

mmol/L, 其标准差为 0.87, 为均数的 42.03%。对照组为 (1.86 ± 0.47) mmol/L, 小剂量组 (0.8 g/kg) 为 (1.36 ± 0.12) mmol/L。分析其原因, 可能与个体差异有关。同时也提示, 大剂量未必就一定表现出明显的活性。这些有待于进一步研究。

荷叶大豆主要表现在促进脂类代谢方面, 对其合成的抑制作用较弱。其主要活性部位集中在黄酮

上, 其次是生物碱。

参 考 文 献

- 1 李广勋. 中药药理毒理与临床. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992: 68
- 2 赵水平. 临床血脂学. 长沙: 湖南科技出版社, 1997: 417
- 3 许腊英, 刘运苟, 叶泽秀, 等. 湖北中医杂志, 1996, 18(4): 302
- 4 卫永第, 陈荣杰. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(4): 350
- 5 莫凤奎, 朱澄云, 黄松鹤, 等. 中国药物化学杂志, 1997, 7(2): 121 (1999-11-30 收稿)

银杏内酯 B 对血小板活化因子激活的大鼠中性白细胞功能的影响

中国医学科学院
中国协和医科大学

药物研究所(北京 100050)

周龙恩* 王文杰** 白金叶 程桂芳

摘 要 探讨了银杏内酯 B 对体外血小板活化因子激活的大鼠中性白细胞某些功能, 包括溶酶体酶的释放, 超氧阴离子的产生以及细胞内游离钙浓度改变的影响。结果显示: 银杏内酯 B 在 $0.5 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 终浓度下, 可使 β -葡萄糖苷酸酶释放量降低 44.2% ~ 73.2%; 在 $0.1 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ 终浓度下, 可使超氧阴离子生成量降低 27.4% ~ 50.0%; 在 $0.1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 终浓度下, 使 PAF 和 fMLP 刺激引起的细胞内游离钙浓度分别降低 13.9% ~ 51.4% 和 2.2% ~ 36.6%。结果提示: 抑制溶酶体酶的释放、超氧阴离子生成以及降低细胞内游离钙浓度的升高可能与其抗炎作用有关。

关键词 银杏内酯 B 血小板活化因子 超氧阴离子 溶酶体酶 细胞内游离钙

Effect of Ginkgolide B on the Fuction of Rat Polymorpho-Nuclear Leukocytes Activated by Platelet Activating Factor

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (Beijing 100050)

Zhou Long'en, Wang Wenjie, Bai Jingye and Chen Guifang

Abstract To investigate the effects of ginkgolide B on release of β -glucuronidase and the production of superoxide anion, as well as intracellular calcium change of rat polymorphonuclear leukocytes activated by platelet activating factor (PAF). β -glucuronidase release was quantitated by enzyme reaction in which phenolphthaleinglucuronic acid was used as the substrate, superoxide anion production was determined by cytochrome C reduction, the change of intracellular calcium was measured by fluorescent indicator Fura-2/Am. In comparison with control, ginkgolide B at final concentration of $0.5 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ inhibited β -glucuronidase release by 44.2% ~ 73.2%; at final concentration of $0.1 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ decreased superoxide anion production by 27.4% ~ 50.0% and at final concentration of $0.1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ decreased the rise of intracellular calcium level induced by PAF and fMLP by 13.9% ~ 51.4% and 2.2% ~ 36.6% respectively. It is concluded that ginkgolide B can significantly affect the functions of rat polymorphonuclear leukocytes. Therefore, its inhibitory effects on lysosomol enzyme release, superoxide anion production and intracellular calcium increase induced by PAF may be related with its antiinflammation action.

Key words ginkgolide B PAF superoxide anion β -glucuronidase intracellular calcium

银杏是我国古老树种之一, 在我国已有 600 多年的药用历史。银杏叶中的主要药用成分之一银杏内酯 B(ginkgolide B) 为强血小板活化因子(PAF) 受体拮抗剂, 具有抑制血小板聚集、拮抗血管通透性

增加、缓解支气管收缩、改善过敏症状等药理活性^[1,2]。近年来研究也发现, 银杏内酯 B 具有较强的抗炎作用。中性白细胞是宿主防御系统的重要组成部分, 又因参与炎症反应而造成机体损伤, 在

