

研究,是目前先进的细胞形态、功能研究手段<sup>[10]</sup>。

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<sup>[1]</sup>,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, S<sub>180</sub> 和 H<sub>22</sub> 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 S<sub>180</sub> 和 H<sub>22</sub> 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 H<sub>22</sub> 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 H<sub>22</sub> 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 Ca<sup>2+</sup> 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* (中国电视学与图像分析), 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

## Inhibition of crocetin on nonenzymatic glycosylation of protein *in vitro*

WANG Ya-juan, QIAN Zhi-yu, SHEN Xiang-chun

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Key words:** crocetin; nonenzymatic glycosylation; orthogonal design; SDS-PAGEs

蛋白质非酶糖基化是目前公认的糖尿病并发症的主要发病机制之一,也是组织器官老化的重要病理基础<sup>[1]</sup>,蛋白质非酶糖基化过程与多元醇通路激活、氧化应激及蛋白激酶 C (PKC) 激活相互影响、相互制约,且都与自由基的产生有极大关系<sup>[2,3]</sup>。许多具有活血化瘀作用的中药对非酶糖基化都有抑制作用<sup>[4]</sup>,并且非酶糖基化过程与氧化应激具有一定的关系<sup>[5]</sup>。西红花是鸢尾科植物西红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头,具有活血化瘀的功效。西红花酸为其主要有效成分之一,是多不饱和脂肪酸的类胡萝卜素类物质,具有明显的抗氧化、清除自由基作用,对心血管系统具有广泛的药理活性<sup>[6-8]</sup>;本研究发现西红花酸对多个模型的糖尿病胰岛素具有明显的改善作用<sup>[9]</sup>。结合中医药改善胰岛素抵抗的研究热点,本实验采用体外非酶糖基化体系,研究西红花酸改善胰岛素抵抗的可能机制。

### 1 材料与方法

1.1 药品与试剂:西红花酸(本实验室精制,HPLC 法测其质量分数 >90%);小牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司);叠氮钠(NaN<sub>3</sub>)和磷酸钠缓冲液(PBS, pH 7.4)为南京试剂一厂生产;葡萄糖为惠兴生化试剂有限公司产品;其余试剂均为市售分析纯。

1.2 蛋白质非酶糖基化:在 PBS 中加入 BSA,使其终质量浓度分别为 5、2.5、2.1 g/L<sup>[10]</sup>,葡萄糖终质量浓度分别为 4.5、1.5、0.5、0.1 mg/mL<sup>[11]</sup>,并加入终浓度为 3 mmol/L NaN<sub>3</sub>防腐,温孵时间分别为 7、14、21 和 28 d,按 3 因素 4 水平正交表(表 1)设计进行 16 组试验,每组设 3 个复孔,放入 37 °C 孵箱温孵,分别于 7、14、21、28 d 取标本,测定糖化白蛋白。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A BSA $\rho/(g \cdot L^{-1})$	B 葡萄糖 $\rho/(mg \cdot mL^{-1})$	C 温孵时间/d
1	1	0.1	7
2	2	0.5	14
3	2.5	1.5	21
4	5	4.5	28

1.3 药物干预试验:在 PBS 中加入 5 g/L BSA、4.5 mg/mL 葡萄糖,并加入 NaN<sub>3</sub>防腐,再加入西红花酸使其终浓度分别  $1 \times 10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-7}$

mol/L;阳性对照组加入葛根素(1 mg/mL);另设空白对照,即:①不加西红花酸的完整糖基化系统(模型组);②加西红花酸但不含 BSA(无蛋白组);③加西红花酸但不含葡萄糖(无糖组)。每组设 5 个复孔,糖基化和各对照体系均在 37 °C 恒温、密封条件下反应。14 d 后,测定各管的糖化白蛋白的荧光值(结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验)。取各组溶液 5  $\mu$ L,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGEs)。

1.4 糖化白蛋白的测定:采用荧光微孔检测仪(SPECTRAMAXXS,美国 MD 公司)测定各管荧光值。各参数分别为激发波长 370 nm,发射波长 440 nm,灵敏度 2,增益 5<sup>[10]</sup>,缝宽 8~10 mm<sup>[12]</sup>。

