

# 微胶囊化儿茶素对阿霉素肾病大鼠 Podocin 表达的影响

何小解, 易著文, 白海涛, 莫双红, 张慧琼, 耿文茂, 党西强

(中南大学小儿肾脏病研究室 湖南省小儿肾脏病临床中心 湖南 长沙 410011)

**摘要:** 目的: 观察微胶囊化儿茶素对阿霉素肾病大鼠足细胞 Podocin 蛋白及基因表达的影响。方法: 将 120 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组、肾病组、激素组、VE 组、儿茶素组和微胶囊组共六组, 尾静脉一次性注射阿霉素 (5mg/kg) 制备肾病模型; 实验第四周末和第六周末杀鼠取血、肾组织, 免疫荧光法检测肾组织中 Podocin 的表达; 同时利用 RT-PCR 检测肾组织中 Podocin 基因表达。结果: 实验第四周末, 各组大鼠足细胞 Podocin 蛋白表达均低于对照组 ( $p < 0.01$ )。实验第六周末, 激素组大鼠 Podocin 蛋白表达与对照组无统计学差异, 其它各组之间相比, 儿茶素组与微胶囊组 Podocin 蛋白表达高于 VE 组 ( $p < 0.01$ ), 微胶囊组高于儿茶素组 ( $p < 0.05$ ), Podocin mRNA 表达在实验末与蛋白表达一致。结论: 微胶囊化儿茶素可上调阿霉素肾病大鼠肾组织中 Podocin 蛋白与基因表达, 微胶囊技术有助于提升儿茶素的生物学效应。

**关键词:** 微胶囊; 儿茶素; 肾病变综合征; WT1; 大鼠

Catechin Microcapsule on Podocin Expression in Rats with Nephrotic Syndrome Induced-adri blastine

HE Xiao-jie, YI Zhu-wen, BAI Hai-tao, MO Shuang-hong, ZHANG Hui-qiong,

GENG Wen-mao, DANG Xi-qiang

(Laboratory of Pediatric Nephrology, The Institute of Pediatrics, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Hunan Province Clinical Central of Pediatric Nephrology, Changsha 410011, China)

**Abstract:** Objective: To observe the effects of catechin microcapsulation on WT1 expression in rats with nephrotic syndrome induced-adri blastine. Methods: 112 female SD rats are randomly distributed respectively in control group, nephrotic syndrome group, dexamethason group, VE group, catechin group and microcapsule group. Catechin microcapsule is made by the way of mist spray dehydration and nephrotic syndrome rats are caused by injecting adri blastine. Before rats killed, we collect blood and kidney tissue, Podocin expression in kidney is observed by indirect immunofluorescence. Podocin mRNA expression in kidney is observed with RT-PCR. Results: Expressions of Podocin on foot process in the other groups are all lower than that of the control, while by the 6<sup>th</sup>, there is no significant difference between that of the Dexamethason and the control, and it was higher in the catechin group and the catechin microcapsulation-treated group compared with that of the VE group. When the former two groups were compared, that in catechin microcapsulation-treated group was higher than that in catechin-treated group. Podocin mRNA expression were accord with Podocin protein expression. Conclusion: Catechin microcapsulation could up-regulate Podocin expression of protein and gene in rats with nephrotic syndrome induced-adri blastine, the technology of microencapsulation could help to upgrade the biological effect of catechin.

**Key words:** microcapsulation; catechin; nephrotic syndrome; Podocin; rat

中图分类号: R692.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)09-0236-06

收稿日期: 2005-10-31

基金项目: 湖南省自然科学基金(02JJXY3020); 湖南省教育厅重点项目基金(02A015)

作者简介: 何小解(1970-), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为小儿肾脏病防治机制研究。

