

药,人参中成分复杂。人参皂苷是人参的主要活性成分,属于三萜类物质,在结构上具有类似 GC 样的甾环结构。人参在抗应激、调节免疫等方面作用有类似 GC 样作用。先前的研究发现,人参茎叶总皂苷在体外能够增强地塞米松诱导的 GR 受体特异性荧光素酶报告基因的表达^[6],进一步的研究发现,这种作用可能是通过其抑制地塞米松对 GRmRNA 以及蛋白的下调作用而实现的^[7]。人参茎叶总皂苷是多苷元的复合物,不同的人参单体皂苷的作用及其机制也不完全一致。本课题组利用双荧光素酶报告基因检测方法,以地塞米松作为参照,观察了人参二醇以及三醇皂苷单体 Rb₁、Re、Rg₁、Rg₃对 GR 报告基因的诱导表达,结果显示,G-Rg₁可特异性诱导 GR 报告基因表达,具有剂量依赖性;并且 G-Rg₁作用 HL-7702 细胞后,细胞 GR 蛋白表达明显下降,本实验结果初步显示 G-Rg₁具有 GC 样的活性,此结果可能对发现人参以及人参皂苷新的药理学作用以及作用靶点奠定一定的实验基础。

References:

- [1] Wang B X. *Ginseng Research* (人参的研究) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1985.
- [2] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72 (5): 248-250.
- [4] Meier C A. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors [J]. *J Recept Sign Transd Res*, 1997, 17(1-3): 319-335.
- [5] Hoeck W, Rusconi S, Groner B. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(24): 14396-14402.
- [6] Li Y, Li M, Wang X, et al. Experimental study on effect of ginsenosides of ginseng stem and leaf in enhancing the transactivation of glucocorticoid receptor induced by Dexamethasone *in vitro* [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(8): 710-713.
- [7] Ling C Q, Li Y, Zhu X Y, et al. Ginsenosides may reverse the Dexamethasone-induced down-regulation of glucocorticoid receptor [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 140: 203-209.

洋金花有效部位及其组分对二甲基亚砷损伤的中国仓鼠卵巢细胞的保护作用

唐 玲¹, 王秋红¹, 杨炳友¹, 肖洪彬¹, 孙艳萍², 匡海学^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 北京大学中国药物依赖性研究所, 北京 100083)

摘要:目的 观察洋金花不同提取物(有效部位、醉茄甙内酯组分和黄酮组分)对二甲基亚砷(DMSO)损伤的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的保护作用。方法 常规传代培养 CHO 细胞,采用噻唑蓝(MTT)法和乳酸脱氢酶(LDH)法测定细胞活性。结果 3% DMSO 与 CHO 细胞共同孵育 24 h 后,经 MTT 法检测细胞存活率明显下降。洋金花有效部位(10~80 μg/mL)剂量依赖性增加细胞活性;洋金花醉茄甙内酯组分(30~120 μg/mL)对 DMSO 的细胞损伤作用无明显影响,而洋金花黄酮组分(2.5~20 μg/mL)呈剂量依赖性减轻 DMSO 对细胞的损伤作用。4.5% DMSO 与 CHO 细胞共同孵育 24 h 后,细胞 LDH 的漏出率明显增加。洋金花有效部位(10~80 μg/mL)、洋金花醉茄甙内酯组分(30~120 μg/mL)和洋金花黄酮组分(2.5~20 μg/mL)均不能降低细胞 LDH 的漏出率。结论 洋金花中的黄酮组分可以减轻 DMSO 的细胞毒性,此种药理作用可能与改善细胞线粒体的功能有关,而对细胞膜的损伤无明显保护作用。

关键词:洋金花;中国仓鼠卵巢(CHO)细胞;二甲基亚砷(DMSO);醉茄甙内酯;黄酮组分(FC)

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)12-1826-06

Protective effects of active fraction and constituents from *Flos Daturae* on Chinese hamster ovary cells injured by dimethyl sulfoxide

TANG Ling¹, WANG Qiu-hong¹, YANG Bing-you¹, XIAO Hong-bin¹,
SUN Yan-ping², KUANG Hai-xue¹

