

静息状态下的细胞功能。但可明显促进由 KCl 诱导的内钙增多, KCl (60 mmol/L) 可使细胞膜除极, L-型钙通道开放, 引起外钙内流, 以钙介导钙释放的形式使细胞内钙增加。说明冬虫夏草可在细胞兴奋状态下起作用, 并且是激动了 L-型钙通道。

L-型钙通道主要分布于骨骼肌和心肌, 其功能为调控兴奋-收缩耦联。冬虫夏草治疗难治性缓慢型心律失常、传导阻滞作用的重要机制可能就在于冬虫夏草水提液可以促进钙内流, 进而触发心肌兴奋和收缩, 使窦房节和房室节细胞兴奋, 从而发挥其正性肌力作用。

References:

[1] Wen Y X, Mu D P. The pharmacological effects and clinical application of *Cordyceps sinensis* [J]. *Tianjin Pharm* (天津药), 1998, 10(1): 47-50.

[2] Wang G W, Tang S C, Chen X W. Effects of *Cordyceps sinensis* extracts on macrophage phagocytic function in mice [J]. *J Shanxi Med Univ* (山西医科大学学报), 2000, 31(1): 20-21.

[3] Lu Z B, Kaichiro K, Tobias O, et al. Density and kinetics of

$I_{K_1}$  and  $I_{K_2}$  in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of  $I_{K_1}$  blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit implications for arrhythmogenesis in humans [J]. *Circulation*, 2001, 104: 951-956.

[4] Li D S, Zhang L M. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium [J]. *Circ Res*, 2001, 88: 1168-1175.

[5] Li G R, Yang B F, Feng J L, et al. Transmembrane  $I_{Ca}$  contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: H98-H106.

[6] Yang B F, Xu C Q, Li Y R, et al. Inhibitory effect of artemisinin on cloned inward rectifier potassium channels [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(4): 245-248.

[7] Yang B F, Li Y R, Xu C Q, et al. Mechanisms of artemisinin antiarrhythmic action [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(3): 169-175.

[8] Yang B F, Li G R, Xu C Q, et al. Effects of RP58866 on transmembrane  $K^+$  currents in mammalian ventricular myocytes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 20(11): 961-969.

[9] Chen B, Jin O. Analysis of nucleosides in the *Cordyceps sinensis* and its fermental powder by RP-HPLC [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1998, 19(2): 88-90.

[10] Li S P, Ji H. Advances in studies on antitumor activity of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 373-375.

## 芦荟多糖对 S<sub>180</sub> 小鼠红细胞膜功能的影响

季宇彬, 邹翔, 汲晨锋, 高世勇\*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**目的 研究芦荟多糖对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠红细胞膜功能的影响。方法 采用荧光分光光度法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以及唾液酸试剂盒分别测定 S<sub>180</sub> 小鼠红细胞膜脂流动性、膜交联蛋白、带 3 蛋白以及膜唾液酸 (SA) 含量。结果 两种芦荟多糖各剂量组均能不同程度地提高 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠降低的红细胞膜脂流动性、带 3 蛋白和 SA 的含量, 降低红细胞膜交联蛋白的含量, 且中剂量均非常显著 (P < 0.01)。结论 芦荟多糖对 S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠红细胞膜功能具有促进作用, 这可能是芦荟多糖抗肿瘤作用的主要机制之一。

**关键词:** 芦荟多糖; 红细胞膜; 膜脂流动性; 唾液酸

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)08-0898-04

### Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S<sub>180</sub> mice

Ji Yu-bin, Zou Xiang, Ji Chen-feng, Gao Shi-yong

(Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin Commerce University, Harbin 150076, China)

**Abstract:** **Object** To study the effect of aloe polysaccharide (AP) on erythrocyte membrane function of S<sub>180</sub> mice. **Methods** Lipid fluidity, the cross-linking protein content, Band 3 protein and sialic acid (SA) content of erythrocyte membrane in S<sub>180</sub> mice were measured by spectrofluorimetry, SDS-PAGE, and SA reagent test Kit, respectively. **Results** Different dosage groups of the two kinds of AP raised the lipid fluidity of erythrocyte membrane, increased Band 3 protein and SA contents of erythrocyte membrane, while decreased the cross-linking protein content at different level. The effect of middle dosage groups of AP were very remarkable (P < 0.01). **Conclusion** AP can improve the erythrocyte membrane function of S<sub>180</sub> mice, which may be one of the most important antitumor mechanisms of AP.

