

全反式维甲酸对小鼠神经系统作用的一般药理试验研究

蒋鹏^a, 林春琴^b, 袁晨星^b, 丁玲^{c*} (浙江大学, a.校医院, b.药物安全性评价研究中心, c.药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 通过小鼠自主活动实验、小鼠协调运动实验、与阈下剂量戊巴比妥钠协同作用实验考察全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)对小鼠神经系统的影响。方法 ICR 小鼠, ♀♂各半, 按体质量随机分为溶剂对照组、250.0, 50.0, 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA 组, 各组小鼠禁食(不禁水)12 h 后分别灌胃给予相应剂量 ATRA, 给药体积为 0.02 mL·g⁻¹。小鼠自主活动实验, 测定给药前及给药后 6, 120, 180 min 小鼠在 5 min 内的活动次数。小鼠协调运动试验, 测定给药后 120 min 小鼠在转棒上的停留时间。与阈下剂量戊巴比妥钠协同作用试验, 给药后 120 min 腹腔注射戊巴比妥钠阈下剂量, 观察睡眠小鼠的例数。结果 ATRA 250.0 mg·kg⁻¹ 作用 120 min 后, 小鼠自主活动次数显著减少, 给予 50.0, 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA 120, 180 min 后均可见小鼠自主活动减少的趋势; 而 250.0, 50.0 及 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA 对小鼠的协调运动均无明显影响, 与阈下剂量的戊巴比妥钠无协同作用。结论 ATRA 能减少小鼠自主活动次数, 对协调运动无明显影响, 与阈下剂量戊巴比妥钠无协同作用。

关键词: 自主活动实验; 协调运动实验; 全反式维甲酸

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)10-1260-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.10.009

General Study on the Effect of All-trans-retinoic Acid on the Nervous System of Mice

JIANG Peng^a, LIN Chunqin^b, YUAN Chenxing^b, DING Ling^{c*} (Zhejiang University, a.School Hospital, b.Center for Drug Safety Evaluation and Research, c.College of Pharmaceutical Sciences, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of the all-trans-retinoic acid(ATRA) on the nervous system of mice by employment mice spontaneous activity test, coordination test, and the synergistic effect of the threshold dose of sodium pentobarbital test. **METHODS** ICR mice, half male and half female, were randomly assigned as vehicle, 250.0, 50.0 and 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA groups according to body weight. After 12 h of fasting (with water), the mice in each group were given the corresponding dose of ATRA respectively by intragastrical administration, dosing volume was 0.02 mL·g⁻¹. As to mice spontaneous activity test, the mice spontaneous activity was determined before and after administration of ATRA for 60, 120, and 180 min. Mice coordinated test was carried out by determining the residence time of mice on the rotary rod 120 min after administration. The synergistic effect of the threshold dose of sodium pentobarbital and ATRA was analyzed 120 min after administration of sodium pentobarbital. The numbers of sleeping mice were calculated. **RESULTS** The 250.0 mg·kg⁻¹ ATRA could significantly reduce the number of spontaneous activity of mice, 50.0 or 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA was found to reduce the trend of spontaneous activities in 120, 180 min; 250.0, 50.0, or 10.0 mg·kg⁻¹ ATRA had no significant effect on the coordination of mice. ATRA had no synergistic effect with the threshold dose of sodium pentobarbital. **CONCLUSION** ATRA can reduce the number of spontaneous activity of mice, and has no significant effect on the coordination of mice, and has no synergistic effect with the threshold dose of sodium pentobarbital.

KEY WORDS: spontaneous activity test; coordination test; all-trans-retinoic acid

全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是维生素 A 类衍生物, 在临床上被用于急性白血病的治疗, 可明显促进白血病细胞分化并抑制其增殖^[1]。有研究证实, 在肺癌、前列腺癌^[2]、乳腺癌^[3]、神经胶质瘤、神经母细胞瘤^[4]以及皮肤癌等多种癌症中, ATRA 都发挥了一定的治疗作用。近年来的研究证实, ATRA 与某些药物联用也有很好的疗效^[5]。然而在临床应用中也发现 ATRA 具有较大的不良反应, 主要包括口唇、皮肤干燥伴脱屑、

消化道反应、头痛、头晕、关节酸痛等^[6]。这些不良反应极大地限制了 ATRA 的临床应用。本研究旨在观察研究灌胃给予 ATRA 对小鼠神经系统的影响, 确定 ATRA 出现非期望的药物效应, 评价其在毒理学或临床研究中观察到的药物不良反应或病理生理作用, 研究所观察到的或推测的药物不良反应机制。据此, 为 ATRA 的临床应用拓展思路, 也期望为今后的研究提供有价值的研究资料。

作者简介: 蒋鹏, 男, 药师 Tel: (0571)13666625663 E-mail: realjump@163.com

*通信作者: 丁玲, 女, 博士, 副教授 Tel:

(0571)18857192032 E-mail: ld362@zju.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 供试品及amp;对照品

