

甘肃黄芪对多柔比星心肌病大鼠心肌组织部分基因表达的影响

余静^{1,2}, 索有瑞³, 张生平¹, 王琼英¹, 常鹏¹, 汪汉卿² (1. 兰州大学第二医院心内科, 兰州 730030; 2. 中国科学院兰州化物所甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000; 3. 中国科学院西北高原生物研究所测试中心, 西宁 810001)

摘要:目的 比较正常大鼠和多柔比星心肌病大鼠心肌组织部分基因表达谱的差异, 探讨甘肃黄芪对上述基因表达谱的影响。方法 30只 Wistar大鼠随机分3组: 对照组即生理盐水组 ($n=10$), 多柔比星组 ($n=10$) 和黄芪+多柔比星组 ($n=10$)。分别从3组心肌组织中抽提总RNA, 用Cy3, Cy5荧光标记, 经逆转录合成动物来源的cDNA探针; cDNA探针与4000点基因表达谱芯片杂交, 结果由软件分析表达信号。结果 共有923条基因出现差异表达, 其中586条基因表达下调, 337条基因表达上调。凋亡相关基因表达在多柔比星心肌病时上调, 氧化和能量代谢相关基因的表达在多柔比星心肌病时下调。6个在多柔比星组上调的基因在黄芪+多柔比星组下调, 8个在多柔比星组下调的基因在黄芪+多柔比星组上调, 3个在多柔比星组上调的基因在黄芪+多柔比星组表达进一步增强。结论 凋亡和能量代谢障碍及免疫因素在多柔比星心肌病的发病机制中参与作用, 甘肃黄芪对多柔比星诱导的心肌病大鼠的心脏保护作用是通过多基因多途径调节相关基因表达而实现的。

关键词: 多柔比星; 黄芪; 心肌病; 基因表达谱

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2007)06-0437-05

Effect of Radix Astragali Gansuensis on Genetic Expression Spectra in Myocardium of Rats with Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy

YU Jing^{1,2}, SUO You-rui³, ZHANG Sheng-ping¹, WANG Qiong-ying¹, CHANG Peng¹, WANG Han-qing² (1. Department of Cardiology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Researching and Developing Center of Natural Occurring Drugs, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 3. Test and Measurement Center, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the difference of genetic expression spectra between doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats and normal controls by DNA microarray. To explore the effects of Radix Astragali Gansuensis on gene expression profiles in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. **METHODS** Thirty Wistar rats were divided randomly into 3 groups, i.e. control group ($n=10$), doxorubicin group ($n=10$) and Radix Astragali + doxorubicin group ($n=10$). cDNA probes were prepared by labeling the mRNA extracted from myocardium and marked with Cy3-dTP and Cy5-dUTP respectively through reverse transcription. DNA microarray were constructed by spotting PCR products of 4000 and cDNAs onto specially treated glass slides and were then hybridized against the cDNA probes followed by fluorescent signals scanning. **RESULTS** Nine hundred and twenty three genes were detected with differential expressions. The expressions of 586 genes were found to be down-regulated and 337 ones up-regulated. Energy metabolism-related genetic expressions were down-regulated in tissues of rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy compared with normal tissue. Expressions of apoptosis-related genes were up-regulated in tissues of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Six up-regulated and 8 down-regulated genes in doxorubicin group were down-regulated and up-regulated in Radix Astragali + doxorubicin group respectively. Expressions of 3 up-regulated genes in doxorubicin group were further enhanced in Radix Astragali + doxorubicin group. **CONCLUSION**

Apoptosis, energy metabolism disorder and immunity may participate the pathogenesis changes in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. Radix Astragali Gansuensis can protect the heart in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. Multiple gene expressions are involved to implement this pharmacological effect.

