

- 素的含量. 南京中医药大学学报, 1998, 14(4): 219.
- [3] 钱士辉, 朱玲英, 袁丽红. 柑橘不同入药部位的成分比较与评价. 中药材, 2001, 24(9): 632.
- [4] 钱士辉, 杨念云, 植飞等. 不同产地陈皮药材的质量初步分析. 基层中药杂志(中药材 GAP 研究与实践版), 2002, 2(2): 45.

Study on the Anticancer Activities (*In Vivo*) of the Extract from *Citrus reticulata* Blanco and Its Influence on Sarcoma-180 Cells Cycle

QIAN Shi-hui¹, WANG Yi-xian², YANG Nian-yun¹, YUAN Li-hong³

(1. Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu, China;

2. Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, Jiangsu, China;

3. Nanjing Industry University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

[Abstracts] **Objective** To study the anticancer activity of the extract from *Citrus reticulata* *in vivo*. **Method** Anticancer activities were tested with tumor model *in vivo* (Sarcoma-180 cells, Heps cells, EAC cells implanted in mice). **Result** The extract from *Citrus reticulata* showed marked anticancer activities on Sarcoma-180 cells and Heps cells implanted in mice, had no marked anticancer activities on EAC cells implanted in mice and induced apoptosis of Sarcoma-180 cell. **Conclusion** The extract from *Citrus reticulata* will have promising prospects as an anticancer Chinese medicine, but further studies will be needed.

[Key words] *Citrus reticulata* Blanco; extract; anticancer activity *in vivo*; cells cycle; apoptosis

[责任编辑 方文贤]

榄仁叶氯仿提取物的 护肝作用及其对肝脏 IL-6 表达的抑制作用

汤新慧¹, 高静¹, 王燕萍¹, 徐力致¹, 赵晓宁¹, 徐强²

(1. 南京大学医学院药物开发研究所, 江苏南京 210093;

2. 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏南京 210093)

[摘要] 目的: 研究榄仁树叶氯仿提取物(TCCE)对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤的防护作用及其机制。方法: 以不同剂量 TCCE(20, 50, 100 mg·kg⁻¹) 给小鼠连续灌胃 5 d 后, 腹腔注射 CCl₄, 24 h 后测定小鼠血清 ALT 活力变化。同时, 运用 RT-PCR 半定量分析肝脏 IL-6 mRNA 量的变化并观察肝组织形态学改变。结果: 小鼠腹腔注射 CCl₄ 24 h 后, sALT 水平显著升高, 为对照组的 5.6 倍(P<0.01)。而各剂量 TCCE 均可显著抑制 CCl₄ 诱导的小鼠 sALT 水平的上升, 其中, 100 mg·kg⁻¹ TCCE 组小鼠 sALT 水平恢复至对照组水平。形态学观察表明, TCCE 明显减轻 CCl₄ 引起的小鼠肝细胞索排列紊乱、肝细胞肿胀及嗜酸性变等, 且能对抗甚至逆转 CCl₄ 引起的急性肝损伤小鼠肝脏 IL-6 mRNA 含量的升高。结论: TCCE 具有很好的护肝作用, 且其机理可能与抑制 IL-6 基因的过度表达有关。

[关键词] 肝损伤; IL-6; TCCE; CCl₄; 小鼠

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2003)12-1169-05

榄仁树 *Terminalia catappa* L. 系诃子属植物,

广泛分布于东南亚一带, 当地民间常用榄仁叶防治肝炎、肝腹水、肝癌等各种肝病, 效果显著。事实上, 该地区肝病发病率甚低。已有报道指出, 榄仁叶水提物具护肝作用^[1-3], 但其有效部位及药理机制的研究未见系统报道。

[收稿日期] 2003-07-10

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目(BK99051)

