

浓度降低,使肠道蠕动减慢,延长水、电解质、营养物质在肠道内停留时间,促进其吸收,减少腹泻次数和粪便量。而且,病毒与受体复合物进入细胞必须有钙离子的辅助作用,由于槲皮素拮抗钙离子通道,使病毒受体复合物不能进入细胞,中断了其生活周期,从而引起病毒死亡,这也是槲皮素在体外能够较好地抑制 HRV 的机制。熊果酸能够刺激 IFN- γ 的分泌^[5],增强机体的免疫功能,提高机体抵抗病毒的能力,但其在体外以何种机制发挥抗病毒作用,还有待于进一步研究。槲皮素和 2 α -羟基熊果酸在体外显示了较强的抗 HRV 作用,但其在体内是否有较强的抗病毒作用,由于其代谢过程不明,有待于进一步研究。

References

- [1] Wei L B, Li Z J, Chen B T, *et al*. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Guava* leaf [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 7(2): 86-89.
- [2] Wei L B, Lü R H, Chen B T, *et al*. Study on the anti-rotavirus effect of *Guava* leaf *in vitro* [J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 1999, 7(10): 895-897.
- [3] Georges P, Myers M G. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop [J]. *Pediatrics*, 2002, 110(6): 67-72.
- [4] Wu S N, Chiang H T, Shen A Y, *et al*. Differential effects of quercetin, a natural polyphenolic flavonoid on L-type calcium current in pituitary tumor (GH3) cells and neuronal NG108-15 cells [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 298-308.
- [5] Chiang L C, Ng L T, Chiang W, *et al*. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species [J]. *Planta Med*, 2003, 69(7): 600-604.

龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响

季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 邹翔, 汲晨峰*

(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 研究龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸 (SA) 水平和封闭度的影响。方法 建立 H₂₂ 荷瘤小鼠模型, 荷瘤小鼠分别 sc 生理盐水、环磷酰胺、龙葵碱 (9.375、18.75、37.5 mg/kg)。采用比色法测定 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和封闭度。结果 龙葵碱可剂量依赖性降低荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和肿瘤细胞膜封闭度。结论 龙葵碱通过降低 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和肿瘤细胞膜封闭度起抗肿瘤作用。

关键词: 龙葵碱; H₂₂ 荷瘤小鼠; 膜封闭度; 唾液酸

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0079-03

Effect of *Solanum nigrum* total alkaloid on sialic acid and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice

J I Yu-bin, WANG Sheng-hui, GAO Shi-yong, ZOU Xiang, J I Chen-feng

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

Abstract: Objective To study the effects of total alkaloid from *Solanum nigrum* (TA SN) on sialic acid (SA) and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** H₂₂ tumor-bearing mice model was established and H₂₂ tumor-bearing mice were given NS, Cytosine (CTX), and TA SN (9.375, 18.75, and 37.5 mg/kg) by sc, respectively. SA content and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ mice were determined by chromatometry. **Results** TA SN could decrease the SA content and the blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice in a dose-dependent manner. **Conclusion** TA SN shows the antitumor activity through decreasing the SA content and blocking degree of tumor cell membrane in H₂₂ tumor-bearing mice.

Key words: total alkaloid of *Solanum nigrum* L. (TA SN); H₂₂ tumor-bearing mice; blocking degree of membrane; sialic acid (SA)

龙葵 *Solanum nigrum* L. 为茄科一年生草本植物, 分布于全国各地, 其主要成分为生物碱。民间使用

龙葵治疗肿瘤效果良好。前期抗肿瘤实验结果表明龙葵碱能够明显延长 H₂₂ 荷瘤小鼠的生存时间。本实验

* 收稿日期: 2004-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400591); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-13); 哈尔滨市青年科学基金资助项目 (2004A FQ XJ035)。

观察其对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平和封闭度的影响, 从而揭示其抗肿瘤的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药品及试剂: 龙葵碱, 纯度 98%, 由黑龙江省药品检验所提供; 环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司产品, 批号 03081321; NADH, Sigma 公司产品。

1.2 动物及瘤株: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 由哈尔滨市兽医研究所动物室提供; H_{22} 瘤株, 购于哈尔滨肿瘤医院肿瘤研究所。

1.3 仪器: 日本岛津 RF-540 荧光分光光度计; 紫外 721 分光光度计, 山东高密分析仪器厂; 水平高速离心机, 北京医用离心机厂; 低温超速离心机, 美国贝克曼公司; 超净工作台, 苏州净化设备厂; 恒温水浴箱, 厦门医疗电子仪器厂。

