

附子大黄配伍减毒存效实验研究

高 鹏, 叶祖光(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: **目的** 观察附子配伍不同比例大黄对附子毒性和药效的影响。**方法** ICR 小鼠, 40 mL·kg⁻¹ 体质量灌胃给药, 平行比较附子和附子配伍大黄的急性毒性, 测定其半数致死量(LD₅₀); SD 大鼠 10 mL·kg⁻¹ 体质量灌胃给药, 平行比较附子和附子配伍大黄的心脏毒性; 采用高效液相色谱法测定附子与大黄配伍前后乌头类生物碱成分的含量; 通过小鼠耳肿胀试验、醋酸扭体试验和回阳救逆试验考察附子配伍大黄对附子药效的影响。**结果** 随着大黄配伍比例的增高, 附子急性毒性 LD₅₀ 有增加趋势, 大黄对附子心脏心律失常抑制率逐渐增大, 附子配伍大黄后主要乌头类生物碱成分含量降低, 但附子配伍大黄后对附子抗炎、镇痛和回阳救逆药效无明显影响。**结论** 大黄对附子毒性具有剂量依赖性拮抗作用, 大黄配伍附子在减轻附子毒性的同时不影响附子的药效, 附子配伍大黄减毒时应该考虑大黄的配伍比例。

关键词: 附子; 大黄; 配伍; 减毒; 存效

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0542-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.006

Experimental Study on Effects of Radix et Rhizome Rhei on Toxicity and Efficacy of Radix Aconiti in Compatibility

GAO Peng, YE Zuguang (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To study the effects of Radix et Rhizome Rhei in different combination ratio on the toxicity and efficacy of Radix Aconiti. **Methods** Acute toxicity was evaluated by detecting the median lethal dose (LD₅₀) in ICR mice treated with gastric infusion of the decoction of Radix et Rhizome Rhei combined with Radix Aconiti in the dose of 40 mL·kg⁻¹ body weight. Heart toxicity was evaluated in SD rats after treat with gastric infusion of the decoction of Radix et Rhizome Rhei combined with Radix Aconiti in the dose of 10 mL·kg⁻¹ body weight. HPLC was applied for the determination of aconitine in Radix et Rhizome Rhei and Radix Aconiti before and after compatibility. The pharmacodynamic research of Radix et Rhizome Rhei combined with Radix Aconiti was also carried out through mice auricular swelling test, acetic acid body writhing test, and test of reviving *yang* for resuscitation. **Results** With the increase of the combined use of Radix et Rhizome Rhei, both LD₅₀ value in acute toxicity test and arrhythmia inhibition rate of Radix Aconiti were positively increased, while the contents of the toxic components in the water-extract of their combination were lower than those in the water-extract of Radix Aconiti alone. The results of pharmacodynamic research showed that the combined use of Radix et Rhizome Rhei had no effect on the anti-inflammatory action, analgesic action and actions of reviving *yang* for resuscitation of Radix Aconiti. **Conclusion** Radix et Rhizome Rhei appeared to have dose-dependent antagonistic action on the toxicity of Radix Aconiti, but has on effect on the pharmacodynamic action of Radix Aconiti. When used for decreasing the toxicity of Radix Aconiti, the dose of the combined use of Radix et Rhizome Rhei should be taken into account. dose of rhubarb should be

收稿日期: 2014-03-17

作者简介: 高鹏, 男, 副教授, 博士后, 研究方向: 中药创新药物研究。Email: gaopenggaopeng@126.com。通讯作者: 叶祖光, 研究员, 研究方向: 中药药理和毒理学。Email: yezuguang@sina.com。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)计划项目(2009CB522800)。

considered when it is combined with *Radix aconiti carmichaeli* for detoxification.

