- [5] Li N, Wang Z Z, Han H R, *et al.* Effects of extract in scorpion venom on regeneration and repair process in injured nerves [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(8): 957-958.
- [6] Wu Y L, Liu C M, Chen L L. Effects of *Buthus martensii* Karsch and decoction on immune function in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1994, 6(2): 13-14.
- [7] Zhou M, Song C Y, Wang L. Effects of ethanol extract from *Buthus martensii* Karsch on anti-inflammatory swell and granuloma weight in rats [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1998(6): 45-46.

龙葵碱对荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响

季宇彬, 王宏亮, 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 观察龙葵碱对 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响。方法 将 S₁₈₀和 H₂₂荷瘤小鼠分为龙葵碱 37.50、18.75、9.37 mg/kg 组、阴性对照组和环磷酰胺 (30 mg/kg) 组, 各组 sc 给药。利用激光共聚焦扫描显微镜, 分别测定各组肿瘤细胞中的 DNA 和 RNA。结果 龙葵碱 (37.50、18.75 mg/kg) 组对 S₁₈₀和 H₂₂小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值均有明显的降低作用。结论 龙葵碱降低 S₁₈₀和 H₂₂小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值可能是其抗肿瘤作用机制之一。

关键词:龙葵碱; 肿瘤细胞; DNA; RNA

中图分类号:R286.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)08-1200-03

Effect of solanine on DNA and RNA in tumor cell of tumor-bearing mice

JI Yu-bin, WANG Hong-liang, GAO Shi-yong

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

Abstract; Objective To observe the effects of solanine on DNA and RNA level in tumor cell of S₁₈₀ and H₂₂ tumor-bearing mice. **Methods** S₁₈₀ and H₂₂ mice were divided into solanine (37.50, 18.75, and 9.37 mg/kg) groups, negative control group and cytoxan (30 mg/kg) group, whom were given drugs by sc. Levels of RNA and DNA in tumor cell membrane in every groups were examined, respectively by laser scanning confocal microtechnic technology. **Results** Solanine (37.50, 18.75 mg/kg) groups reduced the ratio of RNA and DNA in tumor cell of both S₁₈₀ and H₂₂ mice. **Conclusion** Solanine can reduce the ratio of RNA and DNA in tumor cell of S₁₈₀ and H₂₂ mice, which may be one of the mechanisms of solanine's antitumor effect.

Key words: solanine; tumor cell; DNA; RNA

龙葵碱是从茄科植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的全草或未成熟的果实中提取分离出的一种生物碱。前期研究发现龙葵碱能显著延长 H₂₂荷瘤小鼠的生存时间^[1], 并能显著降低 H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性及膜蛋白水平^[2]。为进一步研究龙葵碱抗肿瘤作用机制, 本实验研究龙葵碱对荷瘤小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的影响。

1 材料

1.1 药物: 龙葵碱 (质量分数 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。

1.2 动物及瘤株: 昆明种小鼠, 体重 (20±2) g, 雌雄各半, 购于哈尔滨医科大学动物中心, 许可证号 001010006。S₁₈₀和 H₂₂瘤株购于黑龙江省肿瘤医院。

1.3 试剂及仪器: 吖啶橙 (AO, Molecular Probes, Inc.); 生理盐水; 细胞计数板; 激光扫描共聚焦显微镜, 德国 Leica; HH-S 恒温水浴; LD₄-2A 型台式低速离心机 (北京医用离心机厂); QL-861 型涡旋混合振荡器 (上海博停经贸有限公司); 尤尼柯紫外可见分光光度计。

2 方法

2.1 分组、给药与造模: 选用成熟昆明种小鼠 50

收稿日期: 2004-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400591, 30271598); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-13, C0309); 哈尔滨市青年科学基金资助项目 (2004AFQXJ035); 哈尔滨市科学研究基金 (2004AFQXJ034)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子药理学与肿瘤药理学。

只, 体重 (20±2) g。随机分成 5 组, 分别为龙葵碱 (37.50、18.75、9.37 mg/kg) 组、环磷酰胺 (30 mg/kg) 组和阴性对照组, 每组 10 只小鼠。龙葵碱组分别 sc 龙葵碱 37.50、18.75、9.37 mg/kg, 环磷酰胺组 sc 环磷酰胺 30 mg/kg, 阴性对照组 sc 同体积生理盐水。接种方法按文献方法进行^[3]。接种后无菌连续给药 7 d。

2.2 样品制备: 停药后次日, 在冰台上处死小鼠, 取出肿瘤细胞, 加培养液洗涤离心 (800 r/min)。离心后弃上清液, 留取下层细胞, 再用培养液制备成一定浓度的细胞悬液。

