

红花组分HSYA对人胃腺癌BGC-823移植瘤裸鼠VEGF蛋白、KDR与缺氧诱导因子表达的影响

奚胜艳¹, 张前², 刘朝阳³, 解华², 岳利峰², 李卫东⁴, 臧宝霞⁵, 高学敏²

(¹厦门大学医学院, 厦门 361005; ²北京中医药大学, 北京 100029; ³中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 北京 100021; ⁴中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; ⁵北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029)

摘要: 目的: 研究红花组分羟基红花黄色素A(HSYA)对人胃腺癌皮下移植瘤裸鼠血管内皮生长因子(VEGF)蛋白、含激酶插入区受体(KDR)和缺氧诱导因子(HIF-1 α) mRNA与蛋白表达的影响。方法: 采用BALB/C nu/nu裸小鼠接种人胃腺癌细胞株BGC-823于右前肢腋部皮下建立裸鼠人癌移植瘤模型, 随机分为模型组、对照组、HSYA高、低剂量组(0.056g/L、0.028g/L), 观察抑瘤作用, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测瘤组织VEGF与HIF-1 α 蛋白以及血清VEGF蛋白表达; 蛋白印迹(Western blotting)法测定瘤组织KDR磷酸化蛋白的表达; 实时荧光定量PCR(RT-FQ-PCR)法检测瘤组织KDR及HIF-1 α mRNA表达。结果: HSYA低剂量组抑瘤明显, 该组瘤组织及血清VEGF蛋白表达降低, 瘤组织KDR磷酸化蛋白表达减弱, 与模型组比较差异明显($P<0.05$, $P<0.01$); HIF-1 α 蛋白表达较模型组瘤组织明显减少($P<0.01$)。KDR mRNA表达与模型组相比减弱, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论: 一定浓度的HSYA抑制肿瘤生长的可能机制与抑制VEGF、HIF-1 α 蛋白的表达, 减弱KDR蛋白磷酸化及其基因表达, 从而抑制内皮细胞活化阻碍肿瘤血管新生以及降低肿瘤缺氧微环境对血管生成的诱导有关。

关键词: 羟基红花黄色素A; BGC-823移植瘤; 血管内皮生长因子; 含激酶插入区受体; 缺氧诱导因子; 肿瘤血管生成

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(No.30572436)

Effects of HSYA on protein and mRNA expression of KDR, HIF-1 α and protein expression of VEGF in nude mice with BGC-823 transplantation tumor

XI Sheng-yan¹, ZHANG Qian², LIU Chao-yang³, XIE Hua², YUE Li-feng², LI Wei-dong⁴, ZANG Bao-xia⁵, GAO Xue-min²

(¹Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ³Tumor Research Center, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China; ⁴Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; ⁵Beijing Institute of Cardiopulmonary Vascular Disease, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of Hydroxy Safflor yellow A(HSYA) on the protein and mRNA expression of KDR, HIF-1 α and protein expression of VEGF in serum or transplantation tumor of gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 in nude mice. Methods: The BGC-823 cells was subcutaneously injected into the right anterior armpit of BALB/C nu/nu nude mice and established the animal model of transplantation tumor. The experimental groups were treated with HSYA at concentration of 0.056g/L and 0.028g/L and cyclophosphamide at 2g/L, or with physiologic saline. The tumor inhibitory effect was observed, and the protein expression of transplantation tumor's VEGF, HIF-1 α and serum VEGF were detected by enzyme linked immunosorbent assay, and the KDR protein expression was detected by Western blotting. The mRNA expression of KDR and HIF-1 α in transplantation tumor were detected by real time-fluorescent quantitation PCR respectively. Results: The IR in the group with HSYA at the concentration of 0.028g/L is higher than in the group with normal sodium. The protein expression of VEGF, phosphorylated KDR and HIF-1 α has significant difference after treatment with HSYA at the concentration of 0.028g/L as compared with physiologic saline-treated group($P<0.05$, $P<0.01$). The mRNA expression of KDR in 0.028g/L HSYA group

is less obviously than in the physiologic saline-treated group($P<0.05$). Conclusion: The possible mechanism of HSYA in given concentration to antagonize tumor angiogenesis may be related with inhibiting the protein expression of VEGF, and HIF-1 α and weakening the phosphorylation of KDR protein and its gene expression to inhibit the activation of endotheliocyte and impede the induction of tumor oxygen-poor microenvironment to angiogenesis.