### 2 结果

2.1 BSA 质量浓度、葡萄糖质量浓度、温孵时间对蛋白质体外非酶糖基化的影响:3 因素 4 水平正交设计结果及方差分析见表 2 和 3。从实验结果的 *R* 值可以看出,各因素对结果影响由大到小的次序是 A (BSA 质量浓度) > C (温孵时间) > B (葡萄糖质量浓度),B 和 C 因素对结果影响无显著性。可以看出,若增加 BSA 和葡萄糖质量浓度,尤其是 BSA 质量浓度,糖化白蛋白的量将增加更明显。温孵时间对结果未见明显影响,为节省时间,并参照文献报道<sup>[9,10]</sup>,确定 5 g/L BSA、4.5 mg/mL 葡萄糖及温孵时间 14 d 为蛋白质体外非酶糖基化的最佳条件。

2.2 药物对蛋白质体外非酶糖基化的干预作用

2.2.1 糖基化终产物(AGEs)荧光值测定:西红花酸对体外非酶糖基化体系的荧光值具有明显的降低作用( $P < 0.01$ ), $1 \times 10^{-6}$  和  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 西红花酸对蛋白质体外非酶糖基化具有明显的抑制作用,和葛根素组相当。结果见表 4。

2.2.2 AGEs 的 SDS-PAGEs 图谱测定:结果见图 1。模型组相对分子质量 66 000 的蛋白条带扩散增粗,而各给药组有明显改善。

### 3 讨论

蛋白质的非酶糖基化是体内的葡萄糖、果糖及 6-磷酸葡萄糖等酮糖与体内多种蛋白质,尤其是长寿命蛋白质(如胶原蛋白、基质蛋白等)发生非酶催化的糖基化作用,首先生成 Schiff 碱,继而发生

表 2 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验安排和结果 (n=3)

Table 2 Design and results of L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal test (n=3)

编号	A	B	C	糖化白蛋白 (荧光值, $\bar{x} \pm s$ )
1	1	1	1	205.388 ± 75.648
2	1	2	2	346.741 ± 45.225
3	1	3	3	350.112 ± 9.605
4	1	4	4	577.407 ± 9.630
5	2	1	2	339.235 ± 30.820
6	2	2	1	454.184 ± 23.355
7	2	3	4	578.382 ± 78.988
8	2	4	3	552.523 ± 35.309
9	3	1	3	538.964 ± 54.421
10	3	2	4	576.191 ± 53.043
11	3	3	1	623.223 ± 12.259
12	3	4	2	596.652 ± 23.938
13	4	1	4	893.961 ± 75.368
14	4	2	3	601.735 ± 15.609
15	4	3	2	926.019 ± 39.615
16	4	4	1	786.306 ± 77.271
K <sub>1</sub>	1 479.648	1 977.548	2 069.101	
K <sub>2</sub>	1 924.324	1 978.851	2 208.647	
K <sub>3</sub>	2 335.030	2 477.736	2 043.334	
K <sub>4</sub>	3 208.021	2 512.888	2 625.941	
R	1 728.373	535.340	582.607	
D	432.093	133.835	145.652	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P
A	405 960.53	3	135 320.18	15.32	0.003 2
B	67 005.82	3	22 335.27	2.53	0.153 8
C	54 444.00	3	18 148.00	2.05	0.207 8
误差	52 994.01	6	8 832.33		
总变异	580 404.36				

表 4 西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的作用 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of crocetin on nonenzymatic glycosylation of protein in vitro ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

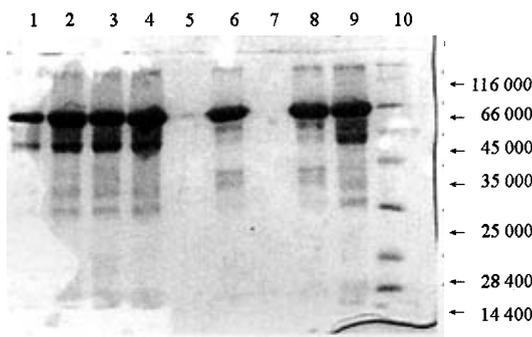
组别	剂量	荧光值
无糖	—	184.13 ± 39.77
无蛋白	—	146.47 ± 32.26*
模型	—	375.03 ± 87.36**
西红花酸	1 × 10 <sup>-6</sup> mol · L <sup>-1</sup>	202.47 ± 52.65△△
	5 × 10 <sup>-7</sup> mol · L <sup>-1</sup>	258.68 ± 65.81△△
	1 × 10 <sup>-7</sup> mol · L <sup>-1</sup>	352.29 ± 88.89
葛根素	1 mg · mL <sup>-1</sup>	189.87 ± 4.33△△

