

- 药), 2004, 35(6): 665-666.
- [5] Liu J, Wang B C, Peng L, et al. Structure-activity relationship of flavonoids antioxidants [J]. *J Chongqing Univ, Nat Sci* (重庆大学学报:自然科学版), 2004, 27(2): 120-124.
- [6] Chen S H. The antioxidant and structure-function relationship of flavonoids [J]. *Strait Pharm J* (海峡药理学), 1998, 10(4): 4-6.
- [7] Chen Q, Wang B C, Tang C H, et al. The relation between structure and antioxidative activity of flavanoids [J]. *J Chongqing Univ, Nat Sci* (重庆大学学报:自然科学版), 2003, 26(11): 48-55.
- [8] Mora A. Structure-activity relationship of polymethoxy-favones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40(4): 793-797.
- [9] Chen J W, Zhu Z Q, Hang K, et al. Relationship between structure and activity of eight natural flavanoids against oxidation [J]. *J East China Norm Univ, Nat Sci* (华东师范大学学报:自然科学版), 2002, 1: 91-94.
- [10] Gandow A V, Joubert E, Hansmann C F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA [J]. *Agric Food Chem*, 1997, 45: 632-638.

## 龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响

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 探讨龙葵碱对  $S_{180}$  及  $H_{22}$  荷瘤小鼠红细胞免疫功能的作用。方法 观察  $S_{180}$  荷瘤小鼠和  $H_{22}$  荷瘤小鼠的红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力, 采用 DPH 荧光探针, 用荧光偏振法测定荧光偏振度 (P), 并计算膜的微黏度 ( $\eta$ ) 研究红细胞膜脂流动性 (LFU)。结果 龙葵碱能升高  $S_{180}$  和  $H_{22}$  荷瘤小鼠的红细胞黏附肿瘤细胞的花环率, 提高两种荷瘤小鼠的红细胞膜的流动性。结论 龙葵碱可能是通过提高两种荷瘤小鼠的红细胞膜的流动性, 从而恢复荷瘤小鼠红细胞免疫功能进而达到抗肿瘤作用。

**关键词:** 龙葵碱; 红细胞免疫; 膜流动性; 荷瘤小鼠

**中图分类号:** R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2007)03-0412-03

### Effect of *Solanum nigrum* alkaloid on erythrocyte immunity function in tumor-bearing 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* alkaloid on erythrocyte immunity function. **Methods** Studying the adherence between erythrocyte immunity and tumor-cell of  $S_{180}$  and  $H_{22}$  tumor-bearing mice; By determining with fluorescence polarization (P) and accounting the micro viscosity ( $\eta$ ) with DPH as a probe the erythrocyte membrane fluidity of the  $S_{180}$  and  $H_{22}$  tumor-bearing mice could be investigated. **Results** *S. nigrum* alkaloid could increase the ratio of adherence anadem between erythrocyte and tumor-cell and promote the erythrocyte membrane fluidity of the two tumor-bearing mice. **Conclusion** The inhibition of *S. nigrum* alkaloid on tumor can be accomplished through improving the erythrocyte membrane fluidity of two tumor-bearing mice and renewing erythrocyte immunity of tumor-bearing mice.

**Key words:** *Solanum nigrum* alkaloid; erythrocyte immunity; membrane fluidity; tumor-bearing mice

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<sup>[1]</sup>; 明显降低  $H_{22}$  荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸水平和封闭度<sup>[2]</sup>; 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<sup>[3]</sup>; 研究还发现龙葵碱可提高  $S_{180}$  小鼠红细胞膜唾液酸水平及封闭度<sup>[4]</sup>。本实验进一步从红细胞免疫功能角度来观察龙葵碱的抗肿瘤作用, 并研究其可能的作用机制。

#### 1 材料

收稿日期: 2006-08-31

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 (2004AFQXJ035); 黑龙江省研究生创新科研基金项目 (YJSCX2005-134HLJ)

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。

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。S<sub>180</sub>、H<sub>22</sub>荷瘤小鼠瘤株由哈尔滨市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(5-Fu,上海旭东海普药业有限公司,批号 H31020593);DPH(Sigma 公司);考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所);戊二醛、瑞氏染色剂(黑龙江省临床检验中心)。

1.3 仪器:752 可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);水平高速离心机(北京医用离心机厂);恒温水浴箱(厦门医疗电子仪器厂);低温高速离心机(美国 Beckman 公司);水平高速离心机(北京医用离心机厂);超净工作台(苏州净化设备厂);RF-540 荧光分光光度计。

## 2 方法

2.1 分组:昆明种小鼠,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 10 只。分别为正常组,模型组,5-Fu(30 mg/kg)组,龙葵碱低、中、高剂量(1.1、2.2、4.4 mg/kg)组。

