

表 1 8种中药注射剂的体外抗内毒素作用

药物	稀释度	清除率 (%)	药物	稀释度	清除率 (%)
双黄连	2 500	72.7	清开灵	2 500	87.3
鱼金	125	57.1	板蓝根	2 500	94.5
穿琥宁	625	85.3	大青叶	25	31.3
抗腮腺炎	5	21.0	鱼腥草	125	69.1

注: 稀释度为该作用的最大稀释倍数。

久,以往多是从抑菌、杀菌等方面进行研究,其效果往往不及抗菌素。研究表明多种清热解毒药物如黄连、黄芩、白头翁、板蓝根等都具有抗内毒素功效^[1,2]。此次实验所选用的药物,多属于清热解毒中药注射剂,结果表明,这些药物在体外均有抗内毒素的作用。对 8种中药注射剂的抗内毒素作用进行比较,双黄连、板蓝根和清开灵注射液抗内毒素效果最好,稀释 2 500倍仍能中和大部分内毒素。穿琥宁、鱼金和鱼腥草注射液也有较好的抗内毒素作用,稀释 125倍能中和 50%以上内毒素。大青叶和抗腮腺炎注射液抗内毒素效果较差,稀释 25倍的大青叶注射液仅能中和 31.3%的内毒素。结果提示,在中药中筛选抗内毒素药物有着广阔的前景。

参考文献:

- [1] 谭毓治,彭旦明,龙舜玲,等. 九个方剂对大鼠实验性发热的影响[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(5): 50-51.
- [2] 刘云海. 板蓝根注射液抗内毒素作用的实验研究[J]. 中草药, 1993, 24(8): 413-414.

根注射液、清开灵注射液、穿琥宁注射液、抗腮腺炎注射液和双黄连贮液等按 1: 5, 1: 25, 1: 125, 1: 625, 1: 2500, 0 稀释,各浓度药品 0.2 mL 与 1 EU/mL 的内毒素 0.2 mL 37℃ 温浴 60 min,各种药品均设药物对照,为弥补药品本身的颜色对结果的影响,有颜色的药品每个浓度设一个药物对照。

1.2.2 内毒素测定: 分别取各管反应液 0.1 mL,与鲎试剂 0.05 mL 混匀,置于 37℃ 水浴 25 min,再加入鲎三肽 0.05 mL,置于 37℃ 水浴 3 min,取出后加入亚硝酸钠溶液 0.5 mL,混匀后加入氨基磺酸胺 0.5 mL 混匀,加入萘乙二胺 0.5 mL 混匀,于波长 545 nm 测定 A 值(分光光度计,北京瑞利分析仪器公司,UV 9100)。用标准曲线的回归方程计算反应液中的内毒素含量。以药物清除的内毒素占总内毒素的百分比表示清除率: 清除率= (总内毒素量-剩余内毒素量)/总内毒素量× 100%。

2 结果

8种药物中,双黄连、板蓝根和清开灵注射液抗内毒素效果最好,在稀释 2 500 倍后仍然能够中和 70%~90% 的内毒素;穿琥宁、鱼金和鱼腥草注射液也有一定的抗内毒素作用;大青叶和抗腮腺炎注射液的抗内毒素效果较差(表 1)。

3 讨论

中草药用来治疗各种感染性疾病的研究由来已

小檗胺类化合物对黑色瘤细胞内钙调蛋白水平的影响

段江燕¹,张金红^{2*}

(1. 山西师范大学 生物系,山西 临汾 041000; 2. 南开大学分子生物学研究所,天津 300071)

摘要:目的 研究 5种小檗胺类化合物对恶性黑色瘤细胞内钙调蛋白 Calmodulin (CaM) 水平的影响。方法 收集不同浓度不同药物作用后的细胞,通过反复冻融法破碎细胞,并用磷酸二酯酶 (PDE)法测 CaM 含量。结果 5种化合物均能不同程度地降低细胞内 CaM 的水平,IC₅₀ (μmol/L) 值分别为: B₀= 10.73, B₂= 9.1, B₄= 7.4, BB= 6.15, EBB= 1.55。结论 小檗胺衍生物降低细胞内 CaM 的能力大于小檗胺,其中 EBB 的效果最为突出。