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是小儿时期泌尿系统常见与多发病,大量蛋白尿是其主要临床表现。其确切的发病机制目前尚不清楚,既往研究认为:蛋白尿的发生与肾小球滤过屏障丧失其正常的结构和功能密切相关。Rodewald 等研究发现<sup>[1]</sup>:肾小球滤过膜中足突间裂孔隔膜的作用尤为关键,并认识到足突间裂孔隔膜结构蛋白分子如 Podocin 等功能的异常是蛋白尿发生的重要机制<sup>[2~8]</sup>。但导致这些足突间裂孔隔膜结构蛋白分子功能异常的机制至今仍不清楚,既往研究证实:活性氧自由基(oxygen free radical, OFR)与蛋白尿的发生密切相关<sup>[1]</sup>,而儿茶素可通过有效清除肾病大鼠体内活性氧自由基而在一定程度上降低尿蛋白的排泄<sup>[4,5]</sup>。但是是否是通过上调足细胞上 Podocin 的表达途径达到抑制蛋白尿的形成,目前尚未见报道。由于儿茶素分子中的酚羟基很活泼,在外界各种条件下极易发生氧化、聚合或缩合等,从而失去抗氧化活性及其它生物学功能,使之在贮存和应用过程中受到了很大的限制;另外,儿茶素的水溶性较强、脂溶性差导致其生物利用度低,微胶囊技术则是解决这一问题的有效途径<sup>[6]</sup>。为此,本研究拟采用微胶囊技术将儿茶素微胶囊化,利用阿霉素肾病大鼠模型观察微胶囊化儿茶素对足细胞 Podocin 表达的影响,旨在为肾病综合征的防治及儿茶素的药化提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组及标本采集

120只周龄相同(6周龄)体重相近(180~220g)的雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(中国科学院上海实验动物中心),实验第1d实验组大鼠均一次尾静脉一次注射阿霉素(5mg/kg,意大利爱宝大药厂),制备肾病模型,对照组注射等量的生理盐水;自实验第二周末开始,将实验组随机分为肾病组、激素组、VE组、儿茶素组及微胶囊化儿茶素组(简称微胶囊组)。儿茶素组(100mg/kg·d)、VE组(50mg/kg·d)、微胶囊组(含儿茶素100mg/kg·d)均行灌胃治疗至第六周末实验结束、激素组自实验第二周末皮下注射地塞米松(1.8mg/kg·d)至第六周末实验结束。

在整个实验过程中,所有大鼠均被饲养在12h白昼、12h黑夜的标准温度(21~22℃)和湿度(50%~70%)环境中,均食用我院动物实验中心自产的全价颗粒饲料和自来水。

在实验第四周末和第六周末每组各杀鼠10只。动物处死前,从腹主动脉取血,一份为抗凝血用于分离血浆,一份为普通血用于分离血清,分离后的血浆与血清均置-20℃冰箱保存备用。并将肾脏分成三份标本,一份用福尔马林固定用于光镜检测,一份用电镜

固定液固定用于电镜检测,一份用液氮速冻用于免疫荧光检测。

### 1.2 微胶囊化儿茶素的制备 参见文献[9]。

取适量的乳化剂A均匀分散于食用乙醇中,另取适量儿茶素均匀分散于溶剂中,然后将两者均匀混合后,利用喷雾干燥机制备微胶囊(喷雾条件为:进风温度130℃左右;出风温度98℃左右;进料速度9~10r/min)。利用扫描电镜检测微胶囊成囊情况及微胶囊的大小,利用高效液相色谱仪测定微胶囊中儿茶素的含量及成分变化,色谱条件:色谱柱:Nova-Pak C<sub>18</sub>(3.9×150mm);流动相:N,N-二甲基甲酰胺:甲醇:冰醋酸=80:4:3;梯度洗脱;紫外检测波长:278nm;柱温:35℃;流速:1.0ml/min;进样量:10μl。具体测定条件如下:

色谱柱	Nova-Pak C <sub>18</sub> (3.9×150mm);
检测波长	278nm;
柱温	35℃;
流速	1.0ml/min;
进样量	10μl;
流动相	采用二元梯度洗脱,A相为超纯水,B相为有机相(N,N-二甲基甲酰胺:甲醇:冰醋酸=80:4:3);
梯度条件	B相比比例由初12%经20min变为30%。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 肾组织 Podocin 表达测定