**Key words:** aloe polysaccharide (AP); erythrocyte membrane; lipid fluidity of membrane; sialic acid

收稿日期: 2003-12-11

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关资助项目 (G00C201303); 哈尔滨市科技局攻关项目 (2003AA6CN095)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。

芦荟为百合科多年生草本植物,其药用品种主要有库拉索芦荟 *Aloe vera* L.、木立芦荟 *A. arborescens* Mill.、斑纹芦荟 *A. vera* L. var. *chinesis* (Haw.) Berg. 等。芦荟多糖 (aloe polysaccharide, AP) 是芦荟的主要成分之一,以往研究表明,AP 具有抗肿瘤、免疫调节、抗菌、消炎、抗辐射及抗艾滋病病毒等多种药理作用<sup>[1]</sup>。前期研究结果表明,AP 体内抗肿瘤作用明确,并且可以促进荷瘤小鼠红细胞免疫功能<sup>[2]</sup>。本实验研究库拉索芦荟多糖和木立芦荟多糖对红细胞膜功能的影响,进一步揭示 AP 通过促进荷瘤小鼠红细胞膜功能抗肿瘤的作用机制。

## 1 材料

1.1 动物:雄性昆明种小鼠,体重(20 ± 2.0) g,黑龙江中医药大学动物中心提供,动物质量合格证号:黑动字第 00101003 号。

1.2 瘤株:S<sub>180</sub>A 小鼠购自哈尔滨医科大学附属第三医院动物研究所。

1.3 药品:库拉索芦荟多糖 (APVL,提取收率为 0.85%,总糖质量分数为 48.56%)、木立芦荟多糖 (APAM,提取收率为 0.91%,总糖质量分数为 50.14%),均由哈尔滨商业大学药物研究所提供。黄芪多糖 (APS),黑龙江省生物制药一厂提供,批号 200301。

1.4 主要试剂:瑞氏染色液、唾液酸 (SA) 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;对甲苯磺酰氟 (PMSF),Sigma 公司产品;N,N-甲叉丙烯酰胺、SDS、Tris、氨基乙酸 (Glycine)、四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵、-巯基乙醇、溴酚蓝 (BPB),Bio-Rad 公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.5 仪器:低温高速离心机 (BECKMAN);低温冰箱 (SANYO 公司);751 型分光光度计;CS-930 荧光分光光度计;凝胶成像分析系统 (Bio-Rad);CM-4006 型电泳仪 (Bio-Rad)。

## 2 方法

2.1 小鼠肿瘤模型的建立:无菌条件下取 S<sub>180</sub>A 小鼠的腹水癌细胞,放入无菌容器内,置冰块中保存。另取 S<sub>180</sub>A 小鼠的少量腹水,置于加有肝素的试管中,观察细胞形态并进行细胞计数。癌细胞数为 97% 以上方可使用。腹水用无菌生理盐水作 1:4 稀释,使瘤细胞数为 5.6 × 10<sup>5</sup>/mL。按每只 0.2 mL 给小鼠腹腔接种。

2.2 分组与给药:将造模小鼠随机分 8 组,分别为模型对照组、APS 提取液组 (100 mg/kg)、APVL 及

APAM 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组,另取 10 只正常小鼠作为正常对照组。各组均 ip 给药,每日 1 次,每次 0.2 mL,连续 7 d,然后进行下列指标的测定。

2.3 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜脂流动性的影响:各组末次给药后 24 h,小鼠眼眶取血,按文献方法操作<sup>[3]</sup>,用荧光分光光度计以激发光波长 362 nm,发射光波长 432 nm,测定与激发偏振光振动方向平行、垂直时的荧光偏振光强度 ( $p$ ),计算微黏度 ( $\eta$ ) 及膜脂流动性 (LFU)。

$$\eta = 2p / (0.46 - p); LFU = (0.5 - p) / p^2$$

2.4 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜交联蛋白含量的影响:末次给药后 24 h,摘眼球取血,按文献方法<sup>[4]</sup>制备红细胞影泡,按 Lowry 法测定膜蛋白含量,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后,剥胶、染色。将凝胶板置于 CS-930 双波长扫描仪上,波长 560 nm 处扫描得到膜蛋白的电泳图谱,并计算膜蛋白组份的百分含量。

