optimization of beta-glucosidase production from pichia pastoris[J]. Appl Biochem Biotechnol，2014，172(1)：380-393.
[9] Mead R，Pike DJ. A review of response surface methodology from a biometric viewpoint[J]. Biometrics，1975，31(4)：803-851.
[10] 徐向宏，何明珠. 实验设计与 Design- Exper、SPSS 应用[M]. 北京：科学出版社，2010：154-155.
[11] 廖艳，王雪，张立实，等. 溶血试验作为眼刺激试验替代方法的研究[J]. 现代预防医学，2002，29(4)：593-595.
[12] 廖南英，刘启德，宓穗卿，等. 溶血试验替代滴眼液眼刺激性试验的可行性研究[J]. 中药新药与临床药理，2012，23(6)：648-652.
[13] 姚晨，孙考祥，梁娜. 角膜上皮细胞培养模型及其在眼部药物研究中的应用进展[J]. 中国新药杂志，2010，19(23)：2147-2151.
[14] Szumiel I，Nias AH. Isobologram analysis of the combined effects of anti-tumour platinum complexes and ionizing radiation on mammalian cells[J]. Br J Cancer，1980，42(2)：292-296.
[15] Fivelman QL，Adagu IS，Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of Plasmodium falciparum [J]. Antimicrob Agents Chemother， 2004，48(11)：4097-4102.
[16] 王永菲，王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报，2005，14(3)：236-240.
[17] Majumdar S，Hippalgaonkar K，Repka MA. Effect of chitosan，benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea[J]. Int J Pharm，2008，348(1-2)：175-178.

（编辑：梁进权）

温阳活血方有效部位促进分化抑制因子 1 表达及抑制内皮细胞自噬性死亡的研究

白 晔[1]，李 菲[1]，黄凤媛[1]，邓柏杨[2]，李熙灿[3]，陈东风[1]，黎 晖[1]，邓汝东[1]，周健洪[1]（1. 广州中医药大学解剖学教研室，广东 广州 510006；2. 广西中医药大学附属瑞康医院，广西 南宁 530011；3. 广州中医药大学中药学院，广东 广州 510405）

摘要：目的 探讨温阳活血方对自噬损伤内皮细胞保护作用的物质基础以及对凋亡相关因子 Activate Caspase-3、自噬相关蛋白泛素结合蛋白 P62 以及分化抑制因子 1(ID1)表达的影响。**方法** 将温阳活血方不同极性提取物(石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、乙醇提取物和水提取物)作用于过氧化氢诱导的自噬性损伤内皮细胞模型，应用二苯基四氮唑溴盐(MTT)法观察内皮细胞的活性，用气相色谱 - 质谱联用技术(GS-MS)分析有效部位的化学成分，Western blot 法检测有效部位对 Activate Caspase-3、P62、ID1 表达的影响。**结果** 温阳活血方石油醚部位可提高内皮细胞活性；GS-MS 检测发现石油醚部位主要成分有 4-(4- 羟基 -3- 甲氧基苯基)-2- 丁酮、3- 丁烯基苯酞、Z- 藁本内酯、E- 藁本内酯、2，10- 冰片二醇、Z，Z-9，12- 亚油酸、6- 姜酚、8- 姜酚等；Western blot 检测发现，石油醚部位能上调 ID1、P62 的表达，抑制 Activate Caspase-3 的表达。**结论** 石油醚部位是温阳活血方对抗内皮细胞自噬性死亡的活性部位，其通过降低内皮细胞内 Activate Caspase-3 的表达，提高 P62 和 ID1 的表达，以对抗内皮细胞的自噬性死亡。

关键词： 温阳活血方；内皮细胞；氧化应激；自噬
中图分类号： R284.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2014)03-0249-06
doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.003

Studies on Active Fraction of *Wenyang Huoxue* Decoction in Promoting Expression of ID1 and Inhibiting Autophagic Cell Deaths in HUVECs