收稿日期:2006-03-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371736)

作者简介:唐 玲(1977—),女,黑龙江省哈尔滨市人,黑龙江中医药大学博士研究生,主要从事中药复方药效物质基础及其作用机制研究。E-mail: tangyuling6688@163.com

* 通讯作者 匡海学 Tel: (0451) 82110803 Fax: (0451) 82110803 E-mail: hxkuang@hotmail.com

(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150040, China; 2. National Institute on Drug Dependence, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To observe the protective effects of various extracts from *Flos Daturae* (FD), including active fraction (AF-FD), withanolides constituents (WC-FD), and flavonoids constituents (FC-FD) on Chinese hamster ovary (CHO) cells against cytotoxicity induced by DMSO. **Methods** The survival rate of CHO cells was examined by MTT assay and LDH leakage assays. **Results** Using MTT assay, coincubation of CHO cells with 3% DMSO for 24 h resulted in a significant reduction of survival rate of CHO cells. AF-FD was tested in a range of 10—80 $\mu\text{g/mL}$ to improve the survival rate of CHO cells in a dose-dependent manner. FC-FD (2.5—20 $\mu\text{g/mL}$), but not WC-FD (30—120 $\mu\text{g/mL}$), could significantly relieve the injury induced by 3% DMSO in CHO cells. In the measurement of LDH leakage, coincubation of CHO cells with 4.5% DMSO for 24 h obviously increased LDH release. However, all the compounds tested, including AF-FD (10—80 $\mu\text{g/mL}$), WC-FD (30—120 $\mu\text{g/mL}$), and FC-FD (2.5—20 $\mu\text{g/mL}$) had no effect on LDH leakage induced by 4.5% DMSO. **Conclusion** The findings suggest that the FC-FD may protect CHO cells from DMSO cytotoxicity assessed by MTT assay, which may be associated with improving mitochondrial function, but not protecting the membrane injury of CHO cells.

Key words: *Flos Daturae* (FD); Chinese hamster ovary (CHO); dimethyl sulfoxide (DMSO); withanolides constituents (WC); flavonoids constituents (FC)

洋金花 *Flos Daturae* 为茄科植物白花曼陀罗 *Datura metel* L. 的干燥花,药用历史悠久。洋金花性味辛、温,具有较强的药理活性,可以平喘止咳、镇痛解痉。临床上广泛用于慢性气管炎^[1]、软组织损伤^[2]、银屑病^[3,4]等的治疗。洋金花主要活性成分为生物碱、黄酮^[5]以及醉茄甙内酯类化合物^[6]。本实验室从洋金花 70% 乙醇提取物中得到有效部位,进一步分离获得醉茄甙内酯组分和黄酮组分。二甲基亚砷 (DMSO) 的细胞生物活性较为复杂,可以影响细胞的增殖和分化^[7];高浓度时能够诱导细胞的程序性死亡^[8],具有明显的细胞毒性作用。本研究在建立了 DMSO 细胞损伤模型的基础上,观察了洋金花有效部位、黄酮组分以及醉茄甙内酯组分对 DMSO 细胞毒性的影响。

1 材料

1.1 药物:洋金花药材购于河北省安国药材批发市场,并经黑龙江中医药大学药学院生药学教研室王振月教授鉴定。

将洋金花用 70% 乙醇回流提取后,采用稀酸浸取乙醇提取物,将此酸溶液进行阳离子交换树脂柱色谱分离。对阳离子交换树脂柱色谱流出液进行大孔吸附树脂柱色谱分离,再用 50% 乙醇洗脱,得洋金花有效部位 (占生药量的 1.5%)。进一步将此有效部位用 Sephadex LH-20 柱色谱法分离,分别得到醉茄甙内酯组分 (含醉茄甙内酯类化合物 91%) 和黄酮组分 (含黄酮类化合物 96%)。其中黄酮组分占洋金花有效部位的 55%。

