

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.11.004

◇ 药学研究 ◇

酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠视交叉上核生物钟基因 Period 1 及 Period 2 表达的影响

张付民, 李艳兵

作者单位: 恩施土家族苗族自治州中心医院中医科, 湖北 恩施 445000

通信作者: 李艳兵, 男, 主任医师, 研究方向为中医学, E-mail: 175868948@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703973); 湖北省教育厅科研项目(Q20172003)

摘要: **目的** 观察酸枣仁汤对睡眠剥夺大鼠视交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)生物钟基因 Period 1(Per1)和 Period 2(Per2)表达的影响,并探讨酸枣仁汤改善睡眠的可能机制。**方法** 将实验大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、褪黑素组和酸枣仁汤组,除空白组外,其他各组腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)以制定睡眠剥夺模型,褪黑素组给予褪黑素溶液($36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),酸枣仁汤组给予酸枣仁汤水煎液($4.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),空白组和模型组给予等体积的0.9%氯化钠溶液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续灌胃2周,1次/天。末次给药后24 h,用自主活动测试仪记录大鼠自主活动时间,Real time-PCR、免疫组化和 Western blot 检测 SCN 中 Per1 和 Per2 的基因和蛋白表达水平。**结果** 自主活动时间检测结果:空白组活动时间为(377.79 ± 39.55)s,模型组为(478.43 ± 38.89)s,褪黑素组为(394.09 ± 31.27)s,酸枣仁汤组为(412.40 ± 36.24)s,空白组大鼠活动时间较少,造模后,与空白组比较,模型组大鼠活动时间明显增加($P < 0.01$);给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠活动时间与模型组比较,都有不同程度减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。Real time-PCR 和 Western blot 检测结果:空白组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 的基因和蛋白表达水平较高,造模后,模型组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 的基因蛋白表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 的基因和蛋白表达上升($P < 0.01$, $P < 0.05$)。免疫组化检测结果:空白组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达水平较高,造模后,模型组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达上升($P < 0.01$, $P < 0.05$),酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Per1 表达也上升($P < 0.05$),Per2 表达上升但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 酸枣仁汤可以通过调节大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 的表达进而改善睡眠剥夺大鼠的睡眠状态。

关键词: 酸枣仁汤; 睡眠剥夺; 视交叉上核; 生物钟基因; Per1; Per2; 机制

Effect of Suanzaoren Decoction on the expression of circadian clock genes Period 1 and Period 2 in the suprachiasmatic nucleus of rats with sleep deprivation

ZHANG Fumin, LI Yanbin

Author Affiliation: Department of Chinese Medicine, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Enshi, Hubei 445000, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Suanzaoren Decoction on the expression of Period 1(Per1) and Period 2(Per2) in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus(SCN) of rats with sleep deprivation, and to explore the possible mechanism of Suanzaoren Decoction to improve sleep. **Methods** The experimental rats were randomly divided into blank group, model group, melatonin group and Suanzaoren Decoction group. Apart from blank group, PCPA was injected intraperitoneally into other groups to establish sleep deprivation model. Melatonin group was given melatonin solution ($36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Suanzaoren Decoction group was given Suanzaoren Decoction ($4.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the blank group and the model group were given the same volume of physiological saline ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), continuous gastric perfusion for 2 weeks, once a day. After the last administration, the autonomic activity tester was used to record the spontaneous activity time of rats. The expression of Per1 and Per2 in SCN was detected by Real time-PCR, Immunohistochemistry and Western blot. **Results** Test results of independent activity time: The activity time of the rats in the blank group was less (377.79 ± 39.55)s. After the model establishment, the activity time of the rats increased significantly [$(377.79 \pm 39.55) \text{ s}$ vs. $(478.43 \pm 38.89) \text{ s}$] ($P < 0.01$). After the administration, the activity time of the rats in the melatonin group [$(394.09 \pm 31.27) \text{ s}$] and the Suanzaoren group [$(412.40 \pm 36.24) \text{ s}$] decreased to different degrees ($P < 0.01$, $P < 0.05$). rt-PCR and Western blot showed that the levels of Per1 and Per2 mRNA and protein expression in SCN were higher in

blank group than in control group, which decreased ($P < 0.01$) after modeling. After administration, the levels of Per1 and Per2 mRNA and protein expression in SCN of melatonin group and *Suanzaoren Decoction* group increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Immunohistochemical results: The expression levels of Per1 and Per2 in SCN of rats in the blank group were higher, which were decreased after modeling ($P < 0.01$). After administration, Per1 and SCN in rats in melatonin group were administered. Per2 expression increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), Per1 expression in SCN of *Suanzaoren Decoction* group also increased ($P < 0.05$), Per2 expression increased, but with no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** *Suanzaoren Decoction* can improve the sleep state of sleep deprived rats by regulating the expression of Per1 and Per2 in SCN of rat.