采用间接免疫荧光法,兔抗鼠 Podocin 单克隆抗体购于试剂 Santa Cruz 公司,荧光标记抗体购自北京中山生物科技有限公司。具体过程为:冰冻切片5μm,PBS冲洗3次,每次3min,滴加1:100稀释的一抗,37℃孵育2h,PBS冲洗3次,每次5min,滴加二抗,37℃孵育0.5h,PBS冲洗3次,封片,荧光显微镜下镜检。结果观察:所有经免疫荧光染色的切片于实验结束时由操作人员在单盲情况下于荧光显微镜下观察,以SECOM摄像头将病理切片上的肾小球图像采集入计算机,作北京航空航天大学CMIAS系列(多功能真彩色图像分析系统)测定肾小球上 Podocin 的平均光密度/CEA的光密度来反映 Podocin 的表达量。

#### 1.3.2 肾组织 Podocin mRNA 表达测定

采用Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法检测。WT1引物参照WT1基因序列,由上海生物工程研究所(Sangon)合成。引物序列如下:Podocin:上游引物序列5'-GCA GCC ACG GTA GTG AAT GT-3',下游引物序列5'-CAG GAA GCA GAT GTC CCA GT-3',扩增片段长度为253bp;内参照GAPDH:上游引物序列5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA TC-3',下游引物序列5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',扩增片段长度为451bp。提取RNA,取2μl于紫外分光光度

计下测定 260nm 和 280nm OD 值, 取 5  $\mu$ l cDNA 模板, 加入 3  $\mu$ l 10  $\times$  PCR Buffer, 2  $\mu$ l 25mmol/L  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l 10mmol/L dNTPs, 12.5  $\mu$ mol/L WT1 或 Podocin 和 NADPH 引物, 2.5  $\mu$  Taq DNA Polymerase, 用去离子水补充至总体积 30  $\mu$ l 后进行 PCR 扩增。扩增条件为: 95 预变性 2min, 94 15s, 64 30s, 72 60s, 36 个循环, 72 延伸 5min。取扩增产物 10  $\mu$ l, 用溴酚蓝作指示剂, 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶经溴乙啶染色后, 用凝胶成像系统进行密度扫描分析, 所测定的扩增产物条带积分光密度值/内参照  $\times$  100 即为靶基因 mRNA 的相对表达量。

1.3.3 24h尿蛋白(Urine Protein  $\mu$ P)定量 采用考马斯亮蓝法。

#### 1.4 统计学分析

采用 SPSS-10.0 统计软件包进行统计学处理, 所有资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示; 多组资料间和同组多个时点资料间比较, 方差齐者, 采用 One-Way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD 法; 方差不齐者, 采用 Kruskal-Wallis 分析, 组间两两比较采用 Mann-Whitney 法, 对有关趋势的变量采用 Pearson 相关分析: 以  $\alpha=0.05$  (two tailed) 作为检验水准,  $p < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 微胶囊化儿茶素的成囊情况、大小及儿茶素含量

利用扫描电镜对微胶囊的囊壁进行观察发现: 微胶囊的成囊情况良好 (见图 1), 囊壁均为致密的整体结构, 壁厚均约为 5  $\mu$ m (见图 2), 囊心物质儿茶素被包裹在囊腔中, 微胶囊颗粒表面比较光滑, 微胶囊的大小在 8.6  $\mu$ m 左右。液相色谱分析表明: 微胶囊中儿茶素色谱图与原料中儿茶素色谱图一致 (见图 3 ~ 4), 并未发现异常杂峰, 微胶囊中儿茶素的含量为 72.202%。

