

想方法之一。大脑中动脉区是脑梗死的好发部位,因此,对猫、大鼠等动物用手术阻断一侧大脑中动脉,即可形成局灶性脑缺血模型。大鼠脑血管解剖特点与人类比较类似,并且损伤部位恒定,实验重复性好。因此本研究采用大鼠线栓法 MCAO 局灶性脑缺血模型来研究补阳还五汤 4 类有效部位的作用。在制备模型中,选择直径为 0.26 mm 尼龙线,可避免烧灼使线栓线头大小不均匀对实验结果的影响;线栓前端涂 poly-L-lysine 可增加缺血程度的稳定性^[5];且插入时蘸取肝素可防止线栓部位血栓形成。

作为评价抗脑缺血效应的指标,脑梗死体积测定是最直接的指标。TTC 水溶液是一种无色溶液,它是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,是脂溶性光敏感的复合物,还原后在正常组织中呈现红色,而缺血组织不产生此变化而呈苍白色。故 TTC 染色用于测定梗死灶大小具有快速、直观地确定梗死范围的优点,且境界清楚。有文献报道,脑组织在缺血 6 h 时, TTC 染色显色的范围才与 HE 染色显示的缺血区域一致。故本研究选择了线栓法 MCAO 局灶性脑缺血模型,观察大脑中动脉闭塞后 6 h 脑组织梗死体积的变化,并观察补阳还五汤 4 类有效部位生物碱、多糖、苷、苷元对脑缺血的保护作用。结果表明,由补阳还五汤中提取的 4 类有效部位均有缩小梗死灶体积的作用,对照药尼莫地平也可使梗死灶体积缩小。提示该方中生物碱、多糖、苷、苷元具有确切的抗脑缺血作用,这 4 类有效部位可能为该方治疗缺血性脑血管病的主要物质基础。这

4 类有效部位中,以生物碱作用最强,苷次之,而苷元和多糖缩小梗死体积的作用较弱。这与以往的研究基本相似^[6]。神经功能积分也表明,4 类有效部位均可使缺血后神经功能行为积分下降,其中以生物碱和苷的作用较强,这也佐证了生物碱和苷可能为该方中重要的抗脑缺血作用的有效部位。对补阳还五汤抗脑缺血有效部位及其机制的深入研究,必将对阐明该方作用的物质基础及揭示脑缺血的治疗效果具有重要的理论意义和应用价值。

References:

- [1] Deng C Q, Wan M, He F Y, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction and its active regions combination on brain heat shock protein 70 expression in gerbils after cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(3): 193-195.
- [2] Deng C Q, Deng Y H, He F Y, et al. Effects of Bu Yang Huan Wu decoction and its active fraction on excitatory amino acid of brain tissue after cerebral ischemia and reperfusion in gerbils [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(6): 24-27.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [5] Ludmila B, Ofelia F A, Raul B, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27: 1616-623.
- [6] Deng C Q, Tang Y H, He F Y. Effect of Buyang Huanwu Decoction and its available compositions combination on cerebral ischemia in mice [J]. *J Human Coll Tradit Chin Med* (湖南中医学院学报), 1999, 19(4): 1-4.

龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响

季宇彬,王胜惠,高世勇,汲晨锋,邹翔

(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 观察龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响。方法 采用荧光探针 DPH 标记法测定肿瘤细胞膜流动性,考马斯亮蓝法测定肿瘤细胞膜蛋白水平。结果 龙葵碱可显著降低 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性,降低 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜蛋白水平。结论 龙葵碱是通过影响肿瘤细胞膜的流动性和肿瘤细胞膜上的蛋白水平恢复细胞的正常生理活性而达到抗肿瘤作用。

关键词:龙葵碱; H₂₂ 荷瘤小鼠; 膜流动性; 膜蛋白水平

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0239-03

收稿日期: 2004-06-15

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 (D0024-13); 哈尔滨市青年科学基金资助项目 (2004AFQXJ035)

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、肿瘤药理及分子药理学研究。

Effect of *Solanum nigrum* alkaloid on membrane fluidity and membrane protein level of tumor cells in H₂₂ tumor-bearing mice