Key words: Hydroxy Safflor yellow A; BGC-823 transplantation tumor; VEGF; KDR; HIF-1 α ; Tumor angiogenesis

Fund assistance: National Natural Science Foundation of China (No.30572436)

实体肿瘤细胞的无限增殖与其组织内丰富的血管生成关系密切。肿瘤血管生成不仅由于瘤组织激活诸多促血管活性物质如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其相关受体的分泌,而且与肿瘤迅速增殖使得内部血供不足相对缺氧^[1]从而诱导新血管生成有关。活血化瘀中药红花具有活血通经,散瘀止痛的功效,在临床上经常用于多种肿瘤的治疗,疗效较好。羟基红花黄色素A(hydroxy safflor yellow A, HSYA)是从红花中提取的主要水溶性活性组分。本实验从血管内皮激活、缺氧诱导的角度,在前期实验结果HSYA抑制肿瘤生长、减少肿瘤血管新生^[2]药效研究的基础上,运用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白印迹法(Western blotting)、实时荧光定量法PCR(real time-fluorescent quantitation PCR, RTFQ-PCR)检测裸鼠BGC-823移植瘤组织含激酶插入区受体(kinase insert domain containing receptor, KDR)和缺氧诱导因子(hypoxia inducing factor-1 α , HIF-1 α)蛋白及mRNA表达、瘤组织及血清VEGF蛋白含量,进一步研究HSYA对肿瘤血管生成的深入分子机制。

材料

1. 动物及细胞株 SPF级BALB/C nu/nu裸小鼠24只,鼠龄4-6周,体质量14-18g,雌雄各半,动物合格证号:SCXK(京)2004-0001,由中国医学科学院肿瘤医院提供。人胃腺癌细胞株BGC-823(低分化),由北京市肿瘤防治研究所提供。

2. 药品与试剂 HSYA标准品:由北京市心肺血管疾病研究所提供,非极性大孔树脂柱层析法分离,原液浓度397.2g/L,纯度为98.9%。对照药注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:08012721)。DMEM、胎牛血清(美国Gibco公司)。实时荧光定量PCR试剂盒(德国Roche公司,批号:13828600)。TRIzol Reagent试剂(美国Gibco-BRL公司)。GAPDH、KDR、HIF-1 α Primer(Human)(北京奥科生物技术公司合成)。兔抗人KDR1054酪氨酸磷酸化抗体、羊抗兔二抗、ECL试剂盒(美国Santa Cruz公司)。PVDF膜(美国Millipore公司)。Bradford

蛋白含量测定试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。VEGF和HIF-1 α ELISA(Human)试剂盒(美国ADL公司)。

3. 仪器 CO₂培养箱(德国贺力氏公司);电子数显卡尺(桂林广陆数字测控股份有限公司);3K30高速冷冻离心机(德国SIGMA离心机有限公司);TE2000倒置显微镜(日本尼康公司);LightCycler2.0实时荧光定量PCR仪及软件系统LightCycler® Carousel-Based System(德国Roche公司);Fluor Chem®凝胶成像系统(美国Alpha Inntech公司);Mini-PROTEAN®3垂直电泳槽(Bio-Rad公司);全波长多功能酶标仪(Tecan Austria GmbH)。Image-Pro Plus6.0图像分析系统(美国Media Cybernetics公司)。