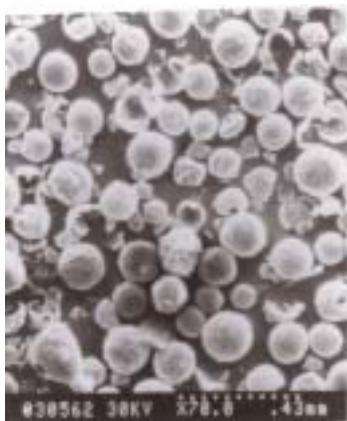


图1 微胶囊化儿茶素扫描电镜图  
Fig.1 SEM of microcapsule

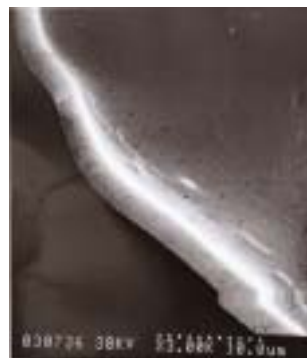


图2 微胶囊化儿茶素囊壁结构  
Fig.2 The wall structure of microcapsule

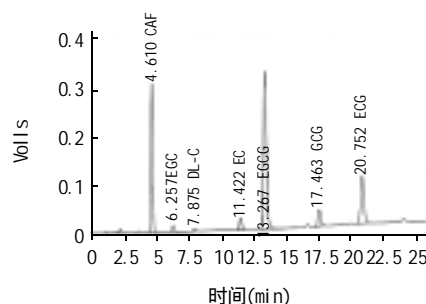


图3 原料中儿茶素组分分析  
Fig.3 Analysis the constituents of catechin in material

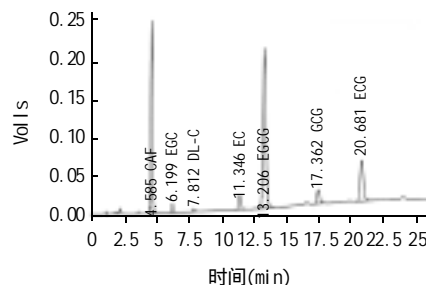


图4 微胶囊中儿茶素组分分析  
Fig.4 Analysis the constituents of catechin in microcapsule

### 2.2 六组不同处理大鼠不同时期 24 h 尿蛋白排泄量的比较

实验初, 各组大鼠尿蛋白排泄量无明显差别 ( $p > 0.05$ )。阿霉素造模后第二周末, 电镜下各模型组肾小球基底膜均可见足突广泛融合, 尿蛋白均较同期对照组增高, 差异有非常显著意义 ( $p < 0.01$ )。实验第四周末, 各组大鼠 24h 尿蛋白的排泄量均高于对照组, 低于肾病组 ( $p < 0.01$ ), 除对照组外, 其它各组大鼠 24h 尿蛋白的排泄量均高于激素组。实验末, 各组大鼠 24h 尿蛋白的排泄量依次为: 肾病组  $>$  VE 治疗组  $>$  儿茶素治疗组  $>$  微胶囊化儿茶素治疗组  $>$  激素治疗组  $>$  对照组。微胶囊化儿茶素治疗组与儿茶素治疗组 24h 尿蛋白的排泄量差异显著 ( $p < 0.05$ )。与 VE 治疗组相比, 微胶囊化儿茶素

治疗组与儿茶素治疗组无论是在第四周末抑或是在第六周末, 24h 尿蛋白的排泄量均有所降低, 差异有非常显著意义( $p < 0.01$ )。具体见表1。

表1 六组不同处理大鼠 24h 尿蛋白的排泄量 ( $\bar{x} \pm s$ , mg/d)  
Table 1 24h urinary protein excretion among six groups rats during experiment ( $\bar{x} \pm s$ , mg/d)

组别	例数	第四周末	第六周末
对照组	10	14 $\pm$ 2	23 $\pm$ 5
肾病组	10	341 $\pm$ 41	462 $\pm$ 44
激素组	10	184 $\pm$ 39 <sup>#</sup>	208 $\pm$ 11 <sup>#</sup>
VE 组	10	296 $\pm$ 39 <sup>no §</sup>	374 $\pm$ 53 <sup># §</sup>
儿茶素组	10	244 $\pm$ 41 <sup>#</sup>	311 $\pm$ 49 <sup># §</sup>
微胶囊组	10	227 $\pm$ 33 <sup>#</sup>	251 $\pm$ 22 <sup>#</sup>
F 值		77	75
P 值		0.00	0.00