2.3 黏附细胞: 将 1% 明胶液滴加到载玻片一面, 37 °C 培养箱中干燥, 待用。在带胶面载玻片上滴加细胞悬液, 放置 37 °C 培养箱中贴壁 10~15 min, 同时以光学显微镜观察贴壁情况。然后以培养液冲洗 2~3 次, 洗去非贴壁细胞。

2.4 荧光染色: AO 染色, AO 可对细胞内 DNA、RNA 双重染色, DNA 在 506 nm 发射绿色荧光; RNA 在 650 nm 发射红色荧光。滴加 0.01% AO 染料 12 μL, 避光 37 °C 孵育 15 min, 用培养液冲去多余染料。

2.5 观察方法: 将载玻片置于 ACASUltima 312 倒置显微镜上, 使用 488 nm 氩离子激光激发荧光染料 AO, 在高倍镜 (40×, NA0.55) 下进行检测。进入 Z-Image 程序, 在光学显微镜下直接寻找贴壁良好的细胞。扫描参数为: 小孔孔径 225 μm, X 轴扫描点数 200, Y 轴扫描点数 150, 扫描步径 0.3 μm, Z 轴扫描次数 1, 镜扫描速度 20 mm/s, 扫描强度 50%, 激光强度 4.2 mW, 每点采样次数 24, 检测器 1 和检测器 2 灵敏度均为 45%。激光沿 Z 轴扫描, 获得细胞断层的扫描信息。

2.6 统计学方法: DNA 和 RNA 及相对比值由计算荧光像素数的方法量化, 数据用 SPSS11.0 进行方差分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 龙葵碱对 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞膜 RNA 和 DNA 荧光像素比值的影响: 实验结果表明, 龙葵碱 37.50 和 18.75 mg/kg 与阴性对照组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$); 龙葵碱 (9.37 mg/kg) 组与阴性对照组比较无统计学意义, 龙葵碱可以降低 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 荧光像素比值, 即降低 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 的比值。见表 1。

3.2 龙葵碱对 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 RNA 和 DNA 荧光像素比值的影响: 龙葵碱 37.50 和 18.75 mg/kg

组与阴性对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$); 龙葵碱 9.37 mg/kg 组与阴性对照组比较无统计学意义, 可见龙葵碱降低了 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 荧光像素比值, 即降低了 H₂₂ 小鼠肿瘤 RNA 和 DNA 的比值。见表 1。

表 1 龙葵碱对 S₁₈₀ 和 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 比值的影响

Table 1 Effect of solanine on ratio of RNA and DNA in tumor cell of S₁₈₀ and H₂₂ mice

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	细胞/ 个	RNA 和 DNA 荧光像素比值 ($\bar{x} \pm s$)	
				S ₁₈₀	H ₂₂
对照	—	10	100	0.953±0.027 3	0.907±0.022 7
环磷酰胺	30	10	100	0.616±0.014 3**	0.422±0.024 1**
龙葵碱	37.50	10	100	0.556±0.022 6**	0.341±0.018 7**
	18.75	10	100	0.352±0.028 6**	0.659±0.031 6**
	9.37	10	100	0.882±0.015 5	0.842±0.020 3

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

激光共聚焦显微术 (laser confocal microscopy, LCM) 是一项新兴的生物显微技术, 是利用荧光物质标记组织或细胞的某一部分, 然后用确定波长的入射光扫描样品不同层面, 并收集荧光物质被激发出的荧光, 用计算机系统进行分析, 把各个层面的荧光图像叠加起来, 形成立体图像。激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 是近 10 年发展起来的一种新型高精度的显微镜系统, 它对于组织和细胞内部微细结构的观察以及生物样品的定性、定量和定位观察均具有极大的优越性^[4], 现已广泛应用于荧光定位、定量测量、共聚焦图像分析、三维图像重建和活细胞动力学参数等方面。LSCM 是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置, 利用计算机进行图像处理, 使用紫外或可见光激发荧光探针, 从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像, 在亚细胞水平上观察诸如 Ca²⁺、pH 值、膜电位等生理信号及细胞形态的变化, 成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具^[5~9]。LSCM 采用了点光源代替场光源, 使探测点与照明点共轭, 有效抑制了同一焦平面上的杂散荧光, 抑制了来自非焦平面的荧光, 提高了图像的信噪比, 使图像的清晰度和纵向分辨率比普通光学显微镜明显升高, 对细胞进行无损光学切片。由于以上特征使其具备了普通显微镜和荧光显微镜的功能, 并配有电子摄像和微机图像数字分析系统, 结合特异的荧光抗体进行一系列亚细胞水平结构和功能的