Keywords: *Radix Aconiti*; *Radix et Rhizome Rhei*; Drug combination; Toxicity attenuation; Efficiency reservation

附子为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx)的子根加工品,味辛、甘,性温、大热,有大毒。中医理论认为,附子辛热燥烈,易伤阴动液,配以寒凉降泄之品以制燥烈之偏,降泄以导热毒外出,可达减毒之效^[1]。如《伤寒论》大黄附子汤、附子泻心汤及《千金方》温脾汤之配大黄,尽寓寒温互制以减附子毒性之义。研究^[2]表明,附子配伍大黄后能解附子的毒性,但大黄的配伍比例对附子毒性的影响鲜有研究。此外,附子配伍大黄减毒后,其药效是否随之降低也缺乏研究。本实验旨在研究附子配伍不同比例的大黄对附子毒性及药效的影响。

1 材料与方法

1.1 药物 附子(黑顺片, *Radix aconiti lateralis* Preparata),产地四川江油,购自江油市中药材公司;大黄(*Rheum palmatum* L.),产地青海,购自北京仟草中药饮片有限公司;乌头碱(批号:110720-200722)、次乌头碱(批号:110798-200805)、新乌头碱(批号:110799-200505)、苯甲酰乌头原碱(批号:111794-200901)、苯甲酰次乌头原碱(批号:111796-200901)和苯甲酰新乌头原碱(批号:111795-200901),均购于中国食品药品检定研究院。阿司匹林肠溶片,批号:120601,南京白敬宇制药有限公司;地高辛片,批号:120711,上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂。

1.2 仪器 16道生理记录仪,美国BIOPAC公司;SHIMADZU SIL-20A高效液相色谱仪,日本岛津公司;OHAUS CP423型电子天平,美国奥蒙斯公司;METTLER TOLEDO ML104/02电子天平,瑞士梅特勒公司;EYELA SB-1100旋转蒸发仪,日本Eyela公司。

1.3 动物 ICR小鼠,SPF级,雌雄各半,体质量18~22 g;SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体质量230~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.4 受试药物制备 黑顺片:取饮片,粗粉碎,加8倍量40%的乙醇回流提取2次,每次1 h,滤过,合并2次煎液,减压回收乙醇,滤液继续减压浓缩

至稠膏,并进行减压干燥,得干膏,备用;大黄:取大黄,加8倍量水回流提取2次,每次1 h,滤过,合并2次提取液,浓缩并干燥,得干膏,备用;实验中所用附子-大黄受试物为上述提取物的混合物,混合比例按折算成原药材的量计。

1.5 不同配伍比例大黄对附子的减毒作用研究

1.5.1 不同配伍比例大黄对附子急性毒性的影响 通过预实验得到单用附子小鼠全部致死剂量和全部存活剂量。以高于预实验动物全部致死剂量和低于动物全部存活剂量为实验剂量范围,组间距0.75,进行附子急性毒性研究。附子配伍大黄药液中附子的剂量设置等同于单用附子。

ICR小鼠,雌雄各半,适应性观察3 d。小鼠禁食16 h,按照设计的剂量给药1次,给药体积40 mL·kg⁻¹。给药当日,尤其是给药后4 h内密切观察动物的毒性反应情况(如一般表现、呼吸、活动及有无惊厥等)及中毒症状发生的时间、持续时间、恢复情况,死亡动物进行大体解剖观察,记录所观察到的变化,连续观察14 d。绘制动物死亡曲线,采用Bliss法计算半数致死剂量(LD₅₀)。

1.5.2 不同配伍比例大黄对附子心脏毒性的影响 首先通过预实验确定附子致小鼠中毒出现心律失常的剂量范围。本实验选择致小鼠90%心率失常的剂量进行实验,观察附子配伍不同比例大黄的心率失常发生率,以考察不同配伍比例的减毒效果。

SD大鼠,雌雄各半,称体质量,实验剂量采用了致小鼠90%心律失常的剂量6.7 g·kg⁻¹,折合成大鼠的剂量为:6.7×0.71=4.76 g·kg⁻¹,按照10 mL·kg⁻¹给药,给药后以1%戊巴比妥腹腔注射麻醉(45 mg·kg⁻¹),使用多道生物信号采集系统记录动物心电图状况,连续观察45 min,以心脏出现各类型的心率失常为心脏中毒的观察指标。

1.6 不同配伍比例大黄对附子的存效作用研究

1.6.1 不同配伍比例大黄对附子抗炎作用的影响^[4] 取体质量18~22 g雄性ICR小鼠,随机分为10组,每种配伍比例根据附子的用量大小而分为高、低剂量组,每组10只动物,用耳部肿胀法进行抗炎实