KEY WORDS: doxorubicin; Radix Astragali Gansuensis; cardiomyopathy; genetic expression spectras

多柔比星 (doxorubicin) 是肿瘤化疗中常用的一种广谱有效的抗肿瘤药物, 但因其产生心脏毒性, 引起心肌病变而使其应用受到限制。心肌损害的分子机制相当复杂, 涉及细胞凋亡、自由基的形成、信号

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目 (ZS031-A25-054-E); 甘肃省科学事业费项目 (QS041-C33-17)

作者简介: 余静, 女, 博士, 教授, 主任医师 Tel: (0931) 8942076 E-mail: yujing2304@sina.com

传导和免疫等^[1]。本实验运用基因芯片技术^[2]比较正常大鼠和多柔比星心肌病大鼠心肌组织中部分基因表达谱的差异,并探讨甘肃黄芪(*Radix Astragalus Gansuensis*)对多柔比星心肌病心肌组织中上述基因表达谱的影响。

1 材料

1.1 动物

Wistar大鼠 30 只,雌雄各半,体重 130 ~ 150 g (甘肃省肿瘤医院动物试验中心,合格证号:医动字第 04-008 号),随机分 3 组,每组 10 只。

1.2 药品与试剂

多柔比星(浙江省海镇药业股份有限公司,批号:040404);黄芪(甘肃省定西黄芪生产基地,2003 年采收),黄芪浸膏由本实验室提取(黄芪甲苷质量分数为 0.076%);TR Izol(上海博星公司);芯片杂交试剂盒(上海博星公司)。

1.3 仪器

FR - 280 电泳仪和 FR - 200 凝胶成像仪(上海复日科技公司);DND - 9052 型杂交箱(上海精宏实验设备有限公司);杂交舱(联合基因公司);GenePix 4000B 芯片扫描仪(AXON 公司);Cambridge CB4 OFJ 核酸分析仪(英国剑桥仪器公司)

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

对照组:腹腔注射生理盐水 $0.125 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周 2 次,并给予生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,共 10 周;多柔比星组:按 Billingham 等^[3]的方法,腹腔注射多柔比星 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (即多柔比星用生理盐水溶解成质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液),每周 2 次,并给予生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,共 10 周;黄芪 + 多柔比星组,腹腔注射多柔比星 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每周 2 次,并给予黄芪浸膏 $2 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,用 2 mL 生理盐水混匀后灌胃,每日 1 次,共 10 周。

2.2 心肌组织标本留取

以质量浓度为 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊巴比妥钠溶液 $30.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射,麻醉动物。剖开胸腔和心包,游离心脏,用磷酸盐缓冲液($\text{pH} = 7.4$)冲洗后,沿心脏长轴取左心室游离壁心肌约 20 mg ,迅速放入用 DEPC 处理过的冻存管中,置于液氮中保存,待提取总 RNA 用。接着,在左心室取约 1 mm^3 大小组织,体积分数为 3%戊二醛前固定,超薄切片 50 nm ,铅铀双染色,透射电镜下观察。将剩余的部分心脏组织,用体积分数为 4%甲醛固定,石蜡包埋切片,嗜红染色,光镜下观察病理变化。取部分心肌

组织电镜下检查,发现线粒体变性,肌纤维收缩带形成,视为多柔比星心肌病成功模型^[4]。

2.3 心肌组织中总 RNA 的提取

使用 Trizol 液,以硫氰酸胍-氯仿-异丙醇法分别提取对照组、多柔比星组及黄芪 + 多柔比星组的总 RNA。

2.4 探针制备

纯化 mRNA 及反转录标记 cDNA 探针并纯化(用 Cy3 dUTP 标记正常组织 mRNA,用 Cy5 dUTP 标记病变组织 mRNA)。乙醇沉淀后溶解在 $20 \mu\text{L}$ $5 \times \text{SSC} + 0.2\% \text{ SDS}$ 杂交液中。

2.5 杂交及洗涤

将大鼠 4 000 点芯片和杂交探针分别在 95 水浴中变性 5 min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于 60 杂交 15 ~ 17 h,然后揭开盖玻片,分别用 $2 \times \text{SSC} + 0.2\% \text{ SDS}$, $0.1\% \text{ SSC} + 0.2\% \text{ SDS}$, $0.1\% \text{ SSC}$ 洗涤 10 min,室温晾干。

2.6 检测与分析

用 ScanArray 5000 扫描芯片,用 InaGene 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。用 40 个管家基因进行 Cy3 和 Cy5 的均衡。用以下 2 个条件作为判定基因差异表达的标准: Cy3 和 Cy5 信号值其中之一必须达 800 以上; Cy5 与 Cy3 的比值大于 2 或小于 0.5(基因的表达变化在 2 倍以上)。每对样品重复 2 次。

