

龙葵碱对 S_{180} 小鼠红细胞膜唾液酸和封闭度的影响

季宇彬, 万梅绪, 高世勇, 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 S_{180} 小鼠红细胞膜唾液酸 (SA) 水平和红细胞膜封闭度的影响。方法 采用比色法测定 S_{180} 荷瘤小鼠的红细胞膜表面的 SA 水平和封闭度。结果 龙葵碱能显著升高 S_{180} 小鼠红细胞膜表面的 SA 水平和增加红细胞膜的封闭度, 差异显著 ($P < 0.05$)。结论 龙葵碱可能是通过增加红细胞膜表面的 SA 水平和增加封闭度来达到抗肿瘤作用的。

关键词: 龙葵碱; S_{180} 小鼠; 红细胞膜唾液酸; 红细胞膜封闭度

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)07-1052-02

Effect of *Solanum nigrum* total alkaloid on sialic acid and blocking degree of erythrocyte membrane in S_{180} mice

JI Yu-bin, WAN Mei-xu, GAO Shi-yong, ZOU Xiang

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

Abstract: Objective To study the effect of *Solanum nigrum* total alkaloid (SNTA) on sialic acid (SA) and blocking degree of erythrocyte membrane in S_{180} tumor-bearing mice. **Methods** Using chromatometry to determine the erythrocyte membrane sialic acid and erythrocyte membrane blocking degree. **Results** SNTA could increase erythrocyte membrane sialic acid level and heighten erythrocyte membrane blocking degree in S_{180} tumor-bearing mice significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition on tumor of SNTA can be accomplished through improving erythrocyte membrane sialic acid and erythrocyte membrane blocking degree.

Key words: *Solanum nigrum* L. total alkaloid (SNTA); S_{180} tumor-bearing mice; erythrocyte membrane sialic acid; erythrocyte membrane blocking degree

龙葵碱是从茄科茄属植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 中提取出来的一种生物碱。前期研究结果表明龙葵碱能显著延长 H_{22} 荷瘤小鼠的生存时间, 并能显著降低 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性及膜蛋白水平^[1], 明显降低 H_{22} 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度^[2], 还可通过影响荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 水平来实现抗肿瘤作用^[3]。在前期实验的基础上发现, 龙葵碱能明显降低红细胞免疫黏附肿瘤细胞的花环率^[4], 从而增强红细胞的免疫黏附能力。因此, 本实验从红细胞的免疫角度进一步观察龙葵碱对红细胞膜上唾液酸 (SA) 和封闭度的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物与瘤株: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 由哈尔滨医科大学动物中心提供, 许可证号

001010006。瘤株由哈尔滨肿瘤医院肿瘤研究所提供。

1.2 药品及试剂: 龙葵碱 (由黑龙江省药品检验所提供, 质量分数 > 99.9%); 5-氟尿嘧啶 (上海忠骅化工有限公司, 批号 05-06-33); DPH (Sigma 公司提供); 考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒、SA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 皂素 (上海化学试剂采购供应站, 批号 86-12-22)。

1.3 仪器: 752 可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司制造; 水平高速离心机, 北京医用离心机厂制造; 恒温水浴箱, 厦门医疗电子仪器厂制造; 低温高速离心机, 美国 Beckman 公司制造; 超净工作台, 苏州净化设备厂制造。

2 方法

2.1 分组: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 为对照组、5-氟尿嘧啶 (30 mg/kg) 组、

收稿日期: 2005-12-10

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 (2004AFQJ035)

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。

Tel: (0451) 84866001 Fax: (0451) 84866001 E-mail: sygao2002@162.com

龙葵碱低、中、高剂量 (1.1、2.2、4.4 mg/kg) 组。

2.2 模型建立及给药: 无菌条件下, 取接种生长良好的 S₁₈₀ 荷瘤小鼠瘤株, 在超净工作台上抽取腹水, 在冰浴条件下, 以生理盐水 1:4 稀释、混匀制成肿瘤细胞悬液 (5×10⁶/mL, 肿瘤细胞混悬液应为乳白色半透明状态, 若有血性腹水不可使用)。按每只 0.2 mL 接种于各组小鼠右侧前肢下。接瘤 24 h 后, 各组 ip 给药, 对照组按相同体积 ip 生理盐水, 无菌条件下连续给药 7 d。次日处死动物测定各项指标。