验。按照表 3 给药剂量给药, 每天给药 1 次, 连续 6 d, 给药体积均为 20 mL·kg⁻¹ 体质量, 模型组给予同体积蒸馏水。末次给药后 1 h, 将二甲苯涂于各组小鼠右耳, 每只 50 μL, 30 min 后处死动物, 用直径 9 mm 的打孔器将双耳同部位的等面积打下, 精密天平称质量, 以左右耳片重之差值为肿胀度, 计算抑制率。

1.6.2 不同配伍比例大黄对附子镇痛作用的影响^[4] 采用扭体法进行镇痛实验。动物分组及给方法同 1.6.1, 末次给药 1h 后, 分别给各组小鼠腹腔内注射新配制的 0.6 %冰醋酸溶液 10 mL·kg⁻¹ 体质量, 以出现扭体(小鼠腹部内凹、伸展后肢、臀部抬高) 为准, 记录各组小鼠出现扭体反应的时间(潜伏期)及 15 min 内扭体次数。

1.6.3 不同配伍比例大黄对附子回阳救逆作用的影响^[5-8] SD 大鼠, 雄性, 250~270 g, 分为 7 组, 即: 空白组, 模型组, 阳性药(地高辛)组, 附子高、低剂量组, 附子-大黄(1:1)高、低剂量组。除空白组外, 其余 6 组 1 次性左侧腹腔注射阿霉素 10 mg·kg⁻¹ 复制急性心衰模型, 马上按照规定的剂量给予一定的药物, 空白组和模型组给予等体积生理盐水^[3-6]; 采用心率失常实验确定的安全剂量 6.7 g·kg⁻¹ 作为高剂量, 以其 1/2 即 3.4 g·kg⁻¹ 作为低剂量进行实验, 阳性药组选择地高辛 22.5 μg·kg⁻¹ (按照正常人用量 5.4 倍折算剂量)。

腹腔给药 24 h 后进行心功能检测, 大鼠先以 20 %乌拉坦腹腔注射麻醉(1.2 g·kg⁻¹), 固定在手术台上, 仰卧位固定四肢, 于颈部腹侧偏右纵向切开皮肤在胸锁乳突肌内侧分离右颈总动脉 1.5 cm, 动脉夹夹住近心端, 结扎远心端然后再经颈动脉插入已准备好的充满肝素的左室导管, 松紧度应以切口处不漏血, 导管又能自由进出为度。左手用镊子夹住颈总动脉及导管, 右手将导管插入左室腔, 感到导管随心脏搏动而明显抖动时, 应减慢插进速度, 再送入导管约 0.2~0.3 cm, 至出现心功信号曲线(宽振幅波线)时, 先稳定 10 min, 再观察 10 min, 观察指标为 5 项: 左室收缩压(LVSP)、左室收缩压最大下降速率(-dp/dtmin)、左室舒张末期压(LVEDP)及心率(HR), 同时四肢皮下埋入针式电极观察 II 导联心电图。参考文献以左室内压(LVSP)或(和)左室内压最大上升速率(+dp/dtmax)下降至正常动物的 20 %~30 %为考察模型成功率指标。

1.7 不同配伍比例大黄对附子毒性成分含量的影响 参照《中华人民共和国药典》2010 年版一部 177 页附子药材项下的含量测定方法^[9], 将附子提取物和大黄提取物按照表 6 中的比例混合后, 采用 HPLC 法测定附子与不同比例大黄配伍前后 6 种代表性生物碱的含量。

1.8 统计学处理方法 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS16.0 软件进行统计处理, 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同配伍比例大黄对附子减毒作用的结果

2.1.1 不同配伍比例大黄对附子急性毒性的影响 通过预实验确定给药剂量分别为: 75, 56.25, 41.2, 31.6, 23.7, 17.8 g·kg⁻¹, 单用附子灌胃给药后, 高剂量组小鼠精神萎靡, 口吐白沫, 动物出现喘气, 继而呼吸停止死亡; 部分动物出现惊厥。动物死亡多发生在给药后 5~30 min, 死亡动物解剖, 肉眼可见到心脏充血, 未见其他明显的病理改变。存活动物在给药后 12 h 恢复正常饮水和进食。附子配伍大黄组的动物中毒表现特征同单用附子。同单用附子比较, 配伍大黄后量-毒曲线明显右移(见图 1), 说明附子大黄合用液毒性明显减低。附子配伍不同比例大黄的减毒作用未发现明显的剂量依赖性, 附子配伍大黄 1:3 以最大给药量给药 10 只小鼠仅死亡 1 只, 未能测出 LD₅₀, 结果见表 1。