关键词: 小檗胺;衍生物;拮抗剂

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)01-0059-03

* 收稿日期: 2001-06-18

作者简介: 段江燕 (1966-),女,山西省临汾市人,1987年毕业于吉林大学化学系生化专业,获理学学士学位,1996年毕业于南开大学生命科学院分子生物学研究所,获理学硕士学位。现为山西师范大学生物系副教授,从事生物化学的教学和科研工作,曾参加过多项国家或省部级科研项目,发表研究论文 10 余篇。Tel 0357-2051796(宅) 0357-2051196(办) E-mail D2051796@public.lf.sx.cn.

Effects of berbamine compounds on calmodulin content in bowes cells

DU AN Jiang-yan¹, ZHANG Jin-hong²

(1. Department of Biology, Shanxi Normal University, Linfen Shanxi 041000, China;

2. Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Key words berbamine; derivative; antagonist

CaM 作为细胞内诸多酶系统的激活因子,其浓度水平的改变往往影响细胞增殖的过程。某些肿瘤的发生、发展与 CaM 密切相关;许多实验结果证明^[1],细胞内 CaM 的水平升高常常与细胞的无序增殖,特别是恶性肿瘤细胞增殖呈正相关,如 CaM 水平与肝癌生长速度呈正相关,齿类及鸟类肿瘤中含量为正常的 2~4 倍,牛皮癣患者病变区域浓度比正常的区域高 30 倍^[2]。CaM 拮抗剂在拮抗 CaM 活性的同时,对细胞的增殖也有一定的抑制作用。人们预言 CaM 拮抗剂对于抗肿瘤具有很大的潜力^[2]。

小檗胺是一种新型的天然钙调蛋白拮抗剂,对其结构进行化学修饰,合成了一系列小檗胺衍生物,酶学实验证明改性后的小檗胺衍生物拮抗的能力超过其母体小檗胺几倍到几十倍之多,且专一性系数高^[3]。先期的细胞学实验结果表明小檗胺衍生物对脑恶性胶质瘤细胞^[4]、人宫颈癌细胞^[5]、腹水癌细胞以及黑色素瘤细胞等都有明显的抑制作用^[6],且抑制肿瘤细胞增殖的作用比小檗胺强^[7]。此结果与酶学基本一致,说明这些化合物抑制细胞增殖与拮抗 CaM 的活性有关。

为了研究小檗胺类化合物对细胞内 CaM 水平的影响,本研究以恶性黑色素瘤 (bowes) 细胞为实验材料,观察了 5 种小檗胺类化合物对细胞生长增殖的影响及其 CaM 含量的变化,其目的在于进一步探讨 CaM 与肿瘤的生长关系以及 CaM 拮抗剂作为抗肿瘤药物的可行性提供科学依据。

1 材料

1.1 bowes 细胞:天津市肿瘤研究所生化室提供

1.2 药物与试剂:小檗胺 (B₀):北京东升制药厂(分析纯) 小檗胺衍生物 (B₁ B₂ BB EBB):南开大学分子生物学研究所生化室合成(分析纯) 磷酸二酯酶 (PDE):南开大学分子生物学研究所生化室制备 钙调蛋白 (CaM):南开大学分子生物学研究所制备,电泳均一纯 其他试剂为国产或进口分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养:细胞在含有 10% 新生牛血清的 DEME 培养液中,置 5% CO₂ 37℃ 的培养箱中培养,3~4 d 后传代。

2.2 细胞样品处理:将接种量一定细胞 (10⁴ cfu/mL) 于 24 孔细胞培养板培养,分为实验组和对照组。培养 24 h 后对实验组加入不同浓度的不同药物,继续培养,每 24 h 进行活细胞计数,并收集细胞,连续 4 d,将收集的细胞用 1 mL 匀浆液垂悬,反复冻融,使其细胞破碎,取出 100 mL 样品用于总蛋白测定,其余部分 100℃,4 min 灭活杂蛋白及酶,15 000 r/min,4℃ 离心 40 min,取上清,调 Ca²⁺ 浓度为 2 mmol/L,用于 CaM 含量测定。

