

马钱子碱对人肝癌细胞 HepG2 细胞膜电位和通透性的影响

徐 睿^{1,2}, 吕晓宇², 蔡宝昌³, 项晓人³, 邓旭坤^{2*}

(1. 睢宁县人民医院 药剂科, 江苏 睢宁 221200; 2. 中南民族大学, 湖北 武汉 430074;

3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘 要:目的 探讨马钱子碱诱导 HepG2 细胞凋亡效应是否涉及其细胞膜通透性和细胞膜电位 (MP) 的改变, 研究其抗肿瘤的分子机制。方法 以 HepG2 细胞为体外模型, 采用吖啶橙/溴乙锭复合荧光染色通过荧光显微镜观察马钱子碱对 HepG2 细胞形态学和细胞膜通透性变化, 采用膜敏感性荧光探针 Di-4-ANEPPS 标记细胞膜电位, 利用激光共聚焦显微扫描技术研究马钱子碱对 HepG2 细胞膜电位在瞬间反应及不同时段的影响。结果 在瞬时反应中马钱子碱 (0.5 mmol/L) 对 HepG2 细胞的 MP 影响不明显, 在 4 h 和 8 h 后, HepG2 细胞的 MP 没有明显变化, 此时细胞已开始出现早期的凋亡形态学变化, 如核固缩、胞膜皱缩、核碎裂、胞浆空泡化、凋亡小体形成等, 12 h 后 MP 负值有所下降, 但同时细胞膜保持完整, 细胞膜通透性和完整性均没有明显变化。结论 马钱子碱在体外能通过诱导 HepG2 细胞凋亡来抑制其增殖, 但这种早期诱导作用和细胞膜电位以及通透性没有明显相关性。

关键词:马钱子碱; 肝癌细胞 HepG2; 细胞膜电位; 通透性; 激光共聚焦显微扫描术

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1692-05

马钱子为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的成熟种子, 辛温大毒, 具有抗炎消肿散结, 活血通络止痛之功效, 临床上广泛应用于痹症、炎症和肿瘤等疾病的治疗^[1]。吖啶型生物碱马钱子碱 (brucine) 和土的宁 (strychnine) 为其主要的活性成分^[2]。动物实验显示马钱子碱具有显著的抗肿瘤作用, 且毒性相对较低^[3,4]。另外, 还发现马钱子碱在体外可以显著抑制人肝癌细胞 HepG2 的增殖, 且马钱子碱主要是通过诱导 HepG2 凋亡而发挥抗肿瘤作用^[5,6]。在此基础上, 本实验采用特异性荧光染料和激光共聚焦显微扫描技术 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 研究马钱子碱的诱导 HepG2 凋亡效应是否涉及细胞膜通透性、细胞膜完整性以及细胞膜电位 (membrane potentials, MP) 的改变, 以探讨其抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料

1.1 药物与试剂:马钱子碱 (NACALAI TESQUE. INC. KYOTO, 日本, 批号: M9F5231, 质量分数 >99.90%), 以 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 配制浓度为 10.0 mmol/L 的储存液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌后, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。吖啶橙 (AO)、溴乙锭 (EB), Sigma 公司产品; RPMI-1640, Gibco 公司产品; 新生小牛血清

(56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 0.5 h, -20 $^{\circ}$ C 保存), Hyclone 公司产品; 胰酶 Trypsin, Amresco 公司产品; 细胞膜电位荧光探针 Di-4-ANEPPS (Molecular Probes, 美国) 用 D Hank's 液配制和稀释。贮存浓度为 1 mmol/L, 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。负载时用 D Hank's 液稀释成 10 μ mol/L, 其他为国产试剂。

1.2 主要仪器:荧光显微镜 (Olympus BX60, 日本), CO₂ 生化培养箱 (Forma Scientific, 美国), 激光共聚焦显微镜系统 (LSM 510, Carl ZEISS, 德国), 透射电子显微镜 (Philips TECNAI-12, 荷兰)。

