

表 3 RME 与 ACE 联合使用对糖尿病小鼠餐后血糖升高的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Inhibitory effect of RME and ACE on postprandial elevation in blood glucose increasing of experimental-diabetic mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	给药后不同时间血浆葡萄糖水平/(mmol · L ⁻¹)			
		0 min	30 min	60 min	120 min
正常对照	—	4.52±0.39	10.41±1.17	7.53±1.34	5.12±0.89
模型	—	15.01±1.59**	21.27±1.94**	20.11±2.88**	15.63±1.17**
阿卡波糖	4.0	13.75±0.64	16.46±2.16△△	15.93±1.63△△	12.41±0.79
RME+ACE	4.0+4.0	15.18±1.23	15.84±1.71△△	16.49±2.02△△	16.55±1.86

与正常对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; △△ $P<0.01$ vs model group

小鼠的降血糖作用。陈震等^[10]也从桑枝水提物中分离得到 4 种多羟基生物碱。尽管桑枝的降血糖功能已被广泛研究^[11],但针对生药桑枝中多羟基生物碱成分的降血糖机制还缺乏研究。儿茶素类化合物具有明显的消除体内自由基的功能^[12],其抗糖尿病活性一直以来被广泛认为是通过降低体内的氧化压力来实现的^[13],但是儿茶素类化合物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用却很少被研究人员所关注。

本实验从对 α -葡萄糖苷酶活性具有明显抑制作用的两种生药入手,分别分离了源于桑枝的生物碱成分和源于儿茶的儿茶素成分,证实了二者无论在酶学水平、离体水平还是体内水平,不仅单独使用具有对 α -葡萄糖苷酶活性的显著抑制效果,而且联合使用上有明显优于单独使用的协同抑制效果。这为探讨生药桑枝和儿茶单味药的降糖机制和降糖中药配伍研究作出了探索性工作。

References:

[1] Bai G, Wang D L, Cao X L, *et al.* Screening α -glucosidase inhibitors in traditional Chinese medicines [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai; Nat Sci* (南开大学学报:自然科学版), 2004, 37(3): 98-102.
[2] Wu Y M, Zou Y X, Liao S T, *et al.* Investigation on the hypolipidemic effect of *Ramulus mori* in hyperlipidemia mice [J]. *Acta Sericol Sin* (蚕业科学), 2005, 31(3): 348-350.
[3] Feng Y, Li Y, Fu R J, *et al.* Study on quality standard of *Catechu* and its extract [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),

2004, 26(4): 325-328.
[4] Bai G, Yang W B, Geng P, *et al.* Compound prescription inhibiting the activity of α -glucosidase and its usage [P]. CN, 2004 10018677.4, 2006-4-12.
[5] Geng P, Zhu Y Y, Yang Y, *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin from mulberry resources and analysis of their bioactivities [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(8): 1151-1154.
[6] Zhang G A, Zhu Y L. New technics in extracting (+)-catechin [P]. CN: 85102818, 1986-12-31.
[7] Geng P, Zhu Y Y, Yang Y, *et al.* Analysis and bioactivity detection of the α -glucosidase inhibitors in the total alkaloid from *Feculae bombycis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(Supp): 159-162.
[8] Asano N, Tomioka E, Kizu H, *et al.* Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis* [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 253: 235-245.
[9] Kimura M, Chen F. Antihyperglycemic effects of *N*-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozocin induced diabetic mice [J]. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, 1995, 12(3): 214-219.
[10] Chen Z, Wang R Y, Zhu L L, *et al.* Researches on chemical components in aqueous extract from *Ramulus mori* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(7): 502-503.
[11] He X M, Liao S T, Liu J P. Research progress on nutrient and functional components and pharmacology of mulberry [J]. *Acta Sericol Sin* (蚕业科学), 2004, 30(4): 390-394.
[12] Zhang L, Duan H J, Fang H J, *et al.* Studies on analysis of catechins and alkaloids in tea by HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(12): 920-924.
[13] Rizvi S I, Zaid M A, Anis R, *et al.* Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(1-2): 70-75.