BAI Ye[1]，LI Fei[1]，HUANG Fengyuan[1]，DENG Boyang[2]，LI Xican[3]，CHEN Dongfeng[1]，LI Hui[1]，DENG Rudong[1]，ZHOU Jianhong[1]（1. Dept. of Anatomy，Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou 510405 Guangdong，

收稿日期： 2013-11-18
作者简介： 白晔，女，博士研究生， 研究方向：中医药保护内皮细胞。Email：EllenPai@foxmail.com。通讯作者：邓柏杨，医学博士。Email：dbygx11@126.com
基金项目： 广西壮族自治区自然科学基金重点项目(2010GXNSFD013051)。

China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011 Guangxi, China; 3. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the active fraction of *Wenyang Huoxue* Decoction in protecting human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) from autophagic cell deaths induced by hydrogen peroxide, and to research its effect on the expression of activated caspase-3, ubiquitin-binding protein P62 and inhibitor of differentiation 1(ID1). **Methods** *Wenyang Huoxue* Decoction was boiled in Soxhlet extractor, and was extracted separately with the solvents of petroleum ether(F1), acetic ether(F2), ethanol(F3) and water(F4). HUVECs with autophagic cell deaths induced by hydrogen peroxide were cocultured with the different extraction fractions of petroleum ether fraction, acetic ether fraction, ethanol fraction and water fraction. And then methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to observe the activities of HUVECs, and the components of active fraction were analyzed by gas chromatography-mass spectrogram (GC-MS). Western blotting was recruited to analyze the effect of active fraction on the expression of activated caspase-3, P62 and ID1. **Results** In our study, petroleum ether fraction(F1) was the active fraction of *Wenyang Huoxue* decoction to protect HUVECs from autophagic deaths. The results of GC-MS showed that main ingredients of F1 were 4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone, 3-butylidenephthalide, Z-ligustilide, E-ligustilide, 2, 10-bornyl glycol, Z, Z-9, 12-octadecadienoic acid, 6-gingerol, 8- gingerol. Western blotting analysis showed that F1 could increase the expression of ID1 and P62, and inhibit the expression of activated caspase-3 in HUVECs. **Conclusion** Petroleum ether fraction(F1) is the active fraction of *Wenyang Huoxue* Decoction to protect HUVECs from autophagic cell deaths, and its mechanism is related to the decrease of expression of activated caspase-3 in HUVECs, and the increase of the expression of P62and ID1.

Keywords: *Wenyang Huoxue* Decoction; Human umbilical vein endothelial cells; Oxidant stress; Autophagy

动脉硬化闭塞症(ASO)是由于周围动脉硬化导致动脉狭窄、闭塞，从而引起的缺血性血管疾病，是最常见外周血管性疾病之一。研究[1]发现，病变受累血管的内皮细胞缺血性损伤是 ASO 的重要发病机制，并有学者[2]认为氧化应激诱导的内皮细胞自噬性死亡是该病血管损伤后的主要转归之一。分化抑制因子 1 (Inhibitor of DNA binding/differentiation 1, ID1) 属于螺旋 - 环 - 螺旋(HLH)转录因子家族成员之一，具有调控细胞周期、促进细胞增殖等作用，参与血管内皮细胞损伤后的修复过程，对细胞自噬水平的调控是 ID1 修复受损内皮细胞的重要机制[3-4]。