1.3 细胞株及细胞培养:人肝癌细胞株 HepG2 (购自中国科学院上海细胞生物研究所, 由本实验室传代培养)。RPMI-1640 培养液加入 10% 新生小牛血清、青霉素 (100 U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL), 调 pH 7.2~7.4, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌。置于培养箱中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 隔日更换新鲜培养基, 3~5 d 传代 1 次。

2 方法

2.1 AO/EB 活细胞复合荧光染色观察细胞核染色质和细胞膜通透性的变化^[7]:取对数生长的 HepG2 细胞制成细胞悬液 (4×10^4 /mL), 接种于预先放入经多聚赖氨酸处理的小载玻片的 12 孔细胞培养板中 (1 mL/孔), 过 12 h 待细胞贴壁后, 加入

收稿日期: 2008-04-29

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划资助项目 (90209052); 江苏省博士创新基金资助项目 (2005098); 中南民族大学人才引进专项

课题 (YZZ06020)

作者简介: 徐 睿 (1966—), 男, 江苏省东海县人, 主管药师, 中药学专业硕士, 研究方向为临床药理学。

Tel: 13505222316 E-mail: zhouxurui@163.com

* 通讯作者 邓旭坤 Tel: 13407100639 E-mail: dxk711208@163.com

100 μL 的马钱子碱溶液,使其终浓度为 0、0.5、1.0 mmol/L。常规细胞培养,于 12、24、48 h 后,取出玻片用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.01 mmol/L PBS (pH 7.4) 轻轻洗 2 次,加入 AO/EB 混合荧光染液(各 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 滴,选用 502 nm 的激发光,荧光显微镜下观察细胞核染色质的形态。

2.2 透视电镜检测细胞膜完整性和超微结构变化^[8]:取对数生长的 HepG2 细胞制成细胞悬液($1 \times 10^5/\text{mL}$),接种于 25 mL 的细胞培养瓶中,待细胞贴壁良好,处于对数生长期时,加入马钱子碱溶液使其终浓度为 0.5 mmol/L,于 24 h 后轻轻刮下细胞,1 000 r/min 离心 5~10 min,获得细胞团块,用 0.01 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗 2 次,4% 戊二醛溶液固定过夜,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检。PBS 洗 3 次,1% 锇酸双重固定,PBS 洗 3 次,蒸馏水冲洗 1 次,系列乙醇-丙酮程序脱水,无水丙酮-环氧树脂渗透,环氧树脂 EPON812 包埋,硬化,超薄切片,枸橼酸铅-醋酸铀染色,透视电镜观察细胞形态和超微结构变化。

2.3 LSCM 检测马钱子碱对 HepG2 的 MP^[9~11] 的影响

2.3.1 荧光染色的预处理:将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于预先放入经多聚赖氨酸处理过的小载玻片的 12 孔板中($2.0 \times 10^3/\text{mL}$),待细胞贴壁后,分别加入药物处理。于 30 s、4 h、8 h、12 h 后进行 MP 检测。检测前吸出 12 孔板各孔中的细胞培养液,用 D Hank's 液洗 2~3 遍,加入 PBS (pH 7.4) 1 mL 和 2 滴 Di-4-ANEPPS 荧光染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 20~40 min,保留染料,上机检测。

2.3.2 马钱子碱对 HepG2 细胞 MP 瞬时动态变化的影响:将荧光染料负载好的待测细胞置于激光共聚焦显微镜的载物台上(37 $^{\circ}\text{C}$),对其进行连续动态扫描(激发波长 488 nm,发射波长 526 nm),先连续扫描 1 min,测定基础荧光强度,待基线平稳后,用微量加液器加入马钱子碱溶液(0.5 mmol/L)干预,以后每隔 20 s 扫描 1 次。镜下动态观察给药后 20~30 min 内 HepG2 细胞内的相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI) 的变化情况,采用 LSM5.1-Image 分析程序,对所扫描的荧光图像进行分析,根据细胞膜结合 Di-4-ANEPPS 后其荧光的相对强度变化,得出反映细胞膜 MP 动态变化的曲线。