* Address: Zhou Long'en, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing
周龙恩 男, 1989 年毕业于第二军医大学药学院, 获学士学位, 1997 年毕业于中国医学科学院药物研究所, 获硕士学位, 现为在读博士生。主要从事抗肿瘤及抗炎免疫药理研究。发表科研论文数篇。

** 联系人

PAF 刺激下, 发生一系列功能变化, 如产生超氧阴离子和其他活性氧代谢物, 脱颗粒并释放溶解体酶及细胞内游离钙 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的改变^[3]。我们采用中性白细胞体外温孵系统, 观察银杏内酯 B 对 PAF 刺激下中性白细胞功能的影响。

1 材料

1.1 动物: Wistar 大鼠, 体重 250~300 g, 雌雄兼用, 由中国医学科学院实验动物繁育场提供。

1.2 药品和试剂: ginkgolide B, PAF, 细胞松弛素 B(cytochalasin B), 细胞色素 C(cytochrome C), 酚酞葡萄糖醛酸(phenolphthalein glucuronic acid), *Micrococcus Lysodeikticus* 购自美国 Sigma 公司, Fura-2/AM 由本所合成室提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器: Hitachi F-4010 型双波长荧光分析仪和 Yamato BT-25 型震荡恒温水浴为日本生产。soniprep 150 超声细胞破碎仪为英国生产。Bio-Rad 500 型酶标仪为美国生产。LDZ4-0.8 自动平衡微型离心机为北京医用离心机厂生产。

2 方法

2.1 中性白细胞悬液的制备^[4]: 大鼠在乙醚麻醉下, 于右胸肋间注射 1% 角叉菜胶 0.2 mL, 4 h 后断头处死, 吸取胸腔渗出液, 冰浴保存, 加含 0.75% NH_4Cl 的 17 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)除去混入的红细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 沉淀的中性白细胞以适当的 Dulbecco's 缓冲液洗涤并制成悬液。涂片以 Giemsa 染色, 分类计数, 中性白细胞数大于 95%。以苔盼蓝排斥法检测, 活细胞数大于 98%。

2.2 中性白细胞释放酶液的制备^[5,6]: 中性白细胞以 Dulbecco's 液悬浮, 调节为 2.5×10^6 个细胞/mL, 采用 10 mL 试管, 加药物或等体积溶媒, 细胞悬液 250 μ L, 均设 4 个复管。置 37 $^{\circ}C$ 水浴震荡温孵 15 min, 加 1×10^{-3} mol/L 细胞松弛素 B 2.5 μ L, 继续温孵 5 min, 再加 2×10^{-5} mol/L PAF 2.5 μ L, 继续温孵 5 min 将试管移入冰浴, 终止反应。4 000 r/min 离心 5 min, 取上清作为释放酶液。

2.3 中性白细胞总酶液及释放酶液的制备: 取细胞悬液 3 mL, 在冰浴中用 soniprep 150 细胞破碎仪超声 1 min(强度为 20 Am), 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液作为总酶液。取总酶液 1 mL, 于 80 $^{\circ}C$ 水浴中灭活 15 min, 作为灭活酶液。

2.4 β -葡萄糖苷酸酶的检测^[5,6]: 依文献原理改为微量法。采用 96 孔酶标板, 每孔加释放酶液或总酶

液、灭活酶液 25 μ L, 2.5 mmol/L 酚酞葡萄糖醛酸 25 μ L, 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.6) 100 μ L。置 37 $^{\circ}C$ 、 CO_2 温孵箱内 18 h。每孔加 0.3 mol/L NaOH 150 μ L 终止反应并显色。在 550 nm 滤光片酶标仪上读数, 计算酶释放量占总酶量的百分数。

2.5 中性白细胞生成超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的检测^[7]: 中性白细胞以 BSS 溶液(NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, $CaCl_2$ 0.14 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g/L, Glucose 1 g/L, HEPES 2.388 g/L, pH 7.4)悬浮, 调节为 2×10^7 个细胞/mL。采用 96 孔酶标板, 每孔加细胞悬液 50 μ L, 药物或等体积溶剂 1 μ L, BSS 液 125 μ L。对照或药物均设 4 个复孔, 置 37 $^{\circ}C$ 、 CO_2 温孵箱内 20 min 后加 1×10^{-4} mol/L 细胞色素 C 25 μ L, 加 1×10^{-3} mol/L 细胞松弛素 B 25 μ L, 2×10^{-4} mol/L PAF 2.5 μ L, 37 $^{\circ}C$ 温孵 10 min。在 550 nm 滤光片酶标仪上读数, 以消光系数 21×10^3 mol/L 计算 $O_2^{\cdot-}$ 的生成量。