注:  $p < 0.01$  Vs 对照组; <sup>#</sup>  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  Vs 肾病组; <sup>§</sup>  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  Vs 激素组。

### 2.3 实验期间六组大鼠肾组织 Podocin 蛋白表达变化

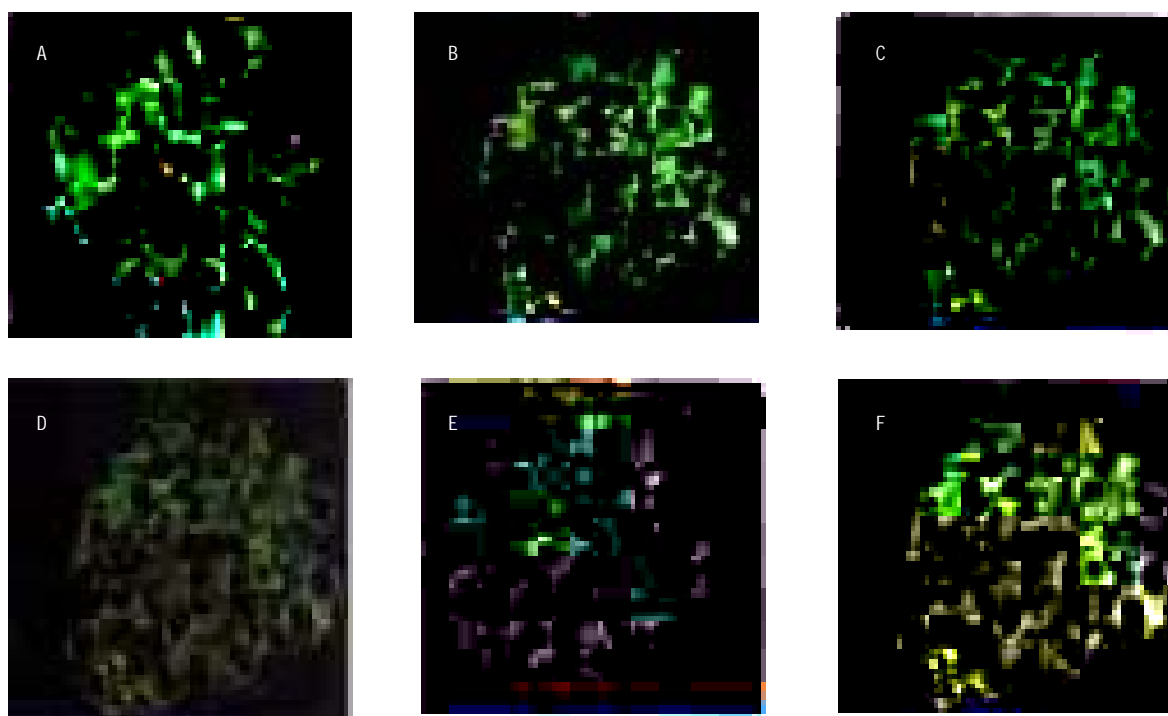
与基因表达不同的是, Podocin 蛋白表达与 WT1 蛋白表达变化趋于一致, 正常大鼠肾小球足细胞存在大量 Podocin 的表达, 肾病状态下, 足细胞 Podocin 表达明显减少(见图5)。实验第二周末, 当蛋白尿大量出现时, Podocin 蛋白表达显著下降( $0.27 \pm 0.03$ ); 实验第四周末, 各组大鼠足细胞 Podocin 表达均低于对照组

( $p < 0.01$ ), 其它各组由低到高依次为: 肾病组、VE 组、儿茶素组、微胶囊组、激素组, 与 VE 组相比, 儿茶素组与微胶囊组 Podocin 表达增高( $p < 0.01$ )。实验第六周末, 各组大鼠足细胞 Podocin 表达均低于对照组, 但激素组大鼠 Podocin 表达与对照组无统计学差异, 其它各组之间相比, 儿茶素组与微胶囊组 Podocin 表达高于 VE 组( $p < 0.01$ ), 微胶囊组高于儿茶素组( $p < 0.05$ ), 相关分析发现 Podocin 表达在实验末与尿蛋白高度负相关( $r = -0.698$ ,  $p < 0.01$ ), 具体见表2。