表 1 附子与大黄配伍前后 LD₅₀ 实验结果表(n=10)

Tabe 1 LD ₅₀ experimental results before and after compatibility		
组别	LD ₅₀ /g·kg ⁻¹	95 %置信区间/g·kg ⁻¹
附子组	33	26.4~41.2
附子-大黄(3:1)组	最高剂量(75 g·kg ⁻¹)死亡 4 只	未测出
附子-大黄(1:1)组	最高剂量(75 g·kg ⁻¹)死亡 2 只	未测出
附子-大黄(1:3)组	最高剂量(75 g·kg ⁻¹)死亡 1 只	未测出

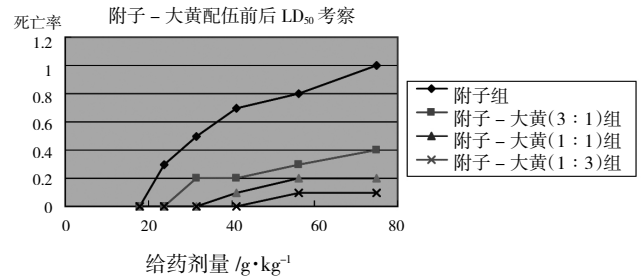


图 1 附子配伍不同比例大黄急性毒性量-毒曲线
Figure 1 Acute toxicity dose toxicity curve of Radix et Rhizome Rhei and different proportion of Radix Aconiti

2.1.2 不同配伍比例大黄对附子心脏毒性的影响 附子致大鼠心律失常表现为室性早搏、室性心动过速，附子配伍大黄后其心律失常的发生率明显下降，而且随着配伍大黄剂量的增加，附子的毒性降低，呈现剂量依赖性的减毒作用，结果见表 2。

表 2 附子与大黄配伍对大鼠心律失常的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 2 Suppression of arrhythmia in rats experimental results of the compatibility of Radix et Rhizoma Rhei and Radix Aconiti

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	心率失常 发生例数	心率失常 发生率 /%	心率失常 抑制率 /%
附子组	4.76	7	87.5	0
附子-大黄(3:1)组	4.76	2	25	71.4
附子-大黄(1:1)组	4.76	1	12.5	85.7
附子-大黄(1:3)组	4.76	0	0	100

2.2 不同配伍比例大黄对附子存活作用的结果

2.2.1 抗炎作用 见表 3。附子配伍大黄的 3 个配伍比例量效关系较好，其中高剂量组随大黄配伍比例增加而抗炎作用有增强趋势，但低剂量组效果不明显，比单用附子低剂量组效果有所减弱。

表 3 附子与大黄配伍对小鼠耳肿胀的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 3 Mouse ear swelling and swelling inhibition test results

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度 /mg	肿胀抑制率 /%
空白组		38 ± 16	
阿司匹林组	0.6	27 ± 21*	28.9
附子低剂量组	3.4	24 ± 14	36.8
附子高剂量组	6.7	18 ± 18*	47.4
附子-大黄(3:1)低剂量组	3.4	29 ± 17	23.7
附子-大黄(3:1)高剂量组	6.7	22 ± 18	42.1
附子-大黄(1:1)低剂量组	3.4	35 ± 31	27.9
附子-大黄(1:1)高剂量组	6.7	17 ± 8*	55.3
附子-大黄(1:3)低剂量组	3.4	27 ± 19	28.9
附子-大黄(1:3)高剂量组	6.7	17 ± 19*	55.3

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。

2.2.2 镇痛作用 见表 4。镇痛实验结果表明，附子大黄配伍对扭体潜伏期影响规律性不强。在扭体次数方面，附子与大黄配伍比例为 1:1 和 1:3 组量效关系均较好，且高低剂量均比单用附子时疗效好。

2.2.3 回阳救逆作用 见表 5，模型制备成功。附子与大黄配伍后，药效无降低。

2.3 不同配伍比例大黄对附子毒性成分含量的影响
见表 6。在附子 6 种代表性生物碱中，苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱和次乌头碱在配伍后含量明显降低，而新乌头碱和乌头碱

表 4 附子与大黄配伍对小鼠扭体次数、潜伏期试验的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 4 Times and writhing latency test results