[通讯作者] 高静 Tel: (025) 3593374 Fax: (025) 3593360

E-mail: jinggao@nju.edu.cn

本实验室工作表明, 榄仁叶氯仿提取物 (*T. catappa L. chloroform extract*, TCCE) 中三萜类化合物含量最高, 达 23.8%。而三萜类物质能有效对抗多种急慢性肝损伤^[4-6]。本实验采用 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型, 结合形态学观察和生化指标的测定, 检测 TCCE 的护肝作用, 并采用 RT-PCR 半定量分析法研究 TCCE 对急性肝损伤小鼠肝脏 IL-6 mRNA 水平的影响, 探讨 TCCE 的药理机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

ICR 雄性小鼠, 63 只, 体重 (20.0 ± 2.0) g, 购于东南大学医学院动物中心。动物质检号: 97003。

1.2 实验材料

TCCE 的提取制备: 榄仁叶收集于中国云南, 由中国科学院江苏植物所姚淦教授鉴定。取干燥榄仁叶 1.1 kg, 加乙醇回流提取, 提取液浓缩后用氯仿萃取, 干燥得 32.0 g TCCE。CCl₄ 为上海长江化学试剂厂产品, 用植物油配成 0.15%; 联苯双酯, 购自北京协和制药厂, 用生理盐水配成 10 g · L⁻¹; ALT 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Tripure 为 Roche 产品; RT-PCR 所用试剂均为 Promega 产品; PCR 引物由上海申友生物工程公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 CCl₄ 诱导的肝损伤模型

小鼠 15 只分 5 组, 分别于腹腔注射 0.15% CCl₄ 0.1 mL · 10 g⁻¹。0, 12, 18, 24, 36 h 后处死动物, 取肝组织做组织学切片, 运用 RT-PCR 方法测定肝脏 IL-6 mRNA 的表达量。

小鼠 48 只分 6 组, 对照组以生理盐水灌胃 0.4 mL · d⁻¹, 腹腔注射植物油每只 0.1 mL · 10 g⁻¹; CCl₄ 组及给药组 (20, 50, 100 mg · kg⁻¹) 分别以等量生理盐水及不同浓度 TCCE 0.4 mL · d⁻¹ 连续灌胃 5 d, 第 6 天腹腔注射 0.15% CCl₄ 0.1 mL · 10 g⁻¹, 联苯双酯组以 200 mg · kg⁻¹ 联苯双酯灌胃 0.4 mL · d⁻¹, 于第 6 天腹腔注射 0.15% CCl₄ 0.1 mL · 10 g⁻¹。24 h 后处死动物, 取血清测 sALT, 取肝组织制作组织学切片, 并测定肝脏中 IL-6 mRNA 的表达量。

1.3.2 酶活力的测定 按 ALT 试剂盒说明测 sALT 活性。

1.3.3 形态学观察 取肝组织 4% 甲醛固定, H-E 染色, 观察肝组织形态学变化。

1.3.4 RT-PCR 方法测定 IL-6 mRNA 表达量 总 RNA 提取: 取新鲜肝组织 40 mg, 剪碎, 加 1 mL Tripure, 按常规方法提取总 RNA, 加适量的 DEPC 处理水溶解。琼脂糖凝胶电泳观察 18 S 和 28 S 带, 在紫外分光光度计上测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 计算 RNA 浓度和纯度。

逆转录: 细胞总 RNA (相当于 1 μg), oligo (dT)₁₅ 0.5 μg, AMV 5 × buffer 4 μL, Rnasin 40 U, 加 DEPC 水至 15 μL。70 °C, 5 min 变性, 在冰上加 4 × dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL, AMV RT 1.5 μL (10⁶ U · L⁻¹) 共 20 μL。42 °C 60 min, 95 °C 5 min, 4 °C 温育, -20 °C 保存。

PCR 扩增: 以看家基因 β-actin (348 bp) 为内参, 其 5' 端引物为: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C, 3' 端引物为: TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G; 目的基因 IL-6 (600 bp) 的 5' 端引物为 CTG GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A; 3' 端引物为: ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T。反应体系为: 10 × buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 2 μL, 4 × dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 2 μL, Primer1 10 pmol, Primer2 10 pmol, cDNA 模板 2 μL, Taq 酶 2.5 U, 加 ddH₂O 至 25 μL, 加 50 μL 石蜡油。反应程序为: 95 °C, 2 min 变性, 94 °C, 50 s; 58 °C, 50 s; 72 °C, 1 min; 反应时, 先加 IL-6 的引物, 10 个循环后再加 β-actin 的引物, 再持续反应 30 个循环。72 °C, 4 min 延伸, 4 °C 保存。