中医认为 ASO 发病机制在于阳气亏虚，复感阴寒之邪，阻滞筋脉，气血凝滞，阳气不达四末，失于温煦，故宜温阳活血，散寒通络[5]。运用温阳活血法可以改善家兔血液流变学异常，使 ASO 得到明显改善[6]。邓柏杨教授在多年临床实践中发现温阳活血、化痰消食疗法能防治 ASO，从而总结出以此法治疗 ASO 的经验方——蠲脉 I 号方，动物实验结果显示该方能有效防治新西兰兔的高脂血症及动脉硬化[7]。本研究将探讨蠲脉 I 号中温阳活血拆方(简称温阳活血方)对抗人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)自噬性死亡的物质基础，及其对凋亡相关因子 Activate Caspase-3、泛素结合蛋白 P62 以及 ID1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 DMEM/F12 培养基，美国 GIBCO 公司，批号：8113372；胎牛血清，天津颢阳公司，批号：TBD21HY；二苯基四氮唑溴盐(MTT)，美国 Sigma 公司，批号：2497B516；二甲基亚砜(DMSO)，美国 Sigma 公司，批号：D5879；过氧化氢，天津富宇精细化工公司，批号：1211241；Activate caspase-3 抗体(批号：999993W)、ID1 抗体(批号：980382W)、P62 抗体(批号：YSLE04W)，北京博奥森公司；气相色谱 - 质谱联用仪(GC-MS)，美国 Agilent 公司；DYY2C 型电泳仪、垂直电泳槽，北京六一仪器厂。

1.2 细胞株 HUVECs 购自复旦大学细胞资源中心。

1.3 药物 将温阳活血方饮片(肉苁蓉、干姜、熟附子、当归、熟地、桂枝、黄芪、川芎)干燥后打成粗

粉，各取 3 g 装入索式提取器，按照极性从小到大的顺序依次用石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇、双蒸水依次进行提取，得到石油醚部位(F1)、乙酸乙酯部位(F2)、无水乙醇部位(F3)、双蒸水部位(F4)。各部位称质量后分别溶于 DMSO 中。

1.4 GC-MS 测定各部位化学成分 质谱条件：电离方式 EI，电子轰击能量 70 ev，扫描范围 20~500 aum。色谱条件：BD-5 ms 石英弹性毛细管柱，初始温度：60 ℃，停 1 min，以 5 ℃·min^{-1} 升温至 250 ℃。进样器温度：250 ℃，分流比 50∶1，进样量：1 μL。定量方法：相对峰面积归一化法。谱库仪器自带。

1.5 HUVECs 培养与模型的建立 将 HUVECs 按 1×10^5 cm^{-2} 接种于细胞培养瓶，置于 37 ℃、5 %CO_2 孵育箱培养。培养液为含 10 %胎牛血清、10^5 U·L^{-1} 青链霉素、4 ng·mL^{-1} 血管内皮细胞生长因子的 DMEM/F12 培养基，2 d 更换培养基，当 HUVECs 生长至对数期、融合至 80 %~90 %时，用 2.5 g·L^{-1} 胰酶室温消化 5 min，按 1×10^5 cm^{-2} 进行传代。用 DMEM/F12 无血清培养液将过氧化氢稀释成终浓度 0.5 mmol·L^{-1}，孵育 HUVECs 3 h，以建立氧化应激损伤的 HUVECs 模型[8]。

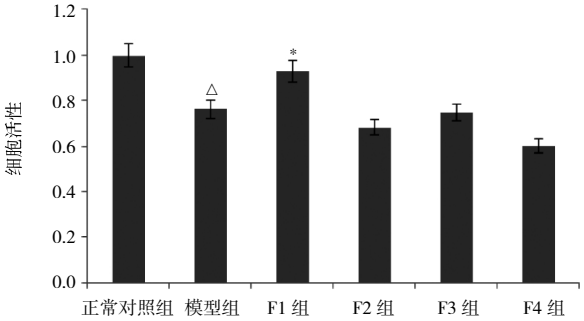
1.6 MTT 比色法检测细胞活性 传代后 HUVECs 以每孔 3000 个种于 96 孔板，于 37 ℃、5 %的 CO_2 孵育箱培养 24 h。将细胞分为正常对照组、模型组、温阳活血方各提取部位组(F1 组、F2 组、F3 组、F4 组)。正常组细胞换成无血清培养基孵育 27 h；模型组细胞以 0.5 mmol·L^{-1} 过氧化氢刺激细胞 3 h 后换无血清培养基孵育 24 h；温阳活血方各提取部位组细胞以 0.5 mmol·L^{-1} 过氧化氢刺激 3 h 后，分别置于含终浓度为 30 μg·mL^{-1} 的温阳活血方各提取部位的无血清培养液中孵育 24 h。每孔加 20 μL MTT(5 mg·mL^{-1})，于培养箱继续孵育 4 h 后将孔内液体吸尽，每孔加入 100 μL DMSO 充分溶解，用酶标仪于波长 490 nm 检测各孔吸光度。将测出的吸光度值最高的药物提取部位确定为温阳补血方活性部位。