与无糖组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

与模型组比较: △△P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs no-glucose group

△△P<0.01 vs model group



1~3-西红花酸 (1 × 10<sup>-6</sup>, 5 × 10<sup>-7</sup>, 1 × 10<sup>-7</sup> mol/L) 组  
 4-无药组 (模型组) 5-西红花酸 (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L) 无蛋白组  
 6-西红花酸 (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L) 无糖组 7-无蛋白组 8-无糖组  
 9-葛根素 (1 mg/mL) 组 10-Marker  
 1-3-crocetin (1 × 10<sup>-6</sup>, 5 × 10<sup>-7</sup>, and 1 × 10<sup>-7</sup> mol/L) groups  
 4-no-drug group (model group) 5-crocetin (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L)  
 without protein group 6-crocetin (1 × 10<sup>-6</sup> mol/L) without  
 glucose group 7-no-protein group 8-no-glucose group  
 9-puerarin (1 mg/mL) group 10-Marker

图 1 SDS-PAGEs 图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of SDS-PAGEs

(AGEs)<sup>[3]</sup>。AGEs 在组织中形成和沉积后,引起组织的老化和功能衰退,在晶状体表现为白内障,在结缔组织表现为组织弹性降低、硬度增加,血管基底膜的糖基化则与老年性血管病变和糖尿病微血管病变有关。低密度脂蛋白 (LDL) 的糖基化修饰与高血脂症、糖尿病心血管并发症有密切关系。在糖尿病患者,糖基化的速度与正常人相比大大加快,与糖尿病微血管并发症密切相关<sup>[13]</sup>。AGEs 还可通过与内皮细胞、单核巨噬细胞等细胞膜上的特异性受体结合而引起细胞因子、激素、氧自由基等可溶性信号物质的改变,导致多种蛋白质基因表达水平的改变<sup>[13]</sup>,对机体造成极大的伤害。

本实验研究了 BSA 质量浓度、葡萄糖质量浓度及温孵时间对体外蛋白质非酶糖基化的影响,根据 3 因素 4 水平正交设计表设计 16 组实验,并将实验结果进行统计学处理,选出了最适条件,结果与有关报道一致<sup>[3,11]</sup>。

本室研究发现,西红花酸对心血管系统具有广泛的药理活性,对氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 及其他各种氧化应激所致的损伤具有明显的保护作用<sup>[14]</sup>。也有报道,西红花酸具有与蛋白结合,从而保护蛋白质避免氧化的作用<sup>[15]</sup>。本研究发现西红花酸可以明显降低体外蛋白质非酶糖基化系统的荧光值,SDS-PAGEs 结果也表明西红花酸各用药组糖化蛋白明显减少,提示其可能对体外的非酶糖基化

重排生成 Amadori 产物,再降解成为 α-酮醛复合物,它比单糖更容易与蛋白质反应,经 Mailard 反应生成棕褐色、具有荧光性的糖基化终末产物

反应具有抑制作用。非酶糖基化作用与心血管系统疾病密切相关,因此推测西红花酸对非酶糖基化反应的抑制作用可能是其具有广泛心血管药理活性的原因之一。但西红花酸对于体内的非酶糖基化的影响及细胞水平的作用,以及其作用机制等<sup>[16,17]</sup>还有待进一步探索。

References:

[1] Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking [J]. *Science*, 1986, 232(27): 1629-1632.  
 [2] Zhu B H, Guan Y Y. Diabetes complications and PKC [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(1): 4-6.  
 [3] Xu Y. MAPK cascade and diabetes complications [J]. *Foreign Med Sci; Endocrinol* (国外医学:内分泌学分册), 2001, 21(1): 8-10.  
 [4] Han C, Pan J Q. Pharmacodynamic study of Chinese traditional medicine of nonenzymatic glycosylation inhibitor [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2000, 9(11): 749-752.  
 [5] Zheng N. Glycation and lipoxidation end products and carbonyl stress [J]. *Foreign Med Sci; Endocrinol* (国外医学:内分泌学分册), 2002, 22(1): 37-40.  
 [6] Yu W P, Qian Z Y, Xu G L, et al. Effects of crocetin on  $[Ca^{2+}]_i$  change in myocardium cell induced by  $H_2O_2$  [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 68-71.  
 [7] Shen X C, Qian Z Y. Effect of crocetin on ATPase and hydroxyproline in myocardial hypertrophy rat induced by overload pressure [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 534-537.  
 [8] Rao S Y, Qian Z Y. Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac

