

为何其 GLUT-1 未见增高,也许不能单纯用代谢增强,葡萄糖需要增多来简单解释这一现象,可能与组织病理类型本身特点有关。尽管鳞状细胞癌光镜病理分期非常明确,但分期的差别没有导致 GLUT-1 表达的差异,可能 GLUT-1 仅对不同类型的肿瘤细胞鉴别有意义而对临床分期没有意义。炎症时,组织代谢也非常活跃,但程度远不及肿瘤状态,所以 GLUT-1 表达比肿瘤低。由于本次实验炎症标本太少,不能得出有实际意义的结论。

参考文献

- 1 Chung JK, Lee YJ, Kim SK, *et al.* Comparison of [^{18}F]fluorodeoxy glucose uptake with glucose transporter-1 expression and proliferation rate in human gloma and non-small-cell lung cancer [J]. *Nucl Med Commun*, 2004, 25(1): 11-17
- 2 Tetu B, Brisson J, Wang CS, *et al.* Expression of cathepsin D, stromelysin-3, and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis [J]. *Cancer*, 2001, 92(11): 2957-2964
- 3 李强,黄波,李奕.组织蛋白酶 D 在非小细胞癌中的表达及临床意

- 义[J]. *实用肿瘤杂志*, 2006, 20(3): 208-209
- 4 王忠民,唐怀好,杨红伟,等.非小细胞肺癌组织蛋白酶 D 和 P 选择素表达的临床研究[J]. *中国医师杂志*, 2004, 6(3): 324-326
- 5 Cheng IW, Ware LB, Greene KE, *et al.* Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(1): 20-27
- 6 董文,陈美云.肺表面活性蛋白 A 与急性肺损伤[J]. *中国急救医学*, 2004, 24(11): 824-826
- 7 Rudlowski C, Moser M, Becker AJ, *et al.* GLUT-1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer [J]. *oncology*, 2003, 66(5): 404-410
- 8 Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(3): 654-662
- 9 马丽,郑洪,刁晓源.非小细胞肺癌组织中 GLUT-1 的表达及临床意义[J]. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(6): 526-528
- 10 钟秀君,周建英,丁伟,等.葡萄糖转运蛋白 1、3 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. *浙江预防医学*, 2006, 18(7): 12-14

(收稿:2009-11-30)

(修回:2010-01-09)

免煎方剂中药对草酸钙结晶生长影响的研究

黄小平 陈协辉 陈丽萍 苏娜 潘达亮 黄进明 陈日来

摘要 目的 探讨三金三子汤免煎方剂中药对草酸钙结晶生长的影响。**方法** 采用 ^{45}Ca - CaCl_2 掺入的结晶生长动力学模型,研究不同作用时间免煎方剂中药对草酸钙结晶生长的影响。**结果** 从免煎方剂中药组 5min 滤液内 cpm% 明显减少,与对照组同时时间点的水平相当,20~120min 诸时间点的 cpm% 与对照组比较, cpm % 减少幅度甚小,甚至接近回复总放管水平。**结论** 免煎方剂中药对草酸钙结晶生长有明显的抑制作用,抑制作用与用药时间呈依赖关系。为临床应用此免煎方剂中药临床治疗尿路结石患者提供一定的试验依据。

关键词 中药 草酸钙结晶

The Study of the Effect of Non-decocting Chinese Traditional Medicine on the Growth of Calcium Oxalate Crystal. Huang Xiaoping, Chen Xiehui, Chen Liping, Su Na, Pan Daliang, Huang Jinming, Chen Rilai. The 2nd People's Hospital of Futian District, Shenzhen, Guangdong 518049, China

Abstract Objective To explore the effect of san jin san zi soup non-decocting Chinese traditional medicine on the growth of calcium oxalate crystal. **Methods** We applied the ^{45}Ca - CaCl_2 incorporated crystal growth kinetic model and investigated the effect of non-decocting Chinese traditional medicine on the growth of calcium oxalate crystal on different action time. **Results** The filtrate's cpm percentage(%) obviously decreased after the non-decocting Chinese traditional medicine acted 5 minutes, which was as much as that of the control group concurrent testing. The filtrate's cpm% decreased less significantly than that of the control group after the non-decocting Chinese traditional medicine acted from 20 minutes to 120 minutes, and even it was approximately near to the initial level. **Conclusion** The non-decocting Chinese traditional medicine has the inhibitory action on the the growth of calcium oxalate crystal, and the

基金项目:广东省中医药管理局科研课题(2007251)

作者单位:518049 广东省深圳市福田区第二人民医院

通讯作者:陈协辉,电子信箱:xhchen66@126.com

inhibitory action depends on the medicating time, which providing some evidence for the doctors to treat the lithangiuria patients by use of the non - decocting Chinese traditional medicine.