2.2 模型的建立及给药:无菌条件下,取接种生长良好的 S<sub>180</sub>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、混匀制成肿瘤细胞混悬液(5×10<sup>6</sup>/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。将 S<sub>180</sub>肿瘤细胞混悬液按每只 0.2 mL 接种于各组小鼠右侧前腋下;H<sub>22</sub>肿瘤细胞混悬液接种于各组小鼠腹腔。正常组不接种。接种 24 h 后,S<sub>180</sub>小鼠 ip 给药,H<sub>22</sub>小鼠 sc 给药。模型组按相同体积给予生理盐水,无菌条件下连续给药 7 d。正常组不给药。于停药第 2 天处死小鼠,眼眶取血,离心、洗涤制成红细胞悬液(1×10<sup>8</sup>/mL)待用。

2.3 龙葵碱对红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力的影响:小鼠肝癌 H<sub>22</sub>细胞接种于昆明种小鼠腹腔连续传代,实验时无菌抽取 7 d 龄腹腔肿瘤细胞,以 Hank's 液洗涤 2 遍,制成肿瘤细胞悬液(1×10<sup>6</sup>/mL)。取此悬液 0.1 mL 加等体积豚鼠(或人)的新鲜血液,37℃水浴 1 h,洗涤离心 2 次,弃上清液,成为血清致敏肿瘤细胞,加 0.05 mL 制备的红细胞悬液 37℃水浴 30 min,加 0.25% 戊二醛固定、涂片、瑞氏染色,肿瘤细胞蓝色,红细胞红色,一个肿瘤细胞结合 3 个以上红细胞为肿瘤红细胞花环。计算肿瘤红细胞花环百分率。

## 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,生理盐水洗涤 2 次,最后悬浮在生理盐水中,得到红细胞悬浮液;按红细胞悬浮液:预冷的双蒸水(1:30)加入预冷的双蒸水,在 4℃下溶血,过夜,制成红细胞溶血液。在 4℃、2 000×g 离心 40 min,弃上清,PBS 洗涤 3 次,最后悬浮在一定量的 PBS 中,即制成影泡悬浮液。考马斯亮蓝蛋白试剂盒测定蛋白的量。

2.4.2 细胞膜的荧光标记:取新配制的 2 mmol/L DPH 四氢喹啉液 10 μL 分别加入 10.0 mL 红细胞膜缓冲液及 10.0 mL 红细胞悬液,25℃温浴 30 min,用 PBS 液洗涤 1 次,最后将细胞悬浮于 4.0 mL PBS 液中,即得 DPH 标记的细胞膜。

2.4.3 荧光偏振度的测定<sup>[5]</sup>:细胞膜的流动性采用荧光偏振度(P)并折算微黏度(η)。本实验采用日立公司生产的 RF-540 荧光分光光度计测 P。λ<sub>e</sub> 362 nm,λ<sub>m</sub> 432 nm,狭缝 10 nm,测温 25℃,按公式计算 P 值和 η 值。最终按照公式 η=2P/(0.46-P),计算出膜脂流动性(LFU)。

2.5 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 t 检验。

## 3 结果

3.1 龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力的影响:结果见表 1。与正常组比较,S<sub>180</sub>荷瘤小鼠与 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠的红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力均有所下降;与模型组比较,龙葵碱低、中、高剂量组均能显著提高红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力(P<0.01),与正常组比较,龙葵碱低、中、高剂量组差异显著(P>0.05),即龙葵碱基本上能使红细胞免疫

表 1 龙葵碱对 S<sub>180</sub> 和 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Table 1 Effect of *S. nigrum* alkaloid on adhesive ability of erythrocyte immunity to tumour cells in S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> tumour-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	肿瘤红细胞花环率/%	
		S <sub>180</sub>	H <sub>22</sub>
正常	—	40.11±2.32**	40.11±2.32**
模型	—	7.23±1.56	8.09±2.84
5-Fu	30	35.62±4.85	36.42±2.73
龙葵碱	1.1	29.32±3.17**	31.01±0.97**
	2.2	36.78±2.93**	36.51±3.27**
	4.4	39.54±3.29**	38.43±1.92**

与模型组比较: \*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs model group

黏附肿瘤细胞能力恢复到正常的生理状态。

3.2 龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞膜流动性的影响:与正常组比较, S<sub>180</sub> 荷瘤小鼠与 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的红细胞  $\eta$  均有所升高, 即 LFU 降低; 与模型组比较, 龙葵碱

低、中、高剂量组均能降低两种荷瘤小鼠的红细胞  $\eta$ , 即提高荷瘤小鼠的红细胞 LFU, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

