

要原因。因而有效的降低脑组织中 Ca^{2+} 含量,可减轻脑细胞的不可逆性坏死。SA TP 能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 Ca^{2+} 含量,表明其对脑组织的保护作用可能与降低脑组织中 Ca^{2+} 含量有关。

脑缺血时细胞内 Ca^{2+} 超载可激活依赖 Ca^{2+} 蛋白水解酶,促使次黄嘌呤 (Hpy) 代谢生成尿酸,此过程产生大量氧自由基,可攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化反应,形成脂质过氧化物,降低膜的流动性,使膜的通透性增加,大量水分子内流,导致线粒体及细胞肿胀,抑制电子传递和氧化磷酸化,进一步加重能量代谢障碍,溶酶体酶释放引起

细胞自身消化,最终导致细胞死亡^[3,4]。SA TP 能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 MDA 含量,提高 SOD 活性,提示其可能通过清除氧自由基及提高抗氧化酶活性对缺血脑组织产生保护作用。

References:

[1] Smith M L, Bendek G. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat [J]. *Acta Neurolog Sci*, 1984, 69(4): 385-401.
 [2] Tang G, Zhang J T. Research advance on mechanism with cerebral ischemic injury and therapeutic policy [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2000, 9(12): 809-812.
 [3] Slater T F. Free-radical mechanism in tissue injury [J]. *Biochem J*, 1984, 222(1): 1.
 [4] Domandy T L. Free radical oxidation and antioxidants [J]. *Lancet*, 1978, 10(1): 647-651.

山楂果总黄酮的提取分离及体外抗肿瘤活性

张妍¹, 李厚伟², 孙建平¹, 张永春¹, 何树庄¹, 杨宝峰^{1*}

(1. 哈尔滨医科大学 药理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge 系蔷薇科植物,含有多种生物活性物质,如三萜酸、黄酮等。其中黄酮类成分有降压、调血脂、增加冠脉流量、强心、抗肿瘤等药理作用^[1]。由于山楂果实中果胶含量很高,给提取分离工作带来很大困难,因此对山楂有效成分的定量研究多集中于山楂叶和山楂核。本实验采用 4 种方法提取山楂果中的总黄酮并进行含量测定,结果表明以 60% 乙醇为溶剂,超声提取,经大孔吸附树脂分离,提取效率较高,且方法简便易行。山楂提取物的抗肿瘤活性已有报道^[2],但其作用机制未见报道。本实验采用激光扫描共聚焦显微镜技术,通过给药前后细胞内钙和 DNA 含量变化对山楂果总黄酮体外抗肿瘤作用机制进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂: 山楂: 购于药材市场,经哈尔滨医科大学生药教研室王伟教授鉴定为山楂 *Crataegus Pinnatifida* Bge 的果实。芦丁对照品: 购于中国药品生物制品检定所。5-氟脲嘧啶注射液 (5-Fu): 上海旭东海普药业有限公司生产,批号 000101,用前生理盐水配制。胎牛血清: Hyclone 生产。RPM 11640 培养基: Gibco 生产。噻唑蓝 (MTT): Sigma 生产,用前以无血清 RPM 11640 配成 1 mg/mL。二甲基亚砷 (DM SO): Sigma 生产。碘化丙啶 (PI) 染料: Sigma 生产,以生理盐水配成 100 μ g/mL,4 避光

放置。Fluo-3/AM: Bio-Rad 生产,配成浓度为 10 μ mol/mL, - 20 保存。RNA 酶 (RNase A): Calbiochem 分装,用 PBS 液配成 2.5 mg/mL,在 80~ 100 加热 15 min,冷至室温后分装, - 20 保存。正丁醇 甲醇 乙醇 氨水 氯化钙均为国产分析纯。实验用水为自制超纯水。

1.2 细胞株: 人喉癌 Hep-2 细胞,培养于含 10% 胎牛血清的 RPM 11640 培养基中 (内含青、链霉素各 100 U/mL, 谷氨酰胺 0.293%), 5% CO₂ 37 温箱中培养,每 2~ 3 d 传 1 代。细胞株由哈尔滨医科大学微生物教研室提供。