2.3.3 马钱子碱在不同时间段内对 HepG2 细胞 MP 的影响:荧光探针的负载和观察方法同上,细胞设正常组和药物处理组,给药组细胞中分别加入马

钱子碱(0.5 mmol/L),常规细胞培养。分别在 4、8、12 h 后,置于 LSCM 下,快速测定 HepG2 细胞 MP 的相对荧光强度。以正常细胞组作为 0 h 段,比较经马钱子碱(0.5 mmol/L)处理 4、8、12 h 后 HepG2 细胞的 MP 的变化。

2.4 数据处理:HepG2 细胞 MP 的瞬时动态变化的检测采用 Carl Zeiss LSM510 软件(版本 V2.3),随机选取视野中的 10 个细胞,以未加处理因素前的细胞内荧光值为 100%,对待测细胞进行实时测量,以获得反映 HepG2 细胞膜 MP 的瞬时动态变化的相对荧光值。数据进行独立样本 t 检验分析。

马钱子碱在不同时间段内对 HepG2 细胞 MP 的影响的检测以正常细胞的荧光值为 100%,测量得到反映经马钱子碱处理 4、8、12 h 后的 HepG2 细胞的 MP 的相对荧光值。数据经 Excel 处理。采用双样本 t 检验进行组间分析。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞核染色质和细胞膜完整性、通透性的影响:马钱子碱(0.5 mmol/L)作用于 HepG2 细胞 12 h 后,通过荧光显微镜和透视电镜只能观察到 HepG2 细胞出现的细胞早期凋亡形态,如细胞核固缩伴随核碎裂,呈新月状或块状边集附在核膜周边,线粒体内嵴肿胀消失,细胞膜保持完整等现象。24 h 后,HepG2 细胞不仅呈现上述形态,而且还表现为细胞皱缩,胞浆内形成空泡;细胞膜依然完整,皱缩外突、出芽形成致密的凋亡小体(apoptosome)等典型的细胞凋亡形态学变化。

在荧光显微镜下可看到 HepG2 细胞经马钱子碱(0.5 mmol/L)作用 24 h 后,胞浆内只呈现黄绿色的 AO 荧光,细胞核内出现块状或点状的高亮度的致密黄色荧光,说明此时虽然细胞发生了凋亡,但其细胞膜依然保持十分完整,细胞膜的通透性没有明显改变(图 1-B);48 h 后,少部分细胞内部可看到红色的 EB 荧光,细胞核内可看到亮度很高的致密黄色荧光,说明此时有部分细胞的细胞膜通透性明显增加,细胞开始产生坏死,但仍以凋亡为主(图 1-C)。

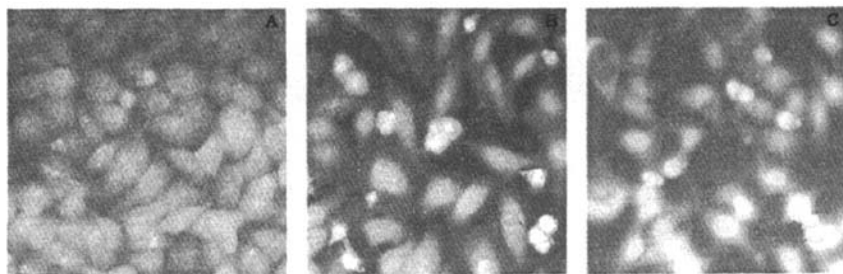
3.2 对 HepG2 细胞中 MP 的影响^[7,10]:结果显示,HepG2 细胞在马钱子碱加入后的 20 min 瞬时反应中,HepG2 细胞膜电位荧光(MP RFI)出现缓慢的下降,由基线水平(RFI 103.44 ± 17.21),于 4 min 后降到谷值(RFI 90.04 ± 15.54),然后轻度回升,于 13.5 min 后回到基线水平(RFI 103.90 ± 13.54),在此期间,MP RFI 在(90.04 ± 15.54)~(103.90 ± 13.54)内波动。至实验结束时,HepG2

