

本研究应用免疫组化研究了大肠癌及腺瘤 sLex 表达,同时对大肠癌周围及远切端黏膜进行了 sLex 检测,结果表明 sLex 是检测大肠肿瘤发生及大肠癌分化程度的重要生物学标志物。

参考文献

- 1 Doekhie FS, Morreau H, de Bock GH, *et al.* Sialyl Lewis X expression and lymphatic microvessel density in primary tumors of node - negative colorectal cancer patients predict disease recurrence[J]. *Cancer Microenviron*,2008,1(1):141 - 151
- 2 Mannori G, Crottet P, Cecconi O, *et al.* Differential colon cancer cell adhesion to E - , P - , and L - selectin:role of mucin - type glycoproteins[J]. *Cancer Res*,1995,55(19):4425 - 4431
- 3 Hiratani K. The clinical significance of tumor - associated glycosylated antigen, sialylated Lewis[J]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, 1991,29(9):1096 - 1103
- 4 Jorgensen T, Berner A, Kaalhus O, *et al.* Up - regulation of the oligo-saccharide sialyl LewisX:a new prognostic parameter in metastatic pros-

- tate cancer[J]. *Cancer Res*,1995,55(9):1817 - 1819
- 5 Croce MV, Sállice VC, Lacunza E, *et al.* Alpha 1 - acid glycoprotein (AGP):a possible carrier of sialyl lewis X (slewis X) antigen in colorectal carcinoma[J]. *Histol Histopathol*,2005,20(1):91 - 97
- 6 Portela SV, Martín CV, Romay LM, *et al.* sLea and sLex expression in colorectal cancer:implications for tumourigenesis and disease prognosis [J]. *Histol Histopathol*,2011,26(10):1305 - 1316
- 7 Trinchera M, Malagolini N, Chiricolo M, *et al.* The biosynthesis of the selectin - ligand sialyl Lewis x in colorectal cancer tissues is regulated by fucosyltransferase VI and can be inhibited by an RNA interference - based approach[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2011,43(1):130 - 139
- 8 Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, *et al.* Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study [J]. *Cancer Res*,1993,53(15):3632 - 3637

(收稿:2011 - 12 - 12)

(修回:2012 - 01 - 04)

太白橐木抗肝损伤作用药效物质基础的初步研究

郭东艳 覃鸿恩 李 瑾 吕 杨 师延琼

摘 要 **目的** 初步确定太白橐木抗肝损伤作用的药效物质基础。**方法** 采用经典的系统溶剂法(极性由小到大:石油醚 - 氯仿 - 乙酸乙酯 - 正丁醇)依次对太白橐木提取液进行萃取,将各提取液分别灌胃给予四氯化碳(CCl_4)致急性肝损伤模型小鼠,检测血清及肝组织中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)的水平,比较各部位的抗肝损伤作用;将筛选出的活性部位用大孔吸附树脂进行分离纯化,不同浓度乙醇进行梯度洗脱,洗脱液分别灌胃给予肝损伤模型小鼠,检测血清及肝组织中 ALT、AST、SOD 的活性和 MDA、GSH - Px 的水平,比较各洗脱部位的抗肝损伤作用。**结果** 与模型对照组比较,正丁醇部位可明显降低 CCl_4 引起的 ALT、AST、MDA 升高,增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH - Px 的水平;70% 乙醇洗脱的正丁醇提取物可明显降低 CCl_4 引起的 ALT、AST、MDA 升高,增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH - Px 的水平,且洗脱液剂量与保肝作用有明显的正相关性。**结论** 太白橐木保肝作用的药效活性物质大多存在于 70% 乙醇洗脱的正丁醇部位,其抗肝损伤作用的活性成分可能与该部位主要成分皂苷类有关。

关键词 太白橐木 抗肝损伤 有效部位

Preliminary Study on Pharmacodynamic Material Basis of Aralia Taibaiensis in Anti - hepatic Injury. Guo Dongyan, Qin Hongen, Li Jin, Lv Yang, Shi Yanqiong. The Medicine College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China