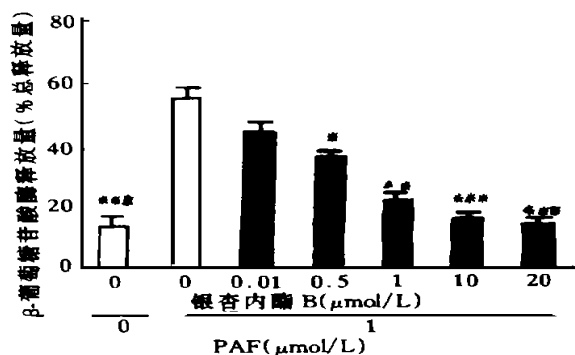
2.6 中性白细胞负载 Fura-2/AM: 中性白细胞以 HBSS-BSA 缓冲液(NaCl 8.0 g/L, KCl 0.44 g/L, $CaCl_2$ 0.134 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.18 g/L, HEPES 2.2 g/L, BSA 1.0 g/L, pH 7.4)悬浮, 调至 1×10^7 细胞/mL。取细胞悬液 1 mL, 加入适量的药物(DMSO < 0.5%), 再加入 1 mmol/L Fura-2/AM 3 μ L, 37 $^{\circ}C$ 水浴震荡 45 min 后, 室温放置 15 min, 3 000 r/min 离心 5 min。用 HBSS-BSA 液 5 mL 洗去残存于细胞外的 Fura-2/AM, 共洗 2 次, 再将洗好的白细胞悬浮于 2 mL HBSS-BSA 液中, 37 $^{\circ}C$ 继续温孵 10 min。

2.7 中性白细胞内游离钙浓度的测定^[8]: 取上述负载 Fura-2/AM 的白细胞悬液 2 mL, 加入 Hitachi F-4010 型荧光分光光度仪的吸收池中, 保持在 37 $^{\circ}C$ 恒温及悬浮状态下, 采用激发波长 340 nm(光栅 5 nm), 发射波长 500 nm(光栅 10 nm), 扫描速度 120 nm/min, 先测定静息状态时的荧光强度(即静息时中性白细胞内游离钙浓度)。再分别于加入刺激剂 0.1 mmol/L PAF 或 fMLP 20 μ L, 10% Triton-100 20 μ L, 500 mmol/L EGTA(用 3 mol/L Tris 液调至 pH 8.7) 100 μ L 后进行测定。用计算机程序“program for Ca^{2+} measurement (F-4010) Quin2 Fura2 Indol”处理实验数据。计算出静息状态和加刺激物后细胞内游离钙的浓度。

3 结果

3.1 银杏内酯 B 对中性白细胞释放 β -葡萄糖苷酸酶的影响: 中性白细胞分别与终浓度为 0.5, 1,

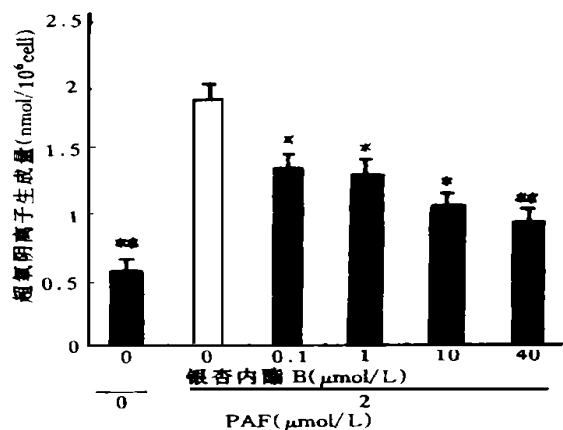
10, 20, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的银杏内酯 B 或对照溶剂温孵后, 给药组 β -葡萄糖苷酸酶的释放量分别比对照组降低 44.2%, 48.4%, 56.5%, 63.6%, 73.2% (图 1)。



与 PAF 刺激组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

图 1 银杏内酯 B 对 PAF 刺激大鼠中性粒细胞 β -葡萄糖苷酸酶释放量的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