1.7 Western blot 检测蛋白表达 将 HUEVCs 种于 6 孔板(方法同 1.6 项)。将细胞随机分为正常对照组、模型组、温阳活血方活性部位组。正常对照组细胞换成无血清培养基孵育 27 h；模型组细胞以 0.5 mmol·L^{-1} 过氧化氢刺激细胞 3 h 后换无血清培养基，孵育 24 h；温阳活血方活性部位组细胞以 0.5 mmol·L^{-1} 过氧化氢刺激 3 h 后，置于含终浓度为 30 μg·mL^{-1} 的温阳活血方活性部位的无血清培养液中孵育 24 h。分组处理细胞后，提取细胞总蛋白。将各组蛋白样品加上蛋白上样缓冲液煮沸变性，进行 SDS 聚氯丙烯凝胶电泳，电转移至 PVDF 膜后，用 50 g·L^{-1} 脱脂牛奶封闭 1 h，分别加入适量浓度的 β-actin、Activate Caspase3、ID1、P62 多克隆抗体，4 ℃孵育过夜，加辣根过氧化物酶标记的二抗室温反应 1 h，洗膜后在暗室中将 PVDF 膜用超敏发光液孵育 1 min，用 X 线曝光显影。图像经扫描仪扫描后，用图像分析软件 Image J 分析光密度值，分别以 Activate-3/β-actin、ID1/β-actin、P62/β-actin 光密度比值来表示 Activate Caspase-3、ID1、P62 蛋白表达水平。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 13.0 统计软件，多组间比较用单因素方差分析，两组间比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 温阳活血方的活性部位筛选 见图 1，与正常对照组比较，模型组 HUVECs 活性明显下降（$P<0.01$）；与模型组比较，石油醚部位(F1)组 HUVECs 活性明显升高($P<0.01$)，石油醚部位对 HUVECs 模型具有保护作用，故认为石油醚部位是温阳活血方对抗内皮细胞自噬性死亡的活性部位。



注：与正常对照组比较，△$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.01$。

图 1 温阳活血方的提取部位对 HUVECs 活性的影响(n=3)

Figure 1 The effect of different extract fractions from *Wenyang Huoxue* Decoction on the activities of HUVECs

2.2 石油醚部位化学成分分析 通过总离子流色谱图和质谱分析，与质谱数据库进行对比，得出石油醚部位的主要化学成分，并通过计算各峰值面积得出各成分含量，见表 1。石油醚部位的主要成分有：4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-2-丁酮、3-丁烯基苯酞、Z-藁本内酯、E-藁本内酯、2，10-冰片二醇、Z，Z-9，12-亚油酸、6-姜酚、8-姜酚。