2.5 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜带 3 蛋白含量的影响:末次给药后 24 h,摘眼球取血,红细胞血影按文献方法制备<sup>[5]</sup>,按 1 mg/mL 定量红细胞血影蛋白,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,利用凝胶扫描分析系统测定带 3 蛋白的相对含量。

2.6 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 SA 含量的影响:红细胞膜血影的制备及蛋白定量方法同 2.5 项方法,取制备好的影泡悬液 1 mL,按试剂盒说明书操作,于波长 569 nm 处直接测定吸光度 ( $A$ )。

2.7 数据处理:结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

## 3 结果

3.1 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜脂流动性的影响:结果见表 1。与正常对照组相比,荷瘤小鼠红细胞微黏度升高,膜脂流动性下降,APVL 和 APAM 给药后,荷瘤小鼠红细胞微黏度均有不同程度的下降,膜脂流动性提高。其中,中剂量作用均非常显著 ( $P < 0.01$ )。

3.2 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜交联蛋白含量的影响:结果见表 2。各治疗组红细胞膜经处理后所形成聚合物百分含量与模型组相比,均有不同程度降低,且中剂量组作用均非常显著 ( $P < 0.01$ )。

3.3 对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜带 3 蛋白含量的影响:结果见表 2。S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜带 3 蛋白含量较正常小鼠有明显下降 ( $P < 0.01$ ),而 AP 各剂量组该项指标均有一定程度的提高,其中两种 AP 中剂量组作用均非常显著 ( $P < 0.01$ ),与正常组比较差异无

显著性 ( $P > 0.05$ )。

3.4 对  $S_{180}$  小鼠红细胞膜 SA 含量的影响: 结果见表 2。  
 $S_{180}$  小鼠较正常小鼠红细胞膜 SA 含量有显著下

降, 而 AP 治疗组该项指标有不同程度的提高, 两种 AP 中剂量组作用均非常显著 ( $P < 0.01$ )。

表 1 AP 对  $S_{180}$  小鼠红细胞膜脂流动性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of AP on lipid fluidity of erythrocyte membrane of  $S_{180}$  mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	<i>P</i>	LFU	
正常	-	0.189 6 ± 0.014 5	1.410 8 ± 0.179 4	8.841 1 ± 1.872 5
模型	-	0.229 4 ± 0.021 6	2.021 7 ± 0.386 9	5.339 9 ± 1.451 9
APS	100	0.203 9 ± 0.017 5*	1.607 8 ± 0.262 7*	7.321 5 ± 1.550 3*
APVL	200	0.210 2 ± 0.017 2*	1.696 8 ± 0.260 8*	6.749 2 ± 1.502 0*
APAM	100	0.191 3 ± 0.012 2**	1.429 7 ± 0.156 7**	8.571 4 ± 1.438 7**
	50	0.207 6 ± 0.020 2*	1.668 1 ± 0.315 9*	7.019 8 ± 1.674 1*
	200	0.204 3 ± 0.054 8**	1.629 2 ± 0.145 9**	7.407 7 ± 3.780 1**
	100	0.190 5 ± 0.032 4**	1.428 3 ± 0.058 2**	8.804 6 ± 4.165 8**
	50	0.208 5 ± 0.024 2*	1.670 7 ± 0.049 4**	6.865 8 ± 2.338 4*

与正常组比较:  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

$P < 0.01$  vs normal group; \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

表 2 AP 对  $S_{180}$  小鼠红细胞膜交联蛋白、带 3 蛋白和 SA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of AP on cross-linking protein, Band 3 protein, and SA contents of erythrocyte membrane of  $S_{180}$  mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	交联蛋白/ %	带 3 蛋白/ %	SA (A)
正常	-	-	25.38 ± 1.48	0.184 ± 0.054
模型	-	0.344 5 ± 0.006 5	18.63 ± 2.57	0.082 ± 0.016
APS	100	0.207 5 ± 0.006 7**	21.37 ± 1.69	0.124 ± 0.037*
APVL	200	0.294 1 ± 0.004 6*	22.13 ± 1.77*	0.137 ± 0.036**
APAM	100	0.204 2 ± 0.007 5**	23.00 ± 1.87**	0.149 ± 0.027**
	50	0.240 2 ± 0.007 0	20.23 ± 0.92	0.105 ± 0.038
	200	0.245 0 ± 0.007 2*	22.03 ± 2.37*	0.124 ± 0.041*
	100	0.202 1 ± 0.007 5**	23.45 ± 1.22**	0.142 ± 0.042**
	50	0.290 1 ± 0.004 2	19.42 ± 1.69	0.109 ± 0.026

