

## 青龙衣多糖对 $S_{180}$ 小鼠红细胞 $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性及 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

汲晨锋, 肖 凤, 季宇彬

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**目的 考察青龙衣多糖对  $S_{180}$  小鼠红细胞  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性及  $[Ca^{2+}]_i$  的影响。方法 青龙衣多糖对  $S_{180}$  小鼠 ip 给药 7 d, 比色法结合试剂盒测定  $S_{180}$  小鼠红细胞膜  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶的活性, 采用激光共聚焦显微镜结合 Fluo-3/AM 荧光探针测定红细胞内  $[Ca^{2+}]_i$ 。结果 青龙衣多糖能提高  $S_{180}$  小鼠红细胞膜  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性 ( $P < 0.05$ ); 降低  $S_{180}$  小鼠红细胞  $[Ca^{2+}]_i$  ( $P < 0.05$ ), 并且青龙衣多糖的作用呈剂量依赖性, 以高剂量组的作用最佳 ( $P < 0.01$ )。结论 青龙衣多糖通过提高  $S_{180}$  小鼠红细胞膜  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶的活性, 排除离子跨膜转运障碍, 稳定其能量代谢和物质代谢, 有利于维持细胞内  $Ca^{2+}$  的正常浓度。

**关键词:** 青龙衣多糖;  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶;  $[Ca^{2+}]_i$

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1842-03

### Effect of Qinglongyi polysaccharide on $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -ATPase activity and $[Ca^{2+}]_i$ in erythrocyte of $S_{180}$ mice

JI Chen-feng, XIAO Feng, JI Yu-bin

(Ministry of Education, Research Center of Life Sciences and Environmental Sciences, Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of Qinglongyi polysaccharide on  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and  $[Ca^{2+}]_i$  in erythrocyte of  $S_{180}$  mice. **Methods**  $S_{180}$  Mice were ip administrated with Qinglongyi polysaccharide for 7 d. The  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activity was observed by spectrophotometer with test kit and the  $[Ca^{2+}]_i$  in erythrocyte of  $S_{180}$  mice was measured by laser scanning cofocal microscope (LSCM) with Fluo-3/AM. **Results** It showed that Qinglongyi polysaccharide increased  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activity ( $P < 0.05$ ), decreased the  $[Ca^{2+}]_i$  in erythrocyte of  $S_{180}$  mice ( $P < 0.05$ ) in a dose dependent manner. The effect in higher dosage was the best ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Qinglongyi polysaccharide could increase the  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase activity in erythrocyte of  $S_{180}$  mice, resolve the obstacle of ion transportation, stabilize the metabolism of energy and materials, and maintain the normal concentration of  $Ca^{2+}$ .

**Key words:** Qinglongyi polysaccharide;  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase;  $[Ca^{2+}]_i$

红细胞膜内的  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶是一个有效的钙泵, 能将过多的  $Ca^{2+}$  排出, 维持细胞内  $Ca^{2+}$  正常浓度。当病理状态时, 红细胞的 ATP 酶活性降低, 影响了红细胞的正常生理功能<sup>[1]</sup>。细胞内过量的钙对于红细胞是有害的, 通过膜上钙泵依赖于 ATP 主动排出细胞内钙, 如果细胞内  $Ca^{2+}$  超过钙泵排出能力或钙泵功能异常, 将使细胞内钙积聚, 钙沉积在细胞膜上, 使红细胞膜丧失其柔韧应变的性质, 变得僵硬, 降低可塑性, 使原双凹圆盘形红细胞变成有很多短的有规则突起的球状体——棘状细胞<sup>[2~4]</sup>。前期实验表明, 青龙衣多糖对  $S_{180}$  小鼠有抗肿瘤作用<sup>[5,6]</sup>。在此基础上, 本实验主要研究青龙衣多糖对