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

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

Abstract: **Objective** To study the effects of alkaloid of *Solanum nigrum* on membrane fluidity and membrane protein level of tumor cells in H₂₂ tumor-bearing mice (H₂₂ mice). **Methods** The membrane fluidity of tumor cells in H₂₂ mice was observed by DPH fluorescent probe marker method, and the level of membrane proteins of tumor cells in H₂₂ mice were determined by Coomassie brilliant blue. **Results** The alkaloid of *S. nigrum* could make the membrane fluidity decline and the level of membrane proteins of tumor cells in H₂₂ mice decrease. **Conclusion** The alkaloid of *S. nigrum* shows the antitumor activity through decreasing the membrane fluidity and the membrane protein level of tumor cells in H₂₂ mice.

Key words: alkaloid of *Solanum nigrum* L.; H₂₂ tumor-bearing mice (H₂₂ mice); membrane fluidity; membrane protein level

龙葵 *Solanum nigrum* L. 别名苦菜、苦葵、老鸦眼、天茄子,为茄科一年生草本植物。分布于全国各地,以东北、华北为多。主要成分为生物碱,另外含有维生素及多种微量元素。有记载民间使用龙葵治疗肿瘤效果良好的报道。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^[1]。本实验进一步观察其对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响,从而揭示其抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药品及试剂:龙葵碱(纯度为 99.5%),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,批号 03081321;DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene), Fluke AG 产品。

1.2 动物与瘤株: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;H₂₂ 瘤株,购于哈尔滨市肿瘤医院肿瘤研究所。

1.3 仪器:RF-540 荧光分光光度计,日本岛津;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。

2 方法

2.1 分组:小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为阴性对照(生理盐水)组,环磷酰胺(30 mg/kg)组,龙葵碱低、中、高剂量(9.375、18.750、37.500 mg/kg)组。

2.2 模型的建立及给药:无菌条件下抽取生长良好的 H₂₂ 荷瘤小鼠腹水,按腹水-生理盐水(1:4)稀释后,于每只小鼠腹腔接种 0.2 mL,接种 24 h 后各组 sc 给药。

2.3 对肿瘤细胞膜流动性的影响:从已接种腹水瘤细胞 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。然后将腹水瘤细胞悬浮在含有 10% 小牛血清的 Eagle 液中,调细胞浓度 1×10⁷/mL。台盼蓝染色检查,95% 以上细胞是活细胞。取已准备好的细胞 2 mL,离心,用 PBS 洗涤 1 次,离心,加 2×10⁻⁶ mol/L DPH 2 mL,25 ℃ 温育 30 min,再用 PBS 洗涤 1 次,悬浮在 4 mL PBS 溶液中。在标准管中加入 2 mL DPH 标记液,空白管中加入等量、等渗的 PBS 缓冲液,混匀后于 25 ℃ 温育 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,弃去残留 DPH 标记液,用等渗 PBS 缓冲液洗涤 2 次,再用等渗 PBS 缓冲液稀释成 4 mL 细胞混悬液,立即进行荧光偏振度(P)测定。用 RF-540 荧光分光光度计,采用氙灯光源,荧光激发波长为 362 nm,发射波长为 432 nm,在 25 ℃ 下分别测定与激发偏振光振动方向平行、垂直时的 P^[2],计算微黏度(η)。

$$\eta = \frac{2P}{0.46 - P}$$

2.4 对肿瘤细胞膜蛋白水平的影响:肿瘤细胞膜影泡的制备参照文献方法^[3],取 H₂₂ 腹水,分别适当处理。用 4 倍量 3 mol/L KCl 抽提肿瘤膜蛋白,对 0.01 mol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析,透析前后分别在 4 ℃ 条件下以 17 000 r/min 离心 30 min,然后用考马斯亮蓝法测定蛋白质水平。

2.5 数据处理:用 SPSS12.0 软件处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性的影响:实验结果表明,龙葵碱可显著降低 H₂₂ 小鼠肿