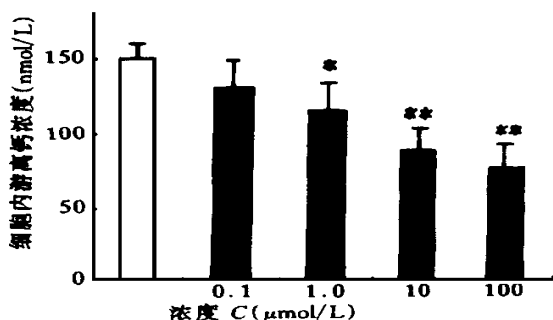
3.2 银杏内酯 B 对中性白细胞产生 O_2^- 的影响: 中性白细胞分别与终浓度为 0.1, 1, 10, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的银杏内酯 B 或对照溶剂温孵后, 给药组 O_2^- 生成量分别比对照组降低 27.4%, 31.1%, 43.7%, 50.0% (图 2)。



与 PAF 刺激组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

图 2 银杏内酯 B 对 PAF 刺激大鼠中性粒细胞超氧阴离子生成量的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

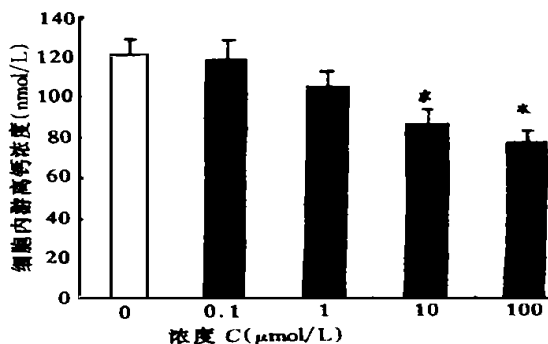
3.3 银杏内酯 B 对 PAF 刺激的中性白细胞内游离钙浓度的影响: 中性白细胞悬液分别与终浓度为 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的银杏内酯 B 或对照溶剂温孵后, 在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ PAF 的刺激下, 给药组中性白细胞内游离钙的浓度分别比对照组降低 13.9%, 25.3%, 43.2% 及 51.4%。表明银杏内酯 B 能显著降低 PAF 刺激所致的中性白细胞内游离钙水平的升高 (图 3)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

图 3 银杏内酯 B 对 PAF 刺激引起的大鼠中性粒细胞内游离钙浓度的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

3.4 银杏内酯 B 对 fMLP 刺激的中性白细胞内游离钙浓度的影响: 中性白细胞悬液分别与终浓度为 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的银杏内酯 B 或对照溶剂温孵后, 在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ fMLP 刺激下, 给药组中性白细胞内游离钙的浓度分别比对照组降低 2.2%, 13.2%, 29.0% 及 36.6%。结果表明, 银杏内酯 B 也可降低 fMLP 刺激所致的中性白细胞内游离钙水平的升高 (图 4)。



与对照组比较: * $P < 0.05$

图 4 银杏内酯 B 对 fMLP 诱导的大鼠中性白细胞内钙水平的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

4 讨论

中性白细胞脱颗粒、溶酶体酶的释放是炎症过程的一种反应, 又是加剧炎性反应的次级原因。 β -葡萄糖苷酸酶存在于溶酶体的嗜苯胺蓝颗粒, 通常以测定该酶在反应液中的活性反映溶酶体酶的释放情况。PAF 在 0.1 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$ 即可诱导中性白细胞溶酶体酶的释放。银杏内酯 B 是从银杏中提取的特异性 PAF 受体拮抗剂。本研究结果显示, 银杏内酯 B 在 0.5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 对 0.2 $\mu\text{mol/L}$ PAF 刺激的中性白细胞 β -葡萄糖苷酸酶的释放有明显的抑制作用。提示抑制溶酶体酶的释放可能是其抗炎作用机

制之一。

中性白细胞活性氧生成系统是一种 NADPH 氧化酶, PAF 与其受体结合可激活此酶, 从而促进中性白细胞释放 $O_2^{\cdot-}$ ^[9]。银杏内酯 B 在 0.1 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$ 对 2 $\mu\text{mol/L}$ PAF 刺激的中性白细胞 $O_2^{\cdot-}$ 的产生有明显的抑制作用, 可能是其抗炎作用机制之一。进一步地证实银杏内酯 B 可拮抗 PAF 的生物学活性。

