温放置5min使其充分裂解→加入200μl氯仿,剧烈振荡混匀30s,使水相和有机相充分接触→4℃下离心15min,上层水相吸取RNA→加入等体积异丙醇沉淀RNA→4℃下离心10min,收集RNA→使用RNase-free的DNase I加入等体积的苯酚/氯仿,离心15min,取上清→取RNA样品1μl,1%琼脂糖凝胶电泳80V×20min,EB染色10min,用凝胶成像系统观察并拍照→置85℃保温5min,使RNA变性→1:20稀释cDNA→上机检测。采用相对定量的方法,以管家基因GAPDH为内参对照,GAPDH基因上游引物序列:5'-AACCTGTGCCACTCTACGAGGGG-3';下游引物序列:5'-ATGATGGAGTTG AAGGTAGTTTCGTGGAT-3';扩增产物长度为102bp。引物由宝生物(TaKaRa)大连有限公司合成。正反向引物序列(5'-3'),e1:GAGCTGAAAACAGCACTTGA,e2:AACGGTCTGTTGGTTTAGCC,扩增产物长度为89bp。数据的收集和分析:qPCR反应完成后,数据的收集和分析主要由相应计算机分析软件PikoReal Software 2.1完成。通过软件按要求调整基线循环和阈值后,计算出其相应的Ct值。Ct值和起始拷贝数有对应关系。本研究数据分析用 $\Delta\Delta C_t$ 法进行目的基因表达的相对定量。

## 2 结果

2.1 超声形态学观察 超声下观察发现,模型组与正常组相比,内模连续性紊乱,回声不均匀;球囊损伤处有强回声区,呈现明显光斑,光斑面积为 $1.23 \pm 0.24 \text{ cm}^2$ 。连翘苷能够明显减轻球囊损伤处回声强度,光斑亮度减弱,呈剂量依赖性,连翘苷150mg/kg组光斑面积为 $0.85 \pm 0.16 \text{ cm}^2$ ,与模型组比较有明显差异,见图1。

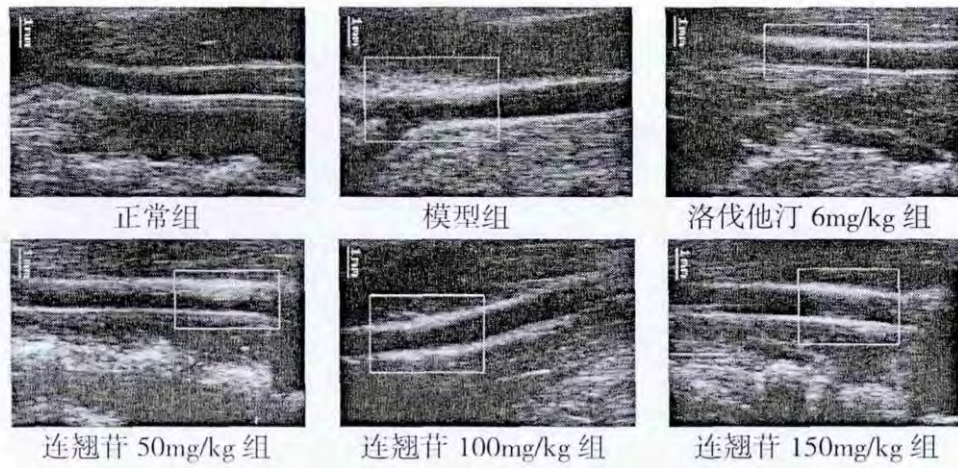


图1 超声下观察 AS 大鼠颈总动脉形态学变化( Frequency 24MHz ,PRF 40KHz)

2.1 病理形态学观察 肉眼形态学观察发现 模型组与正常组相比 ,内皮损伤明显 ,能清楚看到黄色的粥样硬化斑块;连翘苷能够减轻模型大鼠血管内皮损伤 ,使内皮连续性增强、弹性增加 ,粥样硬化斑块明显缩小甚至消失 ,且有一定的剂量依赖性

(图2);光镜下观察 ,连翘苷使模型大鼠血管内皮相对光滑 ,内皮细胞胞核染色相对均匀 ,细胞间隙相对清晰 ,内皮下肌层排列相对规整 ,并且有剂量依赖性 ,见图3。

