

青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究

季宇彬, 马宏图, 杨波, 汲晨锋

(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 观察青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用。方法 制备 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠模型, 青龙衣不同提取部位 ip 给药, 观察其对 S₁₈₀小鼠的抑瘤作用及对胸腺、脾脏器官指数的影响, 对 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠癌细胞膜和红细胞膜表面唾液酸 (SA) 含量的影响。结果 青龙衣冷、热醇提取部位对 S₁₈₀荷瘤小鼠均有明显的抑瘤作用, 并呈良好的剂量-效应关系; 对 H₂₂荷瘤小鼠可延长生存期; 冷、热醇提取部位能显著降低 S₁₈₀和 H₂₂小鼠肿瘤细胞膜表面 SA 含量, 同时显著提高荷瘤小鼠红细胞膜表面 SA 含量。结论 青龙衣冷、热醇提取部位具有抗肿瘤作用。

关键词:青龙衣不同提取部位; 唾液酸; 抗肿瘤作用

中图分类号:R286.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)10-1145-03

Antitumor effects of different extract fractions from Qinglongyi

JI Yu-bin, MA Hong-tu, YANG Bo, JI Chen-feng

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

Abstract: **Object** To observe antitumor effects of different extract fractions from Qinglongyi (DEQ). **Methods** S₁₈₀-mice and H₂₂-mice were given by ip as model. Antitumor effects of DEQ on S₁₈₀-mice were observed, and also the effect on indexes of thymus and spleen, sialic acid (SA) content in cancer cell membrane and erythrocyte membrane in S₁₈₀-mice and H₂₂-mice. **Results** The two extract fractions by cold and hot alcohol have obvious antitumor effects in a dose-effect manner to S₁₈₀-mice, and can prolong H₂₂-mice life. The two extract fractions from Qinglongyi can significantly decrease SA in cancer cell membrane and increase SA in erythrocyte membrane. **Conclusion** The two extract fractions from Qinglongyi have antitumor effects.

Key words: different extract fractions from Qinglongyi (DEQ); sialic acid; antitumor effect

青龙衣为胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 和胡桃 *Juglans regia* L. 的未成熟外果皮, 性味苦、涩、平, 现代研究表明其抗肿瘤作用明显^[1]。为进一步探讨青龙衣抗肿瘤作用的有效成分, 本实验观察了青龙衣两个不同提取部位的抑瘤作用及对荷瘤小鼠细胞膜唾液酸 (SA) 含量的影响。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠, 体重 18~22 g, 雌雄兼用, 由黑龙江中医药大学动物室提供。

1.2 药物与试剂: 青龙衣冷醇提取部位 (含胡桃醌 45.6%) 及青龙衣热醇提取部位 (含胡桃醌 55.5%) 均由哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站自制, 应用时以生理盐水配制。环磷酰胺 (上海旭东海普药业有限公司, 批号 000706)。SA 测定试剂盒 (南京建成生物公司), 蛋白定量试剂盒 (南京建成生物公司)。

1.3 瘤株: 小鼠肝癌 H₂₂、肉瘤 S₁₈₀瘤株均由黑龙江肿瘤医院所提供, 本所移植传代。

1.4 仪器: UV-2102 紫外可见分光光度计 (Unico 公司), 低速离心机 (北京离心机厂), 低温高速离心机 (Beckman)。

2 方法

2.1 对 S₁₈₀小鼠瘤重及免疫器官指数的影响: 小鼠随机分组, 雌雄各半。分别为冷醇高、中、低剂量 (191.37、95.68、47.84 mg/kg) 组, 热醇高、中、低剂量 (121.17、60.58、30.29 mg/kg) 组, 环磷酰胺 (20 mg/kg) 组, 生理盐水组。冷、热醇提取部位的给药剂量均为半数致死量的 1/30、1/60、1/120。各组小鼠于右前腋下常规接种 S₁₈₀瘤细胞悬液 0.2 mL (约 1×10⁶~2×10⁶个细胞), 接种后各组 ip 给药, 连续 7 d。末次给药后处死小鼠, 称体重, 称瘤块、胸腺及脾脏质量, 计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