细胞的 MP RFI 为 99.79 ± 14.18 相当于起始基线水平 (RFI 103.44 ± 17.21) 的 96.47%, 两者相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

马钱子碱 (0.5 mmol/L) 作用于 HepG2 细胞 4 h 和 8 h 后, 细胞内荧光无明显变化 (图 2-B、C), 结果分析显示其 MP RFI 分别为 113.07 ± 25.97 (4 h) 和 109.35 ± 20.728 (8 h), 分别相当于 0 h 的

112.24% 和 108.55%, 与 0 h 的 MP RFI (100.74 ± 20.01) 相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。但在 12 h 后细胞内荧光明显增强 (图 2-D), MP RFI 明显上升, 达到 153.55 ± 19.33 , 为 0 h 的 152.42%, 两者有显著性差异 ($P < 0.001$), 见图 3。

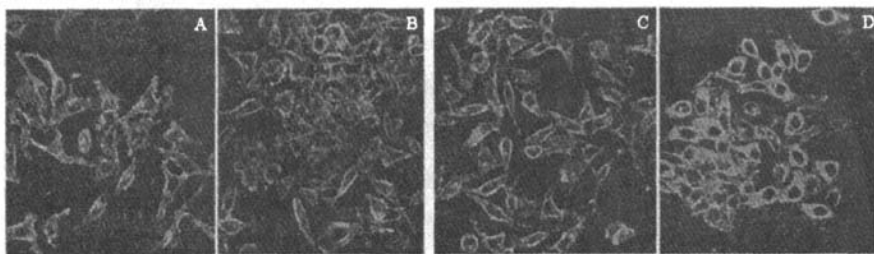
分析以上结果可以看出, 马钱子碱 (0.5 mmol/L) 在 20 min 内对 HepG2 的 MP 有一定的动态影



A-对照组细胞 B-马钱子碱 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h 的细胞 C-马钱子碱 ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 的细胞
A-control cells B-brucine treated cells ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h) C-brucine treated cells ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h)

图 1 马钱子碱处理后 HepG2 细胞核染色质形态及细胞膜通透性的变化 (AO/EB 荧光染色法)

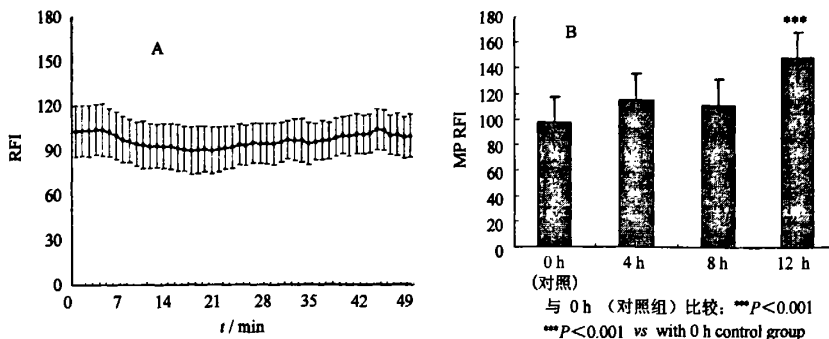
Fig. 1 Chromatin morphological change of nuclei in HepG2 cell lines treated by brucine and change of cell membrane permeability (AO/EB staining)



A-对照组细胞 B-处理 4 h 的细胞组 C-处理 8 h 的细胞组 D-处理 12 h 的细胞组
A-control cells B-brucine treated cells (4 h) C-brucine treated cells (8 h) D-brucine treated cells (12 h)