2 方法

2.1 分组、模型的建立及给药: 小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分别为生理盐水组, 环磷酰胺 (30 mg/kg) 组, 龙葵碱低、中、高剂量 (9.375、18.75、37.5 mg/kg) 组。无菌条件下抽取生长良好的 H_{22} 荷瘤小鼠腹水, 以生理盐水 (1:4) 稀释后, 于每只 0.2 mL 接种于各组小鼠腹腔, 接种 24 h 后, 各组小鼠 sc 相应剂量药物。每天 1 次, 共 7 d。

2.2 肿瘤细胞膜 SA 水平的测定: 从已接种腹水癌细胞 1 周后的小鼠腹腔中, 取腹水约 1 mL, 用生理盐水约 10 mL 洗涤 1 次, 1 000 r/min 离心 10 min, 用约 10 mL PBS 溶液洗涤 1 次。若腹水中有红细胞, 应多洗 2 次, 将红细胞除去。然后将腹水癌细胞以 1×10^7 /mL 悬浮在含有 10% 小牛血清的 Eagle 液中。用台盼蓝检查, 95% 以上细胞是活细胞。取活细胞 1 mL, 加 9 倍生理盐水, 用匀浆器制成 10% 匀浆液, 3 000~3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液 0.2 mL 进行测定, 同时测定组织蛋白。具体操作步骤为: 测定管中加入样品 0.2 mL, 氧化剂 0.2 mL, 5-甲基苯二酚 4.0 mL; 标准管中加入 1 mmol/L SA 标准 0.1 mL, 氧化剂 0.2 mL, 5-甲基苯二酚 4.0 mL; 空白管中加入蒸馏水 0.1 mL, 氧化剂 0.2 mL, 5-甲基苯二酚 4.0 mL, 混匀, 100 °C 水浴 15 min, 流水冷却后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用分光光度计于 560 nm 波长处, 空白管调零读取各管吸光度 (A) 值。

2.3 肿瘤细胞膜封闭度的测定

2.3.1 影泡的制备及影泡的重新封闭: 从已接种腹水癌细胞 1 周的小鼠腹腔中, 取腹水约 1 mL, 用生理盐水约 洗涤 次 / 离心

min, 弃上清液后加入 4 mL 双蒸水, 放入冰箱 4 °C 过夜, 得到肿瘤细胞影泡, 取出后双蒸水洗 3 次, 将洗过的影泡放在等渗溶液中, 37 °C 保温 1 h 即获得封闭影泡^[1]。

2.3.2 NADH-细胞色素 C 氧化还原酶活性的测定: 按 Zamudio^[2]法进行: 取 4 个试管, 分别为不加皂素空白管 (A), 不加皂素样品管 (B), 加皂素空白管 (C), 加皂素样品管 (D)。首先在 A、B、C、D 管中都加入 0.6 mL 封闭影泡, 第 2 步加入 5p8 4 的 PBS, A 管 2.4 mL, B 管 2.2 mL, C 管 2.2 mL, D 管 2.0 mL; 第 3 步 A、B 管不加试剂, C、D 管加入 0.1% 皂素各 0.2 mL; 第 4 步 A、C 管不加试剂, B、D 管加入 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 各 0.1 mL。放置 10 min; 第 5 步 A、C 管不加任何试剂, B、D 管各加 6 mmol/L NADH 0.1 mL, 加完计时 1 min 后, 混匀, 在波长 420 nm 处比色, 以加入 NADH 为起点, 记录反应开始 6 min 内的吸光度值 (每隔 1 min 记录 1 次)。上述反应在 25 °C 进行。比色对照, 除不加 NADH 溶液外其他操作同上。

2.3.3 封闭度计算: 影泡封闭度 (%) 按下式计算。

封闭度 = (加表面活性剂酶活力 - 不加表面活性剂酶活力) / 加表面活性剂酶活力 $\times 100\%$

3 结果

3.1 龙葵碱对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜 SA 水平的影响: 结果见表 1。与生理盐水组比较, 龙葵碱可使荷瘤小鼠肿瘤细胞膜上 SA 水平有明显的降低 ($P < 0.01$), 其中以高剂量组效果最为明显。环磷酰胺组也有同样的作用。

表 1 龙葵碱对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞 SA 水平和封闭度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of TASN on SA level and blocking degree of tumor cell membrane in H_{22} tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	SA/(mmol · L ⁻¹)	封闭度/%
生理盐水	-	0.280 ± 0.030	66.4 ± 1.99
环磷酰胺	30	0.183 ± 0.037**	58.4 ± 3.33**
龙葵碱	9.375	0.176 ± 0.045**	61.3 ± 2.56**
	18.75	0.173 ± 0.045**	56.0 ± 3.07**
	37.5	0.116 ± 0.041**	50.8 ± 4.03**

与生理盐水组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs NS group

3.2 龙葵碱对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜封闭度的影响: 结果见表 1。与生理盐水组比较龙葵碱可明显降低 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜封闭度, 差异显著 ($P < 0.01$), 且呈量效相关, 回归方程为 $Y =$

