

表4 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞线粒体膜电位的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of extract from *P. rupestris* on mitochondrial membrane potential of S_{180} cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	线粒体膜电位(荧光像素数)		
		24 h	48 h	72 h
模型	—	180.44 $\pm$ 30.14	194.11 $\pm$ 28.31	184.96 $\pm$ 40.73
环磷酰胺	0.01	162.98 $\pm$ 50.83	149.92 $\pm$ 39.19*	133.69 $\pm$ 31.48**
糙叶败酱提取物	1	175.20 $\pm$ 40.22	162.16 $\pm$ 30.44*	131.54 $\pm$ 28.62**
	0.5	190.64 $\pm$ 44.38	169.39 $\pm$ 30.57	146.37 $\pm$ 29.14*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

后,大、小剂量组细胞线粒体膜电位均显著降低,与模型组比较,有统计学意义($P<0.05, 0.01$)。

4 讨论

研究表明,细胞凋亡时胞内活性氧自由基(ROS)生成增加,清除ROS的能力下降,大量自由基能与蛋白质、DNA和脂质体等反应,引起蛋白质氧化,DNA链断裂,细胞膜起泡和脂质过氧化等变化^[4]。本实验中糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 细胞,细胞内的自由基水平增多,可能使DNA链断裂,导致细胞凋亡。

研究发现,线粒体膜电位的变化在细胞凋亡过程中起重要作用,是细胞凋亡的关键环节^[5~7]。Minamidawa等^[8]应用激光扫描共聚焦显微镜和光敏剂Chloromethyl-X-rosamine研究正常人细胞时发现:用光源照射充满这种光敏剂的线粒体,可出现线粒体膜内部去极化和线粒体膨胀,从而引起细胞凋亡。另外,Fabio等^[9]的研究也支持这一观点。Zamami等^[10]的实验表明,线粒体膜电位的降低是细胞凋亡早期的一个不可逆改变。大多数凋亡信号通过诱导线粒体膜通透性转运通道(mitochondrial per-

meability transition pore, MPT)的开放或线粒体肿胀,导致线粒体膜电位下降,进而允许线粒体呼吸链蛋白细胞色素C、凋亡诱导因子等从线粒体释放到胞浆。它们直接或间接地激活凋亡蛋白caspase-3等系列因子使一组核蛋白裂解,最终诱导细胞凋亡^[11,12]。

糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 细胞,细胞内荧光强度明显减弱,线粒体膜电位明显降低,可引起细胞凋亡的发生。此作用与其对细胞内自由基水平和线粒体膜电位的影响有关。

参考文献:

- [1] 陈金秀,马培志,王怀璋. 墓头回总苷片治疗大肠癌的临床研究[J]. 中草药, 1999, 30(7): 528-529.
- [2] 王怀璋,王迎红,陈金秀,等. 墓头回总苷片治疗大肠癌的临床观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001, 8(1): 37-39.
- [3] 黄晓峰. 荧光探针技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2004.
- [4] 惠宏襄,赵小宁,金明,等. 自由基与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(1): 12-16.
- [5] Halestrap A P, Doran E, Gillespie J P, et al. Mitochondria and cell death[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 170-177.
- [6] 孙岳平,陈国强,蔡循,等. 氧化酚诱导急性早幼粒细胞性白血病细胞凋亡的研究[J]. 癌症, 1999, 18(1): 1-4.
- [7] 蔡循,陈国强,贾培敏,等. 三氧化二砷诱导血液肿瘤细胞凋亡的机制研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(6): 452-455.
- [8] Minamidawa T, Sriratanana A. Chloromethyl-X-rosamine photosensitizes mitochondria and induces apoptosis in intact human cells[J]. J Cell Sci, 1999, 112(14): 2419-2430.
- [9] Fabio D L, Roberta M, Marcella C, et al. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium[J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1366: 69-78.
- [10] Zamami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo[J]. J Exp Med, 1995, 181: 1661-1672.
- [11] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91: 479-489.
- [12] Wickremasinghe R G, Hoffbrand A V. Biochemical and genetic control of apoptosis; relevance to normal hematological control of apoptosis[J]. Immunol Today, 1997, 18: 44-51.

买麻藤乙醇提取物抗氧化和抑制肿瘤作用的研究

姚柳利¹, 代光辉^{1*}, 张永煜², 陶萍²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200030)

摘要:目的 研究买麻藤 50% 和 95% 乙醇提取物对小鼠体内抗氧化作用及其对人肝癌 BEL-7402 细胞、人白血病 HL-60 细胞的体外抑制活性。方法 D-半乳糖造成实验性衰老小鼠模型,通过测定血清、肝、脑等组织内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和ATP活性来观察买麻藤乙醇提取物对小鼠抗氧化能力的影响;

收稿日期:2007-06-27

基金项目:上海交通大学农科合作研究基金资助项目(AE150039)