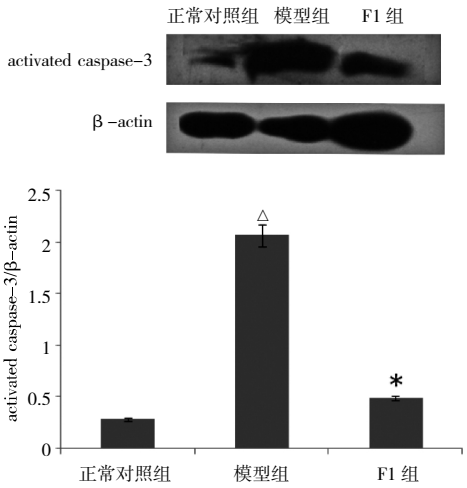
2.3 石油醚部位对 HUVECs 模型 Activate Caspase-3

表 1　石油醚部位 GC-MS 分析结果

Table 1　GC-MS analysis of petroleum ether fraction

编号	保留时间 /min	名称	分子式
1	14.526	4-(4- 羟基 -3- 甲氧基苯基)-2- 丁酮	$C_{10}O_3H_{11}$
2	14.742	3- 丁烯基苯酞	$C_{12}O_2H_{12}$
3	15.367	Z- 藁本内酯	$C_{12}O_2H_{12}$
4	16.398	E- 藁本内酯	$C_{12}O_2H_{12}$
5	17.347	2，10- 冰片二醇	$C_{10}O_2H_{17}$
6	19.203	Z，Z-9，12- 亚油酸	$C_{18}OH_{32}$
7	20.628	6- 姜酚	$C_{17}O_4H_{28}$
8	21.678	8- 姜酚	$C_{19}O_4H_{30}$

表达的影响　见图 2。Western blot 检测显示，与正常对照组比较，模型组细胞 Activate Caspase-3 表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较，石油醚部位组细胞 Activate Caspase-3 表达水平明显下降($P<0.01$)。



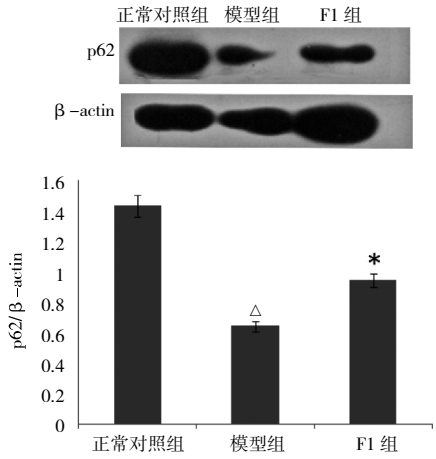
注：与正常对照组比较，$^{\triangle}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.01$。

图 2　石油醚部位对 HUVECs 模型 Activate Caspase-3 表达的影响(n=3)

Figure 2　The effect of petroleum ether fraction on the expression of activated Caspase-3 protein in HUVECs

2.4 石油醚部位对 HUVECs 模型 P62 表达的影响　见图 3。Western blot 检测显示，与正常对照组比较，模型组细胞 P62 表达显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，石油醚部位组细胞 P62 表达明显升高($P<0.01$)。

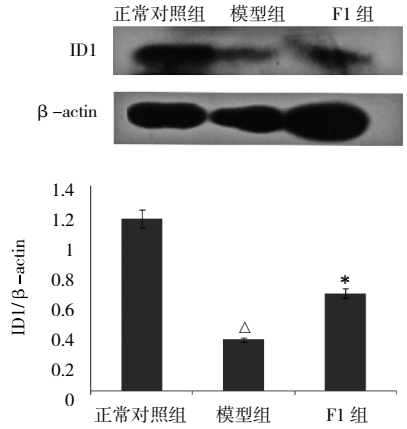
2.5 石油醚部位对 HUVECs 模型 ID1 表达的影响　见图 4。Western blot 检测显示，与正常对照组比较，模型组细胞 ID1 表达显著降低($P<0.01$)；与模型组比较，石油醚部位组细胞 ID1 表达明显升高($P<0.01$)。



注：与正常对照组比较，$^{\triangle}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.01$。

图 3　石油醚部位对 HUVECs 模型 P62 表达的影响(n=3)

Figure 3　The effect of petroleum ether fraction on the expression of P62 protein in HUVECs



注：与正常对照组比较，$^{\triangle}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.01$。

图 4　石油醚部位对 HUVECs 模型 ID1 表达的影响(n=3)

Figure 4　The effect of petroleum ether fraction on the expression of ID1 protein in HUVECs