守宫多糖对淋巴细胞增殖与细胞毒作用的影响

闫祝辰¹, 张晓宇², 吴雄志¹, 谢广茹¹, 陈 丹³

(1. 天津市肿瘤医院 中西医结合科, 天津 300060; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410007;

3. 天津市传染病医院, 天津 300190)

守宫为壁虎科动物无蹼壁虎 *Gekko swinhoana*

Gunther 或其他几种壁虎除去内脏的全体, 是传统

收稿日期: 2007-01-02

作者简介: 闫祝辰(1971—), 男, 天津人, 医学硕士, 主治医师, 主要研究方向为中西医结合肿瘤治疗。E-mail: yanzc@126.com

的咸寒软坚中药,具有祛风、定惊、散结、解毒的功效^[1]。长久以来,守宫被用于治疗瘰癧瘤,是一味重要的抗癌动物药。国内诸多医家使用守宫治疗恶性肿瘤取得了很好的疗效。研究表明:鲜壁虎冻干粉可以抑制 H_{22} 小鼠肿瘤生长,诱导肿瘤细胞凋亡及血管生成^[2]。

传统中医认为守宫咸寒有小毒。药学研究发现守宫含有马蜂毒相似的有毒物质及组织胺类物质、脂肪油、多种氨基酸、微量元素、维生素等^[3~5]。但这些成分的发现不足以系统阐明守宫的抗肿瘤机制及具体作用靶点,而守宫的毒性作用又限制了其临床大剂量应用,故守宫的日用量一般仅 1.5~4.5 g。国内外至今未能从守宫里分离出其抗肿瘤、抗病毒与免疫调节的有效成分。大量研究表明多糖物质对正常的人体细胞无毒。经过前期大量研究,笔者从守宫中分离得到硫酸守宫多糖,发现该成分可以抑制肝癌细胞 BEL-7402 的增殖并诱导分化,而对正常肝细胞 L-02 的生长发育几乎没有影响^[6],起到了很好的增效减毒作用。本实验进一步研究守宫多糖体外对淋巴细胞增殖及细胞毒作用的影响,为探讨守宫抗肿瘤作用物质基础提供依据。大量研究表明,多糖具有抗病毒、抗肿瘤与免疫调节作用。多糖可以活化巨噬细胞,促进淋巴细胞有丝分裂,增强 NK 细胞与 LAK 细胞活性,增强 T_D 细胞功能,诱生 IL-2、IL-12、TNF 等细胞因子^[1~3]。目前国内外从天然原料药里分离得到的绝大多数为植物多糖和微生物多糖。笔者从中药守宫中分离得到守宫多糖 (gecko polysaccharide),本研究将进一步探讨守宫多糖体外淋巴细胞抗肿瘤免疫的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品:守宫多糖(质量分数>95%)由天津市肿瘤医院中西医结合科副主任医师吴雄志博士提供(其分离制备工艺已申请国家专利,专利号:CN1676533A)^[7]。肝癌 BEL-7402 细胞由天津市肿瘤医院中心实验室提供。RPMI-1640 培养液购自北京天润普达生物科技有限责任公司。PBS 磷酸盐缓冲液购自北京中山金桥生物技术有限公司。 CO_2 恒温培养箱 (Thermo HEPA class 100)。

1.2 肝癌细胞冻融液的制备:以肝癌 BEL-7402 细胞冻融液为肿瘤抗原。取 BEL-7402 细胞 2×10^6 /mL (以 PBS 液调整细胞数),经 $-70^\circ C$ (30 min)、 $37^\circ C$ (5~10 min) 反复冻融 3 次,镜检无细胞,冻融液培养无细胞生长,即得 BEL-7402 肿瘤相关抗原,保存于 $-20^\circ C$ 备用。

1.3 密度梯度法分离外周血单核细胞 (PBMC):抽取健康人外周血 20 mL,立即注入经肝素抗凝试管,加 PBS 20 mL 稀释,缓慢加入到有淋巴细胞分离液 40 mL 的离心管中, $2\,000\text{ r/min}$ 离心 20 min,轻轻吸出中间白色层细胞,PBS 洗涤 2 次,即为较纯的 PBMC。PBMC 于含 5% CO_2 的 $37^\circ C$ 恒温培养箱中培养,培养基为含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 (Gibco 公司),含 1% 双抗 (青霉素和链霉素)。