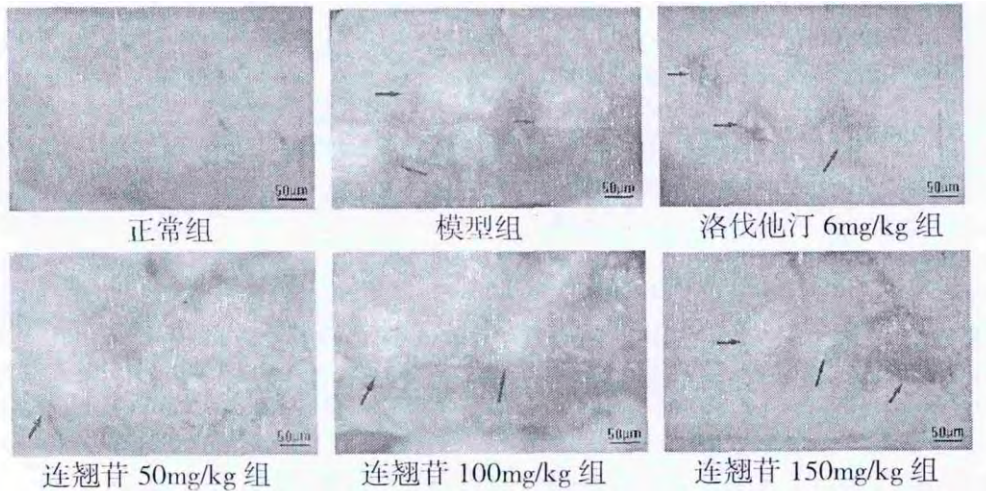


图2 体式显微镜下观察 AS 大鼠颈总动脉形态学变化(肉眼 40×)

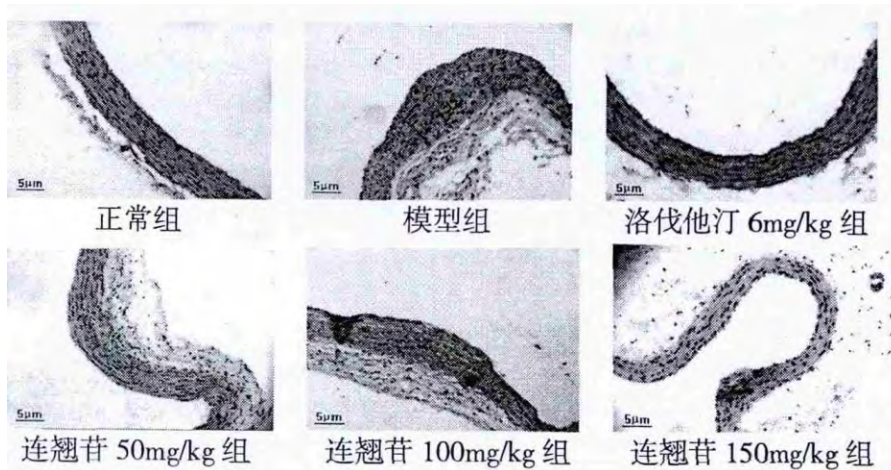


图3 光学显微镜下观察 AS 大鼠颈总动脉形态学变化(HE 染色 400×)

2.3 血管舒缩功能检测 模型组 Ach Emax 为 45.64 ± 6.87% 连翘苷明显增加 Ach Emax 值 ,且具有剂量依赖性 ,连翘苷 150mg/kg 组为 68.57 ± 8.76% ,与模型组比较具有显著性差异

(P < 0.05);模型组 Ach EC<sub>50</sub> 为 2.49 ± 0.48µmol/L 连翘苷明显增加 Ach EC<sub>50</sub> 值 ,且具有剂量依赖性 ,连翘苷 150mg/kg 组为 1.92 ± 0.45µmol/L ,与模型组比较具有显著性差异 ,见表1 图4。