3 讨论

ASO 是由于周围动脉粥样硬化导致动脉狭窄、闭塞，从而引起的缺血性血管疾病。研究[2]发现，受累血管内皮细胞的自噬性损伤是 ASO 的主要致病因素之一。中医及中西医结合内科治疗是 ASO 的研究热点。目前临床和药理研究[9-10]表明，运用中医温阳活血法治疗 ASO 能有效维持内皮细胞的正常功能；中医疗法与手术治疗联用，可有效降低患者 ASO 的复发率。

温阳活血方由肉苁蓉、干姜、熟附子、当归、熟地、桂枝、黄芪、川芎组成。本研究结果显示该方石油醚提取部位能提高过氧化氢损诱导的内皮细胞的活性。GC-MS 检测发现，石油醚部位的主要成

分有 4-(4- 羟基 -3- 甲氧基苯基)-2- 丁酮、3- 丁烯基苯酞、Z- 藁本内酯、E- 藁本内酯、2，10- 冰片二醇、Z，Z-9，12- 亚油酸、6- 姜酚、8- 姜酚，其中 4-(4- 羟基 -3- 甲氧基苯基)-2- 丁酮为医药中间体；3- 丁烯基苯酞为当归的有效成分；E- 藁本内酯为川芎的有效成分；Z- 藁本内酯为当归和川芎活性成分；6- 姜酚、8- 姜酚为干姜的有效成分。研究[11-13]表明，丁烯基苯酞、藁本内酯及姜酚均有改善机体循环、保护血管缺血性损伤的作用。体外实验显示姜酚能清除细胞氧自由基，对抗细胞的氧化应激性损伤[14]；另外，Z，Z-9，12- 亚油酸为长链脂肪酸，具有抑制细胞自噬的作用[15-16]；冰片二醇能够促进受损内皮细胞屏障功能的恢复[17]。

Caspase-3 是凋亡相关蛋白 caspase 家族的成员，是直接介导细胞凋亡的实施效应蛋白和已知的凋亡最后执行因子，故又称为死亡蛋白。Caspase-3 通常以无活性的 Caspase-3 前体形式存在，当细胞受到凋亡信号激活或外界有害刺激时，Caspase-3 被激活，转变成有活性的裂解型 Caspase-3（Cleaved Caspase-3，又称为 Activate Caspase-3），参与细胞凋亡的发生。抑制 Capsase-3 蛋白的激活，即抑制 Activate Caspase-3 的表达，可明显减轻细胞凋亡的发生。故可认为 Activate Caspase-3 的表达水平是判断细胞凋亡水平的的可靠指标之一[18-19]。本研究中，过氧化氢刺激内皮细胞后，细胞中的 Activate Caspase-3 表达明显升高，表明过氧化氢刺激细胞可诱导内皮细胞发生凋亡。石油醚部位能显著降低细胞内 Activate Caspase-3 表达水平，说明温阳活血方石油醚部位可以抑制过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡。

细胞自噬是真核细胞利用溶酶体降解细胞内物质并进行再利用的过程，在细胞内营养缺乏的情况下，可以降解胞质内大分子和细胞器，为生理需要的蛋白质合成提供原料及能量，以维持细胞的生存以及内环境的稳定，同时它能降解机体内有害物质，防止其在细胞内大量聚集。但当细胞内自噬过度激活时，尽管溶酶体依然可以降解细胞内的有害物质，但同时可能将细胞内的细胞器“消化”掉，造成细胞内环境紊乱，引发细胞的程序性死亡[20]。在自噬活化过程中，泛素结合蛋白 P62 可将错误折叠的蛋白泛素化后送至自噬体内，使得错误折叠蛋白和泛素结合蛋白 P62 一同被降解，故 P62 表达降低可作为细胞内自噬水平升高的指标[21]。本研究表明，过氧化氢刺激 HUVECs 后，细胞内的 P62 表达较正常对照组细胞显著降低，结合各组细胞 Activate Caspase-3 表达水平变化情况，表明过氧化氢刺激 HUVECs 后会诱导细胞的自噬性死亡。石油醚部位能使细胞内 P62 表达升高，提示石油醚部位能抑制 HUVECs 模型的自噬发生，从而抑制 HUVECs 自噬性死亡。