方法

1. 细胞培养及动物饲养 将复苏后的人胃腺癌BGC-823细胞接种于75mL培养瓶,每瓶加入DMEM细胞培养液(含10%灭活胎牛血清、100U/mL青霉素和100mg/mL链霉素)15mL,置于37℃、CO₂饱和湿度为5%的培养箱中培养,使用0.25%胰蛋白酶-0.2%EDTA-D-Hank's消化液消化传代。裸鼠置于中国医学科学院实验动物研究中心屏蔽系统辅以洁净层流柜的动物室(SPF级)中饲养,自由饮用盐酸酸化饮水(pH2.5-2.8),Co⁶⁰灭菌饲料[合格证号:SCXK(京)2005-0007],由北京科澳协力饲料有限公司提供。动物适应1周后供接种用。

2. 药液配制 取HSYA,用生理盐水配制0.056、0.028g/L浓度溶液,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,无菌分装,-20℃保存待用。对照组环磷酰胺(CTX)用灭菌生理盐水配成2g/L的溶液。ELISA实验用标准液、生物素标记人VEGF、HIF-1 α 抗体工作液、亲和素-过氧化物酶复合物(ABC)工作液严格按试剂盒说明书配制和使用。Western blotting实验用蛋白裂解液、各级缓冲液等严格按照要求配制。

3. 人癌裸鼠移植瘤模型的建立 参考文献[3]的实验建模法,取处于对数生长期的BGC-823细胞株,用0.25%胰蛋白酶-0.2%EDTA-D-Hank's消化液消化,离心配成 2.15×10^7 /mL单细胞悬液,接种于裸鼠

右前腋部皮下, 每只注射0.2mL (约含瘤细胞数 4.3×10^6), 建立裸鼠人胃癌移植瘤模型。

4. 分组与给药 将接种瘤株24h后的裸鼠随机分为4组, 每组6只, 分模型组, 对照组, HSYA高、低剂量组。模型组给予腹腔注射0.9%灭菌NaCl溶液; HSYA高、低剂量组分别以0.056g/L、0.028g/L浓度HSYA溶液腹腔注射, 此3组均每日注射2次(间隔4至6h), 每次0.2mL, 接种次日开始给药。对照组从接种第3天开始给药, 每2d腹腔注射2g/L环磷酰胺1次, 每次0.2mL。各组于移植瘤模型建立的第20天停止给药并取材。

5. 抑瘤观察 等肉眼见裸鼠腋下肿瘤块生成, 用电子数显卡尺每3d测量1次移植瘤的最长径(a)和最短径(b), 按公式 $V=1/2ab^2$ (mm^3) 计算肿瘤体积。末次给药后24h称重, 颈椎脱臼处死裸小鼠, 完整剥离裸鼠右前腋皮下肿瘤, 用电子天平称取瘤质量, 计算抑瘤率(IR)。IR (%) = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

6. 取材及样品制备 每只裸鼠剥离后的瘤组织用手术刀切取火柴头大小多块, 装入冻存管并迅速投入液氮冷冻, 再于 -70°C 低温冰箱中储存待用。Western blotting实验每只裸鼠瘤组织使用1小块即可; ELISA实验按每50mg瘤组织加入500 μL 匀浆液进行匀浆, 离心去沉淀。

7. 实时荧光定量PCR检测瘤组织KDR与HIF-1 α mRNA表达

7.1 总RNA提取 将最佳抑制浓度的HSYA组及模型组瘤组织的每份样本1小块, 按照TRIzol试剂说明, 采用异硫氰酸胍1步法抽提所取瘤组织总RNA, 所提总RNA经1%的琼脂糖凝胶电泳确定其完整性, 并经紫外分光光度计测样品RNA含量和纯度。