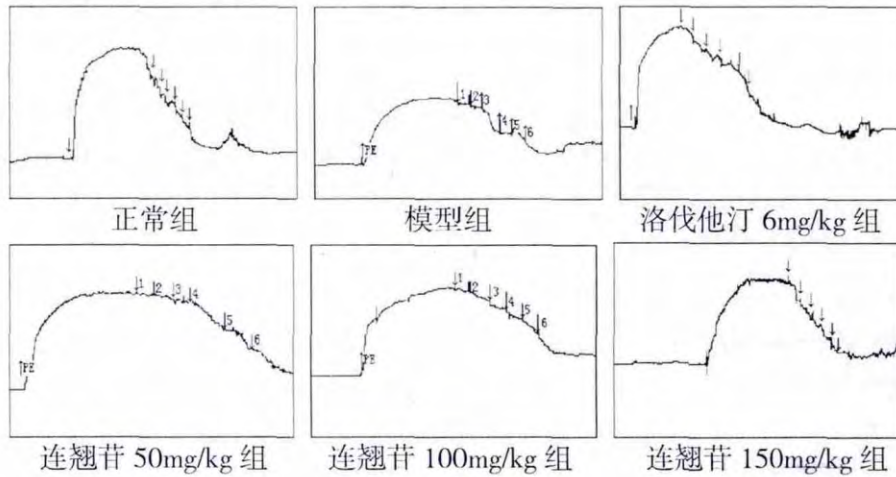


图4 AS大鼠颈总动脉内皮依赖性舒张反应

表1 连翘苷对SD模型大鼠颈总动脉内皮依赖性舒张反应的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 (mg/kg)	Ach Emax (%)	Ach EC <sub>50</sub> (μM)
正常对照		94.45 ± 2.19*	0.27 ± 0.01*
模型对照		45.64 ± 2.29	2.49 ± 0.16
洛伐他汀	6	83.58 ± 3.19*	1.64 ± 0.05*
连翘苷	50	59.66 ± 2.86*	2.36 ± 0.16*
连翘苷	100	64.11 ± 2.08*	2.18 ± 0.13*
连翘苷	150	68.57 ± 2.92*	1.92 ± 0.15*

与模型组比较 \* P < 0.05 (下同)

2.4 连翘苷对血管组织中炎症因子的影响 连翘苷明显降低大鼠血管组织中 IACM-1、VACM-1、IL-1、IL-6 含量,且均有剂量依赖性,与模型组比较有明显差异,见表2。

2.5 连翘苷对血管组织中氧化性指标的影响 连翘苷明显增加大鼠血管组织 NO、SOD 含量,减少 MDA 含量,与模型组比较有明显差异,见表3。

2.6 免疫组化结果 与正常组相比,模型组 NHE-1 的表达明显增加;与模型组比较,连翘苷能显著降低 NHE-1 的含量,差异具有显著性,且具有剂量依赖性,见图5。

表2 连翘苷对SD模型大鼠颈总动脉组织中相关炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 (mg/kg)	IACM-1 (nmol/g·prot)	VACM-1 (μmol/g·prot)	IL-1 (nmol/g·prot)	IL-6 (nmol/g·prot)
正常对照		144.95 ± 5.43*	32.79 ± 5.66*	267.65 ± 8.79*	56.68 ± 2.59*
模型对照		382.45 ± 8.81	49.91 ± 1.89	459.36 ± 11.82	87.18 ± 2.88
洛伐他汀	6	226.12 ± 21.32*	35.64 ± 1.93*	396.85 ± 12.19*	63.43 ± 2.19*
连翘苷	50	354.34 ± 7.11*	47.57 ± 6.65*	443.44 ± 11.72*	84.43 ± 2.25*
连翘苷	100	295.54 ± 8.81*	43.56 ± 2.22*	424.09 ± 8.82*	81.19 ± 1.89*
连翘苷	150	286.45 ± 7.48*	41.46 ± 2.22*	408.22 ± 11.22*	77.53 ± 2.86*