2.3 SA 水平的测定: 按试剂盒方法进行膜蛋白定量后, 按试剂盒方法测定 SA。

2.4 红细胞影泡的制备

2.4.1 不封闭影泡的制备: 给药 7 d 后次日小鼠眼球取血, 肝素抗凝, 在水平高速离心机下 3 000 r/min 离心 10 min, 以生理盐水 (1:3) 洗涤 2 次, 1:1 悬浮在生理盐水中, 得到红细胞悬液, 按 1:30 加入预冷的双蒸水或 5P 8.4 的等渗磷酸缓冲液 (PBS), 4℃ 下溶血, 过夜, 制成红细胞溶血液。4℃ 下以 2 000×g 离心 40 min, 弃上清液, 用 5P 8.4 PBS 洗涤 3 次, 最后悬浮在一定量 PBS 中。即制成影泡悬浮液。

2.4.2 封闭影泡的制备: 影泡悬浮液在 37℃ 下水浴 1 h, 可获得封闭影泡。

2.5 封闭度的测定及计算: 按 Zamudio 法^[5]进行, 具体操作及计算方法参考文献方法^[2]。

2.6 数据处理: 用 SPSS 11.0 软件处理, 各组数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 样本比较采用方差检验。

3 结果

3.1 龙葵碱对红细胞膜 SA 水平的影响: 结果见表 1。与对照组比较, 龙葵碱低、中、高剂量组 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜表面的 SA 水平均提高, 差异显著 ($P < 0.05$); 阳性对照 5-氟尿嘧啶组红细胞膜表面 SA 也有提高。

3.2 龙葵碱对红细胞膜封闭度的影响: 结果见表 1。与对照组比较, 龙葵碱低、中、高剂量组均能显著提高 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜表面的封闭度 ($P < 0.05$), 且随着剂量的增加, 封闭度也明显升高。阳性对照 5-氟尿嘧啶也有明显升高封闭度的作用。

4 讨论

红细胞膜 SA 的减少, 导致红细胞免疫活性的降低。同时, SA 的减少促进红细胞的老化, 使红细胞凝集性、胞膜的脆性增加, 细胞崩解破裂、数量减少, 从而影响红细胞的正常生理生化功能, 可能导致

表 1 龙葵碱对 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜 SA 水平和封闭度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of SNTA on SA level and blocking degree of RBC membrane in S₁₈₀ mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SA/(mmol·L ⁻¹)	封闭度/%
对照	—	0.016 5±0.001 7	49.37±0.89
5-氟尿嘧啶	30	0.019 7±0.002 1*	57.46±0.96*
龙葵碱	1.1	0.020 1±0.005 6*	53.86±1.24*
	2.2	0.021 9±0.001 9*	59.77±1.36*
	4.4	0.021 4±0.002 3*	61.53±1.16*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

肿瘤病人常伴有贫血的发生。由于 SA 的减少, 使其不能有效地清除循环免疫复合物 (CIC), 致使大量 CIC 沉积血管基, 最终激活补体造成免疫损伤^[6~8]。本实验证明龙葵碱升高了红细胞膜表面的 SA, 这可能是龙葵碱抗肿瘤的作用机制之一。

红细胞封闭度是测定红细胞重新封闭能力的指标, 红细胞封闭度的改变即可体现出红细胞膜功能的改变。本实验结果表明龙葵碱对红细胞膜的封闭度具有升高作用, 说明龙葵碱可增加荷瘤小鼠红细胞膜的重新封闭能力, 增加红细胞膜的稳定性, 改善红细胞膜的结构和功能, 从而提高红细胞的免疫能力。

References:

- [1] Ji Y B, Wang S H, Gao S Y, et al. Effect of *Solanum nigrum* total alkaloid on fluidity and membrane protein level of tumor cell in H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 239-241.
- [2] 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.
- [3] Ji Y B, Wang H L, Gao S Y. Effect of solanine on DNA and RNA in tumor cell of tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(8): 1200-1202.
- [4] Ji Y B, Wan M X, Gao S Y, et al. Effect of *Solanum nigrum* alkaloid on polysaccharide erythrocyte membrane immune [J]. *J Harbin Univ Comm; Nat Sci* (哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2006, 22(3): 23-25.
- [5] Zamudio I, Cellino M, Canessa F M. The relation between membrane structure and NADH: (acceptor) oxidoreductase activity of erythrocyte ghosts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1969, 129(1): 336-345.
- [6] Stevenson R A, Huang J A, Studdert M J, et al. Sialic acid acts as a receptor for equine rhinitis A virus binding and infection [J]. *J Gen Viral*, 2004, 85(9): 2535-2543.
- [7] Ji Y B, Zou X, Ji C F, et al. Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S₁₈₀ mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(8): 8.
- [8] Feijoo C C, Rodriguez B F J, Paez de la C M, 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.