1.3 仪器: UV-2201 岛津紫外分光光度计,日本产。离心机,北京医疗仪器修理厂。Bio-Rad 3550 型酶标仪,美国产。Insight plus 激光扫描共聚焦显微镜,美国 Meridian 产。Olympus IX50 倒置显微镜,日本产。RCO 3000TVBB CO₂ 温箱,美国产。

1.4 山楂果总黄酮提取分离方法考察^[3]

1.4.1 提取方法: 水煎煮提取: 山楂果肉 30 g,用蒸馏水煎煮 2 次,滤过,浓缩,得山楂浸膏。乙醇回流提取: 取山楂果肉 30 g,以 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。合并提取液,回收乙醇,得山楂浸膏。甲醇为溶剂,索氏提取: 取山楂果肉 30 g,以甲醇为溶剂,用索氏提取器回流提取 4 h,回收甲醇,得山楂浸膏。超声提取: 取山楂果肉 30 g,加

* 收稿日期: 2003-08-27

作者简介: 张妍(1973—),女,哈尔滨市人,讲师,硕士,研究方向为药理学。E-mail: zhangyan-lhw@163.com

60% 乙醇, 超声 3 次, 每次 45 min, 合并提取液, 回收乙醇, 得山楂浸膏。

1.4.2 大孔吸附树脂柱的制备^[4]: 预处理: 取市售大孔吸附树脂, 用乙醇加热回流洗脱至洗脱液蒸干后无残留物。装柱: 以乙醇湿法装柱, 继续用乙醇在柱上流动清洗, 不时检测流出的乙醇, 至与水混合不呈白色混浊为止 (取 1 mL 乙醇加 5 mL 水)。然后以大量的蒸馏水洗去乙醇, 备用。

1.4.3 大孔吸附树脂分离提取总黄酮: 将所得山楂浸膏分别加入适量蒸馏水, 搅匀, 加入 CaCl_2 1 g, 静置过夜。离心, 分别收集上清液, 用氨水调 pH 至 7~8, 分别加入大孔吸附树脂柱中, 调节流速 5 mL/min, 用蒸馏水洗去杂质, 以乙醇为流动相解吸附, 回收乙醇, 得总黄酮提取物。将水提取物稀释成含生药 1 g/10 mL 的溶液, 其他提取物稀释成含生药 1 g/200 mL 的溶液, 分别测定总黄酮含量。

1.4.4 总黄酮的含量测定: 精密称取芦丁对照品 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.2 g/L 的对照液。标准曲线的绘制: 精密吸取对照液 1、2、3、4、5 和 0 mL (空白), 分别置 10 mL 量瓶中, 各加 60% 乙醇溶液使成 7 mL, 精密加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 精密加入 10% 三氯化铝溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 10 min, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL, 分别用 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 10 min, 置比色杯中, 在 510 nm 处测吸光度 (A), 测 3 次取平均值, 以浓度为纵坐标, A 值为横坐标计算回归方程和相关系数。

1.5 MTT 法测定提取物的抗肿瘤作用: 细胞以每孔 1×10^4 接种于 96 孔培养板, 5% CO_2 37 °C 温箱中培养 24 h 后, 分别加入生理盐水, 山楂果总黄酮及 5-氟脲嘧啶 (阳性药) 溶液, 山楂果总黄酮及阳性药的浓度为 100、10、1、0.1、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 继续培养 48 h 后, 加入 50 μL MTT, 温育 4 h, 弃去培养基, 加入 150 μL DM SO, 在平板摇床上摇匀, 在酶标仪 495 nm 读板, 根据测得的吸光度值计算存活率。

存活率 = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值 \times 100%

1.6 Fluo-3/AM 染色测定细胞内 Ca^{2+} 浓度变化^[5]: 6 孔培养板中, 加入终质量浓度为 15、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的山楂果总黄酮和生理盐水, 各设 2 个平行孔, 混匀后, 5% CO_2 37 °C 温箱中培养 48 h 后, 用 0.125% 胰蛋白酶消化, PBS 液清洗, 加入 100 μL Fluo-3/AM 染液, 37 °C 避光放置 1 h。用适量 PBS 液制成细胞悬液, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察