图 2 激光共聚焦显微镜观察马钱子碱 (0.5 mmol/L) 处理后 HepG2 MP 的变化

Fig. 2 Changes of MP in HepG2 cell after 4, 8, and 12 h treated by brucine



A-马钱子碱对 HepG2 细胞 MP 瞬时动态变化的影响 B-马钱子碱作用于 HepG2 细胞 4、8、12 h 后, MP RFI 的变化
A-effect of brucine ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on instantaneous changes of MP RFI in HepG2 B-effect of brucine ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on changes of MP in RFI HepG2 at 0, 4, 8, and 12 h

图 3 马钱子碱对 HepG2 MP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 3 Effect of brucine (0.5 mmol/L) on changes of MP in HepG2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

响,细胞膜出现了缓慢超极化,但此作用较为微弱。4 h 和 8 h 两个时间段内 HepG2 的 MP 有所降低,但幅度较小,无显著差异。在 12 h 后使其细胞的 MP 明显降低,细胞膜出现较强烈的去极化现象。

4 讨论

在目前,诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的重要机制和研究方向。细胞膜对细胞的正常结构与功能起重要调控作用,如:跨膜信号传递,选择性地物质跨膜运输,调控细胞内外离子水平及渗透压的平衡,维持细胞内环境的恒定^[10,11]。因此,保持细胞膜正常的通透性对细胞来说至关重要。细胞膜上的离子转运系统,包括离子通道、载体蛋白和离子泵。使细胞膜内外保持着一定的不平衡离子分布,形成内负外正(MP),这种电位梯度对多种离子的跨膜流动是必需的。MP 的自稳失调将导致细胞膜生物物理特性改变而影响细胞质微环境。因此细胞膜正常的通透性、完整性以及 MP 是反映细胞生理活性的重要指标。当细胞膜发生异常时,细胞内环境遭到破坏,就可能导致细胞凋亡现象的发生。近年发现非兴奋性细胞如淋巴细胞、肿瘤细胞等也存在膜电位^[10~12]。如药物能对肿瘤细胞的细胞膜的通透性、完整性以及 MP 产生作用,则会影响其生理功能,干扰其代谢活动,从而有可能抑制其增殖。已有一些报道发现一些抗肿瘤药物对肿瘤细胞的 MP 有明显影响,但马钱子碱对肿瘤细胞膜的作用则未见报道。

由于细胞凋亡的早期阶段如凋亡信号的转导,肿瘤相关基因的转录和表达往往是在短时间内完成的。因此,本实验在考察马钱子碱对人肝癌 HepG2 MP 的影响的实验中将设计分为两个部分:利用 LSCM 检测马钱子碱对 HepG2 细胞的 MP 瞬时变化的影响以及在 4~12 h 等不同时间段 MP 变化的影响。两次实验条件有些不同:瞬时反应实验使用的为 D Hank's 液,不同时段考察实验采用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,更接近于正常的生物机体内环境。结果发现在加入马钱子碱(0.5 mmol/L)瞬间至 20 min 的时间内,HepG2 的 MP 在正常范围内窄幅波动,没有出现明显变化;在 4 h 和 8 h 内 HepG2 的 MP 没有发生明显变化,说明此时细胞膜结构和功能没有受到大的损害。同时也说明马钱子碱对 HepG2 MP 的影响与细胞外环境的关系不是很大,而与作用时间有一定的关系。在 12 h 后 MP 显著降低,细胞膜出现较强烈的去极化现象,同时又考察马钱子碱对 HepG2 细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 和线粒体电位 $(\Delta\Psi_m)$ 变化的

影响,发现无论在瞬间还是在 4~12 h 等不同时间段,都出现了细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 急剧升高而 $\Delta\Psi_m$ 剧烈下降的现象^[6]。这些实验结果提示马钱子碱在较长时间(>12 h)时可能影响细胞膜某些离子通道或转运系统。细胞膜外两侧的不均衡分布的离子容易进出细胞,导致离子梯度减小,细胞 MP 便会随之迅速下降。