Key words: *Suanzaoren Decoction*; Sleep deprivation; Suprachiasmatic nucleus; Circadian clock genes; Per1; Per2; Mechanism

失眠为临床常见的精神系统疾病,常以入睡难、易醒、睡眠浅为主要临床症状^[1],现已对人们的生活和工作造成了严重影响,迫切需要寻找切实有效的治疗方法。据统计^[2],中国有3亿睡眠障碍病人,发病率高达38.2%。过去数十年研究者主要通过神经递质假说和神经炎症假说解释了失眠的发病机制,但近几年研究者发现下丘脑生物钟基因失调与失眠存有相关性^[3]。视交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)为下丘脑中的重要神经核团,为生物节律调节中枢,能调节包括昼夜节律在内的多种生物节律^[4]。SCN能调节Period1(Per1)、Period2(Per2)、Clock、Baml1等多种与昼夜节律相关的生物钟基因,其中Per1和Per2的失调与失眠症关系较为密切,为当前学术界研究的热点^[5-6]。动物实验及临床实验均已证实酸枣仁汤对于失眠具有较好的疗效,其机制可能与其调节脑内神经递质水平和神经炎症有关,但尚不能确定其是否可以通过调节生物钟基因而改善睡眠。为进一步探明酸枣仁汤改善睡眠的作用机制,同时也为酸枣仁汤临床应用提供一定的实验支撑,本实验自2017年1月至2018年1月通过腹腔注射PCPA以建立睡眠剥夺模型,并给予模型动物酸枣仁汤,应用自主活动测试仪记录大鼠自主活动时间,Real time-PCR、免疫组化和Western blot检测SCN中Per1和Per2的基因和蛋白表达水平,以初步探明酸枣仁汤干预失眠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 成年健康SPF级雄性SD大鼠,40只,体质量为200~250 g,购自湖北省实验动物研究中心,实验动物许可证号及合格证号分别为SCXK(鄂)2015-0018、420006002854238。

1.2 主要药品及试剂 根据方剂学^[7]中酸枣仁汤药物组成及配伍计量确定本研究酸枣仁汤的药物组成和药物剂量,即酸枣仁汤由酸枣仁30 g、知母9 g、茯苓6 g、川芎6 g和甘草3 g组成,所有饮片均购自湖北省恩施州中心医院中药房。先用8倍于中药

体积的纯水浸泡药物20 min,浸泡后依次使用武火和文火各煎煮药物20 min,用纱布过滤药液,再次向饮片中加6倍于中药体积的纯水,煎煮40 min后滤出药液,混匀两次煎取的药液,最后将药液置于多级旋蒸仪中进行浓缩,最终制成每毫升含生药0.486 g的水煎液。褪黑素片,汤臣倍健股份有限公司,批号20171125D。Takara逆转录试剂盒,大连Takara公司,批号AS4857。SYBR Green qPCR试剂盒,美国Thermo Fisher公司,批号A25780;Trizol,美国Thermo Fisher公司,批号15596026。一抗Per1和Per2均为羊抗鼠抗体,德国默克集团,批号分别为AB5424P、ABN299。HRP标记羊抗小鼠抗体二抗,武汉Cusabio公司,批号CSB-PA644737。

1.3 主要仪器 ZZ-6型自主活动测试仪,上海益联医学。CFX96型实时荧光定量PCR扩增仪,美国Bio-Rad。Quick Drop型核酸蛋白分析仪,美国Molecular Devices。Tanon-1600型凝胶图像成像分析系统,上海天能。

1.4 动物分组及给药 适应性饲养1周后使用统计软件SPSS 19.0生成的随机数字表将实验大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、褪黑素组和酸枣仁汤组,每组10只,除空白组外,其他3组进行腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)混悬液以构建睡眠剥夺模型。根据“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值”计算动物给药剂量,褪黑素组给予褪黑素溶液($36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),酸枣仁汤组给予酸枣仁汤水煎液($4.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),空白组和模型组给予等体积的0.9%氯化钠溶液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续灌胃2周,1次/天。