7.2 PCR扩增 分别取3 μg 总RNA为模板, 在加入Oligo (dT) 和M-MLV逆转录酶后以50 μL 体系在 42°C 下反应1h合成cDNA第一链, 之后 94°C 加热2min以灭活逆转录酶。

按照PCR使用说明, 采用20 μL 反应体系, 取上述反应物2 μL , 加入ddH₂O 12 μL 、PCR Mix 4 μL , 并加入: KDR 244bp引物2 μL ; 上游引物: 5'-CGG TAG CAC AGC CCA GAT TC-3', 下游引物: 5'-GGT CAC AAG CCT CTT CCA GGA-3'; 或加入HIF-1 α 250bp引物2 μL : 上游引物: 5'-TTG ATT GCA TCT CCA TCT CCT-3', 下游引物: 5'-TTC GCT TTC TCT GAG CAT TCT-3'。内标基因选择GAPDH; 上游引物: 5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3', 下游

引物: 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3'; amplicon 268bp。

PCR循环参数: 退火时间设为6s, 退火温度分别设为KDR 57.0°C 、HIF-1 α 53.0°C 、GAPDH 59.0°C , 延伸温度 72°C 的延伸时间(s)依据引物bp数/25而定, 45循环, 其余严格按试剂盒说明书设定。样品加完后, 放入PCR仪卡盘, 运行Light Cycler 2.0系统, 检测并记录循环阈值(cycle threshold, Ct), 所有目标基因表达水平的差异均用治疗组基因相对于内标基因的比值CR (concentration ratio) 来表示。检测结果重复3次。

7.3 琼脂糖凝胶电泳确认RTFQ-PCR扩增产物 随机选取模型组和较好抑瘤HSYA组样品的KDR PCR扩增产物各5 μL , HIF-1 α 同样, 上样后在100V恒压下电泳, Fluor Chem®凝胶成像系统进行DNA电泳条带拍照, 对KDR、HIF-1 α 的扩增结果进行抽样验证。

8. ELISA法测瘤组织及血清VEGF、瘤组织HIF-1 α 蛋白表达 经加样, 37°C 振荡孵育120min; 分别加待检因子抗体, 温育60min; 加入ABC工作液, 温育30min; 加显色液显影, 于酶标仪450nm处读板。

9. Western blotting法检测瘤组织KDR蛋白表达 取瘤组织1小块, 提取总蛋白, Bradford比色测定蛋白质浓度并行蛋白变性, 于电泳槽进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 完毕取胶, 按(+) 海绵-滤纸-PVDF膜-凝胶-滤纸-海绵(-) 顺序夹好电转印夹, 置于垂直电泳槽电转, 再经蛋白质染色及脱色、封闭、KDR及 β -actin抗体孵育、二抗孵育、洗涤, 利用ECL发光液显色, X线定影后, 对胶片进行扫描, 用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析目的蛋白及 β -actin内参条带的平均光密度值。

10. 统计学方法 所得成组资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用SPSS 13.0软件包统计分析, 两组间比较采用独立样本t检验, 检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. HSYA对BGC-823移植瘤的作用 HSYA高、低剂量组及对照组的抑瘤率分别为10.39%、29.96%、48.34%; HSYA低剂量组肿瘤体积及瘤质量与模型组比, 差异有统计学意义($P<0.05$)。实验过程中各组裸鼠未出现意外死亡, 活动自由, 反应尚可, HSYA组未出现皮下出血点。

2. 总RNA提取结果 总RNA样品经琼脂糖凝胶电泳置于紫外灯下观察, 可见18s、28s两条清晰的条

带^[2], RNA样品保持完好, 未被降解。紫外分光比色测定显示: 所有RNA样品在260nm、280nm处的A值之比均在1.8-2.0之间, 表明纯度符合要求。