细胞内钙变化, 并记录细胞的荧光强度, 以细胞的荧光强度反映 Ca^{2+} 浓度, 在激发波长为 488 nm、发射波长 530 nm, 40 倍物镜下观察。

1.7 PI 染色测定细胞内 DNA 含量变化^[6]: 6 孔培养板中, 加入终质量浓度为 15、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的山楂果总黄酮和生理盐水, 各设 2 个平行孔, 混匀后, 5% CO_2 37 °C 温箱中培养 48 h 后, 用 0.125% 胰蛋白酶消化, PBS 清洗, 70% 乙醇 4 °C 固定 1.5 h, 加入 200 μL PBS 和 250 μL RNaseA 液, 37 °C 共同保温 10 min, 荧光染料 PI 750 μL , 室温避光染色 30 min。加 PBS 制成细胞悬液, 在激光扫描共聚焦显微镜下记录细胞的荧光强度, 以反映 DNA 的含量。在激发波长 488 nm、发射波长 630 nm, 40 倍物镜下观察。

1.8 倒置显微镜下观察细胞形态学变化: 培养瓶中加入终质量浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的山楂果总黄酮, 5% CO_2 37 °C 温箱中培养 48 h, 倒置显微镜下 (10 \times 20) 观察给药前后细胞形态改变。

1.9 统计学方法: 采用 Sigmaplot 5.0 软件求得药物的 IC_{50} ; 采用 *t* 检验分析给药前后细胞内钙和 DNA 含量变化。

2 结果

2.1 不同提取方法对山楂果总黄酮提取收率的影响: 结果见表 1。

表 1 不同提取方法的提取率

方法	A	含量/g	提取率/%
水提	0.422 0	0.012	0.04
醇提	0.475 9	0.278	0.93
超声提取	1.031 5	0.588	1.96
索氏提取	1.055 7	0.600	2.00

2.2 标准曲线: 回归方程为 $Y = 9.297 \times 10^{-2}A + 2.101 \times 10^{-3}$, $r = 0.998 9$ 。

2.3 对 Hep-2 细胞生存率的影响: 见表 2。结果表明山楂果总黄酮对 Hep-2 细胞有抑制作用, 且呈明显的剂量依赖性。山楂果总黄酮及 5-氟脲嘧啶的 IC_{50} 值分别为 16.24、0.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 对细胞内钙和 DNA 含量的影响: 山楂果总黄酮作用 Hep-2 细胞 48 h 后, 细胞内钙浓度显著升高, 而 DNA 含量明显降低。高、低浓度山楂果总黄酮组的细胞内钙和 DNA 含量与相应的空白对照组相比差异均有显著性 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 形态学观察: 倒置显微镜下正常肿瘤细胞呈多角形, 体积较大, 细胞核体积约占细胞总体积的 2/3, 细胞聚集生长。山楂果总黄酮作用 48 h 后细胞

表 2 山楂果总黄酮对 Hep-2 细胞生存率的影响 (n= 5)

Table 2 Effect of flavonoids in *C. pinnatifida* fruit on survival rate of Hep-2 cells (n= 5)

组 别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	生存率/%
山楂果总黄酮	100	22.24
	10	58.17
	1	84.36
	0.1	90.17
	0.01	91.17
5-氟脲嘧啶	100	20.21
	10	28.24
	1	50.17
	0.1	80.18
	0.01	83.21

表 3 山楂果总黄酮对细胞内钙离子及 DNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n= 40)

Table 3 Effect of flavonoids in *C. pinnatifida* fruit on Ca^{2+} and DNA of Hep-2 cells ($\bar{x} \pm s$, n= 40)

组 别	质量浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FI	
		Ca^{2+}	DNA
生理盐水	-	214 \pm 45	986 \pm 189
山楂果总黄酮	15	552 \pm 96*	457 \pm 117*
	30	1 648 \pm 275*	262 \pm 59*