1.4 统计方法

进行单因素方差分析 (ANOVA), 组间采用 *q* 检验进行比较。

2 结果

2.1 TCCE 对 CCl₄ 肝损伤小鼠体内 sALT 活力的影响

由表 1 可看出, 小鼠腹腔注射 0.15% CCl₄ 后, sALT 水平显著增高, 为对照组的 5.6 倍, 有显著差异 (*P* < 0.01)。预先灌胃 TCCE 后, 各剂量 TCCE 均可完全对抗上述 sALT 活性的升高, 且在本实验 TCCE 浓度范围内, 随着 TCCE 浓度的增加对 sALT 水平的抑制率随之增加, 即呈剂量依赖关系, 至 100 mg · kg⁻¹ TCCE 则可对 CCl₄ 诱发的 sALT 的显著增高, 且抑酶强度高于联苯双酯。

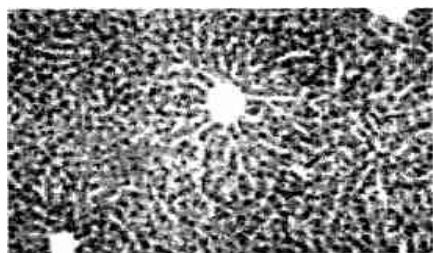
2.2 TCCE 显著改善 CCl₄ 损伤的小鼠肝组织结构

表 1 TCCE 对 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠 sALT 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

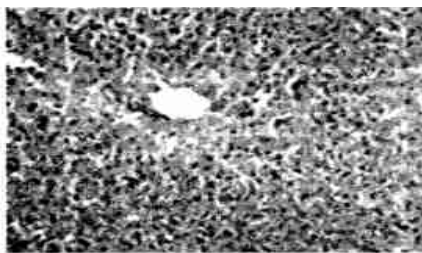
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数	sALT 活性/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组		6	220 \pm 51
CCl ₄ 组		6	1252 \pm 173 ¹⁾
CCl ₄ + TCCE	20	7	584 \pm 65 ²⁾
CCl ₄ + TCCE	50	7	339 \pm 52 ^{2,3)}
CCl ₄ + TCCE	100	7	228 \pm 36 ^{2,3,4)}
CCl ₄ + 联苯双酯	200	6	240 \pm 53 ^{2,3,4)}

注: 与对照组比较 ¹⁾ $P < 0.01$ 与 CCl₄ 组比较 ²⁾ $P < 0.01$

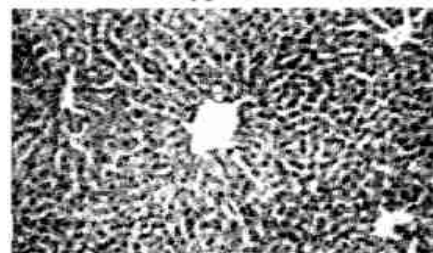
与 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCCE 组比较 ³⁾ $P < 0.01$ 与 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCCE 组比较 ⁴⁾ $P < 0.01$



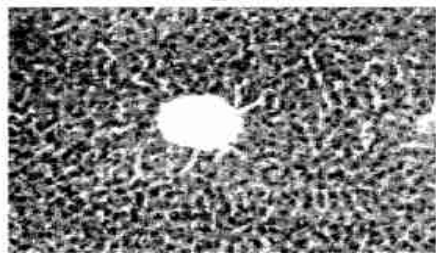
A



B



C



D

图 1 小鼠肝脏组织学切片图 (HE \times 100)

A. 正常对照组 B. 0.15% CCl₄ 0.1mL \cdot 10g⁻¹ CCl₄ 损伤组 C. 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCCE 组 D. 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联苯双酯组

