

活性的一个重要方面。

与此同时,我们在实验中亦曾观察到 ESA、ESA-1 体内用药无直接促进腹腔 MΦ 分泌 TNF-α 的功能,但在给药剂量为 250 mg/kg 时,均可使腹腔 MΦ 在 LPS 刺激下分泌 TNF-α 的功能得到显著增强。这种正常腹腔 MΦ 无影响,而对活化的腹腔 MΦ 分泌细胞因子的功能具有增强作用的具体机制有待进一步实验来阐明。

参考文献:

[1] 夏雪雁,彭仁. 当归醇沉物对外小鼠脾、胸腺淋巴细胞增

殖的影响[J]. 中草药, 1999, 30(2): 112-115.

[2] 李颖,彭仁. 阿魏酸钠和当归醇沉物对免疫性肝损伤的干预作用[J]. 中草药, 2000, 31(4): 274-276.
 [3] 胡映辉,林志彬,何云庆,等. 灵芝菌丝体多糖通过增强小鼠巨噬细胞功能诱导 HL-60 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(1): 27-30.
 [4] 孙卫民,王惠琴. 细胞因子研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999.
 [5] 柳钟勋,左增艳. 当归的免疫药理作用研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(6): 378-379.
 [6] 龙振洲. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998.

西红花苷对血管内皮细胞的保护作用研究

绪广林,钱之玉*

(中国药科大学 药理教研室,江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究西红花苷对过氧化氢所致牛内皮细胞(BAEC)损伤的保护作用,并初步探讨其可能的作用机制。方法 利用过氧化氢刺激 BAEC,观察了西红花苷对细胞培养液内 MDA、SOD、LDH 含量或活性的影响,并对细胞进行流式细胞分析和细胞内钙测定,观察了该药对细胞凋亡及胞内钙的影响。结果 西红花苷可剂量依赖性的减少 MDA 生成,提高 SOD 活性,阻止 LDH 的外漏,还能抑制过氧化氢所致细胞内钙升高,减少细胞凋亡百分率。结论 西红花苷对过氧化氢所致 BAEC 损伤有保护作用,其作用机制可能与其拮抗细胞内钙有关,值得在临床上推广应用治疗心血管疾病。

关键词: 西红花苷-1; 牛内皮细胞; 凋亡; 细胞内钙

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0439-04

Protective effect of crocin-1 on bovine aortic endothelial cells

XU Guang-lin, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, Chinese Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 210009, China)

Key words: crocin-1; bovine aortic endothelial cells; apoptosis; intracellular calcium

番红花为鸢尾花科(Iridaceae)番红花属(*Crocus* L.)植物番红花 *C. sativus* L. 的干燥柱头,又名藏红花、西红花。其主要活性成分为胡萝卜苷类化合物(西红花苷),由于它们的结构差异较小,化学方面的研究如提取、分离、鉴定等很多^[1]。同时因为该类化合物有芳香味并呈现亮丽的黄色且较难消退(保存适当),常在食品和化妆品行业用作染料^[2]。众所周知,西红花苷类化合物一个显著特点就是其抗氧化作用^[3],并具有抗高血压、动脉粥样硬化、脑水肿、脊髓损伤、乳头瘤、关节炎作用,还能提高哺乳动物血流氧分压。近年来还发现其有抗肿瘤^[4]和乙醇

所致记忆和学习障碍的作用^[5]。但红花昂贵的价格限制了它的广泛使用,后来从一种来源广泛的植物里面也成功地提取了该类物质^[6]。不过以上研究一般只限于整体动物研究,缺乏其作用机制的探讨。细胞、分子或基因水平的报道也很少见。本实验利用自制的原料单体对过氧化氢所致内皮细胞过氧化脂质生成、酶活性改变及凋亡进行了研究,并探讨其作用机制,以期为临床应用提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:西红花苷(西红花酸龙胆二糖基, crocin-1)由本实验室自制(纯度>98%, HPLC 法),