3. HSYA对BGC-823移植瘤KDR与HIF-1 α mRNA表达的影响 见表1。将模型组和HSYA抑瘤率较大组(即HSYA低剂量组)的肿瘤组织总RNA的RT产物经实时荧光定量PCR检测, 可发现KDR、HIF-1 α 与内参GAPDH mRNA均有较高表达, 凝胶电泳确认其扩增片段大小分别与理论扩增大小244bp、250bp、268bp基本一致, 如图1所示, 未见其他杂电泳条带; KDR扩增未见熔解杂峰, HIF-1 α mRNA扩增中虽有少量杂峰出现; 但熔解曲线分析显示, 所测基因各自熔解温度相一致, 其总体扩增特异性尚可。KDR、HIF-1 α 各自两组Ct值相差不大, HSYA低剂量组HIF-1 α mRNA的表达水平有减低趋势, 但差异无统计学意义; 该组KDR mRNA表达水平较模型组偏低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 HSYA对裸鼠BGC-823移植瘤KDR、HIF-1 α mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Ct值		CR (mRNA level)	
	KDR	HIF-1 α	KDR	HIF-1 α
模型组	24.48 \pm 0.54	19.68 \pm 0.59	0.48 \pm 0.04	0.87 \pm 0.12
HSYA低剂量组	24.87 \pm 0.64	19.82 \pm 0.28	0.35 \pm 0.03*	0.82 \pm 0.13

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

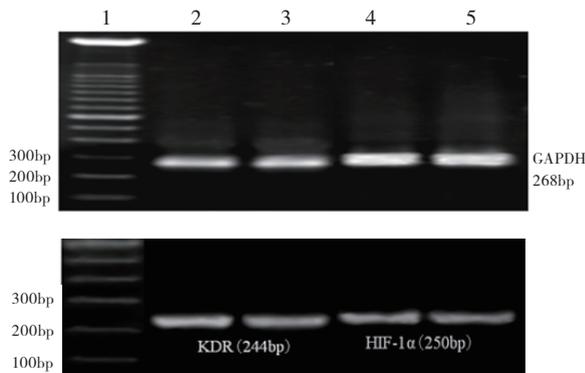


图1 mRNA实时荧光定量PCR产物凝胶电泳图

注: 1为Marker; 2和4为模型组; 3和5为HSYA低剂量组。

4. HSYA对BGC-823移植瘤VEGF、KDR及HIF-1 α 蛋白表达的影响 VEGF蛋白表达是肿瘤血管生成的重要环节。ELISA实验结果显示: HSYA低剂量组瘤组织VEGF蛋白表达减少, 与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); 而裸鼠血清中VEGF蛋白含量相对模型组降低则更为显著($P < 0.01$)。见表2。HIF-1 α 蛋白表达是反映HSYA对肿瘤血管作用的另一分子层面的指标。ELISA法测定结果显示: HSYA低剂量组瘤组织中的缺氧诱导因子HIF-1 α 蛋白表达减少较

模型组明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表2。蛋白印迹法对瘤组织中总磷酸化KDR蛋白的表达进行检测发现: HSYA低剂量组裸鼠移植瘤的KDR蛋白表达较生理盐水治疗的模型组减弱。运用Image-Pro Plus 6.0软件图像分析并对结果进行统计显示: HSYA低剂量组KDR蛋白表达条带相对于 β -actin表达条带的OD比值(optical density ratio)为(0.67 \pm 0.09), 模型组为(0.81 \pm 0.08), 两组蛋白表达条带OD比值前者较小, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。提示给药组瘤组织中磷酸化KDR受体减少。

表2 HSYA对BGC-823移植瘤裸鼠VEGF、HIF-1 α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mg}$)

组别	瘤组织VEGF蛋白	血清VEGF蛋白	瘤组织HIF-1 α 蛋白
模型组	347.32 \pm 30.27	532.47 \pm 67.79	1472.46 \pm 216.17
HSYA低剂量组	299.76 \pm 19.12*	420.32 \pm 73.80**	1035.93 \pm 176.51**