Key words Chinese traditional medicine; Calcium oxalate crystal

流行病学调查研究显示目前尿石病患者至少比 20 世纪初多 10 倍^[1], 人类尿石的主要成分 70% 以上是草酸钙^[2], 一水和二水草酸钙是 2 种主要的结晶形式^[3-5], 还有在尿石与尿液中极少发现的三水草酸钙^[6]。一水草酸钙在草酸钙结石中所占比例最大, 与肾小管细胞表面具有较强的亲和力^[7], 而二水草酸钙及三水草酸钙易随尿液排出人体。一水草酸钙尿石的形成须经结晶、生长、集聚等过程, 抑制和延迟其中任何一个环节, 都将有利于防止尿石的形成。达到此目的最有效方法是降低成石物质的过饱和浓度和使用抑制剂。三金三子汤为我院治疗尿石症的经验方, 药物组成有: 金钱草、海金沙、鸡内金、冬葵子、车前子、莱菔子、石韦、瞿麦、川牛膝、红花、生甘草等, 具有清热利湿、化淤通淋之功^[8]。我院在该方法的基础上制成免煎中药, 并从临床用药筛选出其中的几种药物, 利用三九药业集团免煎单味药物, 组合而成的中药免煎方剂, 进行体外试验研究, 采用⁴⁵Ca - CaCl₂ 的结晶生长动力学模型, 观察免煎方剂中药对草酸钙结晶生长的影响, 为临床用药提供试验依据。

材料与方法

1. 免煎中药组方及制备: 免煎中药上尿路结石汤、枸橼酸钾、维生素 B6, 由深圳市福田区第二人民医院研制。

2. 体外抑制实验⁴⁵Ca - CaCl₂ 示踪剂 (强度 29.6 × 10¹⁰ μBq, 美国杜邦公司生产)。

3. 一水草酸钙籽晶的配制: 将 1.5mmol/L 草酸钾液和 0.6mmol/L 氯化钙液各 500ml 分别经两根橡皮管内缓慢滴入放置在 75℃ 恒温箱内的玻璃器皿内。调节立式搅拌机转速至 200r/min (金属搅拌叶用硅胶包裹), 持续搅拌 5 ~ 6h。待籽晶沉淀后弃去上清液, 底部的混悬液倒入离心管内离心 双蒸水冲洗, 如此反复离心冲洗 6 次。最终的籽晶液比例调节至每毫升液内含 25mg 籽晶。制作的籽粒悬液置室温下贮存。使用时置混悬器上充分混匀。

4. 亚稳过饱和草酸钙溶液的配制: 将 0.8mmol/L 氧化钙液 100ml 和 0.6mmol/L 草酸钠搭掖 100ml 配成混合液, 然后加入氯化钠作支持电解质。使亚稳过饱和液体体系内的离子强度恒定在 0.15。将亚稳过饱和液放入 37℃ 恒温水浴箱内预热 30min, 然后仔细倾入双壁循环水槽内。

5. 实验分组: 不同时间点免煎中药抑制组及不加免煎中药对照组。实验组分别为免煎中药 5、10、20、40、60、120min 组; 取亚稳过饱和液 200ml, pH 值调至 6.5 ± 0.3。将装有亚稳过饱和液的双壁水槽置于磁力恒温搅拌器上持续搅拌, 通

过超级循环水浴装置保持溶液温度始终为 37℃。示踪剂⁴⁵Ca - CaCl₂ 液 50μl, 搅拌 20min, 充分混匀后自总管抽取滤液 3ml 作为总计数管。加入免煎中药 50ml, 再搅拌 20min, 然后加入混匀的草酸钙籽晶悬液 50ml, 继续搅拌。分别于籽晶加入后的 5、10、20、40、60、120min 抽取液体 3ml, 用 0.2μm 微孔滤膜抽滤。再从滤液中取 0.2ml (双管检测), 加入闪烁液 11ml, 混匀后室温放置 20min, 然后用液体闪烁计数器作每分钟放射性计数 (cpm) 测定。对照组: 不加免煎中药, 在加入籽晶前取液 3ml 做对照组空白管, 其他操作同上。按以下公式计算加籽晶后各时间点草酸钙结晶生长指数: 生长指数 = (总计数管 cpm - 加籽晶后单位时间管 cpm) / 总计数管 cpm × 100%。