Hoike 曾报道, 浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ PAF 即可增加中性白细胞 $[Ca^{2+}]$ 至峰值, 随后细胞内钙水平下降。fMLP 也可诱导快速的中性白细胞 $[Ca^{2+}]$ 升高, 且能使 $[Ca^{2+}]$ 维持在较高的水平。一般认为, 在中性白细胞, 细胞内钙水平升高首先是内钙储库的释放, 然后是外钙的内流, 从而导致细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的进一步提高。选择性 PAF 受体拮抗剂 WEB2086 抑制 PAF 刺激引起的 IP_3 产生及内钙储库的钙释放; 而在 fMLP 诱导的细胞反应中, WEB2086 不抑制 IP_3 的产生及内钙储库的钙释放, 但抑制外钙的内流^[8]。本研究结果表明, 银杏内酯 B 明显抑制 1

$\mu\text{mol/L}$ PAF 刺激引起的 $[Ca^{2+}]$ 升高, 而对 1 $\mu\text{mol/L}$ fMLP 诱导的 $[Ca^{2+}]$ 升高抑制作用较弱, 这一结果与上述文献报道相一致。

综上所述, 银杏内酯 B 的抗炎作用可能与其抑制中性白细胞溶酶体酶的释放、超氧阴离子的产生以及细胞内钙水平的升高有关。

参考文献

- 1 Smith P F, MacIennan K, Darlington C L. J Ethnopharmacol, 1996, 50(3): 131
- 2 Braquet P, Hosford D. J Ethnopharmacol, 1991, 32(1-3): 135
- 3 Shukla S D. FASEB J, 1992, 6: 2296
- 4 Yue T L, Varma D R, Powell W S. Biochim Biophys Acta, 1983, 751: 332
- 5 Feinmark S J, Lindgtrn J A, Claesson H E, *et al.* FEBS Letters, 1881, 136: 141
- 6 王文杰, 白金叶, 程桂芳, 等. 中国医学科学院学报, 1997, 19(3): 220
- 7 Stewart A G, Dubbin P N, Harris T, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3215
- 8 Koike H, Imanishi N, Natsume Y, *et al.* Eur J Pharmacol, 1994, 269: 299
- 9 Shaw J O, Pinckard R N, Ferrigni K S, *et al.* J Immunol, 1981, 127(3): 1250

(2000-01-21 收稿)

板蓝根二酮 B 体外抗癌活性研究

广西医科大学(南宁 530021) 梁永红* 侯华新 黎丹戎** 秦 箬 邱 莉 吴华慧

摘 要 目的: 板蓝根二酮 B 抗人肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞体外活性研究。方法: MTT 法测定板蓝根二酮 B 对肝癌 BEL-7402 细胞和卵巢癌 A2780 细胞的抑制作用, 集落形成实验观察药物的诱导分化作用, PCR-ELISA 试剂盒测定细胞的端粒酶活性。结果: 板蓝根二酮 B 具有抑制肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞增殖的能力, 其 IC_{50} 分别为 8.2 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.8 $\mu\text{g/mL}$; 且具有诱导分化作用, 可降低端粒酶活性的表达。结论: 研究结果提示板蓝根二酮 B 具有体外抗肿瘤活性。

关键词 板蓝根二酮 B 抗肿瘤活性 肝癌 卵巢癌

Studies on *in vitro* Anticancer Activity of Tryptanthrin B

Guangxi University of Medical Sciences (Nanning 530021) Liang Yonghong, Hou Huaxin, Li Danrong, Qin Jing, Qiu Li and Wu Huahui

Abstract To study the *in vitro* anticancer activity of tryptanthrin B, one of the active constituent of the root of *Isatis tinctoria* L. on BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cell and A2780 human ovarian cancer cell. Cytotoxicity assay was tested by MTT method. Signs of induction differentiation was observed by colony forming units assay. Telomerase activity in cell was determined by PCR-ELISA method. IC_{50} of tryptanthrin B on BEL-7402 and A2780 cell lines were 8.2 $\mu\text{g/mL}$ and 7.8 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Telomerase activity was dramatically declined and defferentiation of both cancer cell lines was observed. Tryptanthrin B possessed antitumor activity *in vitro*.

* Address: Liang Yonghong, Guangxi University of Medical Sciences, Nanning.
梁永红 大学本科毕业, 理学学士, 高校讲师, 现从事天然药物化学方面研究工作。

** 广西肿瘤防治研究所
本课题为广西教育科研资助项目, 桂 1999[383]-5