$S_{180}$  小鼠红细胞  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性及胞内  $Ca^{2+}$  浓度  $[Ca^{2+}]_i$  的影响, 从而进一步考察其对红细胞膜功能的影响。

#### 1 材料

1.1 药物及试剂: 青龙衣多糖 (哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心提供, 质量分数 66.08%); 5-氟尿嘧啶 (5-FU, 上海旭东海普药业有限公司); Fluo-3/AM 荧光探针 (美国 Molecular Probe 公司); ATP 酶测试试剂盒、蛋白定量试剂盒 (购自南京建成生物公司)。

1.2 动物及瘤株: 昆明种小鼠, 体质量 (20±2) g, 雌雄各半 (哈尔滨医科大学动物实验中心提供); 肉

收稿日期: 2008-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600816); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20060240001)

作者简介: 汲晨锋 (1978—), 男, 黑龙江人, 助理研究员, 博士生, 主要从事抗肿瘤药物研究。

Tel: (0451) 84866922 E-mail: smilejcf001@sina.com

瘤 S<sub>180</sub>(黑龙江省肿瘤医院)。

1.3 主要仪器:紫外-可见分光光度计,激光共聚焦系统(Leica SP2)。

## 2 方法

2.1 实验分组:小鼠随机分成 6 组,每组 10 只,分别为对照组(生理盐水),模型组,阳性对照组(5-Fu),青龙衣多糖低、中、高剂量组。

2.2 动物模型制备方法:无菌条件下抽取接种第 7 天的生长良好的 S<sub>180</sub>荷瘤小鼠腹水(活癌细胞数 > 97%),无菌生理盐水 1:4 稀释,按 0.2 mL/只(细胞浓度约 2 × 10<sup>7</sup>/mL),无菌操作小鼠右前肢皮下接种。对照组不接种。

2.3 给药剂量、途径及观察方法:青龙衣多糖高、中、低剂量(100、50、25 mg/kg)组,阳性对照组给 5-Fu 25 mg/kg,模型组和对照组给同体积生理盐水。于接种 24 h 后开始无菌操作 ip 给药,每只小鼠 0.2 mL/次,每天 1 次,连续给药 7 d,停药 24 h 后眼球采血。

2.4 红细胞膜的制备:新鲜血液 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 PBS 3 000 r/min 离心 5 min,洗涤 3 次,再以 1:1 比例悬浮于 PBS,制成红细胞悬液,血球计数板计数。红细胞悬液加入 5 mL 10 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 溶液,同时加入蛋白酶抑制剂对甲苯磺酰氟(PMSF),4 °C 溶血 12 h,将所得红细胞溶血液以 12 000 × g,4 °C 离心 15 min,弃上清液,10 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 溶液洗涤 3 次,同上离心,吸取白色沉淀物,最后 1:1 悬浮在 pH 7.4 PBS 缓冲液中。

2.5 红细胞膜蛋白定量:采用考马斯亮蓝法。取样品 0.05 mL 加入 3 mL 显色液,混匀,静置 10 min,于 595 nm 波长处,1 cm 光径,蒸馏水调零后,测各管吸光度。计算蛋白的量。

2.6 红细胞 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的测定:采用试剂盒方法测定。酶活性以每小时每毫克蛋白所产生的无机磷摩尔数表示,单位为:μmol/(mg · h)。

2.7 红细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的测定:新鲜血液加 3 倍体积 0.1 mol/L, pH 7.4 PBS, 3 000 r/min 离心 5 min,洗涤 4 次。准确吸取红细胞沉淀 100 μL, PBS 定容至 5 mL,吸取定容后血液 100 μL, PBS 定容至 2 mL,即得所需红细胞悬液。准确吸取红细胞悬液 100 μL,加 500 μL 无钙台氏液,200 μL Fluo-3/AM(用 DMSO 溶解,再加无钙台氏液,终质量浓度为 4 μg/mL),37 °C 避光染色 120 min,3 500 r/min,离心 10 min,弃上清液,加 300 μL 无钙台氏液,充