1.2 细胞系:中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞由北京大

学中国药物依赖性研究所梁建辉研究员提供。

1.3 主要试剂:DMEM 培养基为 Hyclone 产品,噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司,乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒购自北京北化康泰临床试剂有限公司,胎牛血清购自天津市财慧生化制品厂,其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养:CHO 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,同时加入 100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中全湿培养,2~3 d 换液 1 次。

2.2 MTT 法检测细胞活性:在 24 孔培养板中接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的 CHO 细胞,每孔 1 mL,培养 48 h,细胞处于亚融合状态。加入不同体积分数 (0、0.75%、1.5%、3%、6%、12%) DMSO 孵育 24 h,每孔加入 MTT 液 50 μL ,终质量浓度为 250 mg/L,于 37℃、50% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h,然后于室温下每孔加入酸性异丙醇 2 mL,吹打细胞至 MTT 活细胞还原产物甲臜完全溶解,振荡混匀后,于 570 nm 处测吸光度 (A) 值,计算细胞存活率 (细胞存活率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$)。

在亚融合状态的 CHO 细胞中先加入 3% DMSO,再加入洋金花有效部位 (10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 或醉茄甙内酯组分 (30、60、120 $\mu\text{g/mL}$) 或黄酮组分 (2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 培养 24 h,采用 MTT 法测定细胞活性。

选择两块 24 孔培养板,接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的 CHO 细胞,每孔 1 mL,培养 48 h 待细胞处

于亚融合状态后,一块板加入 3% DMSO;另一块板同时加入 3% DMSO 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位共同孵育,于 0、6、12、18、24、30 h 采用 MTT 法测定细胞活性。

2.3 LDH 活性测定:在培养 48 h 的 CHO 细胞中加入 DMSO (2.25%、4.5%、9%) 继续培养 24 h,然后按 LDH 试剂盒说明操作,分别测定细胞培养液和细胞裂解液中 LDH 活性。测定细胞裂解液中 LDH 活性时,先用 1% Triton X-100 裂解细胞。计算细胞 LDH 漏出率 [LDH 漏出率 = 培养液中 LDH 活性 / (培养液中 LDH 活性 + 裂解液中 LDH 活性) $\times 100\%$]。

在亚融合状态的 CHO 细胞中先加入 4.5% DMSO,再加入洋金花有效部位 (10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 或醉茄甙内酯组分 (30、60、120 $\mu\text{g/mL}$) 或黄酮组分 (2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 培养 24 h,然后测定 LDH 的活性。

2.4 统计方法:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), LSD 检验进行组间两两比较。

3 结果

3.1 洋金花有效部位对 DMSO 损伤 CHO 细胞存活率的影响:CHO 细胞在 24 孔培养板中孵育 48 h 后,细胞处于亚融合状态。加入不同体积分数 (0.75%~12%) DMSO,孵育 24 h。采用 MTT 法测定细胞活性。结果表明,细胞的存活率随着 DMSO 体积分数的增加显著降低,3% DMSO 使 CHO 细胞的活性降低了 14.18%,6% DMSO 使其降低了 53.02%,12% DMSO 使其降低了 76.59%。与空白对照组相比差异具有显著性,根据上述实验结果,选择 3% DMSO 作为细胞损伤的体积分数。

表 1 结果显示,3% DMSO 细胞损伤组 (模型组) 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$),说明 3% DMSO 能明显降低细胞活性,而且 3% DMSO 对 CHO 细胞产生损伤的模型稳定,可以重复。在 3% DMSO 损伤因子存在下,加入 10~80 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位,结果表明,洋金花有效部位各组呈剂量依赖性地增加细胞活性,其中 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 组和模型组比较差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001),说明洋金花有效部位从 20 $\mu\text{g/mL}$ 起对细胞损伤就有明显的保护作用。其中,80 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位组比对照组的细胞活性强,说明 80 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位本身就对 CHO 细胞增殖具有一定的促进作用。

为进一步观察洋金花有效部位细胞保护作用的时程变化,接种 CHO 细胞,培养 48 h 后,共同加入 3% DMSO 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位,图 1 的结果显示,18、24、30 h 与单用 3% DMSO 组比较差异显著,说明洋金花有效部位至少作用 18 h 后才对损伤的 CHO 细胞有保护作用。