6. 试验方法: 草酸钙结晶生长测定使用 Resniek 方法。为排除试验技术误差, 试验时抽样、加样均由同一人操作。

7. 滤器的处理: 实验使用特制的有机玻璃抽滤器。每抽滤 1 次, 立即用双蒸水反复冲洗滤器内脏和塑料抽吸管, 然后更换微孔滤膜。

8. 将装有亚稳过饱和液的水槽置于磁力恒温搅拌器上持续搅拌, 溶液的温度通过连接水槽的超级循环水浴装置始终控制在 37℃, pH 值调至 6.5, 结晶生长过程中 pH 值波动不超过 ±0.3 单位。亚稳过饱和液内加入⁴⁵Ca - CaCl₂ 示踪剂。持续搅拌亚稳过饱和液 40min。在此期间抽总放管液作对照。然后加入一水草酸钙籽晶 50μl, 分别在不同时间点抽液 3ml, 用 0.2 微孔滤膜抽滤。每一时间点滤液均取 0.2ml。通过 LKB - 1215 型液体闪烁计数器测定每分钟计数 (cpm)。根据滤液中⁴⁵Ca - CaCl₂ 减少的量估计结晶生长速度。各试验组免煎方剂中药在加入籽晶前溶入亚稳过饱和草酸钙溶液中。每种抑制物试液均重复 2 次, 取 cpm 均值进行计算比较。

结 果

不同作用时间免煎方剂中药对草酸钙结晶生长抑制效果见图 1。P 段 cpm% 稳定, 显然在籽晶加入前无草酸钙自发沉淀和生长。从免煎方剂中药组来看, 在籽晶加入后 5min 内, 滤液内 cpm 明显减少, 与对照组同时时间点的水平相当, 然而, 20 ~ 120min 诸时间点的 cpm% 与对照组比较, cpm% 减少幅度甚小, 甚至接近回复总放管水平, 提示此时间段免煎方剂中药明显抑制了草酸钙结晶的生长过程。

表 1 免煎方剂中药对草酸盐结晶生产的影响 (cpm%)

	P 段	0min	5min	20min	40min	60min	120min
对照组	0.41	0.41	0.37	0.325	0.195	0.135	0.085
试验组	0.41	0.41	0.38	0.31	0.376	0.389	0.37

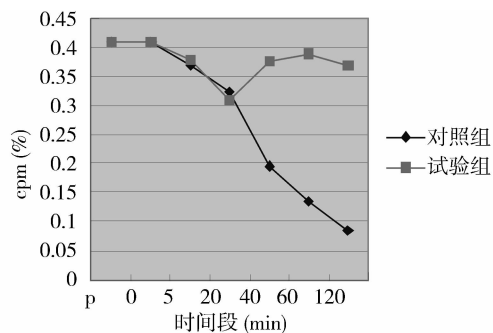


图1 免煎方剂中药对草酸钙的结晶生长的影响

P段为加籽粒前

讨 论

我们采用一水草酸钙籽晶诱导亚稳过饱和草酸钙溶液内草酸钙结晶生长的方法,掺入 $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ 示踪剂,根据滤液内 $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ 的变化定量地测定草酸钙结晶生长速度,同时观察不同时间点免煎方剂中药对草酸钙结晶生长速度的影响。实验结果表明,在无抑制剂的亚稳过饱和草酸钙溶液内,随着籽晶的加入,滤液内cpm%迅速减少,且持续较长时间。这反映了一定量的 $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ 已形成了草酸钙,籽晶在不断生长。这种定量测定结晶生长的方法是准确和稳定的。