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	扭体数	潜伏期 /min
空白组		52.5 ± 17	3.1 ± 0.7
阿司匹林组	0.6	21.3 ± 18.1**	6.3 ± 1.8**
附子低剂量组	3.4	41.8 ± 21	3.7 ± 0.8
附子高剂量组	6.7	33.8 ± 14.2*	3.4 ± 1.4
附子-大黄(3:1)低剂量组	3.4	33.9 ± 15.1*	3.4 ± 1.2
附子-大黄(3:1)高剂量组	6.7	38.1 ± 11	3.3 ± 0.7
附子-大黄(1:1)低剂量组	3.4	38.2 ± 15.2	3.4 ± 1.1*
附子-大黄(1:1)高剂量组	6.7	27.9 ± 16.2*	3.9 ± 0.6
附子-大黄(1:3)低剂量组	3.4	35.9 ± 11.1*	3.6 ± 1*
附子-大黄(1:3)高剂量组	6.7	21.6 ± 9.5**	3.5 ± 1.2

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

表 5 附子与大黄配伍对附子回阳救逆药效的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 5 The effect of compatibility or reviving yang efficacy results table

组别	+dp/dt _{max}	- dp/dt _{max}	LVSP	LVEDP	HR
空白组	4874.18 ± 581.16	-4696.97 ± 942.26	171.85 ± 13.4	-17.17 ± 4.73	447.32 ± 42.85
模型组	1995.63 ± 523.68**	-1679.69 ± 797.94**	105.71 ± 13.22**	1.28 ± 37.99	373.44 ± 27.75**
阳性药组	3778.23 ± 438.36 ^{△△}	-3642.05 ± 734.98 ^{△△}	139.38 ± 11.3 ^{△△}	-14.10 ± 4.85	391.95 ± 79.6
附子高剂量组	4146.18 ± 432.12 ^{△△}	-4200.87 ± 581.05 ^{△△}	158.88 ± 10.47 ^{△△}	13.66 ± 5.77	408.07 ± 29.97 [△]
附子低高剂量组	3387.48 ± 633.08 ^{△△}	-3317.63 ± 562.54 ^{△△}	134.96 ± 12.11 ^{△△}	-9.74 ± 5.01	396.16 ± 49.22
附子-大黄高剂量组	3946.80 ± 435.1 ^{△△}	-3939.17 ± 473.07 ^{△△}	142.02 ± 9.23 ^{△△}	-15.19 ± 3.87	398.94 ± 72.84
附子-大黄低剂量组	3190.09 ± 701.78 ^{△△}	-3270.57 ± 633.08 ^{△△}	132.70 ± 17.09 ^{△△}	-10.5 ± 6.22	332.28 ± 63.78

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ 。

表 6 附子与大黄配伍前后乌头类生物碱含量测定结果(%)
Table 6 The content determination of aconitine before and after of compatibility of Radix et Rhizoma Rhei and Radix Aconiti

组别	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰乌 头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	总含量
附子	0.00480	0.01990	0.00730	0.00100	0.00200	0.00000	0.03499
附子-大黄(3:1)组	0.00351	0.01109	0.00642	0.00681	0.00097	0.00379	0.03260
附子-大黄(1:1)组	0.00281	0.00836	0.00412	0.00943	0.00085	0.00570	0.03129
附子-大黄(1:3)组	0.00076	0.00573	0.00137	0.01065	0.00089	0.00498	0.02438

含量反而增加。

3 讨论

大黄附子汤中附子与大黄的配伍比例为 1:1，本研究为了考察大黄配伍比例对附子减毒影响，在减毒及抗炎镇痛实验中设计了附子-大黄比例为 1:3 和 3:1 的配伍。在附子配伍大黄的减毒实验中，配伍组的急性毒性测定均未得出 LD₅₀ 值；在心脏毒性试验选择单用附子时致 90 %小鼠心率失常的剂量

进行试验,结果3种配伍比例的大黄均有较好的抑制率,且随大黄配伍比例的增加,抑制心率失常作用增强,说明大黄对附子具有很好的减毒作用;比较急性毒性和心脏毒性的附子配伍大黄的实验结果,2种试验方法所获得的大黄减毒作用具有较好的一致性。这提示大黄对附子的减毒作用可能与其心脏的保护作用有关。