作者简介:姚柳利(1980—),女,上海人,硕士研究生,主要从事植物化学研究。E-mail: yll791212@sjtu.edu.cn

*通讯作者 代光辉 Tel: (021) 34205762 E-mail: ghдай@sjtu.edu.cn

MTT 和 SRB 法测定买麻藤乙醇提取物对两种癌细胞的体外抑制作用。结果 买麻藤乙醇提取物对衰老小鼠各组织中的 SOD、CAT、ATP 活性都有明显升高;买麻藤乙醇提取物在质量浓度为 1 mg/mL 时,对 BEL-7402 细胞株的抑制活性最高为 89.6%;在质量浓度为 0.063 mg/mL 时,对 HL-60 细胞株的抑制活性最高为 87.0%。结论 买麻藤 50% 和 95% 乙醇提取物具有较好的小鼠体内抗氧化作用和体外抑制 HL-60 和 BEL-7402 肿瘤细胞生长的作用。

关键词:买麻藤乙醇提取物;抗氧化;HL-60;BEL-7402

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0574-03

买麻藤 *Gnetum montanum* Markgr. 主要分布于我国云南南部、广东省及东南亚地区^[1],在民间与小叶买麻藤 *G. parvifolium* (Warb.) C. Y. Cheng ex Chun 混用,治疗风湿性关节炎、腰肌劳损、筋骨酸软、跌打损伤、溃疡出血和支气管炎等疾病。经药理实验证实买麻藤乙醇提取物对大鼠血清性及酵母性关节炎有明显的抗炎作用^[2]。自陈浩^[3]等首次从买麻藤中分离得到了异丹叶大黄素之后,对于异丹叶大黄素的药理活性方面有了一些研究,如异丹叶大黄素与白藜芦醇对兔外周血中性粒细胞功能的影响^[4]、异丹叶大黄素对人滑膜细胞白细胞介素-8 生成及 mRNA 表达的影响^[5]等,但买麻藤提取物在抗氧化以及抗肿瘤方面的研究还未见文献报道,本实验对买麻藤提取物进行了初步分离,对 50%、95% 乙醇提取物进行了小鼠体内抗氧化和体外抗肿瘤的初步研究,以期开发买麻藤临床新用途提供参考依据。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,体重 22~26 g,购自上海九亭实验动物中心。

1.2 试剂:MTT、磺酰罗丹明 (SRB)、DMSO,均为 Sigma 公司产品。RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶,美国 Gibco 公司产品。胎牛血清,HyClone 公司产品。D-半乳糖,上海恒信化学试剂有限公司。超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒、ATP 酶测定试剂盒,南京建成生物工程研究所生产。其他试剂均为市售 AR 级。

1.3 细胞株:人白血病 HL-60 和人肝癌细胞 BEL-7402 由中国科学院上海药物研究所保存。

2 方法

2.1 买麻藤提取物的制备:买麻藤植物采集于广西,由中国科学院广西植物研究所蒋水元研究员鉴定。取一定量的买麻藤粉末,以 70% 乙醇为溶剂,加热回流提取 3 次,料液比分别为 1:10、1:5、1:5,提取时间分别为 2、1、1 h,回收溶剂,滤过,浓缩至浸膏,加入一定体积的蒸馏水,超声波下震荡溶解,等体积的醋酸乙酯进行萃取 6 次,合并萃取液,

浓缩至浸膏,最后溶于甲醇中,得到买麻藤粗提液。取 10 mL 买麻藤粗提液,经聚酰胺柱色谱分离,水、30%、50%、95% 乙醇梯度洗脱,收集 50%、95% 乙醇提取物,浓缩成浸膏 (50%、95% 乙醇提取物经气质联用分析,分别含异丹叶大黄素 50% 和 30%)。

2.2 体内抗氧化测定

2.2.1 分组及给药:昆明种小鼠 40 只雌雄各半。随机分成 4 组:对照组,每日颈背部 sc 生理盐水 0.3 mL,同时 ig 生理盐水 0.3 mL;衰老模型组,每日颈背部 sc 1% D-半乳糖 0.3 mL,同时 ig 生理盐水 0.3 mL;实验组,每日颈背部 sc 1% D-半乳糖 0.3 mL,同时 ig 50% 或 95% 买麻藤乙醇提取物 120 mg/kg。饲养期间各组均自由进食和饮水,给药 60 d。

2.2.2 指标测定:末次给药 24 h 后,小鼠眼眶取血,脱颈椎处死,取肝、脑、皮肤等器官组织,测定各项衰老指标:血清中 CAT 活性采用铬酸醋酸钾比色法^[6];脑中 SOD 活性用邻苯三酚自氧化法测定^[7];肝中 ATP 量的测定按文献方法^[8]。

2.3 体外抑制肿瘤作用:由中国科学院上海药物研究所国家新药创制中心测试,分别采用 MTT 法^[9]和 SRB 蛋白染色法^[9]测定。

2.4 统计处理:各实验重复 3 次,以最小差异显著法进行统计分析。

3 结果

3.1 体内抗氧化结果:见表 1。与模型组相比,ig 买麻藤乙醇提取物后,小鼠的脑组织、血清,肝组织中 SOD、CAT 活性以及 Na-K-ATP 水平都显著提高 ($P < 0.01$),表明买麻藤乙醇提取物可增强机体抗氧化和清除自由基的能力,延缓机体的衰老。两给药组间差异不显著,与模型组相比,ig 买麻藤乙醇提取物后,小鼠肝中 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