1.5 睡眠剥夺模型的建立 配置PCPA混悬液(按100 mg/mL溶于0.9%氯化钠溶液,剂量500 mg/kg),按10 mL/kg的剂量对模型组、褪黑素组和酸枣仁汤组连续7 d腹腔注射PCPA混悬液以构建睡眠剥夺模型,空白组则连续7 d腹腔注射等体积的0.9%氯化钠溶液。

1.6 动物取材及处理 自主活动实验完成后取材,从每组采用随机数字表法选取4只大鼠以10%水合氯醛经腹腔注射麻醉(4 mL/kg),经腹主动脉取血后断头取脑,剥离颅骨,冰上分离大鼠下丘脑后镜下分离SCN,分装后置液氮速冻,24 h内移于-80℃冰箱以用于Western blot实验。对剩余大鼠以同样方式麻醉,麻醉剪开胸腔,以4%多聚甲醛经左心室灌注,断头取脑并分离下丘脑,置于4%多聚甲醛中固定48 h后进行免疫组化实验。动物处置符合伦理原则。

1.7 指标检测

1.7.1 自主活动时间检测实验 末次灌胃结束后24 h,将大鼠置于自主活动测试仪敞箱中,同时启动自主活动行为追踪系统,记录6 min内各组大鼠的活动时间。

1.7.2 Real time-PCR 检测 SCN 中 Per1、Per2 表达 取SCN组织20 mg,加入2 mL Trizol以提取组织中总mRNA;提取后使用核酸蛋白仪检测各样本纯度和浓度,当OD26/OD280值为1.8~2.0时则表示可进行逆转录合成cDNA;按照Takara逆转录试剂盒说明书对纯度合格的样本进行逆转录以合成cDNA,逆转录合成步骤及逆转录条件参照说明书进行;按照SYBR Green qPCR Master Mix荧光定量试剂盒说明书对合成后的cDNA进行基因扩增,扩增步骤及扩增条件参照说明书进行。分析Real time-PCR过程各检测样本的Ct值,并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示mRNA相对表达水平。通过Primer Premier 5.0引物设计软件设计Per1、Per2及内参 β -actin的序列,各基因序列见表1。

表1 引物序列

目的基因	引物序列	产物长度
Per1	Forward: 5'-GTCTAGCTGGTGCCATTCTC-3'	308 bp
	Reverse: 5'-CTCGATGTAACGGCTTGTG-3'	
Per2	Forward: 5'-CTGTGGTGGTCAACATTCC-3'	334 bp
	Reverse: 5'-GCTCAGTGGCTGCTTTCT-3'	
β -actin	Forward: 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTGC-3'	218 bp
	Reverse: 5'-TGATGTCACGCACGATTT-3'	

1.7.3 免疫组化检测 SCN 中 Per1、Per2 表达 取出

多聚甲醛溶液中的脑组织,进行石蜡包埋。包埋后连续切取5 μ m厚度的切片,并用二甲苯和梯度乙醇对切片进行脱蜡;将切片平展于3% H_2O_2 中浸泡15 min,使用PBS冲洗切片3 min,洗3次;向切片表面均匀滴加稀释后的一抗Perd1(1:100)和Perd2(1:200),室温孵育1 h;使用PBS冲洗切片3 min,洗3次;向切片表面均匀滴加稀释后二的抗(1:1 000),室温孵育15 min;使用PBS冲洗切片3 min,洗3次;滴加DAB显色液,反应5 min;最后再次使用梯度乙醇对切片进行水洗、复染、脱水和透明。显微镜下观察切片,从每天切片中选取5个高倍(400X)视野,用Image Pro-Plus 6.0软件进行图像处理并获取积分光密度(IOD)值。

1.7.4 Western blot 检测 SCN 中 Per1、Per2 表达 取SCN 20 mg,加含PMSF的蛋白裂解液,组织研磨仪匀浆,以4℃,12 000 r/min离心15 min,取上清,用BCA法测定各样本蛋白量;制作10% SDS-PAGE凝胶,每孔上样40 μ g后依次电泳和转膜;使用PBS洗片3 min,洗3次;按抗体说明书加入稀释后一抗Per1(1:1 000)和一抗Per2(1:1 000),置4℃冰箱孵育过夜;使用PBST洗片3 min,洗3次;按抗体说明书加入稀释后二抗(1:2 000);使用PBST洗片3 min,洗3次;向膜表面均匀滴加ECL显色液,置凝胶图像成像分析系统获取各组蛋白条带,拍照并保存各蛋白条带。使用Image J计算各条带灰度值。