研究,是目前先进的细胞形态、功能研究手段^[10]。

本实验所采用的荧光探针为 AO,它可以对活细胞进行染色。AO 染料具有可以被可见光激发,及激光淬灭率低的特点。LSCM 利用 AO 渗透到细胞内部,有选择性地与活细胞的不同成分结合,图像中 DNA 为绿色荧光, RNA 为红色荧光,计算机对获得的细胞荧光强度进行分析,不仅能得到较光学显微镜分辨率高的细胞形态的组分分布的清晰图像,而且可动态观察细胞内代谢的变化。可以处理活的标本,不会对标本造成物理化学性质的破坏。

通过激光束对样品进行扫描建立的共聚焦图像^[1],不仅显示出不同切面 DNA 和 RNA 分布和比值的变化,而且更直观地显示细胞受损后 DNA 和 RNA 的变化。更接近细胞的生活状态。本实验结果表明小鼠 sc 龙葵碱剂量达到 37.50 mg/kg 时, S₁₈₀ 和 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞 RNA 水平明显降低, DNA 水平明显增高,表明肿瘤细胞内 DNA 转录形成 RNA 的代谢受到抑制,这也意味着肿瘤细胞内基因产物——蛋白质的合成受阻,从而抑制肿瘤细胞的生长。给药组 RNA 和 DNA 的比值与阴性对照组比较差异显著 (P<0.01),证明 37.50、18.75 mg/kg 龙葵碱对 S₁₈₀ 和 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的代谢有逆转作用。

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 H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 79-81.

[2] Ji Y B, Wang S H, Gao S Y, et al. Effect of *Solanum nigrum* alkaloid on membrane fluidity and membrane protein level of tumor cells in H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 239-241.

[3] Zou X, Ji C F, Gao S Y, et al. Study on comparison on antitumor effects of three kinds of aloe polysaccharide [J]. *J Harbin Univ Comm; Nat Sci* (哈尔滨商业大学学报:自然科学版), 2004, 20(1): 14-17.

[4] Paddock S W. Principle and practise of laser scanning confocal microscopy [J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(2): 127.

[5] Sanchez I, Xu C J, Juo P, et al. Caspase 8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats [J]. *Neuron*, 1999, 22(3): 623-633.

[6] Trapani J A, Jans P, Smyth M J, et al. Perforin dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction [J]. *Cell Death Differ*, 1998, 6: 488-496.

[7] Beham A, Marin M C, Fernandez A, et al. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage [J]. *Oncogene*, 1997, 15(23): 2767-2772.

[8] Hiddinga H J, Eberhardt N L. Intracellular amyloidogenesis by human islet a myloid polypeptide induces apoptosis in COS-1 cells [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(4): 1077-1088.

[9] Zhang T, Cao E H, Li J F. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular Ca²⁺ and apoptosis using fluo-3 and Hoechst 33342 [J]. *Ana Quant Cytol Histol*, 2000, 22(2): 93-97.

[10] Xi X, Jiang S C, Fang Y Y. Principles and biological applications of laser scanning confocal microscopy [J]. *Chin J Stereol Image Anal* (中国体视学与图像分析), 1996, 1(3,4): 74-79.

[11] Fertil B, Malaise E P. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1985, 11: 1699-1707.

西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的抑制作用

王雅娟,钱之玉*,沈祥春

(中国药科大学 药理教研室,江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的影响。方法 以牛血清白蛋白(BSA)质量浓度、葡萄糖质量浓度及温孵时间为3因素,采用3因素4水平正交设计,通过方差分析寻找体外非酶糖基化的最适反应体系,以此最适体系观察西红花酸对非酶糖基化的影响。结果 糖基化蛋白产量与BSA质量浓度、葡萄糖质量浓度、温孵时间呈正相关;方差分析结果提示,5g/L BSA、4.5mg/mL 葡萄糖及14d的温孵时间为蛋白质体外非酶糖基化的最佳条件;荧光值测定和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGEs)均表明西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化具有显著的抑制作用。结论 西红花酸对体外蛋白质的非酶糖基化具有明显的抑制作用;这可能是西红花酸具有广泛的心血管药理活性及改善胰岛素抵抗的重要机制之一。

关键词:西红花酸;非酶糖基化;正交设计;聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGEs)

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2005)08-1202-04

收稿日期:2005-01-31

作者简介:王雅娟(1980—),女,安徽合肥人,中国药科大学硕士研究生,主要研究方向为生化药理与中药新药研发。

*通讯作者 钱之玉 Tel: (025) 83271322