

青龙衣多糖对 S_{180} 小鼠红细胞膜唾液酸水平、ATP 酶活性及膜电位的影响

汲晨峰¹, 肖 凤², 季宇彬¹

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研发中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:目的 考察青龙衣多糖对 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜唾液酸 (SA) 的量、 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性, 以及红细胞膜电位的影响。方法 应用试剂盒测定 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜 SA 的量、红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的活性, 利用流式细胞仪测定 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜电位。结果 青龙衣多糖能增加 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜表面 SA 的量, 3 个剂量组作用显著 ($P < 0.05$); 增强 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶的活性, 3 个剂量组作用显著 ($P < 0.05$); 升高 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜电位, 其中低剂量组作用显著 ($P < 0.05$), 中、高剂量组作用非常显著 ($P < 0.01$)。结论 青龙衣多糖能增强红细胞的免疫功能, 这可能是青龙衣多糖抗肿瘤作用机制之一。

关键词: 青龙衣多糖; 唾液酸 (SA); Na^+ , K^+ -ATP 酶; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶; 膜电位

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)11-1685-03

Effect of Qinglongyi polysaccharide on sialic acid level, ATPase activity, and membrane potential in erythrocytes of S_{180} mice

Ji Chen-feng¹, Xiao Feng², Ji Yu-bin¹

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Postdoctoral Research of Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of Qinglongyi polysaccharide on sialic acid (SA) content, Na^+ , K^+ -ATP and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity, and membrane potential in erythrocytes of S_{180} mice. **Methods** Using Kit to determine the SA content and Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity, using flow cytometry to determine the membrane potential of erythrocytes of S_{180} mice. **Results** In the treated groups with three doses, it showed Qinglongyi polysaccharide could make the SA content increased ($P < 0.05$), the activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase enhanced ($P < 0.05$), and the membrane potential in erythrocytes of S_{180} mice advanced; Among them, low-dose group was remarkable ($P < 0.05$), middle- and high-dose groups were very remarkable ($P < 0.01$). **Conclusion** Qinglongyi polysaccharide can enhance the erythrocyte immunity, which may be one of its most important antitumor mechanisms.

Key words: Qinglongyi polysaccharide; sialic acid (SA); Na^+ , K^+ -ATPase; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; membrane potential

青龙衣是胡桃科胡桃树属植物胡桃 *Juglans mandshurica* Maxim. 和胡桃楸 *Juglans regia* L. 未成熟果实的肉质果皮, 为民间常用中药, 其药理作用广泛。近年来对青龙衣的临床应用已经较为广泛, 主要用于抗肿瘤治疗, 但青龙衣抗肿瘤确切作用机制并不明确。本实验在前期研究基础上^[1~4], 从红细胞膜功能角度探讨青龙衣多糖抗肿瘤作用机制, 特

别针对红细胞膜唾液酸 (SA)、ATP 酶、膜电位间相互关系的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及瘤株: 昆明种小鼠, 体重 (20 ± 2.0) g, 雄性, 哈尔滨医科大学动物实验中心提供; S_{180} (肉瘤) 购自黑龙江省肿瘤医院。

1.2 主要试剂: 青龙衣多糖 (质量分数 70.08%,

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600816); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20060240001)

作者简介: 汲晨峰 (1978—), 男, 黑龙江人, 助理研究员, 硕士, 主要从事抗肿瘤药物研究。

Tel: (0451) 84866922 E-mail: smilejcf001@sina.com

哈尔滨商业大学药物研究所提供),5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司);蛋白定量试剂盒、SA 对照品(浓度 1 mmol/L)、ATP 酶测试试剂盒、5-甲基苯二酚,均购自南京建成生物工程研究所;罗丹明 123 (Rhodamine 123, Sigma 公司);溶液均用重蒸水配制,使用前经 0.45 μm 滤膜滤过。

1.3 主要仪器:低温高速离心机(Beckman),751 分光光度计(上海第三仪器厂),EPICS-XL 流式细胞仪(Beckman)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠肿瘤模型的建立:将接种后 7 d 生长良好的 S_{180} 小鼠,颈椎脱臼处死,置 75% 酒精浸泡 5 min,腹部皮肤消毒后,剥开腹部皮肤,用无菌注射器抽取乳白色的浓稠腹水(3~5 mL),放入无菌容器内,置冰块中保存。另取少量腹水,作为观察细胞形态及细胞计数用,癌细胞数为 97% 以上方可使用,腹水用无菌生理盐水 1:4 稀释,使肿瘤细胞数为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 。取配制好的细胞悬液,无菌操作小鼠左前腋 sc 接种,每鼠接种 0.2 mL。