myocytes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(4): 427-429.  
 [9] Xi L, Qian Z Y, Shen X C, et al. Crocetin prevents dexamethasone-induced insulin resistance in rats [J]. *Planta Med*, 2005, 71: 1-6.  
 [10] Sui L R, Hou F Y, Miao C S, et al. Inhibitory effects of some Chinese herb components on nonenzymatic glycosylation *in vitro* [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci* (白求恩医科大学学报), 1998, 24(6): 585-586.  
 [11] Cheng M F, Xiao J, Zhou L N, et al. Nonenzymatic glycation of protein *in vitro* and its inhibition by aminoquanidin or metformin [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海医科大学学报), 1998, 25(1): 35-37.  
 [12] Ge Y, Zhang J Q, Zhou Y P. The inhibitory effects of some Chinese herbs or its components on albumin nonenzymatic glycosylation [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1995, 16(4): 333-336.  
 [13] Neeper M, Schmidt A M, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(21): 14998-15004.  
 [14] Yu W P, Qian Z Y, Xu G L, et al. Effects of crocetin on the myocardial cell damages due to oxidative stress [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(5): 452-455.  
 [15] Martin G, Goh E, Neff A W. Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on *Xenopus* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(7): 959-964.  
 [16] Abe R, Shimizu T, Sugawara H, et al. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(2): 461-467.  
 [17] Brodsky S V, Gealekman O, Chen J, et al. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen [J]. *Circ Res*, 2004, 94(3): 377-384.

## 湖北贝母生物碱单体的镇咳、祛痰和平喘作用

张勇慧<sup>1</sup>, 阮汉利<sup>1</sup>, 皮慧芳<sup>1</sup>, 蔡金艳<sup>1</sup>, 曾凡波<sup>1</sup>, 赵 薇<sup>2</sup>, 吴继洲<sup>1\*</sup>

(1. 华中科技大学同济药学院, 湖北 武汉 430030; 2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430071)

湖北贝母 *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C.

Hsia 收载于《中国药典》2000 年版一部中,是仅次于浙贝母的第二大贝母主流品种。在药理研究方面,熊玮等<sup>[1]</sup>初步研究表明其乙醇提取物对多种平滑肌有明显松弛作用,对豚鼠有平喘作用,能提高小鼠耐受常压缺氧能力,其总生物碱对平滑肌的作用、对猫血压及心肌的作用与阿托品相似。本课题组通过系统的镇咳、祛痰、平喘药效学筛选,发现湖北贝母呼吸系统的药效学活性部位在总生物碱,并对其提取工艺进行了优化。本实验研究湖北贝母中各生物碱单体在等剂量条件下的镇咳、祛痰、平喘活性,期望能够寻找到一种天然、高效、低毒的镇咳、祛痰、平喘

药物。

### 1 材料与仪器

1.1 动物:昆明种小鼠,雌雄各半,体重(20±2)g;豚鼠,体重 150~220 g,均由本校实验动物中心提供。

1.2 仪器:402 型超声雾化器,超声波清洗器。

1.3 药物:湖北贝母生物碱单体鄂贝甲素、鄂贝乙素、浙贝甲素、浙贝乙素、湖贝甲素苷、湖贝甲素、鄂贝新均由吴继洲教授提供,均为色谱纯。湖北贝母总生物碱(总碱)系从湖北贝母中采用常规溶剂法直接提取,生药材中的质量分数为 0.49%,主要成分为浙贝乙素、湖贝甲素等 11 种生物碱单体。采用等

收稿日期:2004-10-24

基金项目:湖北省科技厅重大社会发展基金资助项目(972P1102)

作者简介:张勇慧,男,博士,副教授,主要从事天然活性成分及中药新药开发研究。

\* 通讯作者 吴继洲 Tel: (027) 83692739