表 1 洋金花有效部位对 DMSO 损伤 CHO 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

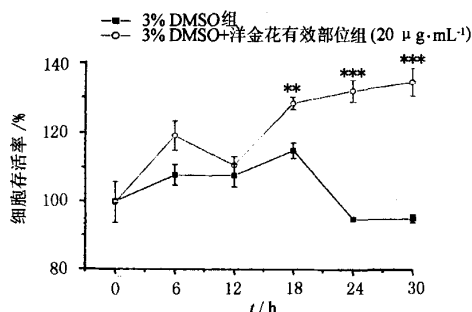
组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.0 $\pm$ 2.5
模型	—	78.1 $\pm$ 2.3**
洋金花有效部位	10	75.0 $\pm$ 2.5***
	20	100.2 $\pm$ 5.0**
	40	107.8 $\pm$ 4.0***
	80	118.2 $\pm$ 5.5***

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group



与 3% DMSO 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 3% DMSO group

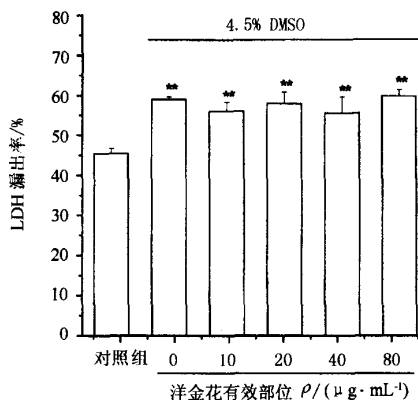
图 1 洋金花有效部位对 DMSO 损伤细胞保护作用的时程变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 1 Time course change of protective effect of AF-FD on CHO cells injured by DMSO ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

3.2 洋金花有效部位对 DMSO 损伤 CHO 细胞 LDH 活性的影响:预实验结果显示 3% DMSO 对 LDH 漏出率不产生明显影响,因此,增加 DMSO 体积分数,选择 2.25%~9% DMSO。结果可见,随着 DMSO 体积分数的增加,呈剂量依赖性地增加细胞 LDH 的漏出率。正常 CHO 细胞组 LDH 漏出率为 (64.93 $\pm$ 3.48)% ($n=4$), 2.25%、4.5%、9% DMSO 组细胞 LDH 漏出率分别为 (64.20 $\pm$ 1.01)%、(72.38 $\pm$ 3.84)% ($n=4$, $P < 0.05$)、(94.55 $\pm$ 1.10)% ($n=4$, $P < 0.001$)。DMSO 体积分数为 4.5% 时对 CHO 细胞产生了明显的损伤。

因此,在随后的有关 LDH 漏出率测定的实验中均选择 4.5% DMSO 处理细胞。

从图 2 可以看出,0 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位组与对照组相比,差异显著,说明 4.5% DMSO 能明显增加细胞 LDH 漏出率。在 4.5% DMSO 损伤因子的存在下,加入 10~80 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花有效部位后,各剂量组与 4.5% DMSO 损伤组相比,差异没有显著性 ($P>0.05$),说明洋金花有效部位 (10~80 $\mu\text{g/mL}$) 不能减轻细胞损伤时 LDH 的漏出率。



与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

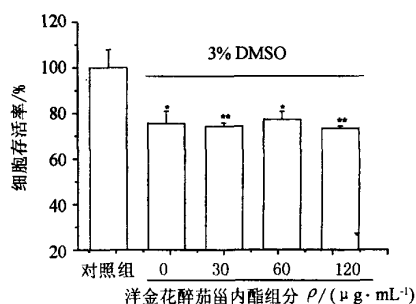
图 2 洋金花有效部位对 DMSO 损伤 CHO 细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig. 2 Effect of AF-FD on LDH leakage in CHO cells injured by DMSO ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

3.3 洋金花醉茄甙内酯组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞的影响:在 24 孔板中孵育 48 h 的 CHO 细胞处于亚融合状态,加入 30、60、120 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花醉茄甙内酯组分后继续孵育 24 h,同样采用 MTT 法和 LDH 法测定细胞活性。MTT 法测定结果表明 (图 3),30、60、120 $\mu\text{g/mL}$ 各剂量组与 DMSO 损伤组相比,未见显著性差异,说明 30、60、120 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花醉茄甙内酯组分对 DMSO 损伤的 CHO 细胞无明显保护作用。