收稿日期: 2004-01-05

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (ZLY03-04)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理学及肿瘤药理学。

2.2 对 H₂₂小鼠生命延长率的影响:分组同 2.1 项。小鼠腹腔接种 H₂₂瘤细胞悬液 0.2 mL (约 1×10⁶~2×10⁶个细胞),给药方法同 2.1 项,每天观察并记录小鼠死亡情况。

2.3 对荷瘤小鼠细胞膜表面 SA 含量的影响

2.3.1 肿瘤细胞膜 SA 含量测定:分组与给药同 2.1 项。给药结束后抽取小鼠腹水 0.5 mL,800 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 0.85% NH₄Cl 除去红细胞,适量 PBS 洗涤 3 次,蒸馏水破膜 1 h。3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,将沉淀悬浮在适量 PBS 液中。蛋白定量采用考马斯亮蓝法^[3],膜蛋白质量浓度为 0.98 mg/mL,SA 含量测定按试剂盒说明书操作,含量以吸光度(A)值表示。

2.3.2 红细胞膜 SA 含量测定:分组与给药同 2.1 项,给药结束后取全血,生理盐水 3 000 r/min 离心,生理盐水(1:3)洗涤 3 次,悬浮在生理盐水(1:1)中。加入 5 mmol/L NaHCO₃(1:20),同时加入蛋白酶抑制剂 PMSF,4 ℃ 溶血 1 h,12 000

r/min 离心 30 min,弃上清液。5 mmol/L NaHCO₃ 洗涤 3 次(同样转速),吸取白色沉淀物,将其悬浮在 5 mmol/L NaHCO₃、0.15 mol/L NaCl 溶液(1:1)中,蛋白定量及 SA 测定同 2.3.1 项。

3 结果

3.1 对 S₁₈₀小鼠瘤重及免疫器官指数的影响:结果见表 1。青龙衣冷醇、热醇提取部位与生理盐水组比较均有显著的抑瘤作用(P<0.05,0.01)。冷醇低剂量和热醇低、中剂量降低小鼠的胸腺指数,但环磷酰胺组有所提高,差异不显著(P>0.05);冷、热醇提取部位升高荷瘤小鼠的脾指数,与环磷酰胺组比较差异显著(P<0.05),而与生理盐水组比较差异不显著,这与相关报道是相符的^[4]。提示青龙衣冷、热醇提取部位可能具有同环磷酰胺相同的副作用,抗肿瘤的同时使荷瘤小鼠体重减轻。

3.2 对 H₂₂小鼠的生命延长作用:结果见表 2。青龙衣不同提取部位均可延长 H₂₂小鼠生命,与生理盐水组比较差异显著(P<0.05)。

表 1 青龙衣不同提取部位对 S₁₈₀小鼠瘤重及免疫器官指数的影响(x̄±s, n=15)

Table 1 Effect of DEQ on tumor weight and indexes of immune organs in S₁₈₀-mice (x̄±s, n=15)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只		体重/g		瘤块质量/g	抑瘤率/%	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)	脾指数/(mg·g ⁻¹)
		始	末	始	末				
冷醇提取部位	191.37	19	18	19.77±2.11	25.16±4.53	0.57±0.13**	60.03	2.60±0.70	8.00±2.56▲
	95.68	21	19	19.13±2.62	22.82±3.48*	0.60±0.14**	58.00	2.78±1.03	8.19±2.15▲
	47.84	20	18	19.61±2.75	24.63±4.60	0.76±0.09*	46.89	3.00±0.80▲	9.10±2.87▲
热醇提取部位	121.17	20	15	19.61±2.52	23.64±4.28	0.50±0.18**	63.80	2.03±0.49	9.13±2.22▲
	60.58	20	18	19.59±2.32	23.95±4.33	0.75±0.12**	47.12	2.88±0.78▲	8.98±2.95▲
	30.29	20	19	19.79±2.21	24.98±3.09*	0.93±0.23**	38.42	2.97±0.99▲	9.28±2.54▲
环磷酰胺	20	20	19	19.37±2.64	23.15±3.54*	0.47±0.17**	67.02	1.84±0.51*	5.00±0.90*
生理盐水	—	20	19	19.53±2.73	28.29±3.57	1.43±0.28	—	3.51±0.69	7.53±2.08