Abstract Objective To study the pharmacodynamic material basis of Aralia taibaiensis in anti - hepatic injury. **Methods** The experimental drugs were systematically extracted by solutions method (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, N - buoh) from Aralia taibaiensis according to solutions' polarity. The mice model of acute liver injury was established by carbon tetrachloride. Activities of ALT, AST, SOD were examined, and levels of MDA, GSH - Px were determined. The hepatic histological changes were observed by optical microscope. The effect of anti - hepatic injury was compared. The effective part was in macroporous adsorption resin to purification, with different concentration gradient itself on ethanol. Then the Same procedures were as above. And the effect of anti - hepatic injury was compared in each elution part. **Results** Compared with model control group, N - buoh extract of Aralia taibaiensis could significantly de-

基金项目:陕西省教育厅资助项目(09JS015,2010JK506);陕西省中管局资助项目(ZY30,ZY31)

作者单位:712046 西安,陕西中医学院药学院

crease the ALT, AST, MDA activities by carbon tetrachloride, improve SOD activity and GSH - Px level. Pathological results showed that N - buoh extract of *Aralia taibaiensis* could significantly reduce the liver injury induced by carbon tetrachloride. The elution things by 70% ethanol from N - buoh extract could significantly decrease the ALT, AST, MDA activities by carbon tetrachloride, improve SOD activity and GSH - Px level. Dosages of eluent were positively related to anti - hepatic injury. **Conclusion** The effective parts for anti - hepatic injury exist mostly at the part of 70% ethanol from N - buoh extract. The active ingredients of anti - hepatic injury might be combined with it's saponins ingredients.

Key words *Aralia taibaiensis*; Anti - hepatic injury; Effective composition

太白橐木(*Aralia taibaiensis*)又名飞天蜈蚣七,系五加科橐木属多年生植物,分布于我国的西部地区,有着非常丰富的野生资源^[1]。主要以根皮入药,用于各种肝炎、肝硬化腹腔积液、消渴、跌打损伤及风湿痹痛等证^[2]。近年来的药理实验研究表明太白橐木具有确切的保肝作用^[3,4]。本实验采用四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型,对太白橐木不同极性部位提取物进行保肝作用的药效学研究,并结合大孔树脂分离技术筛选太白橐木保肝有效部位,为进一步深入研究太白橐木保肝的药效物质基础及作用机制奠定基础^[5]。

材料与方法

1. 材料与仪器:(1)动物:5~6周龄洁净级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 20 ± 2 g,由西安交通大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(陕)2007-001。(2)药物:太白橐木药材购于陕西眉县药材公司,经本院王继涛高级实验师鉴定为五加科植物橐木属(*Aralialinn*)太白橐木(*Aralia taibaiensis*)的根皮。联苯双酯滴丸(浙江医药有限公司新昌制药厂,批号:20100519);ALT、AST试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;MDA、SOD、GSH - Px试剂盒购自南京建成生物工程研究所。所用试剂均为分析纯。(3)仪器:XYJ-2台式高速离心机(江苏恒丰仪器厂生产);UV1102紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司生产);XD811半自动生化分析仪(上海医疗仪器公司生产);JJQ-P2016J生物组织切片机(武汉俊杰电子有限公司生产)。

2. 方法:(1)系统溶剂法提取部位:称取太白橐木药材1kg,8倍量80%乙醇回流提取2次,每次2h,回收乙醇,药渣加8倍量水煎煮两次,每次2h。合并醇提液和水提液,浓缩至约1000ml。采用系统溶剂法,按溶剂极性从小到大依次萃取,得到石油醚提取物、氯仿提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和萃取后剩余水相。各部位提取物加适量0.5%CMC - Na蒸馏水溶液研磨配置成混悬液(每毫升相当于原药材0.3g),备用。(2)大孔吸附树脂提取分离部位:取一定量正丁醇部位加水适量稀释,加于已处理好的HPD₁₀₀型大孔树脂柱上,控制吸附流速为1BV/h,然后用4BV的去离子水除杂,分别用2BV的30%、70%、90%乙醇以1BV/h的流速洗脱,收集洗脱液,回收乙醇后继续减压浓缩成稠膏,60℃烘箱干燥,分别称重,即得橐木提取物^[6,7]。再将上述不同浓度洗脱物配制成高中低浓度溶液(每毫升分别相当于原药材1、0.5、