2.3 样品中 CaM 含量测定^[8]:根据 PDE 可特异地把环核苷酸水解为 5-核苷酸,并在蛇毒中的核苷酸水解酶作用下,进一步水解成腺苷和磷酸,用孔雀石绿法测定水解的最终产物无机磷,计算出酶活力。以已知牛脑 CaM 作标准曲线,同时用 PDE 法测细胞样品中的 CaM,以 PDE 达最大激活的一半时所需 CaM 量为一个 CaM 活性单位,计算细胞样品中 CaM 的含量。

$$\text{CaM 含量} = \frac{\sum (\text{样品 A}_{660} - \text{基础酶活 A}_{660})}{\text{最大激活 A}_{660} - \text{基础酶活 A}_{660}} \times 1 \text{ 个 CaM 活性单位}$$

2.4 蛋白含量测定:染料结合法测定总蛋白^[9],以 BSA 为标准蛋白,绘制标准曲线。

3 结果与讨论

在本实验条件下 (PDE 法) 对照组的 CaM 水平 (以总蛋白中 CaM 含量计算) 高于实验组,其抑制的程度与加药的浓度成正相关,即随药物浓度的增加,抑制能力增加 (图 1~4),就小檗胺衍生物而言,由于取代基的不同表现出抑制作用的不同,药物作用 bowes 细胞 48 h 使细胞内 CaM 降低 50% 时所需的药物浓度 (μmol/L) 分别为:EBB=1.55, B₀=10.73, B₁=6.15, B₂=9.1, B₃=7.6,结果说明这几种化合物不仅具有抑制细胞增殖的作用,而且对细胞内 CaM 的水平也有明显的影响,随化合物浓度的升高,细胞内可溶性 CaM 降低程度增强,随化合物作用 bowes 细胞时间的延长, CaM 水平回升;化合物与细胞接触在 48 h 内,对细胞内 CaM 浓度影响最大。

经改性后的小檗胺,无论是烷氧基化的小檗胺 (EBB B₁ B₂),还是酰基化的小檗胺 (BB),其降低细胞内 CaM 水平的能力均强于未修饰的母体小檗

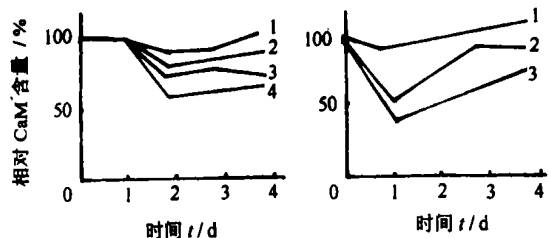


图1 B₀作用 Bowes 细胞后胞内 CaM 水平

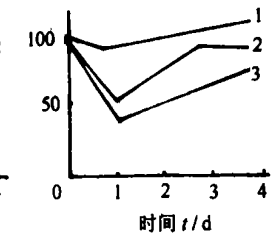


图2 EBB作用 Bowes 细胞后胞内 CaM 水平

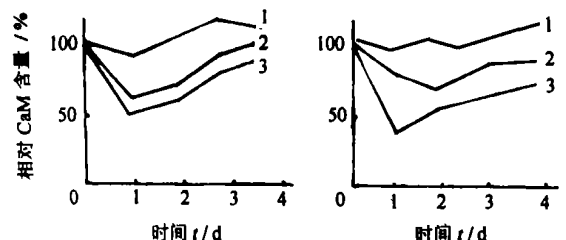


图3 BB作用 Bowes 细胞后胞内 CaM 水平

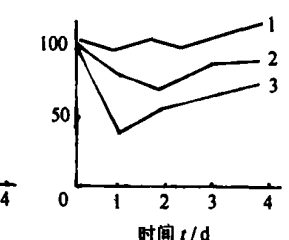


图4 B₂作用 Bowes 细胞后胞内 CaM 水平

胺,其中烷氧基的小檗胺表现出随碳原子数目的增多抑制作用增强 (EBB> B₄> B₂> B₀),这有可能是疏水性的增强以及空间结构的复杂,使拮抗 CaM 的性能增强。在本实验测定条件下,同浓度的药物作用 bowes 细胞后 CaM 含量降低率分别为: B₀=17.5%; B₂=23.5%; B₄=37.5%; EBB=43%;这一结果与抑制生长曲线及集落实验的结果相吻合^[7]。刘树人等在钙调蛋白拮抗剂对长春花碱抗癌作用的影响的实验中^[10],采用胃癌细胞系 MGC803 研究钙调蛋白拮抗剂 W 和 CaM 含量的影响,结果发现培养 24 h 25 μmol/L W 可使细胞 CaM 含量降低 33.2%;我们的实验中,1 μmol/L EBB 培养 24 h 的