分吹散细胞,置于盖玻片上,上激光共聚焦检测。激发激光 488 nm,狭缝 500 μm,扫描激光强度 30%, PMTI 30%,物镜 40 倍。

2.8 数据处理:用 SPSS 11.5 软件处理,各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,样本比较采用方差分析检验。

## 3 结果

3.1 青龙衣多糖对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响:结果见表 1。模型组小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性降低,青龙衣多糖各剂量组能升高 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,青龙衣多糖低剂量组与模型组比较,差异显著(P < 0.05);青龙衣多糖中、高剂量组与模型组比较,差异非常显著(P < 0.01)。

表 1 青龙衣多糖对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性及红细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

Table 1 Effect of Qinglongyi polysaccharide on Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of erythrocyte membrane and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in erythrocyte of S<sub>180</sub> mice ( $\bar{x} \pm s$ , n = 10)

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -ATP 酶/ (μmol · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (荧光强度)
对照	—	0.286 9 ± 0.008 1	30.59 ± 6.32**
模型	—	0.152 3 ± 0.004 9	116.19 ± 2.36
5-FU	25	0.219 8 ± 0.022 6**	98.62 ± 5.69
青龙衣多糖	25	0.177 9 ± 0.032 4*	95.87 ± 5.26*
	50	0.211 8 ± 0.010 5**	67.58 ± 3.25**
	100	0.218 3 ± 0.014 3**	56.97 ± 3.62**

与模型组比较: \*P < 0.05 \*\*P < 0.01

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

3.2 青龙衣多糖对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的影响:结果见表 1。模型组荧光强度值明显大于对照组,说明 S<sub>180</sub>小鼠红细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>增加,且模型组之间比较有非常显著性差异(P < 0.01)。青龙衣多糖各剂量组均能使 S<sub>180</sub>小鼠红细胞内的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低,与模型组相比低剂量组有显著性差异(P < 0.05),中、高剂量组有非常显著性差异(P < 0.01)。

## 4 讨论

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,因此,测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。本实验则通过此种方法,研究青龙衣多糖对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响。结果表明,青龙衣多糖可以升高 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,从而有利于排除离子跨膜转运障碍,稳定其能量代谢和物质代谢,恢复红细胞的正常功能。

细胞内 Ca<sup>2+</sup>作为第二信使和细胞功能的重要

调节者,参与机体许多生理过程和发病机制。Ca<sup>2+</sup>引起的红细胞变形能力的下降的主要原因是<sup>[7,8]</sup>: Ca<sup>2+</sup>引起红细胞膜骨架网络的结构改变和脂双层组成的改变,使膜脂流动性减小;红细胞表面积与体积比的改变(膜成分的减少,细胞形态的改变); Gardos 效应和 Hb 的聚集使细胞内黏度增加;Ca<sup>2+</sup>引起膜蛋白的水解、聚集、交叉连接等结构改变使红细胞膜机械特性发生变化。研究结果表明,当机体处于肿瘤状态时,红细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高。给药后,红细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低,各给药组与模型组之间相比,均有不同程度的差异,提示青龙衣多糖通过提高红细胞表面钙泵活性,排出 S<sub>180</sub>小鼠红细胞内 Ca<sup>2+</sup>,使[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>降低,恢复红细胞正常的生理状态和功能。

参考文献:

[1] 吴克复. 细胞通讯与疾病 [M]. 北京:科学出版社, 2006.