0.25g),备用。(3)抗肝损伤作用实验研究^[8,9]:1)系统溶剂法提取各部位对CCl₄引起的急性肝损伤小鼠肝功能的影响:取洁净级昆明种小鼠96只,雌雄各半,体重 20 ± 2 g,按体重随机分为8组,每组12只,雌雄分开饲养。适应性饲养5天,联苯双酯组按0.6g/kg给药,正常对照组和模型组灌胃等体积的生理盐水,其余各组均按0.4毫升/(天·只)剂量进行灌胃给药,连续灌胃7天。末次给药后2h,将CCl₄溶于精制花生油中,配成0.1%的CCl₄花生油溶液,按0.1ml/10g进行腹腔注射,建立小鼠急性肝损伤模型,正常对照组腹腔注射等量生理盐水,禁食不禁水,16h后摘眼球取血,3500r/min离心10min,上清液保存备用。同时立即剖取肝脏,取0.5g肝组织,剪碎,放于玻璃匀浆器中,加预冷的9倍体积的0.9%生理盐水,2500r/min离心10min,上清液保存备用^[7]。血清生化指标ALT、AST的测定均按试剂盒说明书具体步骤进行,用半自动生化分析仪进行测定。肝组织生化指标SOD、GSH - Px、MDA的测定均按试剂盒说明书具体步骤进行,用紫外分光光度计进行测定。2)大孔吸附树脂分离部位对CCl₄引起的急性肝损伤小鼠的影响:取洁净级昆明种小鼠96只,雌雄各半,体重 20 ± 2 g,按体重随机分为8组,每组12只,雌雄分开饲养。适应性饲养5天,联苯双酯组按0.6g/kg给药^[6],正常对照组和模型组灌胃等体积的生理盐水,其余各组均按0.4毫升/(天·只)剂量进行灌胃给药,连续灌胃7天。处理方法用系统溶剂法。

结 果

1. 系统溶剂法提取各部位对CCl₄引起的急性肝损伤小鼠肝功能的影响:用半自动生化分析仪进行测定血清生化指标ALT、AST,紫外分光光度计测定肝组织生化指标SOD、GSH - Px、MDA。结果见表1、表2。实验结果表明,模型组的各指标水平相对空白对照组均有显著性差异($P < 0.01$)。正丁醇提取物组能明显降低CCl₄引起的ALT、AST、MDA升高,增加肝组织中SOD的活性和GSH - Px的水平,具有显著性差异($P < 0.01$);氯仿组能降低ALT、AST和MDA水平、增加GSH - Px的水平。石油醚、乙酸乙酯及萃取后剩余的水相则作用不明显。

2. 大孔吸附树脂分离部位对CCl₄引起的急性肝损伤小鼠的影响:用半自动生化分析仪进行测定血清生化指标ALT、AST,紫外分光光度计测定肝组织生化指标SOD、GSH - Px、MDA。结果见表3、表4。

表 1 各提取部位对 CCl₄ 引起的急性肝损伤小鼠血清转氨酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{U/L}$)