LDH 测定结果表明 (图 4),洋金花醉茄甙内酯组分 30、60、120 $\mu\text{g/mL}$ 各剂量组与 DMSO 损伤组相比,未见显著性差异,说明 30、60、120 $\mu\text{g/mL}$ 醉茄甙内酯组分对 DMSO 损伤的 CHO 细胞 LDH 的漏出没有明显保护作用。

3.4 洋金花黄酮组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞的影响:在 3% DMSO 的存在下,加入 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花黄酮组分,培养 24 h 后,用 MTT 法测定细胞活性。结果表明,黄酮组分 (2.5~20 $\mu\text{g/}$

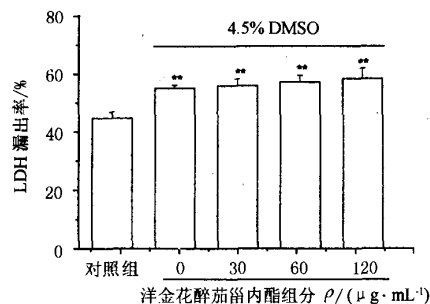


与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

图 3 洋金花醉茄甙内酯组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig. 3 Effect of WC-FD on survival rate of CHO cells injured by DMSO ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

图 4 洋金花醉茄甙内酯组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig. 4 Effect of WC-FD on LDH leakage in CHO cells injured by DMSO ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

mL) 呈剂量依赖性地增强细胞活性,其中 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 组和 3% DMSO 细胞损伤组 (模型组) 比较差异显著 ($P<0.05$),说明洋金花黄酮组分 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 有明显的保护细胞损伤作用。见表 2。

接种 CHO 细胞,培养 48 后,加入 4.5% DMSO 和 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 的洋金花黄酮组分,培养 24 h,测定 LDH 漏出率。结果显示 (表 3):与对照组比较,4.5% DMSO 组及 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花黄酮组分各剂量组 LDH 的漏出率显著性增加。然而,2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 洋金花黄酮组分各剂量组与 4.5% DMSO 组 LDH 的漏出率相比,并无显著性差异,说明洋金花黄酮组分在 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 对于 4.5% DMSO 损伤 CHO 细胞膜导致 LDH 漏出率增加无明显影响。

4 讨论

本实验结果表明,虽然 DMSO 是一种常用的有

表 2 洋金花黄酮组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)Table 2 Effect of FC-FD on survival rate of CHO cells injured by DMSO ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.0 $\pm$ 3.7
3% DMSO	—	72.5 $\pm$ 3.8***
洋金花黄酮组分	2.5	81.4 $\pm$ 3.7**
	5.0	86.4 $\pm$ 6.7*#
	10	92.5 $\pm$ 2.5##
	20	116.0 $\pm$ 5.2***#

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 与 3% DMSO 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group# $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs 3% DMSO group表 3 洋金花黄酮组分对 DMSO 损伤 CHO 细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)Table 3 Effect of FC-FD on LDH leakage in CHO cells injured by DMSO ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	LDH 漏出率/%
对照	—	44.5 $\pm$ 1.3
4.5% DMSO	—	43.9 $\pm$ 3.4**
洋金花黄酮组分	2.5	44.8 $\pm$ 2.4*
	5.0	44.2 $\pm$ 1.1*
	10	45.7 $\pm$ 1.4*
	20	42.5 $\pm$ 0.6**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