与生理盐水组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与环磷酰胺组比较: ▲P<0.05

*P<0.05 **P<0.01 vs NS group; ▲P<0.05 vs Cytoxan group

3.3 对荷瘤小鼠细胞膜表面 SA 含量的影响

3.3.1 对 S₁₈₀小鼠瘤细胞膜和红细胞膜表面 SA 含量的影响:结果见表 3。

表 2 青龙衣不同提取部位对 H₂₂小鼠生存期的影响(x̄±s, n=15)

Table 2 Effect of DEQ on H₂₂-mice life (x̄±s, n=15)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	生存期/d	生命延长率/%
冷醇提取部位	191.37	23.8±2.3	45.14*
	95.68	24.5±3.3	49.61*
	47.84	22.1±2.0	34.64*
热醇提取部位	121.17	24.5±3.5	50.01*
	60.58	23.5±1.8	43.62*
	30.29	21.5±3.1	31.39*
环磷酰胺	20	22.4±3.2	26.95*
生理盐水	—	16.3±2.1	—

与生理盐水组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs NS group

3.3.2 对 H₂₂小鼠瘤细胞膜和红细胞膜表面 SA

表 3 青龙衣不同提取部位对 S₁₈₀小鼠瘤细胞膜和红细胞膜 SA 含量的影响(x̄±s, n=8)

Table 3 Effect of DEQ on SA in cancer cell membrane and erythrocyte membrane in S₁₈₀-mice (x̄±s, n=8)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤细胞膜(A)	红细胞膜(A)
生理盐水	—	0.066±0.011	0.087±0.025
环磷酰胺	20	0.042±0.020*	0.091±0.030
冷醇提取部位	191.37	0.045±0.015*	0.122±0.014*
	95.68	0.055±0.010	0.102±0.022*
	47.84	0.059±0.013	0.090±0.016
热醇提取部位	121.17	0.048±0.021*	0.111±0.020*
	60.58	0.043±0.018*	0.098±0.012*
	30.29	0.052±0.016	0.095±0.018

与生理盐水组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs NS group

含量的影响;结果见表 4。

表 4 青龙衣不同提取部位对 H₂₂小鼠瘤细胞膜和红细胞膜 SA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of DEQ on SA in cancer cell membrane and erythrocyte membrane in H₂₂-mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	瘤细胞膜 (A)	红细胞膜 (A)
生理盐水	—	0.070 ± 0.015	0.078 ± 0.018
环磷酰胺	20	0.030 ± 0.013	0.090 ± 0.013
冷醇提取部位	191.37	0.034 ± 0.019*	0.098 ± 0.011*
	95.68	0.042 ± 0.017*	0.116 ± 0.025*
	47.84	0.056 ± 0.023*	0.086 ± 0.012
热醇提取部位	121.17	0.037 ± 0.014*	0.131 ± 0.023*
	60.58	0.048 ± 0.018*	0.126 ± 0.029*
	30.29	0.066 ± 0.011	0.094 ± 0.015*

与生理盐水组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs NS group

表 3 和 4 结果表明,青龙衣两个提取部位均能明显降低癌细胞膜表面 SA 含量,与生理盐水比较差异显著 (P<0.05),并能显著升高红细胞膜表面的 SA 含量,与生理盐水比较差异显著 (P<0.05),表明青龙衣两个提取部位抗肿瘤作用机制很可能是通过影响细胞膜来实现的。