1.8 统计学方法 所有数据均运用统计软件SPSS 19.0处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均通过正态性检验。组间整体比较采用单因素方差分析,多重比较采用HSD法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自主活动时间检测结果 空白组活动时间为(377.79 $\pm$ 39.55)s,模型组为(478.43 $\pm$ 38.89)s,褪黑素组为(394.09 $\pm$ 31.27)s,酸枣仁汤组为(412.40 $\pm$ 36.24)s,与空白组比较,模型组大鼠活动时间明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠活动时间都有减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。各组大鼠活动轨迹图见图1。

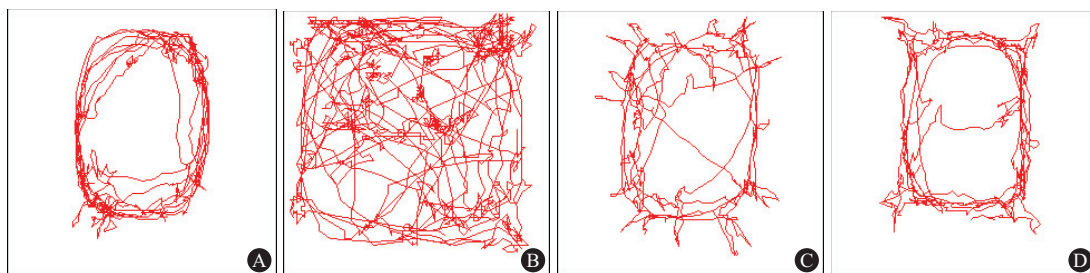


图1 各组大鼠活动轨迹图:A为空白组;B为模型组;C为褪黑素组;D为酸枣仁汤组

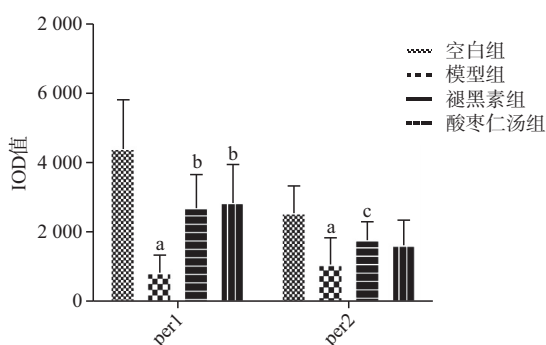
2.2 Real time-PCR 检测结果 空白组大鼠 SCN 中 Per1 mRNA 和 Per2 mRNA 表达水平较高,造模后,模型组大鼠 SCN 中 Per1 mRNA 和 Per2 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Per1 mRNA 和 Per2 mRNA 表达上升($P < 0.01, P < 0.05$)。见表2。

表2 酸枣仁汤对各组大鼠下丘脑 SCN 中 Per1、Per2 mRNA 表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Per1 mRNA	Per2 mRNA
空白组	6	1.78±0.29	1.50±0.27
模型组	6	1.26±0.27	1.09±0.25
褪黑素组	6	1.60±0.21	1.38±0.23
酸枣仁汤组	6	1.50±0.27	1.34±0.2
方差分析			
F值		5.458	3.613
P值		0.004	0.025

注:多重比较为HSD- q 检验

2.3 免疫组化实验结果 空白组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达水平较高,造模后,模型组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 表达上升($P < 0.01, P < 0.05$),酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Per1 表达也上升($P < 0.05$),Per2 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠 SCN 中 Per1、Per2 的 IOD(累积光密度)值见图2。



注:与空白组比较, $^a P < 0.01$;与模型组比较, $^b P < 0.01, ^c P < 0.05$

图2 各组大鼠SCN中Per1、Per2的IOD(累积光密度)值

2.4 Western blot 实验结果 空白组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 蛋白表达水平较高,造模后,模型组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 蛋白表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 蛋白表达上升($P < 0.01, P < 0.05$)。各组大鼠 SCN 中 Per1 和 Per2 蛋白条带见图3,各组大鼠 SCN 中 Per1、Per2 灰度值见图4。