组别	ALT	AST
空白对照组	38.83 ± 4.49	76.58 ± 11.39
CCl ₄ 模型组	515.25 ± 37.11 *	385.92 ± 30.56 *
联苯双酯组	285.25 ± 27.45 ^{△△}	253.50 ± 54.27 ^{△△}
石油醚组	492.75 ± 30.85	370.17 ± 23.09
氯仿组	480.58 ± 33.24 [△]	359.67 ± 24.83 [△]
乙酸乙酯组	483.58 ± 37.79	366.83 ± 25.34
正丁醇组	359.17 ± 37.84 ^{△△}	307.33 ± 38.87 ^{△△}
剩余水相组	493.25 ± 24.52	368.75 ± 40.65

与对照组比, * $P < 0.01$; 与模型组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

表 2 各提取部位对 CCl₄ 引起的急性肝损伤小鼠肝组织 SOD、GSH - Px、MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	MDA (nmol/g)	GSH - Px (U/mg)	SOD (U/mg)
空白对照组	52.05 ± 12.43	182.48 ± 46.38	200.45 ± 21.36
CCl ₄ 模型组	265.41 ± 29.76 *	77.58 ± 17.17 *	78.84 ± 26.51 * *
联苯双酯组	121.92 ± 19.19 ^{△△}	119.02 ± 25.51 ^{△△}	158.94 ± 28.97 ^{△△}
石油醚组	260.85 ± 29.95	87.80 ± 23.89	90.54 ± 37.03
氯仿组	233.56 ± 29.48 [△]	97.93 ± 18.76 [△]	107.44 ± 38.72
乙酸乙酯组	249.15 ± 29.03	90.69 ± 20.32	100.77 ± 35.57
正丁醇组	129.01 ± 20.21 ^{△△}	106.53 ± 17.72 ^{△△}	141.43 ± 44.07 ^{△△}
剩余水相组	237.24 ± 43.25	92.33 ± 21.48	94.22 ± 25.17

与对照组比, * $P < 0.01$; 与模型组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

表 3 不同浓度的各洗脱部位对 CCl₄ 引起的急性肝损伤小鼠血清转氨酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{U/L}$)

组别	ALT	AST
空白组	38.75 ± 4.13	73.83 ± 9.03
模型组	292.58 ± 45.01 *	310.50 ± 38.40 *
阳性组	114.83 ± 19.30 ^{△△}	186.58 ± 29.84 ^{△△}
30% 乙醇高剂量	252.25 ± 28.54 [△]	275.42 ± 21.21 [△]
30% 乙醇中剂量	258.92 ± 37.64	282.50 ± 24.01
30% 乙醇低剂量	273.25 ± 31.92	286.42 ± 21.56
70% 乙醇高剂量	138.75 ± 21.46 ^{△△}	147.50 ± 26.95 ^{△△}
70% 乙醇中剂量	187.92 ± 26.70 ^{△△}	200.42 ± 38.92 ^{△△}
70% 乙醇低剂量	205.83 ± 25.52 ^{△△}	233.67 ± 29.39 ^{△△}
90% 乙醇高剂量	277.50 ± 22.63	286.58 ± 18.85
90% 乙醇中剂量	280.08 ± 22.05	293.17 ± 23.23
90% 乙醇低剂量	281.92 ± 28.10	300.67 ± 23.05

与对照组比, * $P < 0.01$; 与模型组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

实验结果表明:模型组的各指标水平相对空白对照组均有显著性差异($P < 0.01$)。70% 乙醇洗脱液各剂量均能明显降低 CCl₄ 引起的 ALT、AST、MDA 升高,增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH - Px 的水平,具有显著性差异($P < 0.01$),;30% 乙醇洗脱部位的高剂量组能降低 CCl₄ 引起的 ALT、AST 升高,增加肝组织中 SOD 的活性及 GSH - Px 的水平($P < 0.05$),90% 乙醇洗脱部位作用不明显。