3 结果

3.1 多柔比星诱导心肌病病理改变

光镜下:对照组,心肌细胞排列整齐,无心肌纤维的破坏,细胞间隙正常,未见水肿。多柔比星组,心肌细胞多灶性肌浆溶解,有不同程度的颗粒变性与空泡变性,细胞间隙明显增宽,受累较重的心肌细胞,肌原纤维溶解消失,呈小灶状或片状坏死,心肌坏死灶内可见单核、淋巴细胞浸润。黄芪 + 多柔比星组心肌细胞损害程度较多柔比星组轻。电镜下:对照组,心肌细胞核长杆状,居中,常染色质丰富,肌丝排列规则,线粒体圆形或长圆形,板层嵴密集,与肌丝纵形排列,肌丝间散在分布许多糖原颗粒。多柔比星组,心肌细胞核肿胀、溶解消失,肌质中肌丝溶解、中断,线粒体肿胀、畸形,嵴排列紊乱,肌浆网扩张成囊状,部分区域肌细胞呈片状溶解、空化,闰盘杂乱。黄芪 + 多柔比星组可见心肌细胞核肿胀、线粒体肿胀,肌质中肌丝溶解、中断较多柔比星组少见。结果见图 1,2。

3.2 多柔比星组差异表达

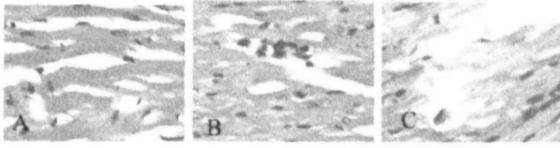


图 1 大鼠心肌组织光镜病理改变 (HE ×400)

A - 正常对照组心肌; B - 黄芪 + 多柔比星 DOX 组心肌; C - 多柔比星 DOX 组心肌

Fig 1 Histopathological changes of myocardium in rats (HE × 400)

A - Control group; B - Radix Astragali + DOX group; C - DOX group

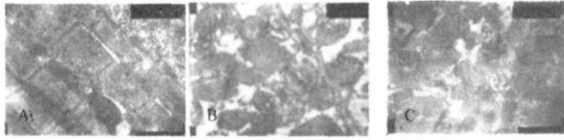


图 2 大鼠心肌组织病理改变电镜病理改变结果 (×13000)

A - 正常对照; B - 黄芪 + 多柔比星 DOX 组; C - 多柔比星组

Fig 2 Ultrastructural changes of myocardium in rats (×13000)

A - Control group; B - Radix Astragali + DOX group; C - DOX group

多柔比星组与对照组之间共有 923 条基因 (含

表 1 甘肃黄芪对多柔比星诱导的心肌病部分差异表达基因的影响

Tab 1 Some differential expression genes in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy

Genbank ID	Definition	Ratio (Cy5/Cy3)	Ratio (Cy5/Cy3)
XM24697	Bcl-2-associated transcript factor mRNA	2.619	0.512
XM215423	Sestrin 1 (p53-regulated protein PA26) mRNA	2.628	0.235
AY346103	Serine/threonine kinase 22A (Sk22a) mRNA	2.323	0.423
XM216276	G1/S-specific cyclin D2 (V N-1 proto-oncogene) mRNA	6.213	0.331
XM 215627	Death associated protein 3 mRNA	2.186	0.226
NM 023972	Glutamate transporter EAAC1 interacting protein mRNA	2.195	0.438
M33821	Rat gamma-glutamyl transpeptidase mRNA	0.005	2.316
L38615	Glutathione synthetase mRNA	0.059	2.163
D85100	mRNA for very-long-chain acyl-CoA synthetase	0.011	2.516
NM198780	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (pck1) mRNA	0.004	2.518
D78592	mRNA for glucose-6-phosphatase catalytic subunit	0.007	2.565
M77694	Fumarylacetylacetic acid hydrolase (FAH) mRNA	0.020	2.851
AF038870	Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) mRNA	0.024	1.993
M880345	Rat pseudo-cystathionine beta-synthase mRNA	0.058	2.025
AY149995	Complement component C4 mRNA	2.522	3.271
AF378093	Sodium channel beta 3 subunit (SCN3B) mRNA	2.733	3.162
AY149994	Complement component C2, mRNA	3.227	3.915