表2 实验不同时期各组大鼠肾组织 Podocin 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Podocin expression among six groups rats during experiment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数(只/次)	第四周末	第六周末
对照组	10	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
肾病组	10	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
激素组	10	0.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3
VE 组	10	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
儿茶素组	10	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2
微胶囊组	10	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3
F		47.0	59.0
p		0.0	0.0

注: 与对照组相比,  $p < 0.01$ ; 与肾病组相比,  $p < 0.01$ ; 与激素组相比,  $p < 0.01$ ; 与激素组相比,  $p < 0.01$ ; 与 VE 组相比,  $p < 0.01$ ; 与儿茶素组相比,  $p < 0.05$ 。



A 为对照组, B 为激素组, C 为微胶囊组, D 为肾病组, E 为 VE 组, F 为儿茶素组。

图5 实验末各组大鼠肾脏 Podocin 蛋白表达

Fig.5 Podocin expression in kidney in rats with nephrotic syndrome at the end of experiment among six group

2.4 实验期间六组大鼠肾组织 Podicin mRNA 表达变化

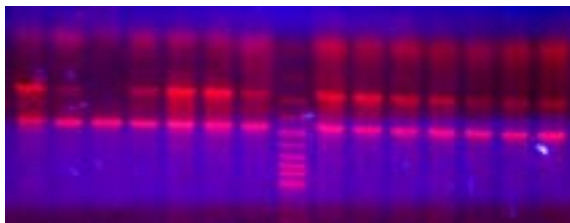
对照组大鼠不同时期肾组织 Podicin mRNA 表达呈现高表达, 肾病组大鼠肾组织 Podicin mRNA 表达在二周末最低, 第六周末其次, 第四周末最高; 激素组大鼠 Podicin mRNA 表达在第四周末低于对照组, 在第六周末较对照组增高, 但无统计学差异; VE 组、儿茶素组、微胶囊组大鼠肾组织 Podicin mRNA 表达在第四周末与激素组无统计学差异, 但明显低于对照组, 实验第六周末, 儿茶素组、微胶囊组与激素组及对照组无统计学差异, VE 组明显低于激素组与对照组, VE 组、儿茶素组、微胶囊组大鼠肾组织 Podicin mRNA 表达在第四周末三组之间无统计学差异, 实验第六周末, 儿茶素组、微胶囊组 Podicin mRNA 表达明显高于 VE 组, 微胶囊组虽高于儿茶素组, 但无统计学差异。具体见表 3。

表 3 实验期间六组大鼠肾组织 Podicin mRNA 表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Podicin mRNA expression among six groups rats during experiment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	第二周末	第四周末	第六周末
对照组	10	103.5 $\pm$ 12.4	101.9 $\pm$ 13.7	105.1 $\pm$ 14.3
肾病组	10	81.7 $\pm$ 3.5	53.7 $\pm$ 8.9	21.3 $\pm$ 3.7
激素组	10		61.2 $\pm$ 11.1	110.5 $\pm$ 15.1 <sup>#</sup>
VE 组	10		54.7 $\pm$ 6.3	61.8 $\pm$ 8.1 <sup>#§</sup>
儿茶素组	10		57.1 $\pm$ 9.6	100.5 $\pm$ 10.7 <sup>#</sup>
微胶囊组	10		60.8 $\pm$ 9.5	103.5 $\pm$ 13.9 <sup>#</sup>

注:  $p < 0.01$  Vs 对照组;  $^{\#} p < 0.01$  Vs 肾病组;  $^{\$} p < 0.01$  Vs 激素组, 与 VE 组相比,  $p < 0.01$ 。