1.4 淋巴细胞增殖试验:将 PBMC 以 2×10^6 /mL 密度分 6 组 (每组 6 孔) 接种于 96 孔板中。前 3 组在接种 3 h 后,分别加入守宫多糖 100、10 $\mu\text{g/mL}$ 与等体积 PBS。后 3 组在接种后 3 h 吸取未贴壁细胞,移入另外 18 个空白孔中,然后每组分别加入守宫多糖 100、10 $\mu\text{g/mL}$ 与等体积 PBS。细胞共培养 4 d,培养结束前 4 h 将前 3 组每孔轻轻吸出 100 μL 培养液后,吸取未贴壁细胞及上清,移入另外 18 个空白孔中。后 3 组每孔轻轻吸出 100 μL 培养液后,所有 6 组细胞每组分别加入 MTT (5 mg/mL) 10 μL ,放入培养箱中继续培养 4 h 后, $1\,200\text{ r/min}$ 离心 10 min,去上清,加入 DMSO 100 μL ,用酶标仪测 490 nm 处吸光度 (A) 值表示淋巴细胞增殖水平。

1.5 PBMC 的活化:用 RPMI-1640 完全培养基调整 PBMC 为 2×10^6 /mL,加入 6 孔板中培养,6 h 后分别加守宫多糖与肝癌细胞冻融液:①只加肝癌细胞冻融液 (终浓度为 1×10^4 /mL);②加肝癌细胞冻融液与守宫多糖 100 $\mu\text{g/mL}$;③加肝癌细胞冻融液与守宫多糖 10 $\mu\text{g/mL}$ 。各组加入肝癌细胞冻融液的肝癌细胞终浓度为 1×10^5 /mL。

1.6 BEL-7402 细胞培养:将 BEL-7402 细胞以 1.5×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板中,于含 5% CO_2 的 $37^\circ C$ 恒温培养箱中培养,培养基为含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640,含 1% 双抗 (青霉素和链霉素)。当细胞进入对数生长期时用淋巴细胞试验的靶细胞。

1.7 淋巴细胞毒试验:将 PBMC 与肝癌细胞冻融液共培养 3 d 后,吸取未贴壁细胞,离心后分别计数 PBMC 数量,取对数生长期的 BEL-7402 作为靶细胞,各组均按 2.5 : 1.5 : 1.10 : 1.20 : 1 和 40 : 1 的效靶比进行杀伤实验 (每个浓度均设 5 个复孔),培养 48 h,培养结束前 6 h 每孔轻轻吸出 100 μL 培养液,加入 MTT (5 mg/mL) 10 μL ,放入培养箱中继续培养 6 h 后,加入 0.01 mol/L HCl-10% SDS

100 μL , 3 h 后用酶标仪于 490 nm 处测 A 值表示存活的肝癌细胞数量。

1.8 统计方法:全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计方法采用双因素方差分析,全部统计由统计软件包 SPSS 11.0 完成。

2 结果

2.1 守宫多糖对淋巴细胞增殖的影响:守宫多糖可促进淋巴细胞的增殖 ($P < 0.001$),提示守宫多糖具有有丝分裂原样作用。贴壁细胞也可促进淋巴细胞的增殖 ($P = 0.007$),并可增强小剂量守宫多糖的促淋巴细胞有丝分裂作用,结果见表 1 和表 2。

表 1 守宫多糖对淋巴细胞增殖的影响

Table 1 Effect of gecko polysaccharide on proliferation of lymphocyte

组别		A 值
因素 1(贴壁细胞)	因素 2(药物)	
含贴壁细胞	不含守宫多糖	0.138±0.015
	守宫多糖 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.106±0.023
	守宫多糖 (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.165±0.021
不含贴壁细胞	不含守宫多糖	0.113±0.012
	守宫多糖 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.108±0.011
	守宫多糖 (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.138±0.012

表 2 守宫多糖与贴壁细胞对淋巴细胞增殖的双因素方差分析

Table 2 Two-way ANOVA of gecko polysacchride and unstuck cells on proliferation of lymphocyte

方差来源	三类平方差	自由度	均方	F	P
校正模型	0.014 48	3	4.827×10^{-3}	16.159	<0.001
贴壁细胞	2.450×10^{-3}	1	2.450×10^{-3}	8.202	0.007
守宫多糖	0.012 03	2	6.016×10^{-3}	20.137	<0.001
误差	9.559×10^{-3}	32	2.987×10^{-4}		
总量	0.615	36			
校正误差	0.024 04	35			