3 讨论

酸枣仁汤具有养血滋阴、除烦安神之功,主治

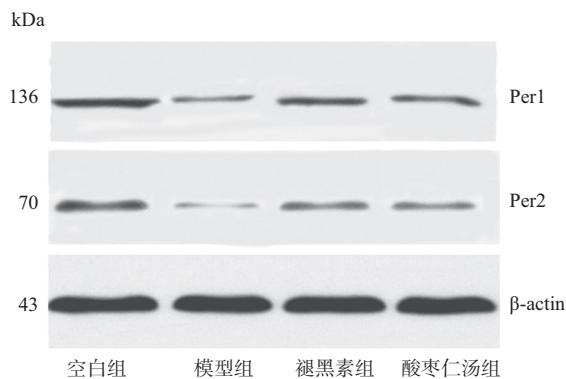
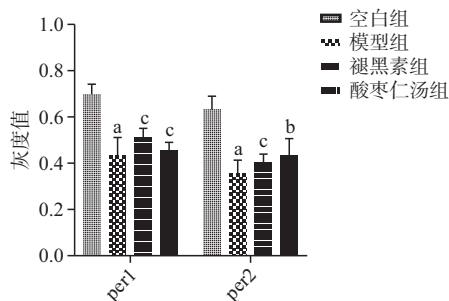


图3 各组大鼠SCN中Per1和Per2蛋白条带



注:与空白组比较, $^a P < 0.01$;与模型组比较, $^b P < 0.01, ^c P < 0.05$

图4 各组大鼠SCN中Per1、Per2灰度值分析

“虚劳虚烦不得眠”^[8]。该方源自张仲景《金匱要略》,由酸枣仁、川芎、茯苓、知母和炙甘草组成。自古以来,酸枣仁汤就备受医家追捧,为临床治疗失眠的有效方。近年来,研究人员从不同角度阐述了酸枣仁汤治疗失眠的机制,但其分子机制尚不明确。近几年,分子生物学的迅猛发展为研究酸枣仁汤治疗失眠的分子机制奠定了良好基础。

烦躁为失眠病人临床上常见的躯体症状之一,睡眠剥夺也会导致啮齿类动物出现烦躁不安的行为表现,该种行为则常表现为自主活动时间的改变^[9]。自主活动测试仪可以观察大鼠自主活动时间和活动轨迹,本实验发现,睡眠剥夺后模型大鼠活动时间明显增加($P < 0.01$),而给与模型动物酸枣仁汤后,大鼠自主活动时间明显减少($P < 0.05$),这说明成功通过PCPA构建了睡眠剥夺模型,同时酸枣仁汤可以改善睡眠剥夺模型大鼠的睡眠状态。

SCN为生物节律的起搏器和调节中枢,能广泛调节体温、呼吸、心脏搏动、血压、血糖和睡眠等多种生物节律^[10]。SCN中可通过调节 Per1、Per2、Clock、Bmal1 等多种节律基因而调节睡眠-觉醒周期,同时这些基因相互作用共同构成调节睡眠的反馈环路,当这些节律基因表达异常时则会引起睡眠障碍^[11-12]。研究发现^[13],Per1 和 Per2 的基因表达异常则会导致昼夜节律周期改变,动物实验研究表明敲出小鼠 Per1 和 Per1 基因则会导致昼夜节律逐渐

消失。基于此,本实验以Per1、Per2这一正向昼夜节律调节基因为研究对象,以阐明酸枣仁汤调节睡眠的分子机制。本实验发现,空白组大鼠SCN中Per1、Per2表达水平较高,造模后,模型组大鼠SCN中Per1、Per2表达水平下降($P < 0.01$),给药后,褪黑素组和酸枣仁汤组大鼠SCN中Per1、Per2表达都有不同程度上升($P < 0.01$, $P < 0.05$)。这说明睡眠剥夺可以引起大鼠下丘脑SCN中节律基因Per1、Per2的异常,而酸枣仁汤可以通过调节SCN中Per1、Per2的表达而达到防治失眠的疗效。