1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14



注: 1、5、8 分别为实验初、实验第四周末与实验第六周末对照大鼠 Podicin mRNA 表达; 10、13 分别为实验第四周末与实验第六周末儿茶素组大鼠 Podicin mRNA 表达; 3、4、2 分别为实验第二周末、第四周末与实验第六周末肾病组大鼠 Podicin mRNA 表达; 7、6 分别为实验第四周末与实验第六周末激素组大鼠 Podicin mRNA 表达; 12、11 分别为实验第四周末与实验第六周末 VE 组大鼠 Podicin mRNA 表达; 14、9 分别为实验第四周末与实验第六周末微胶囊组大鼠 Podicin mRNA 表达。

图 6 六组大鼠不同时期 Podicin mRNA 表达

Fig.6 Podicin mRNA in kidney in rats with nephrotic syndrome during experiment among six group

### 3 讨论

Podicin 是 2000 年 Boute 等<sup>[9]</sup>通过克隆技术研究家族

性激素耐药型肾病综合征时发现的一种新蛋白, 是一种含 383 个氨基酸的内在膜蛋白, 属 Stomatin 家族成员, Roselli 等研究发现, 其主要位于基底膜裂孔隔膜上, 对于维持肾小球滤过屏障起重要作用<sup>[10]</sup>。本研究发现, 实验第二周末, 当蛋白尿大量出现时, Podocin 蛋白表达显著下降, 说明 Podocin 蛋白与阿霉素诱导的肾病综合征大鼠蛋白尿的发生有关; 激素、VE、儿茶素治疗后, Podocin 蛋白表达明显增高, 尿蛋白排泄也随之下降, 说明 Podocin 蛋白参与了肾病大鼠尿蛋白发生与发展, 激素、VE、儿茶素可能是通过上调 Podocin 蛋白表达实现降低尿蛋白排泄之目的。无论是在第四周末还是第六周末, 儿茶素组与微胶囊组大鼠肾组织中 Podocin 蛋白表达均高于 VE 组, 微胶囊组高于儿茶素组, 说明儿茶素上调 Podocin 蛋白表达的效应强于 VE, 儿茶素微胶囊化后, 对于促进肾病大鼠肾组织 Podocin 蛋白表达及降低尿蛋白排泄的能力得到了提升。

与 Podocin 蛋白表达有些不同的是, VE 组、儿茶素组、微胶囊组及激素组 Podocin mRNA 表达在第四周末与肾病组大鼠差异无显著意义, 但均显著低于第二周末时肾病组大鼠 Podocin mRNA 表达, 这从另一层面提示我们 Podocin 作为一种具有独特的高度分化的细胞类型的足细胞的一种功能成分, 其基因表达调控体系可能存在其独特性, 其基因与蛋白表达相背离的具体机制有待于进一步研究。实验第六周末, 各组大鼠 Podocin mRNA 表达与蛋白表达趋于一致, 提示 Podocin 基因与蛋白表达调控在时效上可能存在“慢效应”, 也可能是因为 VE、儿茶素及激素对 Podocin 表达具调控作用。相关分析发现, 实验末, Podocin mRNA 与 Podocin 蛋白表达均与蛋白尿高度正相关, 说明 Podocin 基因与蛋白尿的以生密切相关。

综上所述, Podocin 与阿霉素肾病大鼠蛋白尿的发生有关, 儿茶素可能是通过调节 Podocin 蛋白与基因表达, 降低尿蛋白的排泄; 微胶囊技术可提升儿茶素的生物学效应。

### 参考文献:

- [1] Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, et al. Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(3): 475-481.
- [2] 管娜, 丁洁, 张敬京, 等. 肾病综合征患儿肾小球中 nephrin、podocin、-actinin 及 WT1 的表达[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(3): 205-210.
- [3] Zhang S, Liu Z H, Huang J A, et al. Study on the preparation of high content tea catechins with macroporous adsorption resin[J]. Journal of Tea Science, 2002, 22(2): 125-130.
- [4] 何小解, 易著文, 卢向阳, 等. 儿茶素对肾病综合征大鼠氧自由基与抗氧化酶的影响研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(4): 342-346.
- [5] 何小解, 易著文, 卢向阳, 等. 儿茶素对肾病大鼠血浆及肾皮质内皮