张培萍^[9]等根据微溶电解质动力学原理,利用草酸与氯化钙作用形成草酸钙的性质,加入其他尿液中常见组分,测定草酸钙诱导期与过饱和溶液浓度的关系,并分析结石的显微结构,探讨草酸钙的形成机制及影响因素,结果显示草酸钙的诱导期与溶液过饱和和浓度呈反比关系,且不同干扰因素对草酸钙的过饱和和影响也不同,他们的研究得出结论:钙和草酸是草酸钙形成的必要条件;溶液的过饱和是草酸钙成核的基础;而基质对草酸钙起胶结作用。这为我们通过降低成石物质的过饱和浓度和使用抑制剂防止草酸钙结晶的形成提供了一定的理论基础^[10-13]。我们的结果显示20~120min诸时间点的cpm%与对照组比较,cpm%减少幅度甚小,甚至接近回复总放管水平,提示此时间段免煎方剂中药明显抑制了草酸钙结晶的形成和生长,推测可能与我们应用的免煎方剂中药与草酸或钙离子结合成一定的复合物,抑制和减低草酸钙结晶形成和生长的速度有关,也可能与免煎方剂中药嵌附在结晶表面从而改变结晶的生长习性有关。虽然其起抑制草酸钙结晶形成及生长的机制目前还不清楚,尚需进一步的研究,但是本实验得出的免煎方剂中药对草酸钙结晶生长有明显的抑制作用,抑制作用与用药时间呈依赖关系的结果仍然可以为临床

应用此免煎方剂中药治疗尿路结石患者提供一定的试验依据。

本研究方剂三金三子汤为深圳市福田区第二人民医院治疗尿石症的经验方、药物组成(同上),具有清热利湿、化瘀通淋功效^[8]。其中组成成分:金钱草,为此经验方剂主要成分,有利水通淋,清热解毒,散瘀消肿功效。其作用机制如下:(1)有利胆排石和利尿排石的功效。研究报道,用蝌蚪实验性草酸钙肾结石模型试验表明,金钱草煎汁对于预防和治疗蝌蚪实验性肾结石是有效的。麻醉狗半开放式记录系统实验结果表明,金钱草可引起输尿管上段腔内压力增高,输尿管蠕动增强,尿量增加,对输尿管结石有挤压和冲击作用,促使输尿管结石排出。一水草酸钙为尿路结石的主要成分,金钱草的醇不溶物中的多糖成分,对一水草酸钙的结晶生长有抑制作用,且抑制作用随浓度的增加而增加,正常人尿液对一水草酸钙结晶生长的抑制作用与 $1.94 \times 10^{-5} \text{g(生药)}/\text{ml}$ 所提取的多糖的作用相当。采用导电法,发现精制多糖抑制一水草酸钙结晶生长百分率高于水煎液醇沉部分。(2)金钱草还有抗炎作用,对组胺引起的小鼠血管通透性增加有显著的抑制作用。(3)对免疫系统亦起抑制作用,对细胞免疫、体液免疫均有抑制作用。(4)对血管平滑肌及人血小板的作用:金钱草对血管平滑肌有松弛作用,对试管内ADP及花生四烯酸诱导的人血小板聚集也有一定的抑制作用。车前子:利水,增加尿量作用,清热;海金沙:清热解毒,利水通淋;鸡内金:消积滞,健脾胃,治小便淋沥,痛不可忍;冬葵子:利水,滑肠;莱菔子:具广谱抗菌作用及抗真菌作用;石韦:利水通淋,清肺泄热;瞿麦:清热利水;红花、活血通经、散瘀止痛;生甘草补脾益气,清热解毒,缓急止痛,调和诸药缓解药物毒性、烈性。鉴于草酸钙结石的成因乃多因素所致,显然一种药同时具有多种效用至关重要,方剂中药成分多样,活性成分复杂,单味中药所起的治疗作用可能不及方剂中药效果明显,我国方剂中药依据疾病辨证下药,在长时间的临床实践中取得良好疗效,故方剂中药疗效需以一方剂药物整体研究。本项研究结果表明,三金三子汤免煎方剂中药明显抑制了草酸钙结晶的形成和生长,为临床应用此免煎方剂中药临床治疗尿路结石患者提供一定的试验依据。但其起抑制草酸钙结晶形成及生长的机制目前还不清楚,任何物质只要能与草酸或钙离子结合成一定的复合物,便能抑制和减低草酸钙结晶形成和生长的速度。其机制是否与草酸根结合