表3 连翘苷对SD模型大鼠颈总动脉组织中氧化性指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 (mg/kg)	NO (μmol/g·prot)	SOD (kU/g·prot)	MDA (μmol/g·prot)
正常对照		6.26 ± 0.25*	48.79 ± 1.64*	4.36 ± 0.08*
模型对照		2.37 ± 0.22	23.71 ± 1.19	7.36 ± 0.18
洛伐他汀	6	3.27 ± 0.32*	36.27 ± 1.56*	5.45 ± 0.21*
连翘苷	50	5.28 ± 0.28*	25.44 ± 0.72*	6.98 ± 0.22*
连翘苷	100	5.03 ± 0.16*	29.65 ± 1.19*	6.46 ± 0.13*
连翘苷	150	4.78 ± 0.19*	29.87 ± 1.42*	6.22 ± 0.18*

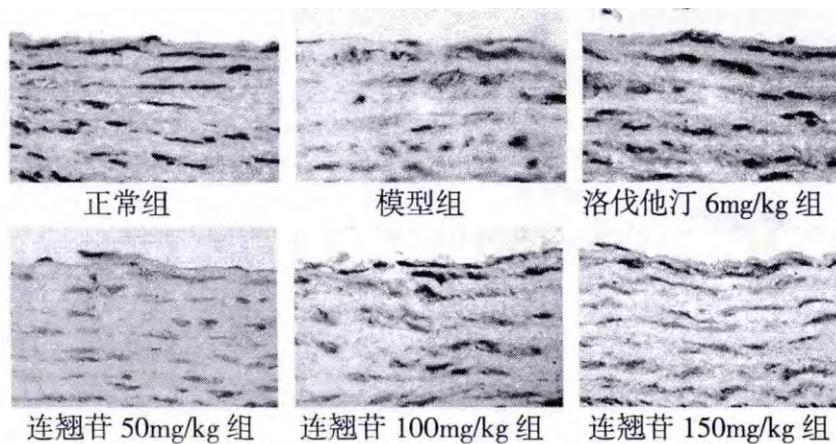


图5 光学显微镜下观察 NHE-1 在 AS 大鼠颈总动脉内皮上的表达(免疫组化 400 ×)

2.7 Western blot 结果 用相应的单克隆抗体做免疫印迹,我们检测了 NHE-1 的蛋白表达。经统计,与正常组相比,模型组

NHE-1 的表达明显增加,与模型组比较,连翘苷能显著降低 NHE-1 的含量,差异显著,见表4,图6。

表4 连翘苷对SD模型大鼠颈总动脉NHE-1蛋白和基因表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量(mg/kg)	NHE-1/ $\beta$ -actin(U)	NHE-1/GSPDH(U)
正常对照		0.64 $\pm$ 0.04*	1.03 $\pm$ 0.05*
模型对照		2.68 $\pm$ 0.11	5.11 $\pm$ 0.25
洛伐他汀	6	1.89 $\pm$ 0.08*	2.33 $\pm$ 0.15*
连翘苷	50	2.56 $\pm$ 0.13*	3.81 $\pm$ 0.24*
连翘苷	100	2.41 $\pm$ 0.11*	3.21 $\pm$ 0.16*
连翘苷	150	2.01 $\pm$ 0.09*	2.67 $\pm$ 0.16*

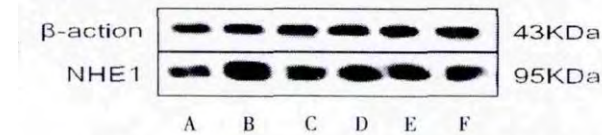


图6 Western法检测AS大鼠颈总动脉NHE-1蛋白表达量

A: 正常组; B: 模型组; C: 洛伐他汀6mg/kg; D: 连翘苷50mg/kg; E: 连翘苷100mg/kg; F: 连翘苷150mg/kg

2.8 qPCR结果 连翘苷150mg/kg组NHE-1/GAPDH基因荧光强度为 $2.24 \pm 0.24$  模型组的NHE-1/GAPDH荧光强度为 $4.12 \pm 0.83$ 。连翘苷150mg/kg组荧光强度与模型组比较,存在明显差异;连翘苷对的NHE-1基因荧光强度具有剂量依赖性,见表4。