水平的的影响

2.3.1 CCl₄ 损伤后不同时间小鼠肝脏 IL-6 mRNA 的表达量的变化 CCl₄ 损伤后 0, 12, 18, 24, 36 h 小鼠肝脏 IL-6 mRNA 的表达量见图 2。对 PCR 产物凝胶电泳结果进行扫描分析, 用 IL-6 和 β -actin 条带扫描值之比分析 IL-6 mRNA 含量的变化。实验发现, 在 0~24 h 范围内, 随着 CCl₄ 损伤时间的延长, 小鼠肝脏 IL-6 mRNA 含量上升; 24 h 后又开始下降, 因此损伤后 24 h 为 IL-6 基因表达的最高峰。故本实验选取损伤后 24 h 作为本实验的检测时间。

2.3.2 TCCE 对 CCl₄ 损伤小鼠肝脏 IL-6 mRNA 水平的影响 由图 3 可看出, CCl₄ 损伤 24 h 后小鼠肝脏 IL-6 mRNA 含量急剧上升, 而不同剂量 TCCE 能对抗 CCl₄ 引起的 IL-6 mRNA 的增加 ($P < 0.01$), 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组均可明显降低 CCl₄ 引起的 IL-

肝切片观察 CCl₄ 作用 24 h 后肝细胞紊乱, 细胞界限不清, 肝细胞肿胀, 出现气球样变细胞, 并出现大量嗜酸小体和炎症细胞浸润。

预先用 TCCE 灌胃的小鼠损伤后肝组织结构比损伤组有明显改善。低剂量组小鼠肝细胞已排列成索, 只有少量嗜酸性变细胞, 肝细胞轻度肿胀, 偶见炎症细胞, 中剂量和高剂量组细胞界限清楚, 肝细胞排列规则, 与联苯双酯保护的小鼠肝组织无差异 (图 1)。

2.3 TCCE 对 CCl₄ 肝损伤小鼠肝脏 IL-6 mRNA

6 mRNA 的增加, 至 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组即可完全对抗 CCl₄ 引起的 IL-6 mRNA 的增加, 使之降低至损伤前水平, 与 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联苯双酯效果一致。



图 2 CCl₄ 损伤后不同时间小鼠肝脏 IL-6 mRNA 表达量的变化
M. DNA 分子量标记

3 讨论

本实验表明 20, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCCE 均能有效抑制 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤 sALT 水平上升, 且呈明显剂量依赖关系。形态学观察发现 TC-

CE 能明显改善 CCL₄ 引起的肝细胞气球样变, 减轻中央静脉周围淋巴细胞、枯否氏细胞浸润, 减轻甚至完全消除 CCL₄ 引起的嗜酸性变, 且效价强度高于联苯双酯。上述结果提示, 榄仁叶氯仿提取物 TCCE 可能是榄仁叶护肝作用的有效部位。

肝细胞损伤加重。而一定剂量的 TCCE 能抑制甚至完全抑制 CCL₄ 引起的小鼠肝脏中 IL-6 mRNA 表达量的升高。提示 TCCE 抗肝损伤作用可能与抑制 IL-6 过量表达有关。

[参考文献]

[1] Chen P S, Li J H, Liu T Y, et al. Folk Medicine *Terminalia catappa* L. and its Major Tannin Component Punicalagin, are Effective Against Bleomycin-induced Genotoxicity in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Lett*, 2000, 152 (2): 115.

[2] Lin C C, Chen Y L, Lin J M, et al. Evaluation of the Antioxidant and Hepatoprotective Activity of *Terminalia catappa* L. *Am J Chin Med*, 1997, 25 (2): 153.

[3] 徐力致, 高静, 朱俐, 等. 榄仁树叶提取物(LR-98)对实验性肝损伤的防护作用. *南京大学学报(自然科学)*, 2000, 36 (2): 197.

[4] Liu J, Liu Y, Mao Q, et al. The Effect of 10 Triterpenoid Compounds on Experimental Liver Injury in Mice. *Fundam Appl Toxicol*, 1994 (1), 22: 34.