成稳定的复合物,抑或嵌附在结晶表面从而改变结晶的生长习性,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 欧阳健明. 草酸钙结石研究中的化学基础[J]. 化学通报, 2002; 326-333
- 2 Xu GZ, Li GX, Ma LT, *et al.* Study on the factors relative to traumatic subarachnoid hemorrhage [J]. Journal of Traumatic Surgery, 2004, 6(6): 430-432
- 3 沈珉. 当代尿石症的流行病学特征[J]. 国外医学社会医学分册, 1999, 16(4): 145
- 4 Messa P, Marangella M, Paganin L, *et al.* Different dietary calcium intake and relative supersaturation of calcium oxalate in the urine of patients forming renal stones [J]. Clin Sci, 1997, 93: 257
- 5 刘丽, 刘克基, 康廷国. 草酸钙结晶及其在中药显微鉴定中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(5): 70-71
- 6 朱军, 沈玉华, 谢安建, 等. 草酸钙型尿结石的研究进展[J]. 化学世界, 2007, 3: 175-178
- 7 Ouyang J - M, Duan L, Tiek B. Effect of carboxylic acids on the crystal growth of calcium oxalate nanoparticles in lecithin - water liposome systems[J]. Langmuir, 2003, 19(21): 8980-8985
- 8 尹亚君, 等. 自拟三金排石汤治疗泌尿系结石 120 例[J]. 中医药学刊, 2003, 21(6): 979-980
- 9 张培萍, 刘丽华, 董峻岭, 等. 草酸钙的形成机理及影响因素. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(5): 567-568
- 10 欧阳健明, 姚秀琼, 苏泽轩, 等. 草酸钙结石的体外模拟[J]. 中国科学(B 辑), 2003, 33(1): 14
- 11 姚秀琼, 欧阳健明, 庞乃章, 等. 泌尿系结石患者尿液中草酸钙结晶的研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(1): 1-3
- 12 叶章群, 章咏裳, 胡仁昭, 等. 氯化锌溴化钾对草酸钙结晶生长的影响[J]. 中华实验外科杂志, 1989, 6(3): 137-138
- 13 叶章群. 泌尿系结石成因及防治新进展[J]. 现代实用医学, 2007, 19(4): 258-261

(收稿: 2009-12-04)

(修回: 2010-01-04)

低氧下丹参酮 II A 对人胃癌 SGC7901 细胞 HIF-1 α 与突变型 p53 表达的影响

冯玉光 宗绪山 邢国辉 吴美英 朱 芸

摘 要 **目的** 观察低氧下丹参酮 II A (Tan II A) 对人胃癌 SGC7901 细胞突变型 p53 表达的影响, 及其与 HIF-1 α 表达和凋亡的关系。**方法** 用氯化钴 (CoCl₂) 创建低氧模型, 设常氧对照组、低氧对照组和低氧加不同浓度 Tan II A 组。分别取 0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10.0mg/L 的 Tan II A 干预低氧胃癌 SGC7901 细胞 48h 和 72h 后 HOECHST 染色法检测细胞凋亡。Tan II A (0.5mg/L、2.0mg/L、10.0mg/L) 干预低氧胃癌细胞 48h 后, 免疫细胞化学二步法检测 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达的变化。**结果** HOECHST 染色法发现, 低氧条件下, Tan II A 可呈时间、剂量依赖性地诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡 ($P < 0.01$), 10.0mg/L Tan II A 作用细胞 72h 后, 凋亡率达 (40.70 $\pm$ 1.55) %。免疫细胞化学法显示, Tan II A 呈剂量依赖性地抑制 HIF-1 α 和突变型 p53 蛋白表达, 且二者呈高度正相关 ($n=4$, $r=0.886$, $P < 0.05$)。**结论** 低氧条件下 Tan II A 抑制人胃癌 SGC7901 细胞 HIF-1 α 和突变型 p53 的表达, 并诱导其凋亡, 提示 Tan II A 可能对防治低氧及 p53 突变导致的克隆选择及凋亡抵抗具有重要作用。

关键词 丹参酮 II A 低氧 胃癌细胞 HIF-1 α p53

Effects of Tan II A on the Expression of HIF-1 α and mt p53 in Gastric Cancer SGC7901 Cell under Hypoxia. Feng Yuguang, Zong Xushan, Xing Guohui, Wu Meiyang, Zhu Yun. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Shandong 261042, China

Abstract Objective The effects of Tan II A on the expression of mutant p53 (mt p53) and HIF-1 α in gastric cancer SGC7901 cell under hypoxia and the correlation between expression of mt p53, HIF-1 α and apoptosis were studied. **Methods** The model of hypoxia was established by CoCl₂. There were three groups: normal control group, hypoxia control group, and hypoxia combined with different concentrations of Tan II A group. After Tan II A was added to the media with 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0mg/L respectively for 48 and 72h during hypoxia, the apoptosis of SGC7901 human gastric cancer cells was detected by HOECHST stain. After Tan II A was added

基金项目: 山东省中医药管理局中医药科技发展计划项目 (2007-156)

作者单位: 261042 山东省潍坊医学院附属医院消化内科