$R^2 = 0.602$ (调整 $R^2 = 0.565$)

2.2 守宫多糖对淋巴细胞毒的影响:守宫多糖可增强肝癌抗原活化的淋巴细胞的细胞毒作用,促进淋巴细胞对肝癌细胞的杀伤作用 ($P < 0.001$, $R^2 = 0.240$)。不同靶效比之间,淋巴细胞对肝癌细胞的杀伤作用无显著差异 ($P = 0.007$),结果见表 3 和表 4。

3 讨论

PBMC 中的贴壁细胞主要是单核细胞与树突状细胞,两者均为外抗原呈递细胞 (APC)。守宫多糖可促进淋巴细胞的增殖,提示守宫多糖具有有丝分裂原样作用。APC 可促进淋巴细胞的增殖,并可增强小剂量守宫多糖的促淋巴细胞有丝分裂作用。守宫多糖可增强肝癌抗原活化的淋巴细胞的细胞毒作用,促进淋巴细胞对肝癌细胞的杀伤作用。需要指出

表 3 守宫多糖对淋巴细胞毒的影响

Table 3 Effect of gecko polysaccharide on cytotoxicity of lymphocyte

组别		A 值
因素 1(药物)	因素 2(靶效比)	
空白对照	2.5 : 1	0.434±0.012
	5 : 1	0.406±0.025
	10 : 1	0.379±0.017
	20 : 1	0.326±0.019
	40 : 1	0.271±0.053
守宫多糖 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.5 : 1	0.338±0.025
	5 : 1	0.316±0.049
	10 : 1	0.281±0.043
	20 : 1	0.313±0.058
	40 : 1	0.280±0.060
守宫多糖 (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.5 : 1	0.389±0.038
	5 : 1	0.386±0.028
	10 : 1	0.353±0.042
	20 : 1	0.374±0.047
	40 : 1	0.415±0.238

表 4 守宫多糖与贴壁细胞对淋巴细胞细胞毒作用的双因素方差分析

Table 4 Two-way ANOVA of gecko polysacchride and unstuck cells on cytotoxicity of lymphocyte

方差来源	三类平方差	自由度	均方	F	P
校正模型	0.149	6	0.024 82	4.368	0.001
贴壁细胞	11.072	1	11.072	1 948.978	<0.001
守宫多糖	0.097 62	2	0.048 81	8.592	<0.001
靶效比	0.051 27	4	0.012 82	2.256	0.070
误差	0.472	83	5.681×10^{-3}		
总量	11.692	90			
校正误差	0.620	89			

$R^2 = 0.240$ (调整 $R^2 = 0.185$)

的是,许多中药都具有双向调节的作用。不同剂量的多糖对体液免疫与细胞免疫的影响是不同的。本实验结果表明守宫多糖小剂量时活化体液免疫而大剂量时活化细胞免疫。体内 T 淋巴细胞的活化需要 APC 的呈递抗原,形成 MHC-Ag-TCR 三元体,并在 APC 分泌的细胞因子的作用下活化增殖。而针对胸腺依赖性抗原,B 淋巴细胞的活化需要 T 细胞的辅助。推测守宫多糖可能通过促进 APC 的抗原呈递作用,促进经 APC 呈递肿瘤抗原的淋巴细胞对肝癌细胞的杀伤作用。同时对淋巴细胞的增殖有直接的促进作用。

本研究发现守宫多糖体外可增强淋巴细胞的抗肿瘤免疫,表明守宫多糖是守宫抗肿瘤与免疫调节的重要物质基础之一。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and technical Publishing House, 1986.
[2] Song P, Wang X M, Xie S. Experimental study on mecha-

- nisms of lyophilized powder of fresh *Gekko chinensis* in inhibiting H_{22} hepatocarcinoma angiogenesis [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2006, Jan, 26(1): 58-62.
- [3] Luo H S, Zhou D H. The brief introduction of anti-cancer traditional Chinese herbal medicine [J]. *New J Tradit Chin Med* (新中医), 1978 (3): 40.
- [4] Jiang D Q, Huang X M, Lu W J. The primary report of the chemical composition analysis of gecko [J]. *Bull Chin Mater Med* (中药通报), 1983, 8(1): 30-31.
- [5] Hu Y Q, Zhao Z J, Jiang P F. The analysis of 28 species of elementaries in 9 species of drugs from insect [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1989, 24(11): 650-651.
- [6] Wu X, Chen D, Xie G R. Effects of *Gekko* sulfated polysaccharide on the proliferation and differentiation of hepatic cancer cell line [J]. *Cell Biol Int*, 2006, 30(8): 659-664.
- [7] Wu X Z. The separation and preparation and application in medical and pharmaceutical industry of *Gekko* polysaccharide [P]. CN 167533A, 2005, 21(40): 118.