[5] Miura N, Matsumoto Y, Miyaii S, et al. Protective Effects of Triterpene Compounds Against the Cytotoxicity of Cadmium in HepG2 Cells. *Mol Pharm*, 1999, 56 (6): 1324.

[6] Liu J, Liu Y, Khaassen C D. Protective Effect of Oleanolic Acid Against Chemical-induced Acute Necrotic Liver Injury in Mice. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, 16 (2): 97.

[7] Adriana S M, Ana R R, Arturo P, et al. Chemically Induced Liver Regeneration is Characterized by Specific IL-6 Gene Expression. *Hepatology Res*, 1999, 15 (1): 10.

[8] Adriana S M, Juan A B. Differential Gene Expression of Pro-inflammatory Cytokines in Acute and Chronic Liver Injury. *Hepatology Res*, 2000, 16 (3): 181.

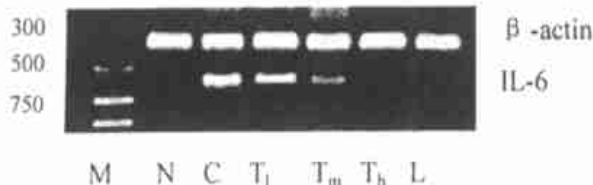


图 3 TCCE 对 CCL₄ 诱导的小鼠肝脏 IL-6 mRNA 水平增高的抑制作用

M. DNA 分子量标记 N. 对照组 C. CCL₄ 组

T₁. 20 mg·kg⁻¹ TCCE 组 T_m. 50 mg·kg⁻¹ TCCE 组

T_h. 100 mg·kg⁻¹ TCCE 组 L. 200 mg·kg⁻¹ 联苯双酯组

急性肝损伤时枯否氏细胞和窦周细胞大量增殖, 从而产生 IL-6 等多种细胞因子, 这些因子调节着炎症和修复过程^[7,8]。IL-6 具有增强自然杀伤细胞杀伤靶细胞的能力, 促进吞噬细胞发挥其细胞毒效应。中性粒细胞集中在中央静脉周围肝小叶内, IL-6 进一步诱导其发生形变、脱颗粒和溶酶体酶释放, 其释放的蛋白酶能直接损害肝细胞, 同时也使脂质代谢产物增多, 氧自由基产生过多, 从而形成逐级放大的连级反应, 介导肝细胞损害, 引起血清转氨酶上升。本实验首次报道了 TCCE 对 CCL₄ 急性肝损伤小鼠肝脏 IL-6 mRNA 表达量的影响。即在 CCL₄ 诱导的肝细胞损伤过程中, 随着 IL-6 表达量的增加,

Hepatoprotective Effects of Chloroform Extract from Leaf of *Terminalia catappa* in Relation to the Inhibition of Liver IL-6 Expression

TANG Xin-hui¹, GAO Jing¹, WANG Yan-Ping¹, XU Li-zhi¹, ZHAO Xiao-ning¹, XU Qiang²

(1. School of Medicine, Institute of Materia Medica, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology,

School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the hepatoprotective effects of *Terminalia catappa* chloroform extract (TCCE) and its effects on IL-6 gene over expression in liver of CCL₄ treated mice. **Method:** Mice were orally pretreated with TCCE (20, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 5 days and the sALT activity of mice was detected 24 hours after the intraperitoneal injection of CCL₄ on the 5 th day. Meanwhile, IL-6 mRNA level was determined by using the method of RT-PCR. And the liver morphological changes were also observed. **Result:** sALT activity was remarkably increased (5.6 fold) after the injection of CCL₄. However, with oral pretreatment of TCCE, changes in sALT were dose-dependently reversed. On the other hand, significant increase in IL-6 mRNA level induced by

CCl_4 was remarkably decreased. The level of IL-6 mRNA in $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCCE treated mice was reversed to that of control. In addition, histological changes such as the infiltration of numerous inflammatory cells and hepatocyte swelling in injured mice were effectively lessened by the pretreatment of TCCE. **Conclusion:** TCCE has hepatoprotective activity and the mechanisms underlying its protective effects may be related to the inhibition on the over expression of IL-6 gene in liver.