附子具有抗炎和镇痛药效学作用,因此在减毒存效研究中,选择抗炎和镇痛作为药效学指标观察附子配伍大黄后的存效作用,结果表明大黄对附子的抗炎和镇痛效价无明显影响;中医角学认为,附子主要作用是回阳救逆,因此除了抗炎、镇痛之外,本研究针对回阳救逆进行了附子强心作用的研究,结果表明附子配伍大黄之后,后者对附子的强心作用无明显影响。综上所述,提示大黄对附子的毒性有明显拮抗作用,但对附子的药效却无显著的负面影响,因此附子配伍大黄减毒不减效。

附子中生物碱类成分是附子主要的毒性成分,本研究观察了附子单煎和附子与大黄合用对附子毒性成分的影响。通过对单用附子及配伍大黄水煎液中生物碱类成分的比较研究发现,配伍后水煎液中多数生物碱的含量下降,并随着大黄比例的增高而

含量递减,但新乌头碱和乌头碱的含量在配伍后却增加,而总乌头碱含量配伍后是下降的,而且随着配伍大黄的比例的增加而减少。这可能是大黄减附子毒性的部分原因之一,其机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王岚,彭成. 附子与大黄配伍源流的研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(2): 100-103.
- [2] 王均宁,张成博,鲍捷,等. 基于方剂组成统计分析的附子减毒配伍规律探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(5): 23-26.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177-178.
- [4] 张广平,解素花,朱晓光,等. 附子甘草配伍减毒增效/存效实验研究. 中国中医药信息杂志[J]. 2012, 19(6): 31-34.
- [5] 金凯,陈中军,罗华荣. 盐酸阿霉素对大鼠心肌损伤的分子机制研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2002, 23(3): 191-194.
- [6] 赵志国,李军云,蒋晔,等. 蜈蚣酸性蛋白对急性心力衰竭大鼠心功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(2): 106-109.
- [7] 刘国平,黄丽,葛敏. 绞股蓝总皂苷对阿霉素致急性心衰大鼠心功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 106-108.
- [8] 胡玉录,张贺龙,吴明华,等. 强心益气汤对多柔比星所致急性心衰大鼠心功能的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 930-932.

(编辑:修春)

重组 HSV1-tkGFP/GCV 荧光蛋白示踪系统的构建及对小鼠黑色素瘤的抑制作用

曾玲¹, 吴映雅¹, 谭宇蕙¹, 丘鹏翔³, 张广献¹, 刘娟², 陈志从¹, 杜标炎² (1. 广州中医药大学生化教研室, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学病理教研室, 广东 广州 510006; 3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立具有绿色荧光蛋白(GFP)示踪功能的单纯疱疹病毒1型胸苷激酶基因/更昔洛韦自杀基因系统(HSV1-tkGFP/GCV),并检测该系统对小鼠黑色素瘤的抑制作用。**方法** 将阳性重组质粒 pLXSN-tkGFP 和 pLXSN-DsRed2 分别转染 B16 细胞,加 G418 进行筛选。用 GCV(5, 50, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)杀伤实验验证 tk 基因的表达。四甲基偶氮唑盐(MTT)法和荧光示踪法验证该系统存在旁杀伤效应。将 B16-tkGFP 和 B16-RFP 细胞按 1:1 混合,接种于 C57BL/6J 小鼠进行肿瘤模型复制,随机分为模型组和 GCV(50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组,腹腔注射给药,每 3 d 检测 1 次肿瘤大小($n=14$)。**结果** 成功获得能发出绿色荧光的 B16-tkGFP 细胞和能发出红色荧光的 B16-RFP 细胞,且 tk 基因在 B16-tkGFP 细胞中表达正常。该系统存在一定的旁杀伤效应。与模型组比较,GCV 组小鼠肿瘤生长受到明显抑制($P<0.01$)。**结论** 重组 HSV1-tkGFP/GCV 系统对小鼠黑色素瘤有明显抑制

收稿日期:2014-03-10

作者简介:曾玲,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合肿瘤防治及分子药理学研究。Email: zeng07@yeah.net。通讯作者:杜标炎,教授,研究方向:中医药防治肿瘤研究。Email: dubiaoyan@gzucm.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072906, 30973811);广东省科技厅承担政府特定任务项目(2012B061700108)。