

究,可能是通过改变生物膜的理化性质和生理结构,如脂水分配系数等。将 3 种吸收促进剂配伍,结果壳聚糖分别和冰片、白芷挥发油都有协同作用,冰片和白芷挥发油无协同作用,说明壳聚糖和白芷挥发油的促吸收机制可能不同,冰片和白芷挥发油的促吸收机制可能相同或冰片用量较文献报道的少,所以作用不明显。总之,复合吸收促进剂配伍产生协同作用的原因有待进一步研究。

由于壳聚糖和冰片已是公认的无毒吸收促进剂,但关于白芷挥发油作为吸收促进剂和吸收促进剂配伍使用对肠黏膜的毒性未见报道,所以本实验从安全性角度出发,进一步考察复合吸收促进剂对肠黏膜的毒性。NPA 是细胞形态的重要参数,当吸收促进剂作用于肠黏膜时,NPA 值会不同程度的减少,从而反映吸收促进剂对肠黏膜的毒性。 V_i 值通常反映肠黏膜绒毛形态的变化,当有毒物质接触肠上皮黏膜时,绒毛皱缩,长度减小, V_i 也减小。本实验复合吸收促进剂配伍使用与台氏液比较,对 NPA 和肠绒毛影响小,NPA 和 V_i 值无显著变化,说明复合吸收促进剂配伍对肠黏膜无毒性作用。

参考文献:

- [1] 李娟,胡永华. 葛根素对人小细胞肺癌 H446 细胞周期和相关周期蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1535-1537.
- [2] 黄萍,龚永生,范小芳,等. 葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室 Apelin/APJ 系统的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 565-569.
- [3] Yu L L, Huang J D. Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats [J]. *Bioch Pharmacol*, 2000, 59: 665-672.
- [4] Polentarutti B L, Peterson A L, Sjöberg A K, et al. Evaluation of viability of excised rat interstitial segments in the using chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics [J]. *Pharm Res*, 1999, 16: 446-454.
- [5] 崔升森. 葛根素体内药理学及葛根黄酮自微乳化软胶囊的研究 [C]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [6] Stephens R H, O'neill C A, Warhurst A, et al. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296: 584-591.
- [7] 张峻颖,黄罗生. 壳聚糖及其衍生物在促进药物口服吸收中的应用 [J]. 海峡药学, 2004, 16(2): 24-27.
- [8] 樊岚岚,唐由之,卢景,等. 冰片对兔角膜上皮细胞膜促渗透作用的实验研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 1998, 8(2): 67-69.
- [9] 陈新梅,朱家璧,孙卫东,等. 吸收促进剂对人参皂苷 Rg1 鼻腔吸收的促进作用及鼻腔毒性 [J]. 药学报, 2006, 41(2): 149-155.
- [10] 李东晓,邓文龙. 冰片促透作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 87-89.

没药挥发油对大鼠神经胶质瘤细胞体外增殖的抑制作用

李舍予¹,田报春¹,张勇刚¹,王海龙²,景璐璐¹,莫显明^{1*}

(1. 四川大学华西临床医学院华西医院 生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041;

2. 四川大学化工学院, 四川 成都 610065)

摘要:目的 探讨没药挥发油(没药油)对大鼠神经胶质瘤细胞 C6 增殖抑制作用。方法 应用 MTT 法检测不同质量浓度没药油对 C6 细胞活性的作用; BrdU 掺入试验检测细胞增殖的变化; 流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 没药油对 C6 细胞活性有明显的抑制作用,其抑制率与质量浓度有关;没药油作用 24 h 后,C6 细胞 BrdU 标记指数明显降低;而不同质量浓度没药油作用 24 h 后,C6 细胞凋亡率与对照组相比无显著改变。结论 没药油对大鼠神经胶质瘤细胞株 C6 的增殖具有明显的抑制作用,但诱导细胞凋亡的作用不明显。