芒果皮提取物止咳化痰和抗炎作用研究

黄敏琪¹, 林忠文¹, 曾宪彪², 李 茂², 陈海燕¹, 韦宝伟²

(1. 广西卫生管理干部学院, 广西南宁 530021; 2. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022)

芒果皮系漆树科植物芒果 *Mangifera indica* L. 成熟果实的干燥果皮。有关芒果枝叶的研究证明其含有芒果苷, 有止咳、化痰作用^[1], 国内已有以芒果枝叶为主要原料的中成药上市^[2]; 芒果皮的研究则较少, 笔者首次从芒果皮中提取出芒果苷, 得率达 2.3%^[3]。为探讨芒果皮是否具有类似于芒果枝叶的药理作用, 本实验采用多种模型, 研究其止咳、化痰、抗炎作用。

1 材料

1.1 芒果皮提取物的制备: 取芒果皮 (采自南宁) 适量, 加 10 倍量 70% 乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩成流浸膏 (相当于原药材 1 g/mL, 含芒果苷 1.61%), 置阴凉处密封保存。临用时以蒸馏水配制。

1.2 阳性对照药: 磷酸可待因片, 青海制药厂生产, 批号 060115; 醋酸地塞米松片, 上海第十制药厂生产, 批号 051211; 复方甘草合剂, 南宁百会药业有限公司出品, 批号 060725。

1.3 动物: 清洁级昆明小鼠, 体重 20~24 g, 雌、雄兼用, 购自广西医科大学医学实验动物中心, 动物合格证 SCXK 桂 2003—003。试验环境温度 (23±2) °C, 湿度 (60±10)%。

2 方法与结果

2.1 对氨水气雾致小鼠咳嗽的影响^[4]: 取昆明种小鼠 50 只, 雌、雄各半, 随机分为芒果皮提取物高、中、低剂量 (生药 15、7.5、3.8 g/kg) 组, 磷酸可待

因片 (60 mg/kg) 组和模型 (水, 20 mL/kg) 组, 每组 10 只。给药组按设定剂量, 以 20 mL/kg 给药体积, 每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d; 模型组同法 ig 等量蒸馏水。末次给药后 1 h, 按氨水气雾引咳法, 用超声雾化器雾化氨水 (25% 氢氧化铵), 使雾化氨水均匀地喷入倒扣的 500 mL 烧杯内, 然后迅速将小鼠放入充满氨水雾气的倒扣烧杯中, 喷雾 10 s, 以小鼠收缩腹部并张口作为咳嗽指标, 记录咳嗽潜伏期和开始咳嗽后 2 min 内的咳嗽次数。以给药组与模型组比较, 用 *t* 检验统计差异显著性 (以下实验统计方法与此相同)。结果见表 1, 芒果皮提取物高、中剂量组和磷酸可待因片组的咳嗽潜伏期延长, 咳嗽次数减少, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$), 提示芒果皮提取物具有止咳作用。

表 1 芒果皮提取物对小鼠氨水气雾引咳的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of extract from *M. indica* peel on NH_4 nebule-induced cough in mice
($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	咳嗽潜伏期/s	2 min 内咳嗽次数
模型	—	26.9±10.8	25.7±9.0
磷酸可待因片	0.060	58.0±34.8**	16.8±7.3**
芒果皮提取物	15.0	39.4±9.2*	18.5±5.6*
	7.5	33.1±14.4*	20.2±6.1*
	3.8	22.3±5.7	25.7±9.5

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ (下表同)

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group (following Tables are same)

收稿日期: 2007-01-19

基金项目: 广西科学基金资助项目 (桂科基 0448044)

作者简介: 黄敏琪 (1958—), 女 (壮族), 广西百色人, 副教授, 研究方向为中药活性成分、药理及制剂。

Tel: (0771) 2853630 E-mail: gxhmq888@163.com