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与正常组比较:  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group;  $P < 0.01$  vs normal group

#### 4 讨论

近年来对 AP 的化学成分、药理作用及机制研究很多, 并认为其应用将主要是针对特定的生物活性和特定的疾病如肿瘤和艾滋病等, 研制开发出医药保健产品。前期研究发现 AP 抗肿瘤作用明确, 并且对机体红细胞免疫功能有促进作用。本研究以  $S_{180}$  小鼠红细胞为研究对象, 对 AP 促进红细胞膜功能而抗肿瘤的作用机制进行深入研究。

带 3 蛋白(又称阴离子交换蛋白 1, AE1) 是红细胞膜上一种多功能嵌膜蛋白(占膜蛋白含量的 25%), 其最基本的功能是执行阴离子(主要  $HCO_3^- - Cl^-$ ) 交换。此外, 在稳定红细胞形态、调节血红蛋白携氧能力、调节和保护糖酵解酶活性以及介导衰老红细胞的清除等方面都有重要作用。本实验发现,  $S_{180}$  小鼠的红细胞膜带 3 蛋白含量与正常小鼠相比显著降低, 而 AP 各剂量组均可不同程度的提高  $S_{180}$  小鼠下降的红细胞膜带 3 蛋白含量,

提示 AP 可以通过提高带 3 蛋白含量, 稳定红细胞膜骨架、增强红细胞变形能力、改善红细胞能量代谢, 从而保证了红细胞多种生理功能的发挥。

SA 是细胞膜上糖蛋白和糖脂末端的残基, 为细胞负电荷的主要来源, 也是细胞膜受体的重要成分, 参与细胞分化、识别, 细胞黏附和接触抑制以及癌细胞的转移等生理病理过程。SA 含量降低会引起红细胞膜的结构和功能异常, 从而加速红细胞的老化, 使红细胞凝集性、胞膜的脆性增加, 红细胞崩解破裂, 数量减少, 最终影响红细胞发挥正常的免疫功能。以往研究表明, AP 可促进荷瘤小鼠红细胞免疫功能<sup>[6]</sup>, 而本实验结果表明, AP 可提高荷瘤小鼠下降的 SA 含量, 这可能是 AP 促进荷瘤小鼠红细胞免疫功能的主要机制之一。

以往研究还发现, 荷瘤机体红细胞膜脂流动性有所下降, 本实验发现, 荷瘤小鼠红细胞膜带 3 蛋白和 SA 含量显著降低, 而膜蛋白的交联度显著升高。

这些结果提示肿瘤发生使机体红细胞膜收缩蛋白、锚蛋白和带 3 蛋白发生交联变构而引起带 3 蛋白含量的下降,进而导致红细胞膜脂流动性的降低<sup>[7,8]</sup>。红细胞膜脂流动性的降低又引起 GPA(血型糖蛋白 A,富含 SA)等多种重要膜蛋白构象改变,SA 含量大幅减少,引起膜表面的电负性降低,红细胞聚集性增加而无法正常识别和清除肿瘤细胞进而导致肿瘤细胞血行转移。而本实验中两种 AP 中、高剂量组均可显著降低膜蛋白聚集性而提高带 3 蛋白含量,使 S<sub>180</sub>小鼠膜脂流动性升高,红细胞膜生理功能趋于正常,这可能是 AP 促进红细胞免疫功能发挥抗肿瘤作用的主要机制之一。

此外,实验中还发现 AP 在 100 mg/kg 剂量下作用最佳,当剂量达到 200 mg/kg 时对实验中的各项指标的作用反而有所下降。这一现象表明 AP 存在作用的最佳剂量。超过这一数值,剂量再增加,作用反而下降,这与以往对于其他多糖类成分活性研究的结论相一致。