通过荧光显微镜和透射电镜可以观察到马钱子碱对 HepG2 细胞膜的完整性及通透性的影响:从细胞超微结构和细胞形态学的变化来看,经马钱子碱(0.5 mmol/L)作用 24 h 后,HepG2 胞体缩小,细胞胞核固缩伴随核碎裂,呈新月状或块状,边集附在核膜周边;线粒体内嵴肿胀消失,形成空泡;皱缩外突、出芽形成致密的凋亡小体等典型的细胞凋亡形态学变化,但细胞膜的通透性和完整性依然正常。48 h 后,细胞膜的完整性依然正常,仅有部分细胞的细胞膜通透性异常增加,细胞开始产生坏死,但仍以凋亡为主。这可能是因为细胞在受到马钱子碱长时间作用时,会造成 HepG2 细胞膜损伤,通道和载体蛋白变性失去功能,细胞膜完整性遭到破坏,以至于细胞内正常的生理活动无法进行,随即死亡。

由于马钱子碱为一极性分子,不能直接进入细胞内部。根据以上的实验结果,可以说明马钱子碱诱导 HepG2 细胞凋亡与其细胞膜通透性及 MP 没有太大的相关性。猜想在短时间马钱子碱引发 HepG2 细胞的早期凋亡事件中,可能马钱子碱是先结合细胞膜上的特定受体,通过细胞膜及细胞内的相关信号传导途径,使细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 急剧升高和线粒体电位剧烈下降来启动细胞凋亡程序,而不是直接通过改变 MP,提高细胞膜通透性甚至是破坏细胞膜的完整性来实现的。至于实际的作用机制是否如此或者还存在其他的机制,尚待以后通过相关的实验研究来开展进一步的验证。

参考文献:

- [1] 邓旭坤,蔡宝昌. 马钱子抗肿瘤药理研究及临床应用进展 [A]. 21 世纪中医药-2004 江苏省博士研究生学术论坛文集 [C]. 南京:南京中医药大学,2004.
- [2] 蔡宝昌,吴 皓,杨秀伟,等. 马钱子中 16 个生物碱类化合物¹³CNMR 谱的数据分析 [J]. 药学报,1994,29(1):44-48.
- [3] 邓旭坤,蔡宝昌,殷 武,等. 马钱子对小鼠肿瘤的抑制作用 [J]. 中国天然药物,2005,3(6):392-395.
- [4] 邓旭坤,蔡宝昌,殷 武,等. Brucine 对 HepG2 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用和毒性的研究 [J]. 中国药理学通报,2006,22(1):35-39.
- [5] Deng X K, Cai B C, Yin W, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seed of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cell and its possible mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 30, 106(2):179-186.

- [6] Deng X K, Yin W, Cai B C, *et al.* The apoptotic effect of Brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* on human hepatoma cells is mediated via Bcl-2 and Ca^{2+} involved mitochondrial pathway [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(1): 59-69.
- [7] 刘建文, 季光, 魏东芝. 药理实验方法学—新技术与新方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000.
- [9] Plasek J, Hronova V. Assessment of membrane potential changes using the carbocyanine dye, diSC-4-(5); synchronous excitation spectroscopy studies [J]. *Eur Biophys J*, 1991, 19(4): 183-188.
- [10] Toyomizu M, Okamoto K, Akiba Y, *et al.* Anacardic acid-mediated changes in membrane potential and pH gradient across liposomal membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1558(1): 54-62.
- [11] 冯力, 刘伊丽, 刘杰, 等. 尼可地尔对豚鼠心肌细胞膜及线粒体膜电位的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 15(1): 23-26.
- [12] 聂思槐, 王立伟, 陈丽新, 等. 高、低分化的鼻咽癌细胞膜电位比较 [J]. 中国药理与毒理学杂志, 1995, 11(3): 246.