机溶剂,但其细胞生物活性却较为复杂。不同体积分数的 DMSO 显示出完全不同的细胞生物活性。0.5% DMSO 对细胞冻存和复苏具有明显的保护作用^[9]。1%~2% DMSO 可以影响细胞的生长周期,使细胞的生长停止在 G₁ 期^[10]。研究资料表明 DMSO 对血液细胞、神经瘤细胞以及结肠癌细胞具有分化诱导作用^[9]。此外,2.5% DMSO 可以诱导角质化细胞^[9]、EL-4 淋巴瘤细胞^[11]等产生凋亡。本实验观察到 0.75% 和 1.5% DMSO 对 CHO 细胞的增殖并无明显影响。增加 DMSO 体积分数至 3%,采用 MTT 法测定细胞活性,可观察到 DMSO 明显的细胞毒性作用。值得指出的是,3% DMSO 并不影响 LDH 的漏出率。从理论上讲,DMSO 作为有机溶剂对细胞膜双脂层结构的影响应该更加明显。然而,实验结果表明并不完全如此。因此,在研究 DMSO 的细胞毒性时,采用 MTT 法测定细胞活性比 LDH 法可能更加敏感。

研究资料表明线粒体内膜存在琥珀酸脱氢酶,可以将 MTT 还原为紫色甲臌^[12]。因此,采用 MTT 法测定细胞活性时,甲臌产物的多少可以间接地反

映线粒体的功能状况。本实验结果表明 3% DMSO 可明显地抑制 CHO 细胞还原生成甲臌的能力。然而,洋金花有效部位在 10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以拮抗 3% DMSO 对 CHO 细胞的抑制作用。本实验室以往的研究证明洋金花有效部位为非生物碱水溶性成分,并获得了该有效部位,在此基础上进一步分离得到醉茄甙内酯组分和黄酮组分。本实验对醉茄甙内酯组分和黄酮组分抗 DMSO 细胞损伤作用的药理学活性作了研究,结果显示黄酮组分在 2.5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以翻转 3% DMSO 对 CHO 细胞还原 MTT 生成甲臌的抑制作用,显示出较好的细胞保护作用。然而,醉茄甙内酯组分在 30~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,采用 MTT 法测定细胞活性,既未观察到细胞保护作用,也未观察到细胞毒性作用。

细胞胞浆中含有丰富的 LDH,在细胞膜通透性和完整性正常的情况下,LDH 难以从胞内漏至胞外。当细胞膜受到损伤时,LDH 的漏出率明显增加。因此,采用 LDH 测定细胞活性时,LDH 漏出率可以反映细胞膜的完整性和通透性。实验结果表明,将 DMSO 的体积分数提高到 4.5% 时,LDH 的漏出率明显增加,说明细胞膜的完整性和通透性受到明显损伤,细胞活性降低。加入洋金花有效部位 (10~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、醉茄甙内酯组分 (30~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以及黄酮组分 (2.5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 均不能有效地降低 LDH 漏出率,说明无论是洋金花的有效部位,还是醉茄甙内酯组分或黄酮组分对于 DMSO 损伤细胞膜的完整性和通透性均未显示出明显的保护作用。

本研究结果表明洋金花有效部位具有一定细胞保护的药理学活性,其主要有效成分是黄酮类化合物。黄酮组分的细胞保护作用可能与其改善细胞内线粒体的功能有关,而对细胞膜损伤的保护作用不明显。

致谢:北京大学中国药物依赖性研究所梁建辉研究员对本研究给予的支持和帮助。

References:

- [1] Liu K P. Treatment of 100 cases of chronic bronchial catarrh with *Flos Datura* tincture medication [J]. *J Chengdu Univ Traditional Chinese Medicine* (成都中医药大学学报), 1993, 16(1): 24-25.
- [2] Huang G C, Li K J, Zhu F S. Treatment of 42 cases of acute soft tissue contusion with *Flos Daturae* Plaster [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(6): 342-343.
- [3] Zhou J H, He Y X, Zhang J G, et al. Treatment of 100 cases of psoriasis clinical observation with *Flos Datura* total alkaloids injection [J]. *J Tradit Chin Med Chin Mater Med Jilin* (吉林中医药), 1986(6): 14.