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

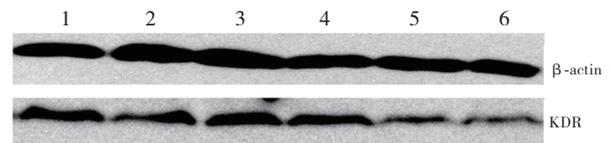


图2 BGC-823移植瘤磷酸化KDR表达蛋白印迹图

注: 1、2、3为模型组; 4、5、6为HSYA低剂量组。

讨论

肿瘤血管生成是处于患病机体精细调控中的一个非常复杂的病理过程, 是血管生成促进因子和血管生成抑制因子共同作用的结果。肿瘤生长期间其血管的增生速度较正常组织血管生长速度快很多倍。肿瘤血管生成过程中, 血管内皮细胞起主要作用, 内皮细胞的增殖是血管新生化发生的最基本和最重要的环节^[4], 因而是肿瘤抗血管生成治疗的特有靶点。内皮细胞专一促有丝分裂因子VEGF, 通过旁分泌形式特异地作用于血管内皮细胞上的受体, 直接刺激内皮细胞增殖。KDR为VEGF最主要受体之一, 具有明显促有丝分裂和化学趋化活性, 在血管通透性升高和血管生成过程中起主要作用^[5]。

人类实体肿瘤组织中存在含氧量低的区域^[6]。目前认为瘤组织缺氧诱导相关因子较多, 其中HIF-1在血管生成中的作用最为重要^[7]。HIF-1 α 在多种消化系统肿瘤中均有较高表达。缺氧在肿瘤血管生成过程中起了重要的促进作用; 瘤组织HIF-1 α 的增加是缺氧执行诱导的主要结果。因此, 对于实体肿瘤来说, 明确药物作用有否抑制VEGF与受体KDR以及缺氧诱导效应对寻找抗肿瘤血管药物有积极的指导价值。

基因表达是生物基因组中结构基因所携带的遗

传信息经过转录、翻译等一系列过程合成特定的蛋白质,进而发挥其特定的生物学功能及效应的全过程。在转录水平、翻译水平研究药物对相关因子的生物效应变化具有重要意义。HSYA为红花中提取的活血功效成分,本研究首次将HSYA用于人胃腺癌裸鼠皮下移植瘤,观察其对肿瘤血管生成的作用,结果见文献[2],由于实验中HSYA高剂量组抑瘤率太低,后续研究意义不大,因此后续基因与蛋白研究主要是对抑瘤率较好的低剂量组进行探讨。本实验针对血管生成过程中最为关键的内皮细胞生长环节以及不可缺少的缺氧诱导环节,于分子水平首次研究HSYA对人胃腺癌裸鼠移植瘤VEGF、受体KDR、HIF-1 α 的改变;通过RTFQ-PCR对移植瘤组织中KDR mRNA表达的检测,ELISA法对瘤组织VEGF和HIF-1 α 、血清VEGF蛋白的检测,以及蛋白印迹法对瘤组织KDR磷酸化蛋白表达的检测,深入研究了HSYA对肿瘤新血管生成的作用机制。

本实验结果发现:模型组和HSYA低剂量组裸鼠人胃腺癌移植瘤组织中VEGF和KDR蛋白以及裸鼠血清中VEGF蛋白都有分泌,瘤组织中KDR mRNA亦有较高表达,但HSYA低剂量组VEGF和磷酸化KDR蛋白含量较低,KDR mRNA表达减少,特别是血清中VEGF蛋白显著减少,提示适当浓度的HSYA溶液有抑制BGC-823移植瘤VEGF蛋白及受体KDR分泌的作用。与临床上胃癌患者癌细胞中广泛表达VEGF^[8]以及中药消痰散结方可降低人胃癌原位移植瘤血管生成因子基因表达有类似结论^[9]。真核生物体内HIF-1的激活可诱发许多协助机体适应缺氧环境的基因的表达。本实验PCR扩增结果显示:两组瘤组织样本中HIF-1 α mRNA均有表达,HSYA低剂量组HIF-1 α mRNA的表达有下降趋势。ELISA结果可看出模型组HIF-1 α 蛋白含量明显高于HSYA低剂量组,表明经过HSYA治疗后处于翻译水平HIF-1 α 减少,适当浓度HSYA可抑制HIF-1 α 蛋白表达,从而降低了肿瘤缺氧微环境对血管生成的诱导。