### 3 讨论

AS的发病机制尚未完全阐明。Ross教授<sup>[9]</sup>在其损伤反应学说的基础上,明确提出"AS是一种炎症性疾病"。炎症反应贯穿于AS起始、进展及斑块破裂血栓形成的全过程,尤其是斑块不稳定发生破裂的中心环节。炎症可以通过多种途径和一系列病理生理变化促进AS的发生和发展,其中关于细胞免疫参与的炎症反应研究最多。研究证明,T淋巴细胞广泛存在于AS斑块处,促进巨噬细胞分泌大量细胞因子,包括IL-1、IL-6、VACM-1、IACM-1等,两者均为炎症和免疫反应的重要递质,并与疾病活动性有关<sup>[10]</sup>,最终导致AS形成和斑块不稳定。本研究证实连翘苷对AS模型大鼠,能够降低IL-1、IL-6、VACM-1、IACM-1水平,有效地抑制炎症反应,干预AS斑块发生、发展,稳定AS斑块,降低心血管疾病的发生。"氧化应激"在AS发生发展中扮演重要角色的重要作用<sup>[11-15]</sup>。本研究发现,AS模型大鼠体内"氧化应激"水平明显升高,NO、SOD含量减少,MDA含量增加,连翘苷能够明显降低MDA含量,增加NO、SOD含量。

细胞膜离子交换蛋白NHE-1是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白,通过交换细胞内外 $\text{Na}^+$ 与 $\text{H}^+$ 作用而调节细胞内pH值<sup>[16]</sup>。研究表明,在人体内NHE-1是维持机体内环境在中性或偏碱性的主要功能蛋白,AS患者体内NHE-1水平明显高于正常人群<sup>[17]</sup>。人类NHE-1基因定位在染色体的1p35-36上,cDNA全长约为5kb,开放阅读框长2445bp。NHE-1蛋白分子质量为 $100 \times 10^3$ ,其分子结构由有815个氨基酸残基组成,结构中疏水N端是NHE-1介导 $\text{Na}^+$ 内流与 $\text{H}^+$ 外流的功能域,亲水C端通过调节胞内pH值来决定pH水平<sup>[18]</sup>。

研究表明,NHE-1活性增高导致细胞膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP}$ 系统活性明显降低,引起细胞内 $\text{Na}^+$ 浓度增加,进一步通过双向性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换机制使细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高,加重细胞内的 $\text{Ca}^{2+}$ 超载<sup>[19]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 超载既可引起线粒体结构紊乱、抗氧化能

力下降,又可激活磷酸酯酶降解膜磷脂,引起细胞器结构破坏,导致细胞水肿、凋亡、坏死,在AS、心力衰竭、冠心病、高血压、肿瘤等疾病的发生、发展及演变过程中起重要作用<sup>[20]</sup>。本研究发现,连翘苷剂量依赖性地抑制了NHE-1的表达,说明连翘苷有可能通过影响NHE-1表达控制体内氧化应激水平,并进一步影响IL-1、IL-6、VACM-1、IACM-1等炎症因子,抑制AS进程,并有可能稳定或减轻AS斑块。