* 收稿日期: 2001-10-18

基金项目:江苏省基础研究计划(自然科学基金)BJ198124

作者简介:绪广林(1973-),男,江苏金湖人,1995年毕业于中国药科大学中药制药专业。毕业后一直从事中药新产品开发及中药活性成分筛选等方面的工作。现为中国药科大学药理学在读博士,研究方向为生化药理,并主要致力于中药心血管系统方面的研究与开发。

* 通讯作者 Tel: 025-3271322 E-mail: xudunlop@263.net

用 PBS 溶解后避光冷藏保存备用。Fluo-3/AM 购自 Bio-Tad 公司,二甲亚砜溶解, -20 保存, 临用前稀释成所需浓度。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶 (1:250) 均为 Gibco 公司产品。小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 其他试剂均为分析纯。MDA、SOD、LDH 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 牛内皮细胞 (bovine aortic endothelial cells, BAEC) 培养^[7]: 在无菌条件下, 取出胸主动脉段约 15 cm, 置于 Hank's 液中冲洗 2~3 次去除残血。将外膜的脂肪和结缔组织分离干净, 并用磷酸缓冲液反复冲洗, 直至无血液残留。将主动脉内膜面翻转朝外, 覆盖在含有 0.25% 胰蛋白酶消化液的平皿内, 使内膜与酶液充分接触并轻轻研磨约 10 min, 然后轻轻刮取内皮细胞, 收集胰蛋白酶消化液到含培养液的离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 制成细胞悬液, 按 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ /mL 密度接种于培养瓶中, 置 37、5% CO₂ 条件下静置培养。4~6 h 后部分内皮细胞已经贴壁。24 h 后用 PBS 清洗杂质及未贴壁细胞, 换入新培养液。以后每 2~3 d 换一次, 直到细胞融合后进行传代培养。光镜下可见细胞呈“鹅卵石”状, 经胞浆内第一因子相关抗原鉴定为内皮细胞。实验用第 4~10 代细胞。

1.3 H₂O₂ 及 crocin-1 处理: 传代 BAEC 铺于 96 孔 (10⁵ cells/孔), 待其生长至单层融合后, 倾去上清液, 以含 0.5% 血清的培养基培养 24 h 使其同步化。H₂O₂ (100, 200, 400 μmol/L) 刺激组在无血清培养基中加入相应的 H₂O₂ 刺激 24 h。给药组在 H₂O₂ 刺激前, 细胞与一定浓度的 crocin-1 预孵 24 h。另设 10% 培养液对照组。

1.4 脂质过氧化物 MDA 测定: 于 24 孔培养板中加入培养的 BAEC, 经 crocin-1、H₂O₂ 处理, 并设 10% 培养液对照组。倾去上清液, 收集板上细胞并经 PBS 充分洗涤, 置低温冰柜 (-70) 反复冻融, 取上清液按试剂盒所述方法测定各组 MDA 含量。

1.5 LDH 和 SOD 测定: 细胞接种 24 孔培养板, 分组及处理方法同 1.3。取各组培养液按试剂盒操作测定 LDH 和 SOD 活性。

1.6 [Ca²⁺]_i 测定: 将培养瓶中的细胞接种于含盖玻片的 24 孔培养板中。测钙前, 将小玻片取出置于自制浴槽中, 加入 Fluo-3/AM 使其终浓度为 5 μmol/L, 于 37 避光温孵 40 min。然后用 Hank's

液洗涤 3 次, 加入不同测试液在荧光倒置显微镜下观察。选择单个待测细胞, 用氩离子激光预扫描, 参数设置: 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm; 扫描方式: 时间扫描; 激光功率: 30 mW; 物镜倍数: 20; 时间间隔: 2 s; 先扫描记录一段正常波动曲线, 再加入测试液, 记录细胞内荧光强度 (FI) 的变化, 并由计算机进行处理。实验测定用染色条件和扫描参数在整个实验过程中保持不变。细胞内游离钙浓度变化用给药前后荧光强度变化计算:

$$[Ca^{2+}]_i \text{ 变化百分率} = (F_{drug} - F_0) / F_0 \times 100\%$$

式中 F_{drug} 表示给药后的荧光强度, F_0 表示给药前的荧光强度。

1.7 流式细胞分析: 将 BAEC 制成单个细胞悬液, 取 10⁶ 个细胞离心后弃上清液, 加入预冷 70% 乙醇固定, -20 保存过夜。测定时离心除去乙醇, 冷 PBS 洗涤 2 次, 5 mg/L 碘化丙啶染色, 室温避光放置 15 min, 尼龙网过滤后上流式细胞仪检测, 用 multicycles DNA 和细胞周期分析软件进行结果处理。