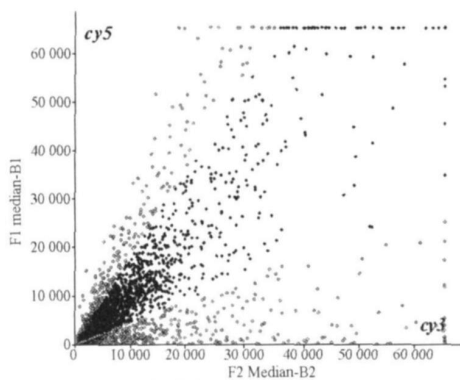


图 3 杂交信号强度散点图

Fig 3 Scatter plot of hybridization signal intensity

4 讨论

未知基因和 EST 片段) 出现差异表达, 其中有 586 条基因表达下调, 337 条基因表达上调。氧化和能量代谢相关基因的表达水平在多柔比星心肌病时表达下调; 凋亡相关基因表达水平在多柔比星心肌病时表达上调; 同型半胱氨酸代谢相关基因表达下调; 编码补体系统的基因表达上调。散点图代表 Cy3 和 Cy5 之间荧光信号比值的离散程度, 愈靠近 X 轴或 Y 轴表明该点基因差异表达愈显著。结果见表 1, 图 3。

3.3 甘肃黄芪治疗后差异表达

黄芪 + 多柔比星组与多柔比星组之间比较共有 812 条基因出现差异表达, 其中有 425 条基因治疗组表达上调, 387 条基因表达下调。6 个在多柔比星组上调的凋亡相关基因在黄芪 + 多柔比星组下调, 8 个在多柔比星组下调的氧化代谢相关基因在黄芪 + 多柔比星组上调, 3 个在多柔比星组上调的基因在黄芪 + 多柔比星组表达进一步增强, 它们是 2 个补体相关的基因和钠通道 β 3 亚单位 (sodium channel beta 3 subunit, SCN3B) mRNA 表达。结果见表 1。

心血管系统生理功能和病理改变的分子机制十分复杂, 用传统的单因素研究理论和方法进行其状态的描述存在一定的缺陷。基因芯片技术可同时检测组织和细胞内多种基因的 mRNA 表达水平, 了解正常组织和疾病组织基因表达谱的差异, 并与组织学与生物化学变化相联系。致病相关的多个基因产物可作为药物作用的靶分子, 通过使表达异常的基因恢复正常表达或使异常表达减轻, 可以指导药物筛选^[5]。

细胞凋亡是心肌病及其演变成心衰的一种非常重要的致病方式, B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 基因和 p53 属细胞凋

亡基因,其蛋白产物相互作用,从而正性或负性调节着细胞凋亡。细胞周期蛋白(Cyclin)可使细胞跨过G₁/S期限制点(R点)屏障,进入S期细胞增多,继发心肌细胞凋亡^[6]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, STK)过度表达可激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路,诱导细胞凋亡使心肌病理性肥厚,心功能下降^[7]。死亡相关蛋白3(death associated protein 3)在细胞凋亡中起重要作用^[8],兴奋性的氨基酸传递体是一具有高度亲和力的L-谷氨酸,L-天门冬氨酸细胞膜转运蛋白^[9],本研究中上述多种凋亡相关基因的表达上调亦证实了心肌细胞凋亡是多柔比星心肌病的一个重要发病机制,甘肃黄芪可通过降低凋亡相关基因表达起到减轻多柔比星心肌损伤的作用。

正常心肌依靠迅速高效的氧化供能,以提供稳定、可靠、足够的ATP以供心脏做功。谷胱甘肽(glutathione homone, GSH)是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂。谷氨酰基转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, -GTT)和谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase, GS)均与GSH的合成有关,编码二者的基因表达下调,提示病变心肌抗氧化能力降低^[10]。线粒体膜上的脂酰CoA合成酶活化长链脂酰CoA,进入线粒体参与脂肪酸氧化以供细胞能量,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-P)和延胡索酰基乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)编码基因表达下调,提示心肌氧化供能障碍^[11]。甘肃黄芪可通过上调上述氧化代谢相关的基因mRNA表达,增强心肌的抗氧化作用。