### 参考文献

- 1 Linhart A, Dostálová G, Bělohávek J, et al. Acrotid intima-media thickness in young survivors of acute myocardial infarction. *Exp Clin Acrdiol*, 2012; 17(4): 215 ~ 220
- 2 Donowitz M, Ming Tse C, Fuster D. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. *Mol Aspects Med*, 2013; 34(2~3): 236 ~ 251
- 3 Sasahara T, Yayama K, Matsuzaki T, et al.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger inhibitor induces vasorelaxation through nitric oxide production in endothelial cells via intracellular acidification-associated  $\text{Ac}2^+$  mobilization. *Vascul Pharmacol* 2013; 58(4): 319 ~ 325
- 4 Blough MD, Al-Najjar M, Chesnelong C, et al. DNA hypermethylation and 1p Loss silence NHE-1 in oligodendroglioma. *Ann Neurol*. 2012; 71(6): 845 ~ 849
- 5 Lin M, Huang X, Tan J, et al. Adenosine alleviates hypoxia-induced rat right ventricular hypertrophy through the NHE-1/AcN signal pathway. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2012; 32(5): 734 ~ 737
- 6 Lee BK, Jung YS. The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-1 inhibitor acripotide prevents glutamate-induced necrotic neuronal death by inhibiting mitochondrial  $\text{Ac}2^+$  overload. *J Neurosci Res* 2012; 90(4): 860 ~ 869
- 7 Vaish V, Sanyal SN. Role of sulindac and celecoxib in chemoprevention of colorectal cancer via intrinsic pathway of apoptosis: exploring NHE-1, intracellular calcium homeostasis and Acpain 9. *Biomed Pharmacother*, 2012; 66(2): 116 ~ 130
- 8 Hawas UW, Gamal-Eldeen AM, El-Desouky SK, et al. Induction of acspase-8 and death receptors by a new dammarane skeleton from the dried fruits of Forsythia koreana. *Z Naturforsch C* 2013; 68(1~2): 29 ~ 38
- 9 Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340(2): 115 ~ 126
- 10 Harskamp RE, Lopes RD, Abisden CE, et al. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann Surg* 2013; 257(5): 824 ~ 833
- 11 Han S, Vaziri ND, Gollapudi P, et al. Hepatic fatty acid and cholesterol metabolism in nephrotic syndrome. *Am J Transl Res* 2013; 5(2): 246 ~ 253
- 12 Liu H, Qu XK, Yuan F, et al. A RTK-absed functional RNAi screen reveals determinants of PTX-3 expression. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(4): 660 ~ 668
- 13 Raynor L, Pankow JS, Rasmussen-Torvik LJ, et al. Pleiotropy and pathway analyses of genetic variants associated with both type 2 diabetes and prostate cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2013; 4(1): 49 ~ 60
- 14 Kono R, Okuno Y, Nakamura M, et al. Peach (*Prunus persica*) extract inhibits angiotensin II-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells. *Food Chem*. 2013; 151(39(1~4)): 371 ~ 376
- 15 Acciapiuoti F, Scognamiglio A, Palumbo R, et al. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2013; 27(5(3)): 109 ~ 113
- 16 Xiang MA, Linser PJ, Price DA, et al. Localization of two  $\text{Na}^+$ - or  $\text{K}^+$ -

H<sup>+</sup> antiporters, AgNHA1 and AgNHA2, in Anopheles gambiae larval Malpighian tubules and the functional expression of AgNHA2 in yeast. *J Insect Physiol*, 2012; 58(4): 570 ~ 579

17 Czepuń M, Rakonczay Z Jr, Varró A, et al. NHE-1 activity contributes to migration and is necessary for proliferation of human gastric myofibroblasts. *Pflugers Arch* 2012; 463(3): 459 ~ 475

18 Pan T, Peng S, Xu Z, et al. Synergetic degradation of konjac glucomannan by  $\gamma$ -ray irradiation and hydrogen peroxide. *Carbohydr Polym*, 2013; 2

(2): 761 ~ 767

19 Sánchez RMA, Zaacrias FM, Arronte RA, et al. Effect of hormone therapy with estrogens on oxidative stress and quality of life in postmenopausal women. *Ginecol Obstet Mex*, 2013; 81(1): 11 ~ 22

20 Mo XG, Chen QW, Li XS, et al. Suppression of NHE-1 by small interfering RNA inhibits HIF-1 $\alpha$ -induced angiogenesis in vitro via modulation of aclpain activity. *Microvasc Res* 2011; 81(2): 160 ~ 168

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对裸鼠 MGC-803 细胞移植瘤抑制作用及机制研究\*

丁峰<sup>1</sup>, 刘学政<sup>1\*</sup>, 李娟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>辽宁中医药大学 沈阳 110847; <sup>2</sup>辽宁医学院 锦州 121000)

**摘要** 目的: 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对人胃癌 MGC-803 细胞异种接种的裸鼠肿瘤的抑制作用及其可能的机制。方法: 对人胃癌 MGC-803 细胞异种接种成功的裸鼠腹腔注射不同剂量的 EGCG, 每天观察裸鼠的一般状态, 处死后称重法测定肿瘤抑制率; HE 染色观察肿瘤组织内细胞变化; RT-PCR 测定 Caspase-3 mRNA 表达水平; 免疫组化法测定 Bcl-2、Bax 表达; Western blot 检测 Smo、Gli-1 蛋白表达。结果: 与模型组相比 EGCG(5、10、20mg/kg)对裸鼠肿瘤的抑制率分别为 20.4%、21.2% 和 48.7%; 与模型组相比, 不同剂量的 EGCG 不同程度上调 Caspase-3 mRNA 表达和 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达, 抑制 Smo、Gli-1 蛋白表达。结论: EGCG 可能通过 Hedgehog 信号抑制人胃癌 MGC-803 细胞接种的裸鼠移植瘤生长, 诱导其凋亡。

