

均匀贴壁生长时,用对照兔血清和含不同剂量中药兔血清的培养液代替原培养液:各组培养液所含血清量均为 10%,培养 3 d 后,除空白对照组外,其他各组加入 MPP^+ (Sigma 公司),使其终浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 。置 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 24 h 后进行指标测定,每组平行重复 3 次。

1.4 透射电镜观察:药物处理 24 h 后,收集细胞加入离心管中, $1\,500 \text{ r/min}$, 4 min, 离心 5 min, 再加入 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次。 $1\,500 \text{ r/min}$, 4 min, 离心 5 min, 弃上清液,沿管壁缓缓加入 2.5% 戊二醛 4 min, 固定 2 h, 用直头滴管剥离细胞团块, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 锇酸 4 min, 固定 1 h 后, 梯度丙酮脱水, 环氧树脂浸透和包埋, 用 LKB—2188 型超薄切片机切片, 醋酸铀-枸橼酸铅染色, JEM—2000EX 型透射电镜观察并拍照。

1.5 流式细胞仪检测:各组经药物处理 24 h 后,以 0.125% 胰蛋白酶消化贴壁的 PC12 细胞,取细胞约 1×10^6 , PBS 洗 2 次,加入 $490 \mu\text{L}$ 结合缓冲液,充分混匀,加入 $5 \mu\text{L}$ annexin V FITC 和 $10 \mu\text{L}$ 溶解的 PI, 轻轻混匀,将试管置于 4°C , 避光孵育 10 min, 上 Coulter Epics 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 检测。每组平行重复 3 次。数据统计用 t 检验。

2 结果

2.1 透射电镜观察结果:电镜下可见正常培养的 PC12 细胞,细胞核染色均匀,核膜清楚完整,胞浆线粒体丰富、胞浆细胞器完整。PC12 细胞经 MPP^+ 作用后,透射电镜下细胞的超微结构变化明显,细胞膜完整,细胞表面微绒毛消失,胞质浓缩,染色质固缩、断裂、高度凝聚,并边集于核膜内面,表现出凋亡细胞特征,此时电镜下以早、中期的凋亡细胞为主。

2.2 流式细胞仪检测结果:当 MPP^+ 浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时, A ~ E 5 组的凋亡细胞比率分别为: $(11.3 \pm 1.18)\%$, $(7.2 \pm 0.65)\%$, $(4.7 \pm 0.78)\%$,

$(1.9 \pm 0.26)\%$, $(13.6 \pm 1.51)\%$, E 组与 D 组比较差异显著 ($P < 0.01$); A 组与 E 组比较差异显著 ($P < 0.05$), A, B 组间比较差异显著 ($P < 0.01$), B, C 组间比较差异显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

PD 是中老年神经系统常见病,随着人口老龄化,该病发病率有逐年增高趋势。本病病因不甚明确,可能与年龄、环境、遗传等因素有关。近年研究表明,PD 发生与细胞凋亡关系密切^[4]。近年临床实践证明,培补肝肾中药治疗 PD 有确切疗效,配合左旋多巴制剂起“增效减毒”效果。PC12 细胞来源于大鼠嗜铬细胞瘤,能合成、储存并释放适量儿茶酚胺^[5],目前已广泛用于神经细胞死亡方式和毒性机制研究。本实验采用神经毒素 MPP^+ 建立 PC12 细胞凋亡模型,并采用血清药理学方法,流式细胞仪 (FACS) 检测,透射电镜观察等手段,探讨含培补肝肾中药兔血清对 PC12 细胞凋亡模型的保护作用。结果表明,培补肝肾中药对 MPP^+ 诱导的 PC12 细胞凋亡有一定抑制作用,2 倍等效剂量中药的抑制作用明显优于 1/2 等效剂量及等效剂量中药的抑制作用。本实验为培补肝肾中药治疗 PD 提供理论依据,培补肝肾中药抗凋亡具体机制有待进一步研究。

References:

- [1] Chen J Z, Jiang W, Shi J, et al. Parkinson's disease treated by Chinese materia medica of Peibuganshen [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 1999, 23 (3): 14-15.
- [2] Che J Z, Jiang W, Wu B R, et al. 40 Cases of Parkinson's disease treated by Oral Liquid of Pingzhan- [J]. *J Anhui Coll Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 1999, 18(2): 9.
- [3] Liao T F, Huang S Y, Jian Y M, et al. Central inhibitory effects of water extract of Acorin Gramine Rhizome in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 1998, 61: 185-193.
- [4] Ziv , Melamed E, Nardi N, et al. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons: a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1994, 170: 136-140.
- [5] Estrvez A G, Radi R, Barbeito L, et al. Peroxynitrite induced cytotoxicity in PC12 cell: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors [J]. *Neurochem*, 1995, 65: 1543-1550.