综上所述,羟基红花黄色素A能降低人胃腺癌BGC-823移植瘤KDR、VEGF以及血清VEGF的表达,直接阻碍了肿瘤血管生成过程的第1步骤即减少肿瘤细胞分泌促血管生成因子,从而在一定程度上抑制了内皮细胞活化的信号转导,阻碍其增殖,减弱了肿瘤血管的形成。HSYA可于翻译水平减少HIF-1 α 形成,从而抑制HIF-1 α 介导的血管生成效应。与另一活血中药色素类成分姜黄素通过降低肝细胞癌HIF-1 α 蛋白表达以阻断肿瘤血管生成的发现相似^[10]。肿

瘤组织微环境氧供障碍通过HIF-1 α 介导VEGF上调,使其基因转录激活,促进肿瘤血管生成^[11];此外缺氧还可通过上调VEGF受体KDR而刺激血管生成^[12]。因此,HSYA尚有可能是通过抑制HIF-1 α 蛋白,进而减弱了VEGF对血管的诱生作用。本研究的开展不仅是对前期研究中HSYA抗肿瘤血管生成^[2]的另一机制补充,而且从分子层面丰富了活血化瘀中药红花的药理作用。以往HSYA的研究主要集中于心血管药理层面^[13],在抑制肿瘤血管生成方面的作用除本课题组外尚未见其它报道。因而本研究对于开发HSYA新的药理作用及阐明红花活血化瘀的作用机制、研究新型抗肿瘤药物具有重要价值。

参 考 文 献

- [1] Duffy J P, Eibl G, Reber H A, et al. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 12
- [2] 奚胜艳, 张前, 解华, 等. 羟基红花黄色素A对裸鼠人胃腺癌BGC-823移植瘤血管及VEGF, bFGF mRNA表达的影响. *中国中药杂志*, 2009, 34(5): 605-610
XI Sheng-yan, ZHANG Qian, XIE Hua, et al. Effects of hydroxy safflor yellow A on blood vessel and mRNA expression with VEGF and bFGF of transplantation tumor with gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 in nude mice. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(5): 605-610
- [3] 贺岩, 李莹杰, 王齐敏, 等. 建立胃癌实验动物模型方法的研究. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4): 251-255
HE Yan, LI Ying-jie, WANG Qi-min, et al. Study on method of establishment of laboratory animal model of gastric cancer. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2006, 14(4): 251-255
- [4] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86(3): 353-364
- [5] 徐彬. 血管内皮生长因子及受体与肿瘤. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(6): 320-322
XU Bin. Vascular endothelial growth factors, receptors and tumor. *Foreign Medical Sciences · Clinic Biochemistry and Laboratory Medicine*, 2002, 23(6): 320-322
- [6] Itasaka S, Shibuya K, Inoue M, et al. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*, 2007, 26(54): 7508-7516
- [7] 陈意生, 史景泉. *肿瘤分子细胞生物学*. 2版. 北京: 人民军医出版社, 2004: 87
CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan. *Tumor Molecular Biology of the Cell*. Beijing: People's Military Medical Press, 2004: 87
- [8] 朱颖蔚, 成金罗, 钱科清, 等. 胃癌患者血清VEGF、p53的表达及意义. *现代肿瘤医学*, 2007, 15(3): 375-376
ZHU Ying-wei, CHENG Jin-luo, QIAN Ke-qing, et al. Expressions of serum VEGF and p53 in patients with gastric carcinoma. *Modern Oncology*, 2007, 15(3): 375-376