[2] 石玉玲, 习松. Fluo-3 荧光微量法测定人红细胞胞浆内游离钙离子浓度 [J]. 检验医学, 2005, 20(3): 290-291.  
 [3] 刘群威, 汤圣兴, 胡焕昭, 等. 高血压病患者红细胞内 Ca 浓度及 ATP 酶活性与红细胞变形性的关系 [J]. 皖南医学院学报, 2005, 24(1): 38-40.  
 [4] 田红燕, 马爱群, 沈涪锡. 高血压患者红细胞 ATP 含量、红细胞膜 ATP 酶活性与钙、镁代谢的研究 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2002, 2(5): 183-185.  
 [5] 汲晨锋, 肖凤, 季宇彬. 青龙衣多糖对 S<sub>180</sub>小鼠红细胞膜唾液酸水平、ATP 酶活性及膜电位的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1685-1687.  
 [6] 季宇彬, 马宏图, 杨波, 等. 青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1145-1147.  
 [7] Masaki T, Yasokawa N, Tohnishi M. Flubendiamide, a novel Ca<sup>2+</sup> channel modulator, reveals evidence for functional cooperation between Ca<sup>2+</sup> pumps and Ca<sup>2+</sup> release [J]. *Molecul Pharmacol*, 2006, 69(5): 1733-1739.  
 [8] Moreau B, Straube S, Fisher R J, et al. Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent facilitation and Ca<sup>2+</sup> inactivation of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels [J]. *J Bio Chem*, 2005, 280(10): 8776-8783.

## 复肾降纤宁对糖尿病肾病大鼠的影响及机制研究

陈益山, 曹文富\*, 焦颖华

(重庆医科大学附属第一医院 中西医结合科, 重庆 400016)

**摘要:**目的 观察复肾降纤宁对糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏蛋白激酶 C(PKC)、血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子-β(PDGF-β)的影响及对肾脏的保护作用。方法建立链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病肾病(DN)大鼠模型,将成模糖尿病大鼠随机分成 4 组:模型组、复肾降纤宁组、厄贝沙坦组、厄贝沙坦+复肾降纤宁组,同时取正常大鼠设对照组。各组大鼠采用相应的干预措施处理 12 周。常规方法检测各组大鼠肾脏指数、血糖、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、尿白蛋白排泄率(UAER),免疫组化法检测肾 PKC 和 VEGF 表达,Western blotting 检测肾组织 PDGF-β 的表达,透射电镜观察肾脏超微结构。结果 模型组大鼠肾皮质 PKC、VEGF 和 PDGF-β 表达显著升高,肾脏超微结构改变明显,血糖、UAER、BUN、Scr、肾脏指数显著增高;复肾降纤宁组、厄贝沙坦组和厄贝沙坦+复肾降纤宁组上述指标显著低于模型组(P<0.05),肾脏超微结构改变明显改善;厄贝沙坦+复肾降纤宁组各项指标改善明显优于模型组、复肾降纤宁组和厄贝沙坦组(P<0.05),但未达到对照组水平。结论 复肾降纤宁对 DN 大鼠肾脏形态和功能有明显保护作用,其机制可能与减少肾组织中 PKC、VEGF 和 PDGF-β 的表达,减轻肾组织纤维化有关。

**关键词:**复肾降纤宁;糖尿病;蛋白激酶 C;血管内皮生长因子;血小板衍生生长因子

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)12-1844-05

### Effect of Fushenjiangxianning on diabetic nephropathy rats and study on its mechanism

CHEN Yi-shan, CAO Wen-fu, JIAO Ying-hua

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Fushenjiangxianning on renal protein kinase C (PKC), renal vascular endothelial growth factor (VEGF), renal platelet-derived growth factor β (PDGF-β), and renal protection in diabetic nephropathy (DN) rats. **Methods** The diabetic SD rats induced by STZ were divided into four groups: diabetic control group, Fushenjiangxianning group, Irbesartan group,

收稿日期:2008-07-11

基金项目:重庆市卫生局资助项目(渝中医[2003]32号 B-26)

作者简介:陈益山,重庆石柱人,在读硕士,主要研究方向为代谢病与肾病中西医结合治疗研究。E-mail: chenys06311@163.com

\* 通讯作者 曹文富