1.4.2 实验分组、给药剂量及途径:模型小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,青龙衣多糖低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组;阳性对照组(5-氟尿嘧啶 25 mg/kg);模型组(同体积生理盐水);另取 10 只正常小鼠为正常对照组。于接种后 24 h 开始 ip 给药,每只小鼠 0.2 mL/次,每日 1 次,连续 7 d,停药后 24 h 眼球采血。

1.4.3 红细胞膜的制备:取全血,3 000 r/min 离心,1:3 洗涤 3 次,1:1 悬浮在生理盐水中。加入 10 mmol/L Tris-HCl (1:20),4 $^{\circ}\text{C}$ 溶血 24 h,然后以 12 000 r/min 离心 30 min,弃上清。5 mmol/L PBS 洗涤 3 次(同样转速),吸取白色沉淀物,将其 1:1 悬浮在 PBS 溶液中。用蛋白试剂盒定量膜蛋白,将样品最终称释至 1 mg/mL,放置低温冰箱备用。

表 1 青龙衣多糖对 S_{180} 小鼠红细胞膜 SA 量、 Na^+ , K^+ -ATP 和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性与膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Qinglongyi polysaccharide on SA content, Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity, and membrane potential in erythrocyte of S_{180} mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	A	Na^+ , K^+ -ATP 酶/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Rh123 荧光强度/ %
模型	—	0.075 $\pm$ 0.019	0.158 0 $\pm$ 0.004 9	0.152 3 $\pm$ 0.004 9	36.3 $\pm$ 3.0
5-FU	25	0.090 $\pm$ 0.016**	0.201 0 $\pm$ 0.008 7*	0.219 8 $\pm$ 0.022 6**	68.7 $\pm$ 2.9**
正常	—	0.106 $\pm$ 0.090**	0.306 2 $\pm$ 0.031 0	0.286 9 $\pm$ 0.008 1	99.1 $\pm$ 4.2
青龙衣多糖	25	0.082 $\pm$ 0.013*	0.179 6 $\pm$ 0.012 8*	0.177 9 $\pm$ 0.082 4*	50.5 $\pm$ 4.8*
	50	0.094 $\pm$ 0.009**	0.214 0 $\pm$ 0.014 3*	0.211 8 $\pm$ 0.010 5**	78.0 $\pm$ 5.1**
	100	0.088 $\pm$ 0.019*	0.219 1 $\pm$ 0.026 8*	0.218 3 $\pm$ 0.014 3**	87.3 $\pm$ 4.6**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

1.4.4 对 S_{180} 小鼠红细胞膜表面 SA 量的影响:按 SA 测定试剂盒说明操作,于 560 nm 波长处,空白管调零读取各管吸光度(A)值,以此表示 SA 的量。

1.4.5 对 S_{180} 小鼠红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响:采用试剂盒方法测定。酶活性以每小时每毫克蛋白所产生的无机磷的量表示,单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ 。

1.4.6 对 S_{180} 小鼠红细胞膜电位的影响:调整红细胞浓度 $5 \times 10^6/\text{mL}$,取 200 μL 红细胞悬液加入 200 μL 罗丹明 123 (终质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,不断震荡,使其充分染色。加入 1 mL PBS,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,洗涤 3 次;最后加入 0.5 mL PBS,充分吹散细胞,300 目尼龙网滤过到流式管中上流式细胞仪检测,激发波长 488 nm,发射波长 530 nm,每个样本采集 10 000 个细胞。

1.5 数据处理:用 SPSS 11.5 软件处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本比较采用方差分析检验。

2 结果

2.1 对 S_{180} 小鼠红细胞膜表面 SA 量的影响:结果见表 1。青龙衣多糖低、高剂量组与模型组比较,差异显著($P<0.05$),青龙衣多糖中剂量组能显著升高 S_{180} 小鼠红细胞膜表面 SA 的量,与模型组比较,差异非常显著($P<0.01$)。

2.2 对 S_{180} 小鼠红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 及 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响:结果见表 1。对于 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性来说,青龙衣多糖各剂量组均能升高 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性,与模型组比较,差异显著($P<0.05$)。对于 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性来说,青龙衣多糖各剂量组同样能升高 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性,青龙衣多糖低剂量组与模型组比较,差异显著($P<0.05$);青龙衣多糖中、高剂量组与模