bowes 细胞可使 CaM 降低 46.3%,相差 25 倍,虽细胞不同,但仍能间接地看出 EBB 的效果之强。

在本实验中发现 CaM 拮抗剂的浓度与拮抗 CaM 的能力成正比关系,如加入药物 24 h 0.2 μmol/L 使 CaM 含量降低 12%; 1 μmol/L 使 CaM 含量降低 46.3%; 2.5 μmol/L 使 CaM 含量降低 51.2%,但随培养时间的延长,相对的 CaM 降低率有所升高,推测细胞在增殖过程中需要一定的药物浓度,才能使增殖的细胞受到抑制,但随培养时间的延长,随药物被代谢分解,药物浓度相对降低,从而降低拮抗 CaM 活性,使细胞增殖继续,因此表现出拮抗 CaM 的性能降低,使 CaM 相对抑制率升高。

参考文献:

- [1] Wei J W. Positive correlation between calmodulin content and hepatoma growth rates [J]. Cancer Res, 1982, 4(6): 2571-2574.
- [2] William N Hait. Aporential Target for cancer chemo theapeutic Agents [J]. Clin Onco, 1986, 14(6): 994-1012.
- [3] You han Xu. The effect of berbamine derivatives on activated Ca²⁺-Mg²⁺ dependent ATPase in anthyrocyte membranes [J]. Biochem J, 1987, 248: 985-988.
- [4] 刘杰文. 钙调素拮抗剂小檗胺衍生物对成纤维细胞增殖功能的影响 [J]. 细胞生物学杂志, 1998, 15(8): 130-132.
- [5] 张金红,耿朝晖,段江燕,等. 小檗胺及其衍生物的结构对 Hele 细胞生长增殖的影响 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 1996, 29(2): 89-91.
- [6] 张金红,耿朝晖,段江燕. 比色分析法在贴壁细胞药物敏感性测定中的应用 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 1996, 29(4): 109-121.
- [7] 张金红,段江燕,毛启龙,等. 小檗胺及其衍生物对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 1997, 28(8): 483-485.
- [8] 刘景生. 钙调蛋白的制备及活性测定 [J]. 中国医学科学学报, 1985, 7(6): 453-458.
- [9] Criss W E. Calcium Calmodulin and Cancer [J]. Fed Proo, 1982, 4(1): 2289-2291.
- [10] 刘树人. 钙调素拮抗剂对长春花碱抗癌作用规定的影响 [J]. 中华医学杂志, 1994, 7(4): 11-14.

《中草药》杂志 2001 年增刊征订启事

为了促进中药现代化的研究进程,加强中药新药研究与开发的信息交流,商讨我国入关后中药产业的发展新对策,推动西部药用植物资源的保护、开发和利用,《中草药》杂志编辑部拟于 2001 年 10 月中旬在四川省成都市召开“第三届中药新药研究与开发信息交流会暨《中草药》杂志第七届编委会”。为了配合此次会议的召开,经国家科技部国科财便字(2001)066 号文批准,我们编辑出版了《中草药》杂志 2001 年第 32 卷增刊。本增刊共收载论文 150 篇,特邀中国工程院院士和国内十多位知名专家和中青年学科带头人就中药新药研究的热点问题撰写综述文章(文题见《中草药》杂志 2001 年第 7 期)。另外,还有反映国内近年来中药植化、药理、分析、制剂、药材及临床等方面的新理论、新方法和新成就的科研论文和综述性文章 140 余篇。

增刊为大 16 开本,200 页(约 50 万字),天津市报刊增刊特准许印证(2001)第 098 号,定价 65 元,另加包装费、邮费 5 元。凡订阅者请向我部索取订单:300193 天津市鞍山西道 308 号《中草药》杂志编辑部。