[Key words] liver injury; IL-6; TCCE; CCl_4 ; mice

[责任编辑 方文贤]

黄芪对新生鼠乏氧缺血脑损伤 海马区神经保护作用的研究

贾瑞¹, 蒋犁¹, 乔立兴¹, 陈平圣²

(1. 东南大学 临床医学院, 江苏 南京 210009; 2. 东南大学 基础医学院 病理科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 探讨新生儿乏氧缺血脑损伤(HIBD)后, 脑细胞损伤的机制和黄芪对海马区的神经保护作用。方法: 用新生大鼠建立新生儿 HIBD 的模型, 于缺氧后不同时间点取脑, 分别行组织病理学检查并计数海马 CA1 区神经细胞死亡率、半定量逆转录-聚合酶反应(RT-PCR)检测 caspase-3(天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-3) mRNA 表达、三等分迷宫测试成熟大鼠学习记忆能力。分 Sham 组、模型组、黄芪治疗组观察并对比上述指标。结果: 模型组结扎侧海马 caspase-3 mRNA 表达于 HI 后 6 h 轻度升高, 24 h 达高峰, 48 h 后下降, 5 d 和 7 d 时恢复至基础水平。黄芪组 HI 后结扎侧海马神经细胞死亡率明显降低, caspase-3 mRNA 的表达峰值降低了 44%~46%(mRNA), 成熟大鼠的学习记忆能力明显提高。结论: 黄芪对未成熟脑 HIBD 后海马部位有明显的神经保护功能, 此功能与抑制 caspase-3 的表达有关。

[关键词] 脑缺氧; 脑缺血; 半胱氨酸蛋白酶; 凋亡; 黄芪

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2003)12-1173-04

围产期缺氧缺血脑损伤(HIBD)是造成新生儿死亡、智力低下及长期神经系统功能紊乱的一个重要因素。大脑边缘系统特别海马部位既是缺氧缺血的易损区^[1], 又是学习记忆的关键部位^[2]。最新的研究显示: 凋亡在未成熟脑 HIBD 的病理进程中起着重要作用^[1,3], 而 caspase-3(天冬氨酸特异酶切的半胱氨酸蛋白酶-3)是凋亡级联反应中的关键效应子, 应用 caspase 抑制剂对 HIBD 具有神经保护功能^[4]。本研究将黄芪用于未成熟脑 HIBD 的治疗, 一方面检测其对海马 HI 后 caspase-3 mRNA 表达水平的影响, 另一方面通过迷宫观察黄芪对 HIBD 的成熟鼠学习记忆能力的影响。此两方面将同时探讨黄芪对未成熟脑 HIBD 近期、远期的神经保护功能

及保护机制, 为临床探索新生儿 HIBD 的治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

出生 7 d 的同窝 S D 大鼠, 雌雄不限, 体重 12~14 g, 由复旦大学提供鼠种, 东南大学医学院实验动物中心繁殖。共 129 只(造模过程中死亡 15 只), 随机分成 3 组: 假手术(Sham)组 18 只, 模型组 48 只, 黄芪治疗组 48 只。按照 Rice^[5] 方法制备 HIBD 模型: 将新生鼠乙醚吸入麻醉后仰卧位固定。颈正中切口, 游离左侧颈总动脉, 4-0 号线结扎, 恢复 2~3 h 后置于 2 000 mL 密闭容器中, 37 °C 恒温。以 2 L \cdot min⁻¹ 的速度输入 8% O₂, 92% N₂ 混合气体 2 h, 取出后置于原饲养环境中。Sham 组仅游离左颈总动脉但不结扎。所有新生鼠均由母鼠代养。

黄芪注射液由成都地奥九泓制药厂生产(批号 0203097), 规格为每支 10 mL, 含生药 20 g。治疗组幼鼠于造模后即刻及每日同一时间腹腔注射此药

[收稿日期] 2003-07-07

[基金项目] 江苏省科委社会发展基金资助项目(BS-98058)

[通讯作者] Tel: (025) 3417096 E-mail: rzjia9599@yahoo.com.cn