高同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)血症是心血管疾病的独立危险因素^[11-12]。甜菜碱型同型半胱氨酸甲基转移酶(betaine homocysteine methyltransferase, BHMT)及胱硫醚-合成酶(pseudo-cystathionine beta-synthase)均为同型半胱氨酸代谢过程中的关键酶,其编码基因表达下调,提示同型半胱氨酸代谢受阻,体内同型半胱氨酸增加。甘肃黄芪可通过上调同型半胱氨酸代谢相关酶mRNA的表达,降低同型半胱氨酸。

本研究中编码补体系统的基因补体C₂, C₄(complement component C₂, C₄)表达上调,证实了补体系统参与了多柔比星心肌病的演变。体内补体系统激活,可引起白细胞趋化、聚集和脱颗粒反应并释

放大量自由基,引起脂质过氧化增强,加重心衰^[13]。本实验黄芪+多柔比星组C₂, C₄mRNA的表达进一步提高,可能是此阶段仍然为免疫亢进时期,如果再进一步观察不同的病程中及不同的黄芪剂量其变化规律可能会更明确地解释其原因。也表明了心肌损伤修复过程的复杂性,目前暂不好定论。

临床和实验室的研究都证明,钠通道SCN3B在心脏损害时心律失常的发生中起重要作用,心脏损害时离子通道的电生理重塑引起了动作单位的延长,本实验在多柔比星组SCN3B mRNA表达增强,经黄芪治疗后其表达进一步增强,说明此时仍存在着心律失常的可能,由于与补体系统同样存在的原因,还有待进一步的研究^[14]。

黄芪已广泛地应用于临床,其心脏保护作用已有许多结论肯定的研究^[15]。应用基因芯片技术使我们更进一步明确黄芪心脏保护基因调控涉及多个基因群,这些基因群之间存在的相互作用和病理生理机制还有待于进一步探讨。用基因芯片技术研究甘肃黄芪的心脏保护作用,探讨甘肃黄芪的作用靶点,对于西部中药的现代化开发具有一定的意义。

REFERENCES

- [1] MOHAMED H E, EL-SWEFY S E, HAGAR H H, *et al.* The protective effect of glutathione administration on doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2000, 42(2): 115-121.
- [2] PAONIN F, LOWE D G. Expression Profiling Techniques for Cardiac Molecular Phenotyping [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11(6): 218-221.
- [3] BILLINGHAM M E, BRISTOW M R, DANES J R, *et al.* Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes [J]. *Cancer Treat Rep*, 1978, 62(6): 865-872.
- [4] MCPHERSON M J, HAMES B D, TAYLOR G R. *PCR 2: A Practical Approach* [M]. Oxford: Oxford University Press, 1995: 91.
- [5] SERVICE R F. Silicon chips find role as *in vivo* pharmacist [J]. *Science*, 1999, 283(5402): 619.
- [6] WATAYA-KANEDA M, KANEDA Y, HNO O, *et al.* Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis [J]. *Arch Dermatol Res*, 2001, 293(9): 460-469.
- [7] CAVALLARO S, AGATA V, ALESSIE, *et al.* Gene expression profiles of apoptotic neurons [J]. *Genomics*, 2004, 84(3): 485-496.
- [8] BUSCHA C R, HEATH D D, HUBBERSTEY A. Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) [J]. *Gene*, 2004, 329(31): 1-10.
- [9] LNCI, ORLOV I, RUGGIERO A M, *et al.* Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GIRAP3-18 [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 84-88.
- [10] MANCULI, CHANG X B, BUYSE F, *et al.* Intermediate structural states involved in MRPL mediated drug transport role of glutathione [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(5): 3347-3356.
- [11] HAMMOND L E, NESCHEN S, ROMANELLA J, *et al.* Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(27): 25629-25636.