型组比较,差异非常显著 ($P < 0.01$)。

2.3 对 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜电位的影响:结果见表1。 S_{180} 小鼠经药物作用后,Rh123 荧光染色显示红细胞膜膜电位明显升高。青龙衣多糖低剂量组与模型组比较,差异显著 ($P < 0.05$);而 5-FU 组,青龙衣多糖中、高剂量组与模型组比较,差异非常显著 ($P < 0.01$);其中,青龙衣多糖中、高剂量组的药效比阳性对照组好。

3 讨论

红细胞是血液循环中最重要的固有免疫细胞,在抗肿瘤免疫反应中,红细胞不仅具有识别、黏附、浓缩、杀伤抗原,清除循环免疫复合物,增强 NK 细胞、LAK 细胞和淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力,参与机体免疫调控,而且在完整的自我调控系统,受到神经内分泌系统、红细胞免疫调节因子等多种因素的调节。SA 是糖蛋白和糖脂糖链末端的残基,广泛分布在哺乳动物细胞膜表面(包括红细胞),为细胞表面负电荷的主要来源,亦为胞膜受体的重要成分,参与细胞分化、识别、黏附等许多重要生理过程,决定着细胞膜的特征。

细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶维持细胞 Na^+ , Ca^{2+} 内环境的稳定,维持细胞内

外的渗透压平衡和跨膜电化学梯度。当 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性降低,就会引起细胞内高 Na^+ , Ca^{2+} 。

青龙衣多糖能增加 S_{180} 小鼠红细胞膜表面 SA 的量,则意味着负电荷的量增加,SA 与 Ca^{2+} 结合,增强红细胞膜表面的 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性,使红细胞排钠排钙能力增强,这就激活了离子的跨膜转运,从而升高了红细胞膜膜电位水平。本实验表明青龙衣多糖能提高 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜表面 SA 的量,升高红细胞膜表面的 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性,从而使 S_{180} 荷瘤小鼠红细胞膜电位升高;对红细胞具有保护作用,增强了红细胞的免疫功能,这可能是青龙衣多糖抗肿瘤的作用机制之一。

References:

- [1] Ji Y B, Ma H T. Effect of Qinglongyi extracts on cell membrane fluidity of tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(12): 1387-1390.
- [2] Ji Y B, Chen H J, Ji C F. Research on effect of ATPase in tumor cells of H22 type with Qinglongyi polysaccharide [J]. *Drug Eval* (药品评价), 2006, 3(6): 412-415.
- [3] Ji Y B, Ma H T, Yang B, et al. Antitumor effects of different extract fractions from Qinglongyi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1145-1147.
- [4] Wang X J, Ji Y B. The effects of Qinglongyi polysaccharide on cell membrane fluidity and blocking degree of tumor mice RBC [J]. *Drug Eval* (药品评价), 2005, 2(4): 277-279.

山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血管功能损伤的保护作用

杨宇杰¹,王春民²,党晓伟²,左彦珍¹

(1. 承德医学院,河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司,河北 承德 067000)

摘要:目的 探讨山楂叶总黄酮(FHL)对高脂血症大鼠血管功能损伤的保护作用及机制。方法 采用维生素D₃加脂肪乳剂造成大鼠高脂血症模型,观察离体血管舒张及收缩反应,同时检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、NO和内皮素(ET)的量。结果 FHL可明显降低血清TC、TG和LDL-C的量,提高HDL-C与TC比值。FHL可增强大鼠离体血管舒张及收缩反应,且可使血清NO的量升高,ET的量降低。结论 FHL具有调血脂作用,对高脂血症所致大鼠血管功能损伤具有明显保护作用,其对血管内皮依赖性舒张反应的保护作用可能与增加NO,减少ET合成、分泌有关。

关键词:山楂叶总黄酮;高脂血症;血管功能损伤

中图分类号:R286.26

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)11-1687-04

Protection of flavonoids in hawthorn leaf against vascular dysfunction of hyperlipidemic rats

YANG Yu-jie¹, WANG Chun-min², DANG Xiao-wei², ZUO Yan-zhen¹

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Chengde JFK Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China)

Key words: flavonoids in hawthorn leaf (FHL); hyperlipidemia; vascular dysfunction