瘤细胞膜流动性,其中高、中剂量组与生理盐水组比较 η 显著升高,差异显著 ($P<0.01$)。环磷酰胺也

有同样作用 ($P<0.05$),但疗效较龙葵碱组弱。结果见表 1。

表 1 龙葵碱对 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜流动性及膜蛋白水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Alkaloid of *S. nigrum* on membrane fluidity and membrane protein level of tumor cells in H_{22} mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组 别	剂 量/(mg · kg ⁻¹)	P	η	膜蛋白/%
生理盐水	—	0.124 8±0.015 9	0.750 2±0.132 7	2.738 9±0.431 6
环磷酰胺	30	0.143 2±0.006 6*	0.904 1±0.060 9*	2.070 6±0.318 6*
龙葵碱	37.500	0.158 0±0.007 8**	1.047 8±0.078 3**	1.989 2±0.307 8*
	18.750	0.152 3±0.012 8**	0.994 3±0.123 2**	1.930 1±0.330 4*
	9.375	0.147 9±0.007 6*	0.948 6±0.071 1*	1.533 0±0.099 3**

与生理盐水组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs NS group

3.2 龙葵碱对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜蛋白水平的影响:结果表明,龙葵碱可降低 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜蛋白水平,其中以高剂量组最为明显 ($P<0.01$),中剂量和低剂量差异显著 ($P<0.05$)。结果见表 1。

4 讨论

膜质流动性的变化是膜组成成分变化的体现,膜流动性的改变将影响细胞的正常生理功能。膜质流动性的变化会影响到膜蛋白的构象与功能。膜脂适合的流动性是膜蛋白正常功能表现的必要条件。如果超出正常范围,生物膜就会产生异常的变化。已经发现很多疾病患者的病变细胞膜或红细胞膜的流动性异常。例如,急性淋巴细胞白血病患者淋巴细胞膜的流动性明显高于正常人。本实验的结果表明,龙葵碱可显著降低 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性,其中高、中剂量组与生理盐水组比较 η 显著升高 ($P<0.01$)。环磷酰胺也有同样作用 ($P<0.05$),但疗效较龙葵碱组弱。由此可以推断龙葵碱通过恢复肿瘤细胞膜的流动性,从而恢复细胞的正常生理功能,达到抗肿瘤的作用。

膜蛋白是膜的重要组成部分,其与肿瘤密切相关^[4,5]。膜的流动性的改变受膜蛋白水平的影响,膜蛋白的变化将导致膜的通透性、渗透压、膜电位、跨膜转运能力、外信号向内传导的变化,导致细胞丧失正常的细胞内环境,使得细胞核内信息指令异常,导

致细胞分裂速度、细胞恶性行为的获得异常。本实验在观察细胞膜流动性变化的同时,进一步观察了龙葵碱对 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜蛋白水平的影响,发现龙葵碱各组膜蛋白含量较生理盐水组显著降低,其中以高剂量组最为明显 ($P<0.01$),中剂量和低剂量差异显著 ($P<0.05$)。从而推断龙葵碱是通过影响肿瘤细胞膜上的一类或几类蛋白的数量和种类的变化而恢复细胞的正常生理活性而达到抗肿瘤的目的的,从而恢复了肿瘤细胞膜的流动性。至于龙葵碱是通过影响肿瘤细胞膜上蛋白的数量还是种类而发挥疗效的,还有待于进一步的实验研究。

References:

- [1] Ji Y B, Wang S H, Gao S Y, et al. Effect of *Solanum nigrum* total alkaloid on sialic acid and blocking degree of tumor cell membrane in H_{22} tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 79-81.
- [2] 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.
- [3] Zhang Q H, Zhang J P, Jia H S. *Biochemistry* (生物化学) [M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Medical University Publishing House, 1999.
- [4] Jai P, Wu S B, Li F, et al. The mechanism of topotecan resistance in ovarian cancer cell line [J]. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 2004, 26(3): 139-142.
- [5] Zheng D L, Peng B W, Huang Q L, et al. Expression of 67kD laminin receptor in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2003, 22(3): 248-252.

声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入光盘及网络数据库,请在来稿时声明,本刊将作适当处理。本刊所付稿酬包含刊物内容编入数据库服务报酬,不再另付。