**关键词** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 人胃癌 MGC-803 细胞; 细胞凋亡

DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2016.03.009

胃癌是世界高发肿瘤之一, 平均每年 100 万的癌症死亡患者中, 胃癌位列第二, 中国更是胃癌的高发国家<sup>[1]</sup>。近年研究发现中药因其毒副作用小, 作用温和, 在抗肿瘤研究方面受到众多学者和临床医生的关注<sup>[2]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)为绿茶的主要活性成分之一, 具有较强的抗氧化, 清除自由基和抗癌的作用<sup>[3-5]</sup>。体外研究发现 EGCG 可通过线粒体途径以及上调 KLF4 和下调 NF- $\kappa$ B 通路, 诱导癌细胞 G0/G1 期阻滞进而抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[6-8]</sup>。腹腔内注射 EGCG 可通过降低 STAT3 活性, 降低肿瘤组织微血管密度而抑制肿瘤的生长<sup>[9]</sup>。Hedgehog 信号通路是参与肿瘤发生发展的重要信号通路, 其异常激活参与了胃癌肿瘤的发生, 然而 EGCG 是否通过该通路抑制裸鼠移植性胃癌的发展, 诱导癌细胞凋亡目前尚无报导, 因此本研究将采用裸鼠为研究对象, 重点探讨 Hedgehog 信号通路是否参与了 EGCG 对人胃癌 MGC-803 细胞移植性肿瘤的抑制作用, 为 EGCG 抑制胃癌生长的可能机制提供进一步的参考。

### 1 材料与方 法

1.1 试验药物 EGCG 购自于南京景竹生物技术有限公司, 批号 JZ15031102, 高效液相色谱法检测含 EGCG 为 98%, 其高效液相色谱图如图 1。

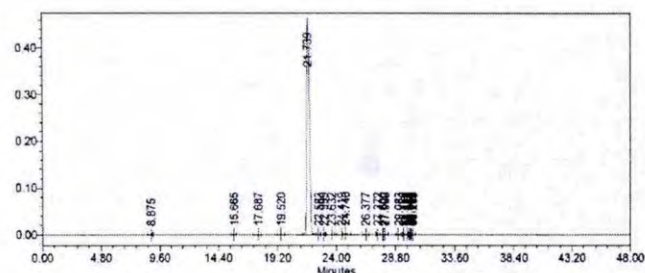


图 1 EGCG 的高效液相色谱图

5-FU(货号: F6627)粉末购自于 sigma 公司。

1.2 动物和细胞 SPF 级 BALB/c 裸鼠 30 只, 体重 18 ~ 20 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(京)2012-0001, 饲养于无菌条件下, 并给予无菌饲料和水。人胃癌 MGC-803 细胞购自于南京凯基生物技术有限公司; 根据说明书采用 10% 的胎牛血清和 90% 的 RPMI 1640 培养基培养于培养瓶中, 放于 37℃ 二氧化碳孵箱中。待细胞汇合度达到 70-80%, PBS 冲洗细胞三遍, 加入 0.25% 的胰酶, 消化 2 分钟后传代, 一次传代 1 瓶传为 2 瓶。

1.3 试剂 Caspase-3 引物购自于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(批号: 150729A15-36); Bax(货号: ab32503)、Bcl-2(货号: ab7973)一抗为 abcam 公司产品; Smo(货号: bs-2801R), Gli(货号: bs-4206R)一抗为北京博奥森公司产品; 免疫组化检测试剂盒(批号: K142421C)为北京中衫金桥公司产品; BCA 法蛋白

\* 资助项目: 辽宁省联合基金项目(项目编号: 2015010347-301)

\*\* 通讯作者