2 结果

2.1 crocin-1 对脂质过氧化物 MDA 含量的影响: H₂O₂ 与 BAEC 共同孵育后, 显著加剧细胞膜的脂质过氧化反应, MDA 含量剂量依赖性地增加, 给予不同浓度的 crocin-1 对 200 μmol/L 过氧化氢所致 MDA 增加有良好的抑制作用, 并呈剂量依赖性, 见表 1。

表 1 crocin-1 对过氧化氢所致 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	H ₂ O ₂ (μmol/L)	crocin-1 (μmol/L)	MDA (nmol/mL)
1	0	0	0.819 ± 0.057
2	100	0	0.977 ± 0.084* *
3	200	0	1.210 ± 0.059* *
4	400	0	1.316 ± 0.092* *
5	200	0.1	1.111 ± 0.062
6	200	1	0.989 ± 0.076#
7	200	10	0.832 ± 0.072# #

与第 1 组比较: ** $P < 0.01$

与第 3 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

2.2 crocin-1 对内皮细胞 SOD 活性的影响: BAEC 加入 H₂O₂ 后, 其 SOD 活性随剂量升高而降低, 加入不同浓度 crocin-1 可剂量依赖性地抑制 SOD 活性的降低, 表明该药还能通过提高内在的抗氧化酶活性, 保护细胞膜免受自由基的攻击 (表 2)。

2.3 crocin-1 对 LDH 含量的影响: 不同浓度 H₂O₂ 与 BAEC 共同孵育后, 可显著增加 LDH 从 BAEC 中漏出, 而加入不同浓度的 crocin-1 后, LDH 活性

降低,表明其从细胞膜中漏出减少,提示该药可减轻过氧化氢对细胞膜的损伤而导致的 LDH 大量外泄(表 3)。

表 2 crocin-1 对过氧化氢所致 SOD 活性降低的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol/L}$)	crocin-1 ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/mL)
1	0	0	31.202 ± 2.620
2	100	0	10.065 ± 0.592**
3	200	0	7.860 ± 1.256**
4	400	0	6.550 ± 1.216**
5	200	0.1	7.806 ± 1.621
6	200	1	9.364 ± 1.894
7	200	10	10.636 ± 1.644##

与第 1 组比较: ** $P < 0.01$

与第 3 组比较: ## $P < 0.01$

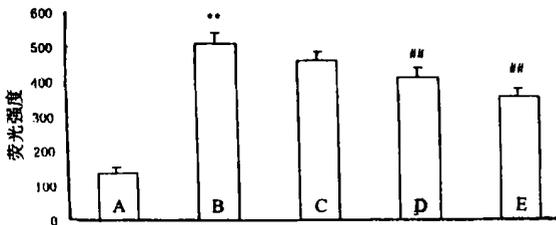
表 3 crocin-1 对过氧化氢所致 LDH 外漏的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol/L}$)	crocin-1 ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/mL)
1	0	0	569.366 ± 56.131
2	100	0	708.117 ± 72.441**
3	200	0	759.467 ± 24.617**
4	400	0	1450.280 ± 223.342**
5	200	0.1	770.126 ± 26.548
6	200	1	700.651 ± 35.149#
7	200	10	654.455 ± 34.541##

与第 1 组比较: ** $P < 0.01$

与第 3 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

2.4 crocin-1 对 H₂O₂ 诱导 BAEC [Ca²⁺]_i 升高的影响: 当加入 H₂O₂ 刺激后, 内皮细胞内钙离子浓度随时间缓慢升高。如在刺激前分别加入 crocin-1 0.1, 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$, 可使升高幅度分别降低 10%、20%、32% (图 1)。