3.2 体外抑制肿瘤细胞作用:买麻藤 50%、95% 乙醇提取物对体外培养的白血病 HL-60 细胞和肝癌 BEL-7402 细胞株均具有明显的抑制作用 (表 2)。

表1 买麻藤乙醇提取物对小鼠脑中 SOD、血清中 CAT 活性和肝中 ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of ethanol extracts from *G. montanum* on activities of SOD in brain, CAT in serum, and ATP level in liver of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	SOD 活性/ (U · mg ⁻¹)	CAT 活性/ (U · mL ⁻¹)	ATP/(μmol Pi/mg ⁻¹ · h ⁻¹)	
			Na ⁺ -K ⁺ -ATP	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP
对照	31.15±1.78**	9.60±1.37**	0.48±0.07**	0.49±0.120*
模型	17.60±2.46	4.94±1.89	0.36±0.07	0.35±0.058
50% 乙醇提取物	30.74±2.76**	15.21±2.38**	0.64±0.097**	0.41±0.120
95% 乙醇提取物	25.72±1.60**	15.78±1.26**	0.59±0.088**	0.45±0.072

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

表2 买麻藤乙醇提取物对 BEL-7402、HL-60 细胞株生长的抑制作用

Table 2 Inhibition of ethanol extracts from *G. montanum* on growth of BEL-7402 and HL-60 cells

样品	ρ / (mg · mL ⁻¹)	生长抑制率/%	
		BEL-7402	HL-60
50% 乙醇提取物	4	68.7	40.2
	1	89.6	40.1
	0.25	0	63.7
	0.063	0	87.0
	0.016	0	63.1
95% 乙醇提取物	4	80.9	66.1
	1	61.0	71.6
	0.25	12.8	77.6
	0.063	17.1	82.5
	0.016	6.2	75.9

针对 BEL-7402 细胞株, 50% 乙醇提取物质量浓度为 1 mg/mL 时, 抑制率最高, 为 89.6%; 95% 乙醇提取物质量浓度为 4 mg/mL 时, 抑制率最高, 为 80.9%。而针对 HL-60 细胞株来说, 50% 乙醇提取物和 95% 乙醇提取物, 质量浓度为 0.063 mg/mL 时, 抑制率皆达到最高, 分别为 87.0% 和 82.5%。从表中可以看出, 对于 HL-60 及 BEL-7402 两种细胞的抑制率, 95% 乙醇提取物的效果略优于 50% 乙醇提取物; 这两种提取物对于 BEL-7402 人肝癌细胞株的抑制率均高于对 HL-60 人白血病细胞株的抑制率。

4 讨论

本实验结果表明: 买麻藤 50%、95% 乙醇提取

物, 均能显著提高小鼠组织中的 CAT、SOD 活性及 Na⁺-K⁺-ATP 酶的水平, 清除机体氧自由基, 以及提高机体抗活性氧损伤的能力。

本实验结果同时还表明 50%、95% 买麻藤乙醇提取物对小鼠各项指标无显著差异, 因此买麻藤提取物的抗衰老适宜剂量, 还有待进一步研究。

两种提取物分别对 HL-60 和 BEL-7402 都具有明显的抑制作用。从对 BEL-7402 细胞株的抑制率可以看出, 50% 乙醇提取物效果优于 95% 乙醇提取物, 这其中是一种物质在起作用, 还是多种物质的协同作用, 还有待于进一步研究。

本实验结果初步证明了买麻藤乙醇提取物具有小鼠体内抗氧化作用和体外抑制肿瘤细胞生长作用, 在此基础上, 该两种提取物还有待于进一步提纯和进行药理活性研究, 该结果将为开发抗氧化抗衰老保健品和新型抗癌药物奠定基础。

致谢: 中国科学院广西植物研究所蒋水元研究员对所需植物的采集和鉴定; 北京协和医院林茂教授对本研究所提出的宝贵建议; 中国科学院上海药物研究所国家新药创制中心对外抗肿瘤作用的研究; 上海交通大学毕业生张奕和周君对该实验的协助。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志 [M]. 第7卷. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997.
- [3] 陈浩, 林茂. 买麻藤的化学成分研究 [J]. 中草药, 1999, 30(8): 571-573.
- [4] 钟森, 郭颖, 邓建云, 等. 异丹叶大黄素与白藜芦醇对兔外周血中性粒细胞功能的影响 [J]. 药学报, 1998, 33(11): 812-815.
- [5] 侯琦, 李良成, 郭颖, 等. 异丹叶大黄素对人滑膜细胞白细胞介素-8 生成及 mRNA 表达的影响 [J]. 药学报, 2001, 36(6): 407-410.
- [6] 雷柏平, 周伯通, 蔡宏伟, 等. 过氧化氢酶活性的比色测定法 [J]. 临床检验杂志, 1993, 11(2): 73.
- [7] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进 [J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [9] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.