关键词: 没药; 没药油; 神经胶质瘤; 增殖; 凋亡

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1103-04

神经胶质瘤是常见颅内原发性肿瘤,对一般化学治疗均不敏感。尽管各种治疗手段不断提高,患者平均生存期仍不足 1 年。中国传统医学在治疗胶质瘤上有着悠久的历史,其中没药是各种治疗方剂中的重要组成药物之一。没药是橄榄科植物没药树

Commiphora myrrha Engl. 或爱伦堡没药树 *Balsamodendron ehrenbergianum* Berg. 树皮渗出的油胶树脂,含有挥发油、树脂、树胶等成分,有散血去瘀、消肿定痛等功效^[1]。Shoemaker 等^[2]发现利用中医传统的煎药方法制作的没药水提物对 8 种肿

* 收稿日期: 2008-10-22

基金项目: 四川大学大学生创新性实验计划重点项目(2007055)

作者简介: 李舍予(1985-),男,满族,天津市人,八年制医学博士在读,主要从事中药肿瘤药理及多基因遗传病发病机制的研究。

E-mail: lisheyu@gmail.com

* 通讯作者 莫显明 Tel: (028) 85164017 Fax: (028) 85164047 E-mail: xmingmo@scu.edu.cn

瘤细胞株中的 7 种有抑制作用,但对正常体细胞没有影响。另有报道,同属印度穆库尔没药 *Commiphora mukul* (Hook. ex Stocks) Engl. 提取物孕甾酮 (guggulsterone) 及麦加没药树 *Commiphora opobalsamum* Engl. 树脂和倍半萜类提取物可通过特异性诱导凋亡,抑制前列腺癌细胞活性^[3,4]。研究曾报道用没药饲养白化小鼠,对其 Ehrlich 腹水癌有一定的治疗作用。没药的挥发油成分没药油具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗血吸虫等作用,但其抗肿瘤作用研究较少。仅有研究报道没药油对齿龈成纤维细胞和齿龈上皮细胞有一定的细胞毒性^[5]。而其中一种呋喃倍半萜成分对乳腺癌细胞株 MCF-7 有抑制作用^[6]。本研究以大鼠神经胶质瘤细胞株 C6 为细胞模型,观察没药油对神经胶质瘤细胞的体外抑制作用,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药品、主要试剂和仪器:大鼠神经胶质瘤 C6 细胞本室自行保存。没药油为按照文献方法操作后得到 (总质量分数 > 98%)^[7]。胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司)、RPMI1640 培养基 (美国 Gibco 公司)、小牛血清 (兰州民海生物工程有限公司)、MTT (美国 Sigma 公司)、Dapi (美国 Invitrogen 公司)、5-溴脱氧尿嘧啶 (BrdU, 美国 Sigma 公司)、二抗 (鼠抗兔, 美国 Invitrogen 公司)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)、多谱酶标仪 (美国 Thermo 公司)、流式细胞仪 (美国 BD 公司)、荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 药物稀释:将 1 μL 没药油与无水乙醇 1:1 混合后,分别溶于 98 μL 超纯水中,混合均匀,备用。同时配置 1% 乙醇溶液。使用时取备用液用超纯水按照 1:10、1:100、1:1000 稀释。

1.3 细胞培养:大鼠神经胶质瘤细胞 C6 于 RPMI 1640 培养基 (含 10% 小牛血清), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养,细胞于培养皿中贴壁生长,每 2~3 天传代 1 次。

1.4 细胞活性测定 (MTT 法):分别将细胞用胰酶消化后,以每孔 1.5×10^4 个接种于 48 孔板,按质量浓度梯度分别加入没药油稀释液,终质量浓度分别为 0.16、0.8、1.6、8、16、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24 h) 和 0.24、1.2、2.4、12、24、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (72 h),对照组及低质量浓度组加入相应乙醇溶液补足 (使各孔乙醇终体积分数相同)。分别于作用 24 h 和 72 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h 后,

弃去上清,每孔加入 500 μL DMSO,震荡使沉淀完全溶解后用酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光度,并计算细胞存活率。实验重复 2 次,两次分别设复孔 5、6 个。