#### 4 讨论

表 2 龙葵碱对 S<sub>180</sub> 和 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠红细胞膜流动性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of *S. nigrum* alkaloid on membrane fluidity of erythrocyte in S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> tumour-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	S <sub>180</sub> 小鼠			H <sub>22</sub> 小鼠		
		P	$\eta$	LFU	P	$\eta$	LFU
正常	—	0.203 8 ± 0.012 6	0.543 8 ± 0.100 8	6.589 1 ± 0.016 3	0.219 5 ± 0.014 6	0.562 1 ± 0.023 4	6.442 9 ± 0.016 2
模型	—	0.245 1 ± 0.007 5	0.675 1 ± 0.015 9	4.658 2 ± 0.025 1	0.250 7 ± 0.023 4	0.692 7 ± 0.018 9	4.956 1 ± 0.061 3
5-Fu	30	0.186 9 ± 0.006 7	0.482 7 ± 0.000 7	7.994 3 ± 0.008 9*	0.194 2 ± 0.008 2	0.496 2 ± 0.008 4	7.321 1 ± 0.009 7*
龙葵碱	1.1	0.215 8 ± 0.009 1	0.536 8 ± 0.009 1	6.761 5 ± 0.018 2*	0.208 1 ± 0.017 2	0.538 6 ± 0.010 9	6.972 5 ± 0.108 4*
	2.2	0.176 2 ± 0.007 4	0.469 5 ± 0.008 4	8.116 4 ± 0.028 4*	0.189 7 ± 0.009 7	0.489 3 ± 0.021 0	8.000 4 ± 0.095 1*
	4.4	0.184 5 ± 0.000 7	0.458 3 ± 0.006 9	9.007 2 ± 0.009 7*	0.176 4 ± 0.011 9	0.468 5 ± 0.009 9	8.561 4 ± 0.126 4*

与模型组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs model group

由于红细胞结构简单, 因此在很长一段时期里, 人们认为红细胞的功能仅在于氧气及二氧化碳的体内运输功能。随着研究的不断深入, 研究发现红细胞具有免疫黏附能力, 并具有促进白细胞吞噬作用; 学者在发现红细胞有多种免疫能力后, 提出了“红细胞免疫系统”这一概念, 使得红细胞免疫学得以迅速的发展。后又有学者提出红细胞在阻止恶性肿瘤转移方面甚至比其他细胞起着更重要的作用。这些发现及以后的许多研究均证实了红细胞免疫系统是一个完整的免疫体系, 同时也是一个至关重要的免疫子系统<sup>[6-9]</sup>。

红细胞膜流动性实际上是指 LFU, 其中也包含膜中蛋白质的运动。LFU 对红细胞的形态结构、酶活性、受体活性及物质转运均有影响。大量事实证明, 许多疾病与生物膜脂的流动性变化有关, 在细胞周期的不同时期、代谢过程中、疾病条件下以及药物作用后细胞膜都会有流动性的变化, 而且发现许多疾病除实质性器官的细胞膜病变外, 常伴有红细胞膜的异常。红细胞的正常功能也与红细胞膜的流变性质有很大关系, 对细胞形态、物质运输、酶活性、抗原性及受体活性等均有影响。膜流动性增大,  $\eta$  下降, 血流流速加快, 红细胞免疫黏附肿瘤细胞的能力则会随之增强<sup>[5,10]</sup>。

本实验研究表明, 龙葵碱可增强 S<sub>180</sub> 与 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的红细胞免疫黏附肿瘤细胞的能力; 同时, 与正常组相比, 荷瘤小鼠红细胞  $\eta$  升高, LFU 下降; 在经过龙葵碱处理后, 不同荷瘤小鼠体内红细胞  $\eta$  均有不同程度地降低, 即 LFU 提高。表明龙葵碱对肿瘤的扩散和转移具有重要的作用, 提示龙葵碱可能

是通过提高红细胞的膜流动性和增强红细胞对肿瘤细胞的免疫黏附作用, 从而增强红细胞免疫功能来进一步激活整个机体免疫系统, 进而达到综合的治疗效果, 这可能是龙葵碱抗肿瘤的一个重要机制。

#### 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 H<sub>22</sub> 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 H<sub>22</sub> tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 78-81.
- [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* total alkaloid on sialic acid and blocking degree of erythrocyte membrane in S<sub>180</sub> mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(7): 1052-1053.
- [5] Ji Y B, Zou X, Ji C F, et al. Effect of aloe polysaccharide on erythrocyte membrane function of S<sub>180</sub> mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(8): 898-901.
- [6] Gangopadhyay S K, Sarkar S, Begum Z, et al. Brain tumor inhibition in experimental model by restorative immunotherapy with a corpuscular antigen [J]. *Exp Biol*, 2003, 41(8): 805-813.
- [7] Van Horsen R, Ten Hagen T L, Eggermont A M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility [J]. *Oncologist*, 2006, 11(4): 397-408.
- [8] Potselueva M M, Pustovidko A V, Kovaleva InV, et al. Cytotoxic action of polymorphonuclear leukocytes on tumor and normal cells during ascite tumor development *in vitro* and *in vivo* [J]. *Tsitologia*, 2005, 47(1): 57-63.
- [9] Murdoch W J, Van Kirk E A, Smedts A M. Complement-inhibiting effect of ovarian cancer antigen CA-125 [J]. *Cancer Lett*, 2006, 236(1): 54-57.
- [10] Gao S Y, Zhang Y J, Wang S S, et al. Effect of xianlu anticancer on polysaccharide erythrocyte manbrane sialic acid and blocking degree [J]. *J Harbin Univ Comm; Nat Sci* (哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2005, 21(4): 411-414.