4 讨论

通过生物膜研究疾病,是目前探讨疾病发病机制的重要途径之一。SA 参与许多生物学现象的调控,包括激素的作用、酶的催化、细胞间的识别和黏着、免疫反应、物质转运、突触的传递、神经的再生及神经中枢的高级神经活动等^[5]。研究表明,肿瘤细胞膜表面 SA 含量与正常细胞表面的含量相比有显著增加。肿瘤细胞膜上 SA 的异常增加与肿瘤恶性程度有关^[6]。本实验结果表明青龙衣冷、热醇提取部位均能显著降低荷瘤小鼠癌细胞表面 SA 含量,说明

其具有一定抗肿瘤转移能力^[7,8],其作用是抑制了正常细胞转变为肿瘤细胞。本实验结果还表明青龙衣不同提取部位均能显著增加红细胞膜表面 SA 含量。提示青龙衣抗肿瘤的机制可能是抑制了肿瘤的血行转移,即抑制了 SA 从红细胞膜表面的脱落,从而延缓正常的红细胞的免疫功能低下的过程。

青龙衣两个提取部位中主要含有胡桃醌、苷类和少量多糖类物质,抗肿瘤作用明显。由本实验看,青龙衣两个提取部位能延长荷瘤小鼠生命,对小鼠肉瘤生长也有明显的抑制作用。从免疫器官的影响来看,具有降低免疫器官指数的趋势,因此可以推测是其毒性作用的表现。但与环磷酰胺比较,作用又较小 (P<0.05),推测与其含有多糖类物质有关。

References:

- [1] Alkhawa J A. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia* Am [J]. *Chin Med*, 1997, 25(12): 175-180.
- [2] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [3] Li J W, Zhang T W, Zen W, et al. Apply coomassie blue method to measure protein quantitation [J]. *Chin J Biologic* (中国生物制品杂志), 2000, 13(2): 118-120.
- [4] Xu W. Experiment studies on the inhibition and immune activities on Qinglongyi power injection preparation [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2002, 8(10): 39-41.
- [5] Zhang C M, Liu Y, Yang H C. Biological functions and clinical significances of sialic acid [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 1990, 24(6): 500.
- [6] Lin S Q, Li J W. Effects of expression of α -2, 6-(ST6Gal I) to sialic colon tumor cell [J]. *J Mod Clin Med Bioeng*, 2004, 10(1): 1-3.
- [7] Li S S. Biology progress of sialic acid and sialic acid ramification [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 1997, 2(2): 70.
- [8] Isao K S, Miyazawa T, Itoh M, et al. Possible mechanism of inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid: nucleoside conjugate [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 3728.

复方 861 对人肝星状细胞 α -平滑肌肌动蛋白 mRNA 表达的调节作用

王 琳^{1,4}, 王宝恩², 肖培根³, 汪 建⁴, 乔廷江¹, 谈学海⁴

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京友谊医院肝病研究中心, 北京 100050; 3. 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; 4. 北京华大基因研究中心, 北京 101300)

摘 要:目的 研究复方 861 对人肝星状细胞 (LX-2) 中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 基因表达的调节作用。方法 应用基于 SYBR-Green I 的实时定量荧光 PCR 方法, 研究复方 861 分别作用 24、48、72 h 后, LX-2 细胞中 α -SMA

收稿日期: 2003-12-06

基金项目: 中国科学院创新工程项目 (KSCX2-SW-207)

作者简介: 王 琳 (1973—), 女, 山西太原人, 助教, 博士研究生, 1998 年毕业于北京中医药大学, 而后在北京中医药大学任教, 并从事证候学的研究工作, 2001 年考取北京中医药大学与北京华大基因研究中心联合培养的博士, 导师为肖培根院士和王宝恩教授, 研究方向为中药基因组学。