1.5 BrdU 掺入试验:分别将细胞用胰酶消化后,以每孔 3×10^4 个接种于 24 孔板,按质量浓度梯度分别加入没药油稀释液,终质量浓度分别为 0.8、8、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照组及低质量浓度组加入相应体积分数的乙醇溶液补足。于 20 h 后加入 BrdU 使终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后用 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min, 1% Triton-PBS 孵育 30 min, 5% 羊血清封闭 10 min,避光加入 BrdU 抗体室温孵育 2 h,加入二抗室温孵育 1 h, Dapi 染色,并于荧光显微镜下随机选取 10 个非重叠视野 ($\times 100$) 观察、摄影,计数 BrdU 阳性细胞数占总细胞数的比例,即 BrdU 标记指数 (labeled index, LI)。实验设复孔 4 个。

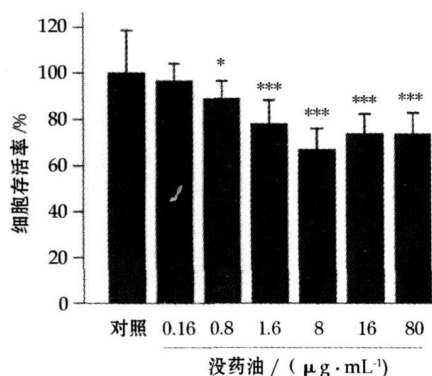
1.6 细胞凋亡检测:将培养于 25 mm 培养皿中的没药油处理组 (质量浓度分别为 0.8、8、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与对照组 (无水乙醇补足) 细胞分别消化收集,按照试剂盒说明书用 Annexin V-FITC/PI 双标记后进行流式细胞双色分析。

1.7 统计学处理:结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,数据分析、做图均采用 SPSS 13.0 统计软件。

2 结果

2.1 没药油抑制 C6 细胞活性作用:MTT 法提示,没药油对 C6 细胞的抑制作用呈质量浓度依赖性,在 8、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时作用最显著,而 72 h 时没药油抑制作用较 24 h 时下降 (见图 1、2)。没药油处理 24 h 和 72 h 后,当药物质量浓度分别为 8 和 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其细胞存活率分别下降到 $(67 \pm 7)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(78 \pm 6)\%$ ($P < 0.01$)。但当药物质量浓度超过此水平后,药物在两个时间点肿瘤细胞活性又有回升趋势。

2.2 没药油抑制 C6 细胞的增殖作用:Dapi 染色显示,用 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没药油处理 24 h 后细胞分裂指数 (分裂相细胞占总细胞数的比例) 较对照有显著降低 [对照组 $(28 \pm 1.0)\%$; 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没药油 $(1.6 \pm 0.7)\%$, $P < 0.05$]。BrdU 掺入实验表明没药油处理 24 h 可以使 C6 细胞 BrdU 标记指数明显低于对照 ($P < 0.05$, 见图 3),而在 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时没药油的作用最为显著 ($P < 0.01$)。但当没药油质量浓度达到 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 C6 细胞的 BrdU 标记指数却有所

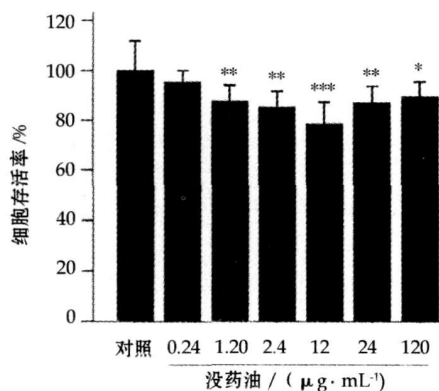


与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 没药油处理 24 h 后 C6 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Survival rate of C6 cells after 24 h-treatment with MO ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

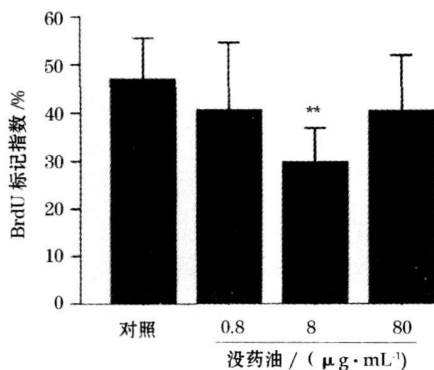


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 2 没药油处理 72 h 后 C6 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Survival rate of C6 cells after 72 h-treatment with MO ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图 3 没药油处理 24 h 后 C6 细胞 BrdU 标记指数 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 3 BrdU labeled index of C6 cells after 24 h treatment with MO ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