黄杞叶提取物降血糖作用的研究

李晨岚^{1,2}, 王大鹏², 蔡兵^{2*}, 郑应华^{1,2*}

(1. 华中农业大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430091; 2. 北京生物医药研究所, 北京 100091)

摘要:目的 研究黄杞叶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性以及对正常小鼠糖耐量的影响。方法 水煎黄杞叶, 得黄杞叶水提物, 再经聚酰胺柱色谱分离, 得到水洗脱组分 (Fr-1)、20% 乙醇洗脱组分 (Fr-2)、95% 乙醇洗脱组分 (Fr-3) 和 90% 丙酮水洗脱组分 (Fr-4)。采用体外 α -葡萄糖苷酶活性筛选模型, 测试黄杞叶水提物和各组分样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。通过测定小鼠空腹血糖以及糖耐量, 评价样品对血糖水平的影响。结果 黄杞叶水提物和 Fr-3 对体外 α -葡萄糖苷酶活性具有明显的抑制作用, 且呈良好的量效关系, Fr-3 的抑制作用较黄杞叶水提物增强, 程度与样品浓缩倍数吻合。在小鼠体内实验中, 黄杞叶水提物和 Fr-3 对小鼠空腹血糖没有显著影响, 但使负荷高糖的小鼠血糖水平显著降低。结论 黄杞叶水提物和 Fr-3 能显著提高正常小鼠的糖耐量, 其作用机制可能与抑制 α -葡萄糖苷酶活性相关。Fr-3 富集黄杞叶水提物的活性成分, 是代表黄杞叶水提物相关作用的有效部位。

关键词: 黄杞叶; α -葡萄糖苷酶; 糖耐量

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1696-03

黄杞叶为胡桃科植物黄杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wall. 的干燥叶, 具有清热止痛之功效, 用于治疗感冒发热、疝气腹痛, 在民间常用作保健茶饮用。黄杞茶含有大量的黄酮糖苷, 具有良好的抗氧化活性。动物实验表明黄杞叶在抗凝血、调血脂等方面都有一定的效果^[1]。黄杞总黄酮可降低四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖^[2,3], 但是黄杞叶的降糖作用及作用机制尚未有系统的研究。因此, 本研究以 α -葡萄糖苷酶为作用靶向, 探讨黄杞叶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性以及对小鼠血糖水平的影响。

1 材料

1.1 药材: 实验用黄杞叶于2007年5月采自广西桂林山区, 由广西资源甜茶种植园提供, 经广西资源甜茶种植园技术员曾珊珊鉴定。

1.2 试剂与仪器: 拜糖苹 (阿卡波糖片, 北京拜耳医药保健有限公司, 规格 50 mg/片, 批号 110163); 4-

硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG, 美国 Sigma 公司); 牛血清白蛋白、可溶性淀粉 (上海生工生物工程技术有限公司); 聚酰胺薄膜 (浙江黄岩化学实验厂); 化学试剂均为分析纯 (北京化学试剂有限公司); 葡萄糖试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司); 酶标仪 (Spectramax M5 型, Molecular Devices Corporation)。

1.3 动物: 清洁级昆明种小鼠, 雄性, 6 周龄, 体重 (22 $\pm$ 2) g, 由中国协和医科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 黄杞叶的提取及制备: 取干燥黄杞叶 500 g, 粉碎, 水煎提 2 次, 每次用 5 L 水煎煮 2 h, 合并水煎液, 减压浓缩至小体积后冷冻干燥, 得黄杞叶水提物 180 g。取黄杞叶水提物 108 g, 用适量水溶解, 上聚酰胺柱 (4.6 cm $\times$ 40 cm, 保留体积 550 mL), 依次

收稿日期: 2008-04-07

作者简介: 李晨岚 (1983—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 主要从事中药药理学的研究。Tel: (010) 82693619 E-mail: xiaolan0425@163.com

* 通讯作者 蔡兵 郑应华 Tel: (010) 88546390 13391682332