ID1 是一种具有调控细胞周期，促进细胞增殖作用的转录因子[22]，能通过抑制细胞周期相关蛋白 P21 基因的启动子活性，抑制 P21 蛋白的表达，从而抑制 P21 蛋白与自噬相关蛋白 Beclin-1 的结合，降低细胞内的自噬水平[4]。此外，ID1 同时能通过抑制自噬相关基因 P53 启动子活性，降低 P53 蛋白对下游自噬过程的活化作用，并能上调细胞内 bcl-2 的表达，抑制细胞自噬性死亡的发生[23-24]。本研究显示，模型组细胞内 ID1 表达低于正常对照组细胞，表明抑制细胞内 ID1 活性是过氧化氢诱导的内皮细胞自噬性损伤的途径之一；石油醚部位能明显提高 HUVECs 内 ID1 表达水平，表明石油醚部位能通过调控细胞内 ID1 水平抑制细胞内的自噬性损伤。

本研究结果表明，石油醚部位是温阳活血方对抗内皮细胞自噬性死亡的活性部位，其通过降低 HUVECs 内 Activate Caspase-3 的表达，提高 P62 和 ID1 的表达，以对抗内皮细胞的自噬性死亡。但由于石油醚部位成分较多，有待进一步从中寻找具体发挥作用的成分。

参考文献：

[1] 王春喜，齐清会，吴咸中. 内皮素、一氧化氮等内皮细胞活性因子与动脉硬化闭塞症血瘀证关系的研究[J]. 中国中西医结合杂志，1999，19(8)：463-465.

[2] Ding Z，Liu S，Wang X，et al. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage，autophagy and inflammation in atherosclerosis[J]. Sci Rep，2013，3：1077.

[3] Norton JD，Deed RW，Craggs G，et al. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation[J]. Trends Cell Biol，1998，8：58-65.

[4] 陈建. 血管内皮细胞 hCASK-ID1 通路对 P53 表达调控的机制研究[D]. 重庆：中国第三军医大学，2007.

[5] 张翠月，高征，范雪峰，等. 中医外科学[M]. 北京：中国古籍出版社，2009：399-401.

[6] 邓柏杨，葛辛，郝钰. 温经活血对实验损伤性动脉硬化性闭塞症家兔血液流变学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2005，11(7)：517-518.

[7] 何泽生，张美花，黄仕任，等. 蠲脉 I 号对兔动脉硬化血液流变学和血脂的影响[J]. 广西医学，2014，36(1)：56-58.

[8] 李立平，韦瑛，蔡捷，等. 过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡与 Caspase-3 表达的实验研究[J]. 陕西医学杂志，2008，37(8)：960-