A-静息状态 B-H₂O₂ 200 $\mu\text{mol/L}$
C~E-crocin-1 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$

与静息状态相比: ** $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组相比: ## $P < 0.01$

图 1 crocin-1 对 H₂O₂ 诱导 BAEC [Ca²⁺]_i 升高的影响

2.5 crocin-1 对 H₂O₂ 诱导 BAEC 凋亡的影响: H₂O₂ 200 $\mu\text{mol/L}$ 可致内皮细胞发生明显的凋亡, 其凋亡百分率为 49.92%, crocin-1 10 $\mu\text{mol/L}$ 可使凋亡百分率降至 3.13%, 而 1 $\mu\text{mol/L}$ crocin-1 使凋亡百分率降至 22.93%, 更低浓度对凋亡百分率影响不显著。

3 讨论

钙作为第二信使物质, 参与调节机体各种生理活动^[8]。细胞内钙稳态是维持调节细胞功能的必要条件。生理情况下, 细胞内游离钙浓度较细胞外低一百万倍。这种浓度差的维持, 有赖于质膜、内质网及线粒体钙转运系统。当某种因素使胞内钙大幅度增加甚至超载时, 就会导致各种病理性变化。过氧化氢作为活性氧家族中的一员^[9], 可直接作用于膜脂质, 形成脂质过氧化物, 从而 MDA 生成增加, 质膜通透性增加, 外钙内流增多, LDH 漏出也增多, 同时 SOD 活性下降; 过氧化氢还能通过抑制 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性, 导致细胞内 Na⁺ 堆积, 升高的 Na⁺ 可迫使 Na⁺-Ca²⁺ 交换器反向运转, 胞内钙不能排出, 导致钙超载, 并且过氧化氢可直接损伤内质网及线粒体钙转移系统, 使其丧失缓冲调节细胞内钙的能力。我们的实验说明, 200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 可使细胞内钙显著升高。异常升高的钙可能通过启动黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统或花生四烯酸系统产生氧自由基及其他细胞毒物质, 并可加剧线粒体功能障碍, 使氧化磷酸化紊乱, 导致内皮细胞损伤甚至激活凋亡调控基因, 促发凋亡。

Crocin-1 能够与膜脂质过氧化自由基形成复合物 CroRCOO[·] 或 CroR[·], 而这两者相对于 RCOO[·] 和 R[·] 来说较稳定也不太容易进攻其他物质, 因而其危害大大减低。另外, H₂O₂ 进入细胞后还能通过如下反应: H₂O₂ + Fe²⁺ → OH[·] + Fe³⁺ + OH⁻ 形成羟自由基, 后者可与膜磷脂或嘌呤嘧啶碱基反应, 生成各种产物引起细胞功能改变。它也能与 OH[·] 形成复合物 ROH[·], 从而减少它的损害。本实验表明西红花苷能显著减少 MDA 生成, 减少 LDH 漏出, 提高 SOD 活性。另外, 它也能抑制细胞内钙的升高, 从而使细胞内维持相对较低的水平, 阻止了钙超载对凋亡调控基因的促发, 使内皮细胞损伤减少甚至不发病理性改变。本实验显示西红花苷可剂量依赖性抑制过氧化氢诱导的 BAEC 凋亡。以上分析提示西红花苷可通过降低细胞内钙而发挥对内皮细胞的保护作用。

有文献报道西红花苷对实验性动脉粥样硬化有显著的抑制作用^[10], 因为它能显著减少动脉壁脂质的沉积及血液中脂质的含量, 从而对脂质引起的内皮损伤也有保护作用。由此看来, 该药对血管内皮细胞的保护作用是多方面的, 而内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化和高血压等心血管疾病的起始阶段, 因而该药应用于临床治疗上述疾病可能是有效的。

本实验证实了西红花苷对过氧化氢所致内皮细胞凋亡有保护作用,但其对基因表达或调控的影响还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Marie-Rose Van Calsteren, Martine C Bissonnette, Francois Cormier, *et al.* Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from *Crocus sativus* and *Gardenia jasmnoides* [J]. *Agric Food Chem*, 1997, 45: 1055-1061.