戊地昔布抑制 clone 26 肿瘤细胞增生及机制

李军霞, 师晨霞, 苏素文, 张永健, 王永利* (河北医科大学药理教研室, 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨戊地昔布对小鼠肠癌 clone 26 细胞的生长抑制作用及机制。方法 用噻唑蓝 (MTT) 法检测戊地昔布对 clone 26 细胞生长的作用。用流式细胞仪检测 clone 26 细胞凋亡率和细胞周期分布。用 Western blot 检测 clone 26 细胞 caspase-3、PCNA 和 COX-2 的表达。结果 戊地昔布可抑制 clone 26 细胞生长并呈时间和浓度依赖性。50 ~ 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊地昔布可明显提高 clone 26 细胞的凋亡率, 从对照的 3.1% 提高到 4.4% ~ 11.0%。给予戊地昔布后, 细胞的增殖指数, S 期的细胞比例和 G2/M 期细胞有下降趋势, 但只有在 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊地昔布组时才有统计学意义。给予戊地昔布后, 细胞 PCNA 的表达降低, caspase-3 的表达升高, COX-2 的表达没有变化。结论 戊地昔布通过诱导凋亡和细胞周期停滞而抑制 clone 26 细胞生长, 小剂量时主要与凋亡有关, 大剂量时与诱导凋亡和细胞周期停滞有关。Caspase-3 参与戊地昔布诱导的凋亡。

关键词: 戊地昔布; 环氧化酶-2; 小鼠肠癌 clone 26 细胞; 凋亡

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-2494(2007)06-0441-04

Inhibition of Valdecoxib on the Proliferation of Clone 26 Cancer Cell and Its Mechanism

LI Jun-xia, SHI Chen-xia, SU Su-wen, ZHANG Yong-jian, WANG Yong-li* (Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect and mechanism of valdecoxib on the proliferation of colorectal cancer clone 26 cell. **METHODS** MTT assay was used to study the inhibitory effect of valdecoxib on the cancer cell growth. Flow cytometry was used to observe the effect of valdecoxib on proliferation, apoptosis and the cell cycle distribution. Western blot was used to determine the expression of caspase-3, PCNA and COX-2. **RESULTS** Valdecoxib significantly inhibited the proliferation of clone 26 cell in a time- and dose-dependent fashion. The apoptosis rate was increased from 3.1% in control group to 4.4% ~ 11.0% in valdecoxib groups at 50 ~ 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The proliferation index and the proportion of cell in the S and G2/M phase had the tendency to decrease, but there was statistical significance only in valdecoxib 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group. The expression of caspase-3 was increased. The expression of PCNA was decreased and the expression of COX-2 was not changed. **CONCLUSION** Valdecoxib inhibits clone 26 cell growth in a dose- and time-dependent fashion. The effect is mainly associated with apoptosis at low doses and also associated with cell cycle arrest at high doses. The apoptosis is associated with the increase of caspase-3.

KEY WORDS: valdecoxib; cyclooxygenase-2; mouse colorectal cancer clone 26 cell; apoptosis

环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 有两种亚型, COX-1 和 COX-2, COX-1 组成性表达在大部分正常组织, 参与正常生理功能的调节如肾脏血流的调控和胃肠黏膜稳定性等。大部分正常组织不表达 COX-2, 但在肿瘤组织, 特别是在胃肠道肿瘤, COX-2 表达增多, 研究发现, COX-2 在肿瘤的发生发展中有

重要作用^[1]。

流行病学的证据表明, 长期服用阿司匹林等非甾体抗炎药 (NSAIDs) 可减低肠道、食管、胃、胰腺、肺部肿瘤的发病率, 尤其是对肠道肿瘤作用明显, 可使其发病率降低 40% ~ 50%^[2]。但非选择性的 COX-2 抑制剂如阿司匹林等由于抑制 COX-1, 长期

- [12] LEE M B, BLUNT J W, LEVER M, *et al.* A nuclear magnetic resonance-based assay for betaine-homocysteine methyltransferase activity[J]. *Anal Biochem*, 2004, 330 (2) : 199-205.
- [13] JORDAN E J, ZHAO Z Q, VINTEN-JOHANSEN J. The role of neutrophils in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 43 (4) : 860-878.
- [14] ADACHI K, TOYOTA M, SASAKI Y, *et al.* Identification of

SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (47) : 7791-7798.

- [15] CHEN Z K, HU S J. The experimental study progress of effect of *Astragalus membranaceus* on cardiovascular diseases [J]. *Adv Cardiovasc Dis* (心血管病学进展), 2003, 24 (2) : 113-116.

(收稿日期: 2005-12-25)

作者简介: 李军霞, 女, 博士 * 通讯作者: 王永利, 男, 博士生导师

Tel: (0311) 86057291