- [9] 许玲,苏晓妹,陈亚琳,等.中药消痰散结方对人胃癌裸鼠原位移植瘤VEGF,KDR mRNA表达的影响.世界华人消化杂志,2004,12(4):988-990
XU Ling,SU Xiao-mei,CHEN Ya-lin,et al.Effects of Xiaotansanjie recipe on mRNA expression of VEGF,KDR of human gastric adenocarcinoma orthotopically transplanted in nude mice.World Chinese Journal of Digestology,2004,12(4):988-990
- [10] Bae M K, Kim S H, Jeong J W, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. Oncol Rep, 2006, 15(6): 1557-1562
- [11] Lin L X, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Biochem Res Commun, 2002, 291(4): 908-914
- [12] 王瑞年.分子肿瘤学概论.上海:上海科学教育出版社,2001:79
WANG Rui-nian. General Discussion of Molecular Oncology. Shanghai: Shanghai Science Education Press, 2001: 79
- [13] 万春平,包照日格图,却翎,等.红花的研究进展.时珍国医国药,2007,18(11): 2854-2855
WAN Chun-ping, BAO Zhaorigetu, QUE Ling, et al. Study and research progress of Carthamus tinctorius Linn. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007; 18(11): 2854-2855
(收稿日期: 2011年7月12日)

· 论著 ·

艾片的体外黏膜渗透性及影响因素研究

宋道^{1,2}, 杜守颖¹, 陆洋¹, 马勇¹, 陈晓兰¹

(¹北京中医药大学中药学院, 北京 100102; ²陕西中医学院药学院, 西安 712046)

摘要: 目的: 考察艾片的体外黏膜渗透性及影响因素。方法: 选择离体牛蛙腹皮为渗透模型, 采用改良的 Franz 扩散池进行体外黏膜实验; GC 测定艾片中龙脑的含量, 研究接收液的不同 pH 值、温度、搅拌速度及药物浓度对艾片体外黏膜渗透的影响。结果: 搅拌速度对艾片的渗透有一定的影响; 而接收液的 pH 值、温度及药物浓度对艾片的渗透无影响。艾片黏膜渗透性良好, 累积渗透率与时间符合一级吸收过程。结论: 离体牛蛙腹皮可作为艾片的体外黏膜渗透性研究的实验模型。

关键词: 艾片; 离体蛙皮; 黏膜渗透; 表观渗透系数

基金资助: 国家自然科学基金面上项目 (No.81073057), “重大新药创制”科技重大专项 (No.2009ZX09502-008), 中药生产技术与过程控制技术标准平台 (No.2009ZX09308-003), 教育部博士点基金 (No.20090013110007), 北京中医药大学创新团队发展计划

Study on in vitro mucosal factors affecting mucosal permeability of borneol

SONG Xiao^{1,2}, DU Shou-ying¹, LU Yang¹, MA Yong¹, CHEN Xiao-lan¹

(¹School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; ²School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

Abstract: Objective: To study the in vitro mucosal factors that affect such permeability of borneol. Method: Bullfrog skin was selected as the permeation model, and the modified Franz diffusion was adopted to investigate the percutaneous adsorption in vitro. Borneol as quantified by GC. Different of pH receiving solution and temperature, mixings speed and impacts of drug concentration on percutaneous adsorption in vitro were systematically studied. Result: Percutaneous permeation of borneol was to some extent affected by mixings speed. Other factors had no effect on the penetration of borneol. There existed a good percutaneous of borneol. And the relationship between the cumulative permeability rate and time was coincided with the first order kinetic process. Conclusion: Taken the in vitro abdominal skin of bullfrog as the permeation model, which were study on in vitro mucosal factors affecting mucosal permeability of borneol.

通讯作者: 杜守颖, 北京市朝阳区望京中环南路6号北京中医药大学中药学院, 邮编: 100102, 电话: 010-84738615
E-mail: dushouying@263.net