回升,并接近 0.8 μg/mL 没药油处理时的水平。提示 8 μg/mL 为没药油抑制 C6 细胞增殖的最适作用质量浓度。结果与 MTT 法一致。

2.3 没药油诱导 C6 细胞的凋亡作用: 为了进一步探讨没药油对 C6 细胞抑制作用的机制,通过流式细胞仪对经没药油处理后的细胞凋亡情况进行了检测,不同质量浓度没药油处理 24 h 后与对照组相比,凋亡程度未发现显著性差异 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 没药油对 C6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

Table 1 Effect of MO on apoptosis of C6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	坏死细胞/ %	凋亡晚期 细胞/%	完整活细胞/ %	凋亡早期 细胞/%
对照	-	0.10±0.00	1.80±0.28	95.95±0.64	2.15±0.35
没药油	80	0.20±0.00	3.30±1.98	93.30±2.97	3.25±0.92
	8	0.15±0.07	2.60±0.71	93.90±0.71	3.40±0.00
	0.8	0.15±0.07	4.00±0.99	91.65±0.78	4.20±0.28

3 讨论

没药油是没药的挥发油成分,主要成分为倍半萜类物质,包括呋喃桉叶素-1,3-二烯(34.0%)、香樟烯(12.9%)、莰烯(8.5%)等^[8]。其中,Zhu 等^[6]在没药的树脂成分中分离得到了 6 种单体成分,并证明其中的一种呋喃倍半萜类物质 [ret-1S, 2S-epoxy-4R-furanogerma-10(15)-en-6-one] 对乳腺癌细胞株 MCF-7 有抑制活性。本实验采用 MTT 法和 BrdU 掺入实验证实没药油对 C6 细胞有明显的抑制增殖作用,而并不引起 C6 细胞明显凋亡。当没药油质量浓度为 8 μg/mL 时平均抑制率最大,可达 33.8%。而文献报道没药油在 80 μg/mL 时才对齿龈上皮细胞和成纤维细胞的生长有明显的抑制作用,而 8 μg/mL 没药油对正常细胞无明显抑制作用^[1]。提示胶质瘤细胞比正常细胞对没药油更为敏感。本实验中,多种检测方法均提示当质量浓度达到 80 μg/mL 时,没药油对 C6 的抑制作用有所下降,提示没药油作用于肿瘤细胞存在最佳剂量。没药油抗肿瘤作用仍有待进一步研究。

致谢:四川大学生命科学院医学细胞生物学教研室胡火珍教授、杨春蕾副教授、张彤彤、马刚在实验设计和进展中给予的无私的指导和帮助;四川大学华西临床医学院/华西医院/生物治疗国家重点实验室干细胞生物研究室黄巧容、苟继龙、周立、陈乙兰、张胜良、尹超然在实验中给予的无私的帮助。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee S H, et al. In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs [J]. Phy-

- tother Res, 2005, 19(17): 649-651
- [3] Singh S V, Zeng Y, Xiao D, *et al.* Caspase-dependent apoptosis induction by guggulsterone, a constituent of Ayurvedic medicinal plant *Commiphora mukul*, in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by Bax and Bak [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(11): 1747-1754
- [4] Shen T, Wan W, Yuan H, *et al.* Secondary metabolites from *Commiphora opobalsamum* and their antiproliferative effect on human prostate cancer cells [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(9): 1331-1337
- [5] Tiptona D A, Lylea B, Babichb H, *et al.* *In vitro* cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2003, 17(3): 301-310
- [6] Zhu N, Kikuzaki H, Sheng S, *et al.* Furanosesquiterpenoids of *Commiphora myrrha* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(11): 1460-1462
- [7] 孙芳云, 张芳侠, 曾南阳, 等. 正交试验优选乳香、没药等五味药挥发油的提取工艺 [J]. *中成药*, 2005, 27(7): 828-829
- [8] Marongiu B, Piras A, Porcedda S, *et al.* Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extract of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. and of *Acorus calamus* L. [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(20): 7939-7943