[2] Rios J L, Recio M C, Giner R M. An update review of saffron and its active constituents [J]. *Phytother Res*, 1996, 10: 189-194.

[3] Alan Mortensen, Leif H Skibsted. Importance of cartenoid structure in radical-scavenging reactions [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 2970-2977.

[4] Nair S C, Panikar B, Pannikar K R. Antitumor activity of saffron [J]. *Cancer Lett*, 1991, 57: 109-116.

[5] Minoru Sugiura, Yukihiro Shoyama, Hiroshi Saito, *et al.*

Crocin prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(2): 703-707.

[6] Thanh Quan Pham, Francois Cormier, Edward Farnworth, *et al.* Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasmnoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 1455-1461.

[7] 章静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996.

[8] 卢青, 刘冀珑, 陈大元. 胞质钙信号[J]. *生命化学*, 1999, 19(2): 78-82.

[9] Li P F, Christian Maasch, Hermann Haller, *et al.* Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1999, 100: 967-973.

[10] 张陆勇, 季慧芳, 周素娣, 等. 西红花总苷对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的影响[J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(5): 383-386.

一种真菌菌丝体甲醇提取物—A7 的抗肿瘤活性研究

逯海燕¹, 郭顺星^{1*}, 林 晨², 张雪艳², 付 明², 梁 肖², 于能江¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学肿瘤研究所, 北京 100021)

摘要:目的 研究一种真菌菌丝体甲醇提取物—A7 的抗肿瘤活性。方法 MTT 法观察 A7 对人 BEL-7402 肝癌细胞、HCT-8 结肠癌细胞、SPC-A-1 肺腺癌细胞、GLC-82 肺腺癌细胞和 EC-109 食管癌细胞的生长抑制作用; 以小鼠移植性肿瘤 S₁₈₀ 模型, 观察 A7 的体内抗肿瘤作用。结果 A7 对前述癌细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.8, 1.7, 4.7, 5.0, 7.6 μg/mL, 均小于 10 μg/mL; 动物实验表明, 50 mg/kg A7 对 S₁₈₀ 实体肉瘤的抑制率达 46.8% (P < 0.001)。结论 A7 在体外和体内都具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 真菌菌丝体; 抗肿瘤; MTT 分析; S₁₈₀ 实体肉瘤

中图分类号: R 286. 91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0442-03

Studies on antitumor activity of A7 extracted from one fungal mycelium

LU Hai-yan¹, GUO Shun-xing¹, LIN Chen², ZHANG Xue-yan²,
FU Ming², LIANG Xiao², YU Neng-jiang¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Institute of Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Key words: fungal mycelia; antitumor activity; MTT assay; S₁₈₀ sarcoma

真菌发酵产物具有增强机体免疫力、抗辐射和抗肿瘤等生物活性, 日益受到人们的普遍关注。自然界中真菌种类繁多, 真菌发酵产物是研究、发现新化合物和开发研制新药的重要天然宝库。*Calcarisp orium arbuscula* Preuss 是我室从四川野生灵芝子实体中分离纯化获得的一种真菌, 我们对其发酵获得的

菌丝体甲醇提取物进行了体外和体内抗肿瘤活性实验研究。

1 材料

1.1 药品: 菌丝体, 由本室发酵获得。菌丝体浸膏 A7 的制备: 将菌丝体干燥后研成粉状, 用 75% 甲醇提取并浓缩得粘稠浸膏, 2.6 kg 菌丝体得 410 g

* 收稿日期: 2001-10-07

作者简介: 逯海燕(1975-), 女, 山东潍坊人, 博士研究生, 1997 年毕业于山东医科大学药理学系, 同年考入协和医科大学攻读硕士研究生和博士研究生, 研究方向为抗肿瘤药理。Tel: 13681518997 E-mail: haiyan-lu@hotmail.com

* 通讯作者 E-mail: shunxing.guo@bj.col.com.cn clin@public.bta.net.cn