#### References:

- [1] Ji Y B, Zou X, Gao S Y. Research on aloe polysaccharide [J]. *J Harbin Univ Commerce—Nat Sci Edit* (哈尔滨商业大学学报·自然科学版), 2003, 19(4): 377-381.
- [2] Zou X, Ji C F, Gao S Y. Study on comparison on antitumor effects of three kinds of aloe polysaccharide [J]. *Harbin Univ Commerce—Nat Sci Edit* (哈尔滨商业大学学报·自然科学版), 2004, 20(1): 14-17.
- [3] Zhang X J, Ji Y B, Qu Z Y, et al. Influence of Chaihu Capsule on RBC membrane function of H<sub>22</sub> mice [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(4): 332-333.
- [4] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [5] Fu G H, Jiang X S, Wang X M, et al. Purification and characterization of C1 peptide released from Band 3 protein [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1999, 15(3): 271-274.
- [6] Jia S H, Zhang X J, Peng H S, et al. Effect of polysaccharides of *Aloe vera* L. on immune function of red blood cell in S<sub>180</sub> [J]. *J Harbin Univ Commerce—Nat Sci Edit* (哈尔滨商业大学学报·自然科学版), 2002, 18(6): 607-609.
- [7] Cui X B, Fu G H, Jiang X S, et al. The changes of Band 3 protein and membrane fluidity in pathologic condition [J]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2000, 34(6): 396-398.
- [8] Sun D G, Shi Y, Chen K, et al. Effects of membrane proteins crosslinking on biomechanical properties of the erythrocyte membrane [J]. *Beijing Biomed Eng* (北京生物医学工程), 2000, 19(2): 96-100.

## Antilipid peroxidation of polyamines from pilose antler

CHEN Xiao-guang<sup>1</sup>, JIN Shu-li<sup>2</sup>, DI Lin<sup>1</sup>, LIU Xin-yu<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacology, Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China; 2. Hospital of Changchun Public Traffic Company, Changchun 130021, China)

**Abstract:** **Object** To investigate the antioxidant activity of polyamines isolated from pilose antler (PAIPA). **Methods** The effects of PAIPA on the lipid peroxidation (MDA formation) in microsomes of rat brain, liver, and kidney induced by NADPH-Vitamine C (Vc) and ferrous-cysteine systems *in vitro*, the superoxide anion radical production (reduced cytochrome C formation) in xanthine-xanthine oxidase system *in vitro*, and the CCl<sub>4</sub>- and ethanol-induced MDA formation in mice liver *in vivo* were evaluated. **Results** PAIPA could significantly inhibit the lipid peroxidation (MDA formation) in microsomes of rat brain, liver, and kidney induced by NADPH-Vc and ferrous-cyctein, the superoxide anion radical production (formation of reduced cytochrome C) in xanthine-xanthine oxidase system *in vitro*, and the CCl<sub>4</sub>- and ethanol-induced MDA formation in mice liver *in vivo*. **Conclusion** PAIPA exhibits an antioxidant activity.

**Key words:** pilose antler; polyamines; lipid peroxidation; superoxide anion radical

## 鹿茸多胺的抗脂质过氧化作用

陈晓光<sup>1</sup>, 金淑莉<sup>2</sup>, 邸琳<sup>1</sup>, 刘新宇<sup>1</sup>, 张晓宇<sup>1</sup>

(1. 吉林省中医中药研究院 药理室, 吉林 长春 130021; 2. 长春公交医院, 吉林 长春 130021)

**摘要:**目的 研究鹿茸多胺的抗氧化作用。方法 测定鹿茸多胺在体外对 NADPH-维生素 C 和 Fe<sup>2+</sup>-半胱氨酸系统诱发的微粒体脂质过氧化反应 (MDA 形成) 的影响, 对黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统超氧阴离子自由基 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

\* 收稿日期: 2003-11-19

作者简介: 陈晓光 (1964—), 男, 吉林安图人, 助理研究员, 硕士, 1991—1993 年在日本北里研究所附属东洋医学研究所生化室进修, 主要从事中药生物化学及生化药理研究。Tel: (0431) 6816836 E-mail: xg\_chen@163.com