4 讨论

SA 是细胞膜上糖蛋白和糖脂链末端的残基,广泛分布于哺乳动物细胞(包括红细胞)膜表面,为细胞负电荷的主要来源,亦为细胞膜受体的重要成分^[3,4],参与细胞分化,癌细胞的转移,细胞的识别、黏附和接触抑制等生理过程。因此,细胞膜上 SA 含量的改变将导致细胞内一系列生物学变化。同时 SA 也是红细胞 C3b 受体(CR1)的重要成分,除红细胞外,机体的其他组织细胞膜上也存在一定水平的 SA。研究发现随着肿瘤的生长,腹水和血清中 SA 水平增加,并与肿瘤的生长和类型呈相关性,细胞膜表面 SA 水平与肿瘤的恶性程度有关。肿瘤细胞比正常细胞更易产生 SA^[5]。研究表明 SA 在肿瘤的病理过程中具有“抗识别作用”,许多癌化的细胞的表面富含 SA 黏蛋白^[6,7],其水平高达膜上蛋白总水平的 0.5%,而在正常细胞表面,这类成分没有或很少,因此认为这是癌细胞逃避免疫攻击的机制,并且和癌细胞的转移有关^[8]。将癌细胞分离出来,用唾液酸苷酶除去细胞表面的 SA,再注入体内,结果导致体内原有的癌细胞解体或消失^[9]。本实验结果表明龙葵碱使荷瘤小鼠肿瘤细胞膜上 SA 水平明显降低。由此推测龙葵碱可能属抗肿瘤药物中的代谢药,主要影响 DNA 的合成,文献报道可与 DNA 结合的药物和一些抗代谢药可抑制肿瘤产生 SA^[9]。其机制是直接和 DNA 结合而影响 DNA 合成酶,进而影响 SA 的合成。

细胞膜 SA 水平与细胞膜活性密切相关,因此进一步研究对肿瘤细胞膜活性的影响就显得非常重要。细胞膜在等渗溶液中能重新封闭起来,恢复对大

分子和阳离子的通透屏障,形成封闭影泡。测定红细胞膜重新封闭能力的指标即封闭度。实验结果表明:龙葵碱与环磷酰胺均可明显降低 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜封闭度,提示细胞膜活性降低,其结果有可能导致肿瘤细胞的解体和死亡。

References

- [1] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究与实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1997.
- [2] Zamudio I, Cellino M, Canessa FM. The relation between membrane structure and NADH: (acceptor) oxidoreductase activity of erythrocyte ghosts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1969, 129(1): 336-345.
- [3] Stevenson RA, Huang JA, Studdert MJ, et al. Sialic acid acts as a receptor for equine rhinitis A virus binding and infection [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(9): 2535-2543.
- [4] Ji YB, Zou X, Ji CF, et al. Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(8): 898-901.
- [5] Feijoo CC, Rodriguez BFJ, Paez de la CM, et al. Clinical significance of preoperative serum sialic acid levels in colorectal cancer: utility in the detection of patients at high risk of tumor recurrence [J]. *Int J Biol Markers*, 2004, 19(1): 38-45.
- [6] Bektemur G, Ozer F, Kanat F, et al. Diagnostic efficiency of serum lipid-bound sialic acid level in malignant pleural effusions [J]. *Tuberk Toraks*, 2003, 51(3): 265-270.
- [7] Albuquerque GRP, Nakamura CV, Souza W, et al. Differential expression of sialic acid and N-acetylgalactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(5): 629-640.
- [8] Marquez M, Nilsson S, Lennartsson L, et al. Charge-dependent targeting: results in six tumor cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(3a): 1347-1351.
- [9] Li SS. Biological progress of sialic acid and its derivatives [J]. *Prog Pharm Sci* (药科学进展), 1997, 21(2): 71.

银耳多糖对小鼠脾脏淋巴细胞蛋白激酶 C 活性的影响

胡庭俊, 梁纪兰, 程富胜, 陈灵然*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 农业部新兽药工程重点开放实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 观察银耳多糖(TPS)体外对小鼠脾脏淋巴细胞蛋白激酶 C(PKC)活性的影响,探讨 TPS 对免疫细胞信息传递系统的效应。方法 应用反向离子对高效液相色谱法测定小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性。结果 TPS 能促进体外培养的小鼠脾脏淋巴细胞 PKC 活性。结论 TPS 的免疫调节作用与淋巴细胞的信号传导系统密切相关。

关键词: 银耳多糖; 淋巴细胞; 蛋白激酶 C

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0081-04

* 收稿日期: 2004-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970556)

作者简介: 胡庭俊(1965—),男,博士,研究员,主要从事中药免疫药理研究工作。