# 银杏中银杏酸诱导人白血病细胞 U937 凋亡的研究

杨小明<sup>1,3</sup>, 陈永昌<sup>2</sup>, 陈 钧<sup>3</sup>, 谢吉民<sup>1</sup>

(1. 江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212002;

3. 江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

**摘 要:** 目的: 研究银杏酸体外对 U937 细胞生长的抑制作用, 探讨其作用机理。方法: 采用 MTT 法检测银杏酸对 U937 细胞增殖的影响, 激光共聚焦显微镜观察细胞形态的变化, DNA 琼脂糖电泳检测其生化特征的改变, 流式细胞仪分析细胞凋亡率。结果: U937 细胞经银杏酸作用 24~48h, 细胞的生长明显被抑制; 银杏酸作用 28h 出现了细胞皱缩、核浓缩、体积缩小等明显的凋亡的形态学特征; 细胞 DNA 经琼脂糖电泳可见典型的梯形条带; 10.0 µg/ml 的银杏酸作用 40h 后, 细胞凋亡率为 14%。结论: 银杏酸对 U937 细胞具有明显的抗肿瘤活性, 其作用机理与诱导细胞凋亡有关。

**关键词:** 银杏酸; U937 细胞; 凋亡; MTT

Apoptosis Study on Human or Leukaemia Cell Line U937 Induced by Ginkgol ic Acids from *Ginkgo biloba* L.

YANG Xiao-ming<sup>1,3</sup>, CHEN Yong-chang<sup>2</sup>, CHEN Jun<sup>3</sup>, XIE Ji-min<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China;

3. School of Bio-environment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** To investigate the inhibitory effects of ginkgol ic acids on U937 cells *in vitro* and its anti-tumor mechanism. Method: The growth inhibitory effects of ginkgol ic acids on U937 cell were assayed by MTT method. Changes of U937 cell morphologic character were observed under laser focusing microscope. Bio-chemistry characteristics of cell apoptosis was observed by DNA agarose electrophoresis. Apoptosis rate of U937 was analyzed by FCM. Result: Ginkgol ic acids shows obvious inhibitory effect on cell growth after culturing U937 cell with it for 24~48h. Exposure U937 cell to ginkgol ic acids for 28h, that ginkgol ic acids make the U937 nucleolus shrink in volume, darken in color, distort in shape. U937 cells show morphologic characteristics of cell apoptosis. U937 cell DNA appears DNA ladder type in agarose electrophoresis. Exposing U937 cell to 10.0 µg/ml ginkgol ic acids for 40h, the apoptosis rate is 14%. Conclusion: Ginkgol ic acids show an anti-tumor activity through inducing apoptosis in tumour cell.

收稿日期: 2005-10-26

基金项目: 江苏省教育厅自然科学研究项目(01KJD310003); 江苏大学高级人才启动金项目(05JDG024)

作者简介: 杨小明(1963-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物有效成分的提取及活性研究。

素、一氧化氮表达的影响研究[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(9): 550-554.

[6] Zhang K D, Xu D M, Wang P. Microencapsulation method[J]. Journal of Functional Polymers, 2001, 14(4): 474-480.

[7] 刘袖洞, 何洋, 刘群, 等. 微胶囊及其在生物医学领域中的应用[J]. 科学通报, 2000, 45(23): 2476-2485.

[8] Amory J K, Anawalt B D, Blaskovich P D, et al. Testosterone release

from a subcutaneous, biodegradable microcapsule formulation (Viatrix) in hypogonadal men[J]. Journal of Andrology, 2002, 23(1): 84-91.

[9] Boute N, Griboval O, Roselli S, et al. NPSH2, encoding the glomerular protein Podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome[J]. Nat Genet, 2000, 24(4): 349-353.

[10] Roselli S, Griboval O, Boute N, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area[J]. Am J Pathol, 2002, 160(1): 131-138.