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NS group

变圆, 体积明显变小; 细胞核畸变, 体积变小, 且细胞数目明显减少, 细胞单个生长。表明山楂果总黄酮有效的抑制了肿瘤细胞的增殖。

3 讨论

实验结果表明对于山楂果中总黄酮的提取, 有机溶剂提取效率明显高于水提取。索氏提取为连续回流提取, 因此提取效率高于单纯回流提取。超声提取可以破坏细胞壁, 使细胞内的有效成分大量溶于有机溶剂, 所以提取效率也较高。以甲醇为溶剂, 经索氏提取器提取, 大孔吸附树脂分离, 提取效率最高; 以 60% 乙醇为溶剂, 超声提取, 经大孔吸附树脂分离, 提取效率较高。超声提取简便易行, 节约有

机溶剂, 所用试剂对人体较为安全, 因此适于规模生产。索氏提取虽然效率略高, 但耗时、费力, 且所用试剂对人体危害较大。因此, 超声提取是一种较为理想的提取方法。

山楂果总黄酮对正常细胞的生长无明显影响, 但对肿瘤细胞的生长却有显著抑制作用。共聚焦实验结果显示山楂果总黄酮使肿瘤细胞 DNA 含量明显降低, 表明山楂果总黄酮是通过抑制肿瘤细胞 DNA 的生物合成, 从而阻止瘤细胞的分裂繁殖。最新研究结果认为细胞内钙离子浓度与细胞凋亡过程关系密切。大量证据表明在多种细胞中凋亡的诱导和抑制与信号传导通路有关, 细胞内游离的 Ca^{2+} 浓度对信号传导起着重要作用。 Ca^{2+} 与细胞凋亡的两个主要阶段即基因凋亡过程的起始阶段和凋亡的最后通路—— Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶的激活都有关系。 Ca^{2+} 还可通过调节某些转录因子的活性, 导致基因表达的变化, 诱导凋亡的发生。因此, 胞浆 Ca^{2+} 浓度的增加可作为凋亡起始的早期信号。共聚焦实验结果表明山楂果总黄酮使肿瘤细胞内钙离子浓度明显升高, 山楂果总黄酮在体外对 Hep-2 细胞的抑制作用可能是通过钙超载, 进而导致细胞凋亡。

References:

- [1] Traditional Chinese Herb Group of No. 157 Hospital of PLA. Hawthorn [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1975, 5(5): 46-55.
- [2] Liu Z P, Guo F C, Yang H Y, et al. The inhibitory effect of hawthorn extract on L₁₂₁₀ ascites carcinoma [J]. *J Henan Oncol* (河南肿瘤学杂志), 1993, 6(4): 243-245.
- [3] Liu C Y, Tang L H, Gu Z L. Effects of different methods on the extraction rate of flavonoids from hawthorn [J]. *Acta Acad Med Suzhou* (苏州医学院学报), 1998, 18(12): 1266.
- [4] Deng S W, Ma S C. Isolation of the extract of *Ligusticum wallichii* Franch by adsorbent resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(1): 23-24.
- [5] Dong D L, Sun J P, Luo D L, et al. Effect of berberine on the cytosolic calcium concentration in the single ventricular cell of guinea pig [J]. *Chin J Phamacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2000, 14(2): 128-130.
- [6] Zhao C J, Kong F Y, Liu Q H, et al. Apoptosis of glioblastoma multiforme cells induced by VM-26 treatment *in vitro* [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2000, 19(7): 649-652.

癃清片对大鼠前列腺炎的抑制作用

韩双红, 王玉芬, 陈卫平, 韩行湛, 张富庚*

(天津市医药科学研究所, 天津 300070)

癃清片 (LQT) 主要由黄连、泽泻、赤芍、金银花等中药精制而成, 具有清热解毒、凉血通淋之功效。临床用于热淋所致的尿频、尿急、尿痛、尿短、腰

痛等症。本实验主要探讨其抗前列腺炎的药理作用, 旨在为其临床应用提供理论依据。

1 材料

* 收稿日期: 2003-10-15