9 种中药提取物对乙型溶血性链球菌的抑菌作用比较

王 莘, 苏玉春, 董 浩, 杨会敏, 王建华, 李金凤*

(吉林农业大学生物技术学院, 吉林 长春 130118)

乙型溶血性链球菌是人体易感染的菌体,能引

起变态反应性肾炎、风湿病、心肌炎等疾病。本实验

* 收稿日期: 2003-07-12

作者简介: 王 莘(1959—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为农业生物工程。

着重比较 9 种中药提取物抑菌程度, 为明确抑菌效果提供理论基础。

1 材料

中药蜂胶、鹿花盘、板蓝根、蒲公英、金银花、千里光、黄柏、黄芩、黄连均购于长春市吉深药店, 由吉林农业大学中药材学院郑有兰副教授鉴定。将此 9 种药材分别置 60 ℃ 烘箱烘干, 粉碎, 分别称取各中药粉末 10 g, 以 95% 乙醇为溶媒, 索氏提取器回流提取 2~3 次, 合并提取液, 挥干溶剂, 得各中药提取物, 蜂胶提取物含生药 0.2 g/mL, 其余提取物均含生药 1 g/mL。置冰箱 4 ℃ 保存。

2 方法

2.1 菌悬液的制备: 挑选长势较好的优良乙型溶血性链球菌(吉林农业大学食品工程学院提供)接入不加琼脂的液体培养基中, 恒温摇床培养 16~24 h, 使菌活化繁殖, 当菌液由透明变黄色混浊时停止培养, 置冰箱中备用。

2.2 抑菌滤纸片的制备: 将定量的普通滤纸用打孔器打成直径为 6 mm 圆片, 置于洁净干燥试管内 120 ℃ 干热灭菌 2 h 后, 分别浸于 6 种不同浓度的各药液(两倍稀释法, 95% 乙醇稀释)中, 即得。

2.3 血板的制备: 培养基: 葡萄糖粉(18 g/L)、蛋白胨(10 g/L)、牛肉浸膏(10 g/L)、琼脂粉(14~16 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), 蒸馏水溶解, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 7.0, 121 ℃, 1.0×10^5 Pa 高压灭菌 30 min, 冷却至 60~70 ℃, 无菌条件下加入无菌脱纤维羊血(采自吉林农业大学动物科技学院实验用羊)适量, 混匀后迅速倒入灭菌培养皿中, 每皿 15~20 mL, 冷凝备用。

2.4 抑菌实验(琼脂平板扩散法): 取琼脂血板, 均匀涂布一层稀释的试验菌, 试验菌用量以对照血板表面菌生长能呈半密集菌落为定。将均匀涂菌后的琼脂血板置于 37 ℃ 恒温培养箱中 5 min, 使表面干燥, 用无菌镊子将抑菌滤纸片按标号依次均匀贴在培养基表面, 轻压纸片使接触良好。37 ℃ 倒置培养 24 h, 取出平板, 观察抑菌圈大小并测定其

直径。

3 结果

3.1 蜂胶提取物抑菌结果: 见表 1。蜂胶提取物对溶血性链球菌的抑菌效果随浓度降低而降低。浓度为 0.2 g/mL 时抑菌效果最明显, 0.025, 0.0125, 0.006 25 g/mL 的提取液不具有抑菌作用。

表 1 不同浓度蜂胶提取物的抑菌圈直径

Table 1 Bacteriostatical diameter of different concentration propolis extract to germ

质量浓度 $/(g \cdot mL^{-1})$	抑菌圈直径 /mm	质量浓度 $/(g \cdot mL^{-1})$	抑菌圈直径 /mm
0.2	8.2	0.025	0
0.1	7.5	0.012 5	0
0.05	6.5	0.006 25	0

3.2 鹿花盘提取物的抑菌结果: 见表 2。鹿花盘提取物对溶血性链球菌的最佳抑菌浓度为 0.25 g/mL, 且抑菌效果随浓度变化呈二次曲线。

表 2 不同浓度鹿花盘提取物的抑菌圈直径

Table 2 Bacteriostatic diameter of different concentration coronet extract to germ

质量浓度 $/(g \cdot mL^{-1})$	抑菌圈直径 /mm	质量浓度 $/(g \cdot mL^{-1})$	抑菌圈直径 /mm
1	15	0.125	13
0.5	13	0.062 5	12
0.25	24	0.031 25	0

3.3 其他 7 种中药提取物的抑菌结果: 7 种中药体外抑菌试验结果表明, 用乙醇回流法提取的成分抑菌效果较明显, 其抑菌效果依次为黄连> 黄柏> 黄芩> 金银花> 千里光> 蒲公英> 板蓝根。其中黄连、黄柏、黄芩、金银花、千里光的抑菌效果明显。

4 讨论

用乙醇回流法提取 9 种中药所得乙醇提取物均对乙型溶血性链球菌有不同程度抑制作用, 蜂胶在 0.2 g/mL 时抑菌直径达 8.2 mm, 效果最明显; 鹿花盘在 0.25 g/mL 时, 抑菌圈直径达 24 mm, 效果最明显, 其他 7 种中药在 1 g/mL 相同浓度条件下抑菌效果大小依次为黄连> 黄柏> 黄芩> 金银花> 千里光> 蒲公英> 板蓝根。

美国 ALPHA 实验室认可

美中国际合作中国企业

葡萄籽提取物

(原花青素≥95%)

专业生产厂家

电话: 0086-022-26721040; 26723305; 26737125

传真: 0086-022-26721041

网址: <http://www.jf-natural.com>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司

天津北辰科技园园路