枇杷花提取物止咳作用研究

王静波¹, 杨必坤¹, 张宏^{1,2*}, 李琪¹, 张晓喻¹, 刘刚¹

(1 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610068; 2 四川师范大学植物资源应用与开发研究所, 四川 成都 610068)

摘要:目的 研究枇杷花 95%、75%、50% 乙醇提取物, 水提取物和混合提取物的止咳作用。方法 分别采用小鼠氨水引咳法和枸橼酸豚鼠引咳法观察枇杷花各提取物的止咳作用。结果 与对照组比较, 枇杷花 95% 乙醇提取物, 混合提取物高、中剂量组及 50% 乙醇提取物, 水提取物高剂量组对小鼠和豚鼠均有明显的止咳作用, 并与阳性对照组相当。75% 乙醇提取物高、中剂量组和各提取物低剂量组均无明显止咳作用。结论 枇杷花 95% 乙醇提取物和混合提取物具有明显止咳作用, 50% 乙醇提取物和水提取物具有一定止咳效果, 75% 乙醇提取物无明显止咳效果。各提取物中三萜化合物可能具有明显止咳作用, 总黄酮具有一定止咳作用。

关键词: 枇杷花; 止咳; 总黄酮

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1106-04

枇杷花为枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥花蕾及花序, 气味香醇独特, 性温, 可入肺散寒, 化痰止咳, 治疗伤风感冒^[1,2]。枇杷花主要的化学成分是三萜类化合物^[3]和黄酮类化合物。文献报道枇杷叶中三萜类和黄酮类化合物均具有较好的抗炎和镇咳作用^[4,5], 在临床上多用于治疗急、慢性呼吸道疾病^[6]。而枇杷花的相关研究较少。本实验采用分光光度法和 HPLC 法测定枇杷花中的总黄酮、齐墩果酸和熊果酸的量, 用小鼠和豚鼠模型进行枇杷花不同溶剂提取物的止咳药效实验, 探讨枇杷花不同溶剂提取物的止咳效果, 以及止咳物质基础, 为枇杷花资源的开发利用提供科学的依据。

1 材料

1.1 药材: 枇杷花, 2006 年 10 月采于四川蒲江, 经本校生命科学学院植物教研室鉴定为枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的花, 采后置于 50℃ 下烘干备用。

1.2 药物与试剂: 复方磷酸可待因口服溶液 (4.5 mg/mL), 香港奥美制药厂生产, 批号 20070005; 京都念慈菴蜜炼川贝枇杷膏, 京都念慈菴总厂有限公司生产, 批号 L2710061; 蛇胆川贝枇杷膏, 广州潘高寿药液股份有限公司生产, 批号 G05013; 神奇枇杷止咳颗粒, 贵州神奇药液股份有限公司生产, 批号 20071015; 急支糖浆, 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司生产, 批号 88070500028; 氨水 (分析纯)、枸橼酸 (分析纯)、羧甲基纤维素钠 (CMG-Na) 均由成都市科龙化工试剂厂生产。

1.3 仪器: WH-2000 超声波雾化器, 汕头市粤华医疗器械厂有限公司生产; Buchi Syncore Analyst R-12 多功能平行浓缩仪; Shimadzu UV-1700 型紫外可见分光光度计; Dionex-Summit P680A DGP-6 型双三元高效液相色谱仪。

1.4 动物: 小鼠, 昆明种, 雌雄各半, 体质量 (20±2) g, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 动物合

* 收稿日期: 2008-09-25

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目 (2006B035); 四川省攀枝花市科技局重点项目 (2008CY-S-1)

作者简介: 王静波 (1982—), 女, 辽宁省辽阳市人, 硕士研究生, 主要从事天然产物研究工作。

E-mail: wangjingbo8299@163.com

* 通讯作者 张宏 E-mail: zhanghong651@yahoo.com.cn