供试品: ATRA(黄色粉末, 陕西森弗生物技术有限公司, 批号: 20090514, 含量: 99.6%, 保存条件: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温、避光保存); 溶剂对照: CMC-Na(微黄色纤维状粉末, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 30036328)。

1.2 仪器

小鼠自主活动计数仪(山东医学科学院); YLS-4C 小鼠转棒式疲劳仪(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

1.3 动物

清洁级 ICR 小鼠, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, 体质量 $18.0\sim 24.5\text{ g}$, 4~6 周, 由浙江大学动物中心提供。实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2008-0033。

1.4 小鼠自主活动实验

取检疫合格的小鼠 40 只, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, 按体质量随机分成 4 组, 分别为溶剂对照组、ATRA 250.0, 50.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 每组 10 只。实验前 1 d 将小鼠放于自主活动仪中适应环境 5 min。实验时各组禁食 12 h 后的小鼠分别灌胃给予相应剂量溶液, 给药容积为 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。用多功能小鼠自主活动计数仪记录给药前及给药后 60, 120, 180 min 时小鼠的自发活动次数。每次记录前先将小鼠置于自发活动仪里适应 2 min 后, 记录 5 min 内小鼠的自发活动次数。

1.5 小鼠协调运动实验

取检疫合格的小鼠 40 只, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, 按体质量随机分成 4 组, 分别为溶剂对照组、ATRA 250.0, 50.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 每组 10 只。实验前 1 d 将小鼠放于转棒仪上, 转速 $25\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 在转棒上停留时间 $<3\text{ min}$ 的小鼠弃之不用。实验时各组禁食 12 h 后的小鼠分别灌胃给予相应剂量的溶液, 给药容积为 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。实验时记录给药后 120 min 小鼠在转棒上的停留时间, 停留时间超过 10 min 以 10 min 进行计算。

1.6 ATRA 与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用实验

取检疫合格的小鼠 80 只, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, 按体质量随机分成 4 组, 分别为溶剂对照组、ATRA 250.0, 50.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 每组 20 只。各组禁食 12 h 后的小鼠分别灌胃给予相应剂量的溶液, 给药体积为 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。给药后 120 min 雄性小鼠腹腔注射戊巴比妥钠阈下剂量($25.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 雌性小鼠腹腔注射戊巴比妥钠阈下剂量($30.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),

给药体积为 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。给药后将小鼠放在实验台上, 以小鼠翻正反射消失 1 min 以上作为入睡指标, 观察睡眠小鼠的例数。

2 结果

2.1 ATRA 对小鼠自主活动的影响

ATRA 灌胃给药后可减少小鼠自主活动, $250.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药后 120, 180 min 小鼠自主活动明显减少, 120 min 时的自主活动数与溶剂对照组比较差别有显著性意义($P<0.01$), ATRA 50.0, $10.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药后 120, 180 min 均可见自主活动减少的趋势, $50.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药后 120 min 与溶剂对照组比较差别有显著性意义($P<0.05$), 其余各时间点与对照组比较差别无显著性意义。结果见表 1。

表 1 ATRA 对小鼠自主活动的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 ATRA's effect on spontaneous activity of mice($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药前/次	给药/次		
			60 min	120 min	180 min
溶剂对照组	-	169 \pm 29	137 \pm 14	129 \pm 39	84 \pm 34
	250.0	155 \pm 43	118 \pm 31	82 \pm 32 ²⁾	56 \pm 26
ATRA 组	50.0	144 \pm 35	119 \pm 24	96 \pm 24 ¹⁾	69 \pm 26
	10.0	168 \pm 22	113 \pm 42	106 \pm 38	66 \pm 27

注: 与溶剂对照组比较,¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with vehicle group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.2 ATRA 对小鼠协调运动的影响

实验结果表明, ATRA 250.0, 50.0, $10.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 对小鼠协调运动无明显影响, 各剂量组在给药后 120 min 小鼠在转棒上停留时间与溶剂对照组比较差别均无显著性意义。结果见表 2。

2.3 ATRA 与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用

实验结果表明, ATRA 250.0, 50.0, $10.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与阈下剂量戊巴比妥钠(♂ 小鼠 $25.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ♀ 小鼠 $30.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)无协同作用, 与溶剂对照组比较差别无显著性意义。结果见表 2。

表 2 ATRA 对小鼠协调运动的影响及其与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 ATRA's effect on the coordination of mice and synergistic effect with the threshold dose of sodium pentobarbital($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	ATRA 对小鼠协调运动的影响		ATRA 与阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用	
		动物数/ 只	转棒上的 停留时间/s	动物数/ 只	翻正反射消 失的例数/只
溶剂对照	-	10	561.7 \pm 92.7	20	5
ATRA	250.0	10	578.5 \pm 68.0	20	4
	50.0	10	540.5 \pm 111.3	20	5
	10.0	10	565.9 \pm 72.2	20	3