- [4] The psoriasis research team of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine. Treatment psoriasis report of 242 cases with *Flos Datura*. [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 1985, 26(2): 32-33.
- [5] Pate D W, Averett J E. Flavonoids from *Datura metel* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1986, 14(6): 647-649.
- [6] Shingu K, Furusawa Y, Nohara T, et al. Solanaceous studies. XI V. New withanolides, daturametelins C, D, E, F, and G-Ac from *Datura metel* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(8): 2132-2135.
- [7] Souza Dos Santos A L, Rodrigues M L, Alviano C S, et al. *Herpetomonas samuelpessoai*: Dimethyl sulfoxide-induced differentiation is influenced by proteinase expression [J]. *Curr Microbiol*, 2003, 46: 11-17.
- [8] Greiner C, Wolfer J, Hulsmann S, et al. Bioelectrical behavior of hypoxic human neocortical tissue under the influence of nimodipine and dimethyl sulfoxide [J]. *Brain Res*, 2003, 959: 199-205.
- [9] Manabu K, Kerko I, Yohko K, et al. DMSO Induces apoptosis in SV40-transformed human keratinocytes, but not in normal keratinocytes [J]. *Cancer Lett*, 1996, 108: 185-193.
- [10] Fiore M, Zanier R, Degrassi F. Reversible G (1) arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells [J]. *Mutagenesis*, 2002, 17: 419-424.
- [11] Liu J, Yoshikawa H, Nakajima Y, et al. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1: 63-74.
- [12] Hussain R F, Nouri A M E. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 160(1): 89-96.

归苓片改善动物学习记忆功能的研究

董文心¹, 阮克锋², 顾丰华¹, 沈平壤², 李朋云¹, 林志宏²

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200437; 2. 上海中药制药技术有限公司, 上海 201203)

摘要:目的 研究归苓片(FBD)促进动物学习记忆功能的作用。方法 小鼠 ig 给予 35、70、140 mg/kg FBD, 连续 1 周, 观察 FBD 对东莨菪碱所致小鼠记忆获得障碍、亚硝酸钠所致小鼠记忆巩固不良和 45% 乙醇致小鼠记忆再现障碍的影响, 并观察 FBD 对大鼠双侧颈总动脉结扎所致的慢性脑部供血不足而产生的记忆障碍的改善作用。结果 FBD 对由东莨菪碱所致的小鼠记忆获得障碍、亚硝酸钠所致的小鼠记忆巩固不良和 45% 乙醇所致的小鼠记忆再现障碍均有明显的改善作用; 并可改善大鼠双侧颈总动脉结扎所致的慢性脑部供血不足而产生的记忆障碍。结论 FBD 可促进动物的学习记忆功能。

关键词: 归苓片(FBD); 记忆障碍; 学习记忆功能

中图分类号: R286.74

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)12-1831-05

FBD used to improve learning and memory function of animals

DONG Wen-xin¹, RUAN Ke-feng², GU Feng-hua¹, SHEN Ping-rang², LI Peng-yun¹, LIN Zhi-hong²

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China; 2. Shanghai Traditional Chinese Medicine Technology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To study on FBD (composed with *Poria cocos*, *Atractylodes macrocephala*, and *Angelica sinensis*) used to improve learning and memory function of animals. **Methods** The mice were treated by ig FBD with the doses of 35, 70 and 140 mg/kg for one week continuously. Effect of FBD on dysmnnesia of acquired learning of mice induced by scopolamine, dysmnnesia of memory retention of mice induced by NaNO₂, and dysmnnesia of reappearance of memory of mice induced by 45% ethanol were studied. Improvement for the dysmnnesia of memory due to chronic blood deficiency in brain of rats induced by ligating the carotid arteries of two sides were observed. **Results** FBD can improve the dysmnnesia of mice induced by scopolamine, NaNO₂, and 45% ethanol significantly, also dysmnnesia due to chronic blood deficiency in brain of rats induced by ligating the carotid arteries. **Conclusion** FBD has the function to improve the learning and memory function of animals.

Key words: FBD; dysmnnesia; learning and memory function

收稿日期: 2006-04-13

作者简介: 董文心(1956—), 女, 博士, 研究员, 在巴黎六大医学院获药理学硕士、博士学位, 主要从事神经药理研究。

Tel: (021) 55514666-362 Fax: (021) 65449361 E-mail: dwxnn@sina.com