收稿日期:2007-03-13

作者简介:杨宇杰(1969—),女,医学硕士,副教授,研究方向为中药新药开发与研究。Tel: (0314) 2291149

青龙衣多糖对S180小鼠红细胞膜唾液酸水平、ATP酶活性及膜电位的影响

作者：[汲晨锋](#), [肖凤](#), [季宇彬](#), [JI Chen-feng](#), [XIAO Feng](#), [JI Yu-bin](#)
作者单位：[汲晨锋, 季宇彬, JI Chen-feng, JI Yu-bin\(哈尔滨商业大学, 生命科学与环境科学研发中心, 黑龙江, 哈尔滨, 150076\)](#), [肖凤, XIAO Feng\(哈尔滨商业大学, 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江, 哈尔滨, 150076\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2007, 38 (11)
被引用次数: 2次

参考文献(4条)

1. [Ji Y B;Ma H T](#) [Effect of Qinglongyi extracts on cell membrane fluidity of tumor-bearing mice](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2004(12)
2. [Ji Y B;Chen H J;Ji C F](#) [Research on effect of ATPase in tumor cells of H22 type with Qinglongyi polysaccharide](#)[期刊论文]-[药品评价](#) 2006(06)
3. [Ji Y B;Ma H T;Yang B](#) [Antitumor effects of different extract fractions from Qinglongyi](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2004(10)
4. [Wang X J;Ji Y B](#) [The effects of Qinglongyi polysaccharide on cell membrane fluidity and blocking degree of tumor mice RBC](#)[期刊论文]-[药品评价](#) 2005(04)

本文读者也读过(10条)

1. [季宇彬](#), [汲晨锋](#), [马宏图](#), [JI Yu-bin](#), [JI Chen-feng](#), [MA Hong-tu](#) [青龙衣冷、热乙醇提取物对H22小鼠肿瘤细胞膜生化功能影响的研究](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2005, 30(7)
2. [汲晨锋](#), [肖凤](#), [季宇彬](#), [JI Chen-feng](#), [XIAO Feng](#), [JI Yu-bin](#) [青龙衣多糖对S180小鼠红细胞Ca2+, Mg2+-ATP酶活性及\[Ca2+\]i的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#)2008, 39(12)
3. [季宇彬](#), [陈海继](#), [汲晨锋](#), [JI Yu-bin](#), [CHEN Hai-ji](#), [JI Chen-feng](#) [青龙衣多糖对H22型肿瘤细胞的ATPase活性影响的研究](#)[期刊论文]-[药品评价](#)2006, 3(6)
4. [徐巍](#), [高景泰](#), [杨志红](#), [高奎滨](#) [青龙衣粉针剂抑瘤与免疫作用的实验研究](#)[期刊论文]-[中国中医基础医学杂志](#) 2002, 8(10)
5. [汲晨锋](#), [肖凤](#), [JI Chen-feng](#), [XIAO Feng](#) [青龙衣多糖对S180小鼠红细胞膜组分的影响](#)[期刊论文]-[哈尔滨商业大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 24(4)
6. [季宇彬](#), [马宏图](#) [青龙衣提取物对荷瘤小鼠细胞膜流动性的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#)2004, 35(12)
7. [徐巍](#), [郭彩玲](#), [高奎滨](#) [青龙衣粉针剂对人肝癌细胞株的作用](#)[期刊论文]-[中医药学报](#)2002, 30(5)
8. [任生](#), [孟丽](#), [王桂花](#) [中药青龙衣注射剂复合化疗药物介入治疗肺癌13例报告](#)[期刊论文]-[中国中医基础医学杂志](#) 2000, 6(7)
9. [季宇彬](#), [陈海继](#), [汲晨锋](#), [JI Yu-bin](#), [CHEN Hai-ji](#), [JI Chen-feng](#) [青龙衣多糖的提取及单糖组分和质量分数测定](#)[期刊论文]-[哈尔滨商业大学学报\(自然科学版\)](#) 2006, 22(4)
10. [孙桂君](#), [李越](#) [复方青龙衣颗粒抗肿瘤作用的实验研究](#)[期刊论文]-[中国中医药科技](#)2004, 11(6)

引证文献(2条)

1. [汲晨锋](#), [肖凤](#), [季宇彬](#) [青龙衣多糖对S180小鼠红细胞Ca2+, Mg2+-ATP酶活性及\[Ca2+\]i的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2008(12)

2. [杜艳萍](#) [青龙衣抗癌作用研究进展](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2012(4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200711032.aspx