表 4 不同浓度的各洗脱部位对 CCl₄ 引起的急性肝损伤小鼠肝组织 SOD、GSH - Px、MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	MDA (nmol/g)	GSH - Px (U/mg)	SOD (U/g)
空白组	37.92 ± 7.91	186.90 ± 35.12	177.37 ± 27.33
模型组	128.66 ± 26.84 *	93.51 ± 36.17 *	82.12 ± 33.20 *
阳性组	50.44 ± 11.62 ^{△△}	159.84 ± 23.99 ^{△△}	142.95 ± 17.92 ^{△△}
30% 乙醇高剂量	109.49 ± 15.15	123.72 ± 26.42 [△]	114.74 ± 28.89 [△]
30% 乙醇中剂量	110.53 ± 17.88	117.09 ± 11.69	111.63 ± 39.72
30% 乙醇低剂量	112.05 ± 22.25	109.80 ± 12.13	103.37 ± 44.28
70% 乙醇高剂量	71.70 ± 8.81 ^{△△}	151.86 ± 25.20 ^{△△}	137.44 ± 27.70 ^{△△}
70% 乙醇中剂量	77.49 ± 6.61 ^{△△}	137.62 ± 21.01 ^{△△}	127.89 ± 12.87 ^{△△}
70% 乙醇低剂量	84.23 ± 11.31 ^{△△}	128.75 ± 14.71 ^{△△}	119.42 ± 19.11 ^{△△}
90% 乙醇高剂量	110.57 ± 23.46	110.37 ± 23.84	94.32 ± 20.46
90% 乙醇中剂量	111.25 ± 20.89	108.28 ± 15.36	91.80 ± 21.67
90% 乙醇低剂量	115.86 ± 15.96	102.67 ± 16.37	92.63 ± 30.67

与对照组比, * $P < 0.01$; 与模型组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

讨 论

肝脏是人体内最大的实质器官,结构和功能复杂,易受多种病原体、毒物及免疫病理累及。四氯化碳进入肝细胞后,使线粒体膜的脂质溶解,从而影响线粒体的结构和功能,使酶蛋白质合成减少,造成酶的破坏,因而影响代谢功能和能量的生成,致使肝细胞的变性、坏死。本实验通过采用经典的系统溶剂法并结合大孔树脂分离技术,对太白橐木抗肝损伤作用进行了初步研究,结果表明:正丁醇部位可显著降低 CCl₄ 引起的 ALT、AST、MDA 升高,增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH - Px 的水平,氯仿、石油醚等部位作用不明显。因此初步分析:正丁醇部位所含成分可能为太白橐木抗肝损伤作用的主要活性成分。对正丁醇部位进一步进行大孔树脂分离,分别得到不同醇浓度洗脱部位,结果表明 70% 乙醇洗脱部位大中小剂量组均能显著降低 CCl₄ 引起的 ALT、AST、MDA 升高,增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH - Px 的水平,且剂量与保肝作用有明显的正相关,结合太白橐木中的主要化学成分为皂苷类,因此初步判断太白橐木中皂苷含量的高低与抗肝损伤作用可能有一定的相关性,其活性成分的确定及作用机制还有待于进一步试验。

参考文献

1 孙碌. 橐木的价值及资源保护[J]. 特产研究,1991,(2):50

2 王忠壮,张凤春,苏中武,等. 太白橐木的生药学研究及化学成分分析[J]. 中国药学杂志,1995,30(4):199

3 崔大江,邹敏,聂丹丽. 飞天蜈蚣七对实验性肝纤维化大鼠胰岛β细胞功能的影响[J]. 河北中医药学报,2004,19(1):21-23

4 崔大江,聂丹丽,衣蕾. 太白橐木对大鼠肝星状细胞核因子-κB 活性表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(4):48-49

- 5 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991
- 6 郭东艳, 卢雪梅. 太白楸木总皂苷纯化工艺研究[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(4): 65-67
- 7 张丽娟. 生地黄止血物质基础及海绵剂制备工艺研究[D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2011
- 8 周程艳, 余海平, 陶志彬, 等. 杜仲水提物对四氯化碳所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2321-2323
- 9 冯天艳, 方荣, 邓改改, 等. 根皮苷对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 47-49
- (收稿: 2012-02-10)
- (修回: 2012-02-27)