1006.
[9] 邓柏杨. 中医药防治血管 PTA 术后再狭窄研究概况[J]. 辽宁中医杂志，2004，31(9)：795-796.
[10] 邓柏杨. 中西医结合非手术治疗急性下肢深静脉血栓形成[J]. 四川中医，2005，23(8)：69-70.
[11] 康一. 中药当归的药效物质基础研究[D]. 天津：天津大学，2009.
[12] 王迎超. 川芎内酯及其主要成分 Z- 藁本内酯抗动脉粥样硬化作用机制研究[D]. 杭州：浙江大学，2013.
[13] 蒋苏贞，宓穗卿，王宁生. 姜酚心血管药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药，2007，18(1)：219-221.
[14] 于宁，曾虹燕，邓欣. 姜酚的提取、鉴定及其抗氧化性研究[J]. 食品科学，2007，28(8)：201-204.
[15] 黄卫东，吕武清. 冰片的研究进展[J]. 中国药业，2008，17(4)：64-66.
[16] Wang R，Paul VJ，Luesch H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga Ulva lactuca as activators of the cytoprotective Nrf2-ARE pathway[J]. Free Radic Biol Med，2013，57：141-153.
[17] 赵保胜，宓穗卿，张银卿. 冰片对大鼠脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达量的影响[J]. 中药新药与临床药理，2001，12(2)：88-90.
[18] Zhang Y，Goodyer C，LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3，-6，-7，and -8[J]. J Neurosci，2000，20(22)：8384-8389.
[19] Marani M，Tenev T，Hancock D，et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis[J]. Mol Ceil Biol，2002，22(11)：3577-3589.
[20] 秦正红，乐卫东. 自噬—生物学与疾病[M]. 北京：科学出版社，2011：60-61.
[21] Ichimura Y，Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy [J]. Semin Immunopathol，2010，32(4)：431-436.
[22] 王红. 转录因子 ID1 对内皮祖细胞增殖、迁移的影响及在损伤血管修复中作用的研究[D]. 重庆：中国第三军医大学，2010.
[23] 贾思远. 分化抑制因子 Id1 相互作用蛋白的研究[D]. 重庆：中国第三军医大学，2003.
[24] 徐海东. 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在自噬调控以及细胞生存中的机制研究[D]. 重庆：中国第三军医大学，2012.

（编辑：梁进权）

白头翁总皂苷碱水解产物的抗胶质瘤作用及机制研究

彭翠平[1,2]，许琼明[2]，张　天[2]，李笑然[2]，杨世林[1,2]，周　英[1]，刘艳丽[2](1. 贵州大学药学院，贵州 贵阳 550025；2. 苏州大学药学院，江苏 苏州 215123)

摘要：目的　探讨白头翁总皂苷碱水解产物(PAHS)的抗胶质瘤作用及机制。**方法**　采用 MTT 法、集落形成实验分别检测细胞存活率和集落形成率，同时采用 Giemsa 染色观察 PAHS 对肿瘤细胞形态学变化；采用 hoechest33342 染色观察人脑胶质母细胞瘤细胞株 U251 凋亡细胞形态变化；用流式细胞仪检测细胞的凋亡；用 Western Blot 法检测 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达变化。**结果**　PAHS 可以剂量依赖性的抑制 U251 细胞的增殖，抑制 U251 细胞集落的形成；PAHS(6.25，9.375，12.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$)可以诱导 U251 细胞凋亡，抑制率分别为(6.00±2.05)%、(46.19±0.24)%、(78.26±2.10)%。PAHS 可以上调 Caspase-3、Bcl-2 等蛋白的表达。**结论**　PAHS 具有良好的抗胶质瘤作用，其机制可能与调节 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达有关。

关键词：白头翁总皂苷碱水解产物；胶质瘤；抗肿瘤；凋亡；机制
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2014)03-0254-06
doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.004

Anti-glioma Effect and Mechanism of Alkali Hydrolysate of Total Saponins from *Pulsatilla chinensis* on Human Glioma U251 Cells

PENG Cuiping[1,2]，XU Qiongming[2]，ZHANG Tian[2]，LI Xiaoran[2]，YANG Shilin[1,2]，ZHOU Ying[1]，LIU Yanli[2](1. College of Pharmaceutical Science，Guizhou University，Guiyang 550025 Guizhou，China；2. College of Pharmaceutical

收稿日期：2013-12-23
作者简介：彭翠平，女，硕士研究生，研究方向：天然药物活性成分及其作用机制研究。Email：penging2011@163.com。通讯作者：刘艳丽，副教授。研究方向：中药药理与抗肿瘤药理研究。Email：liuyanli@suda.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金项目(81273402)；重大新药创制国家科技重大专项(2011ZX11102-001-19)；江苏省自然科学基金(BK2012620)；2013 年苏州大学大学生创新创业训练计划(2013xj060)。