3 讨论

本试验系统选用小鼠作为实验对象来进一步考察和研究 ATRA 对于中枢神经系统的影响。在本实验中, ATRA 250.0 mg·kg⁻¹ 给药后 120 min 能明显见到小鼠自主活动次数减少, 而 ATRA 50.0, 10.0 mg·kg⁻¹ 给药后 120, 180 min 也均可见自主活动减少的趋势; ATRA 250.0, 50.0, 10.0 mg·kg⁻¹ 对小鼠的协调运动无明显影响, 而且与阈下剂量的戊巴比妥钠也无协同作用。以上结果说明 ATRA 对神经系统存在一定的影响, 尤其是在高剂量的情况下, 短时间内即可影响小鼠的自主活动, 但是 ATRA 对小鼠协调运动的影响并不明显, 且与阈下剂量的戊巴比妥钠也无协同作用。这进一步提示我们在临床应用中, 小剂量 ATRA 的使用将是避免不良反应, 提高患者生活质量的一条更为可行的途径。对 ATRA 适宜剂量和临床应用方法的探寻将是今后研究的方向, 希望本实验所观察到的药物不良反应能为 ATRA 的临床应用提供新思路, 也能为今后的研究提供有价值的研究资料。

REFERENCES

- [1] TALLMAN M S, ANDERSEN J W, SCHIFFER C A, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(15):1021-1028.
- [2] KARABULUT B, KARACA B, ATMACA H, et al. Regulation of apoptosis-related molecules by synergistic combination of all-trans retinoic acid and zoledronic acid in hormone-refractory prostate cancer cell lines[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 249-259.
- [3] SU J, LI M Q, ZHONG G S. Effects of all trans retinoic acid on the expression alterations of beta-protein 1 in human breast cancer cell lines of MDA-MB-468 and MCF-7[J]. *Natl Med J China(中华医学杂志)*, 2012, 92(31): 2219-2221.
- [4] LIU X, CAO F F, ZHANG N, et al. Study on ATRA-induced differentiation of neuroblastoma and the expression of TrkA splicing isoforms [J]. *Mod Oncol(现代肿瘤学杂志)*, 2011, 19(11):2161-2165.
- [5] SHAO X J, QI X T, LIU Y J, et al. Single and combined effects of dictamnine with all-trans retinoic acid(ATRA) on differentiation of acute myeloid leukemia(AML) cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(3): 268-273.
- [6] WEI H Q, ZHONG W Y. Clinical application and research progress of all-trans-retinoic acid [J]. *Med Recap(医学综述)*, 2014, 20(6): 1088-1090.

收稿日期: 2016-06-23

白藜芦醇通过抑制膀胱癌细胞的糖代谢增强顺铂的抗肿瘤活性

刘晓明¹, 朱智伟¹, 王刚¹, 陈特磊¹, 张伟²(1.宁波市泌尿肾病医院, 浙江 宁波 315100; 2.浙江大学医学院, 杭州 310000)

摘要: 目的 研究白藜芦醇增强顺铂对膀胱癌细胞的杀伤活性及机制。方法 MTT法和流式细胞术分别检测顺铂单独治疗及联合白藜芦醇治疗对膀胱癌细胞系 T24 的杀伤活性和凋亡诱导效应。将 T24 细胞用白藜芦醇和顺铂处理后, 检测 T24 细胞对葡萄糖的摄取能力和乳酸及 ATP 的生成能力。将 T24 细胞用白藜芦醇和顺铂处理后, 用 Western blot 方法检测 T24 细胞 PKM2 的表达水平。构建 PKM2 真核表达载体, 检测 PKM2 表达载体对白藜芦醇联合顺铂杀伤 T24 细胞疗效的影响。**结果** 白藜芦醇单独治疗在体外对 T24 细胞的杀伤活性较低, 但能显著增强顺铂对 T24 细胞的杀伤活性。白藜芦醇能显著减弱 T24 细胞对葡萄糖的摄取和乳酸及 ATP 的生成并下调 T24 细胞的 PKM2 表达水平。转染 PKM2 表达载体后, 白藜芦醇对顺铂的协同抗肿瘤作用受到抑制。**结论** 白藜芦醇通过下调 PKM2 的表达抑制肿瘤细胞的糖代谢增强顺铂对膀胱癌细胞的杀伤活性。

关键词: 白藜芦醇; PKM2; 糖代谢; T24; 顺铂

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)10-1262-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.10.010

Resveratrol Promotes Cisplatin-induced Cell Death by Inhibiting the Glucose Metabolism in Bladder Cancer

LIU Xiaoming¹, ZHU Zhiwei¹, WANG Gang¹, CHEN Telei¹, ZHANG Wei²(1.Ningbo City Hospital of Urinary and Renal Disease, Ningbo 315100, China; 2.Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, China)

作者简介: 刘晓明, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: (0574)55662051 E-mail: ningboliuxiaoming@163.com