综合分析,课题组认为酸枣仁汤可能通过调节大鼠SCN中Per1、Per2的表达进而改善慢睡眠剥夺大鼠的睡眠状态。本研究机制初步阐明了酸枣仁汤干预失眠的作用机制,但其调节节律基因的分子机制有待于进一步研究。此外,本研究也为其他中医经典方的现代化研究提供了一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 钱见见,蔡圣朝.针刺百会五针结合中药治疗心肾不交型失眠验案1则[J].中医外治杂志,2018,27(1):59-60.
- [2] 张红菊,赵忠新.睡眠障碍临床研究的主要进展[J].神经疾病与精神卫生,2015,15(1):6-8.
- [3] 魏歆然,魏高文,郑雪娜,等.不同经穴组合针刺对失眠大鼠下丘脑生物钟基因Clock和Bmal1表达的影响[J].针刺研究,2017,42(5):429-433.
- [4] 马艳苗,贾跃进,柴智,等.浅述中西医对失眠症昼夜节律的认识[J].世界中西医结合杂志,2017,12(9):1189-1191.
- [5] YOKOTA S I, HORIKAWA K, AKIYAMA M, et al. Inhibitory action of brotizolam on circadian and light-induced Per1, and Per2, expression in the hamster suprachiasmatic nucleus [J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 131(8): 1739-1747.
- [6] ZHANG B, GAO Y, LI Y, et al. Sleep Deprivation Influences Circadian Gene Expression in the Lateral Habenula [J]. Behavioural Neurology, 2016, 2016: 7919534. DOI:10.1155/2016/7919534.
- [7] 谢鸣.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,2010:258.
- [8] 王思宇,杨学,何园.酸枣仁汤方证探微[J].上海中医药杂志,2016,50(7):30-34.
- [9] 王培坎,吴高义,李吉国,等.睡眠剥夺对大鼠行为学及咀嚼肌电图的影响[J].现代生物医学进展,2014,14(9):1645-1647.
- [10] YU J, CHEN J, HU T, et al. Effect of Electro-Acupuncture on Expression of Circadian Clock Gene Per2 and Bmal1 in Sleep-Deprivation Model Rat [J]. Chinese Medicine, 2016, 7(1): 16-24.
- [11] TAMAYO A G, DUONG H A, ROBLES M S, et al. Histone monoubiquitination by Clock - Bmal1 complex marks Per1 and Per2 genes for circadian feedback [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(10): 759-766.
- [12] 魏文静,仝立国,仲启明,等.蛇床子催眠活性组分对对氯苯丙氨酸致失眠大鼠海马钟基因与氨基酸类神经递质表达的影响[J].中草药,2018,49(11):2614-2619.
- [13] ONO D, HONMA K I, YANAGAWA Y, et al. Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. [J]. Journal of Physiological Sciences, 2018, 68(4): 333-343.

(收稿日期:2018-07-14,修回日期:2018-09-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.11.005

◇ 药学研究 ◇

槲皮素抑制人肝癌细胞 HepG2 的体内外活性研究

周孟^{ab}, 廖祥明^{ab}, 王珊^{ab}, 巩仔鹏^c, 张荣红^d

作者单位: 贵州医科大学^a民族药与中药开发应用教育部工程研究中心、药用植物功效与利用国家重点实验室,
^b药学院, ^c贵州省药物制剂重点实验室, ^d组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004

通信作者: 张荣红, 女, 讲师, 研究方向为肿瘤学, E-mail: 476281051@qq.com

基金项目: 贵州省民族药药效物质基础研究科技创新人才团队(贵州省高层次人才培育(百层次)(黔科合平台人才[2016]56135677))

摘要:目的 系统评价槲皮素(Qu)体内外干预HepG2人肝癌细胞增殖效果。方法 使用MTT法检测不同浓度Qu在不同作用时间对HepG2细胞的体外抑制活性;采用裸鼠移植瘤实验,评价腹腔注射Qu对HepG2人肝癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用;使用TUNEL法检测凋亡指数。结果 Qu作用HepG2细胞24、48和72 h的IC₅₀分别为110.50, 63.73和46.38 μmol/L;12.5, 25和50 mg/kg的Qu都能显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,且呈浓度依赖性;其中50 mg/kg的Qu对人肝癌HepG2细胞裸鼠皮下肿瘤模型的抑瘤率为46.65%,差异有统计学意义($P < 0.05$),相对肿瘤增殖率为46.68%。同时Qu还会导致约20.17%的体内肿瘤细胞发生凋亡,且几乎无毒性,表现出良好的抑瘤效果。结论 Qu能较为显著的抑制体内外HepG2肝癌细胞的增殖并会导致其发生凋亡,且由于极低的毒性及在自然界的广泛分布,使Qu成为新型抗肝癌药物开发的重要资源。

关键词: 槲皮素; 肝癌; HepG2细胞; 抗肿瘤活性; 细胞凋亡