成骨细胞在精-丙-天-丙 16 自组装多肽水凝胶表面培养的研究

张 锋 任灵飞 应永芳 施更生

摘 要 **目的** 研究小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 在自组装多肽水凝胶材料上黏附、伸展、增殖和分化的能力。**方法** 人工合成短肽精-丙-天-丙 16(RADA16), 制备 RADA16 水凝胶并用扫描电镜观察其微观结构。同时在 RADA16 多肽水凝胶支架材料上接种 MC3T3-E1 细胞, 观察细胞黏附、伸展、增殖和分化的情况。**结果** MC3T3-E1 细胞能够在多肽水凝胶上黏附、伸展和增殖。成骨诱导培养后的细胞有较高水平的 ALP、OC 表达及矿化基质沉积, 成骨相关基因 Runx2, OSX, AKP-2 和 OC 也有高表达, 且表达量随着时间的延长而不断升高。**结论** 自组装多肽水凝胶能够支持 MC3T3-E1 细胞的黏附、伸展、增殖和分化, 显示了良好的生物相容性, 可能在牙周炎所致的骨质缺损修复中有广泛应用。

关键词 多肽水凝胶 RADA16 成骨细胞

Study of Osteoblast Cultured on the Surface of RADA16 Self-assembling Peptide Hydrogel. Zhang Feng, Ren Lingfei, Ying Yongfang, Shi Gengsheng. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317100, China

Abstract Objective To investigate the ability of attachment, spreading, proliferation and differentiation of mouse pre-osteoblasts, MC3T3-E1, on RADA16 self-assembling peptide hydrogel. **Methods** RADA16 peptide was custom synthesized. RADA16 peptide hydrogel was prepared and SEM was used to explore its ultra-structure. Then, MC3T3-E1 cells were seeded on RADA16 peptide hydrogel. Cell attachment, cell spreading, cell proliferation and cell differentiation were evaluated. **Results** MC3T3-E1 cells adhered and spread well on RADA16 peptide hydrogel. High ALP activity, OC production, calcium deposition and expressions of bone-related genes (Runx2, OSX, AKP-2, OC) were detected, and their expressions were increased with the culture time. **Conclusion** Self-assembling peptide scaffold can support pre-osteoblast attachment, spreading, proliferation and differentiation and show good compatibility. This kind of peptide scaffold might have a wide application in dentistry, especially the treatment of bone defects caused by periodontal disease.

Key words Peptide hydrogel; RADA16; Osteoblast

牙周病是人类口腔中两大最常见的疾病之一, 也是成年人牙齿缺失的首要原因。根据 2005 年第 3 次全国口腔健康流行病学调查结果显示: 我国 80%~97% 的成年人患有不同程度的牙周疾病。牙周病的治疗方法不少, 但是牙周组织的恢复尤其是牙周支持骨的恢复一直没有得到很好的解决。最近有一种新型的多肽自组装纳米纤维支架材料被广泛用于细

胞培养和组织修复^[1~4]。这些低分子多肽水溶液(0.1%~1.0%), 能够在一定条件下(温度、pH 值、离子浓度等)自发的形成稳定的和具有一定强度的水凝胶支架材料^[5]。根据这种特性, 可以使之在体外为溶液状态而在体内为凝胶状态, 从而实现可注射性。由于牙周病引起的骨组织缺损形状复杂且非常不规则, 可注射水凝胶修复材料具有尤其明显的优越性, 通过注射的方法将具有一定流动性的生物材料种植体内, 原位成型, 因此很容易充满整个具有不规则形状的缺损部位, 手术创伤非常微小。

本文将研究自组装多肽水凝胶材料 RADA16 的

基金项目: 2007 年浙江省科技厅基金资助项目(2007C 23016)

作者单位: 317100 临海, 浙江省台州医院

通讯作者: 施更生, 电子信箱: painfulzf@yahoo.cn