



图 6 LAMS 对 PC-3 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of LAMS on Caspase-3 protein expression of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

前列腺癌是欧美国家主要的男性肿瘤疾病,目前普遍的观点认为,从正常前列腺组织发展到前列腺癌要经历 4 个主要的过程:前列腺上皮细胞内瘤、局部前列腺癌、侵袭性前列腺癌和转移性前列腺癌等几个阶段,其间每一步都伴随着遗传的改变和各种基因的异常^[5]。

本实验结果证实 LAMS 体外能抑制 PC-3 细胞的生长,并促进其 S + G₂ 期阻滞和凋亡,抑制 bcl-2 mRNA 表达及其蛋白表达,并促进 caspase-3 mRNA 表达及其蛋白表达。

本研究结果初步证实 LAMS 具有体外抗前列

腺癌作用。

参考文献:

- [1] Bratt O. Hereditary prostate cancer [J]. *BJU Int*, 2000, 85 (5): 588-598.
- [2] 董浦江,姚榛祥,涂刚. LAMS 对肝癌细胞株的 Bcl-2、Bax 基因蛋白影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2002, 27(1): 26-31.
- [3] Hoffman R, Paper D H, Donaldson J, et al. Characterisation of a laminarin sulphate which inhibits basic fibroblast growth factor binding and endothelia cell proliferation [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(11): 3591-3598.
- [4] 徐中平,李福川,王海仁. 昆布多糖硫酸酯的抑制血管生成和抗肿瘤作用 [J]. *中草药*, 1999, 30(7): 551-553.
- [5] Harrington K J, Spitzweg C, Bateman A R, et al. Gene therapy for pro-state cancer: current status and future prospects [J]. *J Urol*, 2001, 166: 1220-1233.

徐长卿多糖的分离纯化及其抗辐射和升高白细胞的作用

朱世权^{1,2},蔡文秀¹,薛玲¹,许云禄¹

(1. 福建医科大学蛇毒研究所,福建 福州 350004; 2. 福建省肿瘤医院 药剂科,福建 福州 350014)

摘要:目的 从徐长卿中提取多糖组分并观察其对辐射和环磷酰胺 (CTX) 所致小鼠骨髓抑制的影响。方法 水提醇沉法从徐长卿根茎粉末中提取徐长卿多糖粗品 (CPB),粗品经 DEAE-Sephrose FF 柱纯化,组分作 IR 分析。以 7.5 Gy ⁶⁰Co 射线正面及背面照射小鼠,观察徐长卿多糖对模型小鼠外周白细胞总数、骨髓 DNA 系数、胸腺系数及脾系数的影响。以 CTX 100 mg/kg ip 1 次致小鼠骨髓抑制后,观察徐长卿多糖对模型小鼠外周血白细胞总数的影响。结果 CPB 经 DEAE-Sephrose FF 柱色谱分离获得两个多糖组分峰 (CPBA 和 CPBB),提取率分别 16.57%、7.80%。小鼠接受 ⁶⁰Co 辐射后,CPBB 高剂量 [100 mg/(kg · d)] 组小鼠外周血白细胞数、骨髓 DNA 系数与模型组相应指标比较均明显增高 (P < 0.05); CPBB 低剂量 [50 mg/(kg · d)] 组胸腺系数及脾系数 (0.92 ± 0.32) 与模型组相应指标比较均明显增高 (P < 0.01)。小鼠 ip CTX 后,CPBB 高、中剂量组小鼠外周血白细胞数与模型组比较均有明显提高 (P < 0.05)。结论 徐长卿多糖 CPBB 有明显对抗 ⁶⁰Co 辐射引起的小鼠胸腺、脾缩小和骨髓 DNA 降低的作用,同时也有对抗 ⁶⁰Co 辐射或 CTX 引起的白细胞降低的作用。

关键词:徐长卿; 多糖; ⁶⁰Co; 环磷酰胺; 抗辐射

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)01-0103-04

收稿日期: 2009-03-12

作者简介: 朱世权 (1972—), 男, 福建省闽清县人, 主管药师, 硕士, 研究方向为医院药学。

Tel: (0591) 87688691 E-mail: zsqxq@126.com

*通讯作者 许云禄 Tel: (0591) 83569646 E-mail: snake@mail.fjmu.edu.cn

徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa 为萝藦科草本植物,入药部位为其根及根茎,部分地区用其带根全草。徐长卿又名蓼刁竹、竹叶细辛,为我国药学专著《神农本草经》所收载,以后历代本草书籍亦多载入。徐长卿性温,味辛,归肝、胃经,具祛风止痛、温经活络、解毒消肿之功效,常用于治疗风湿痹痛、胃痛胀满、牙痛、腰痛、跌打损伤、荨麻疹、湿疹等。徐长卿主要活性成分有丹皮酚(又名牡丹酚)、苷元及黄酮、氨基酸等。此外已有文献报道,徐长卿中还含有多糖不同活性的多糖组分^[1]。

多糖类药物近年来很引人注目,尤其在抗凝、调血脂、提高机体免疫和抗肿瘤、抗辐射方面都具有显著药理作用与疗效。有文献报道多糖类物质对由于放化疗引起的机体白细胞减少具有明显的改善作用,如念珠菌多糖、人参多糖、细菌多糖等^[2-4]。而徐长卿中含有多糖活性多糖,关于它们对放化疗引起的小鼠骨髓抑制的影响尚未见报道,本实验对徐长卿多糖抗辐射和升白细胞作用进行初步研究,为其应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,体质量(20±2)g,雌雄兼用,合格证号:闽实动质准第002-04号,福建医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂:徐长卿购自福州市中药材医药公司,经福建省药材公司鉴定,产地山东,批号020130,药用部位为根茎;复方阿胶浆,山东东阿阿胶股份有限公司产品,批号041019;环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司出品,批号06020821。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器:岛津UV-2501PC型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司产品;Magna 750 FT-IR 红外光谱仪,美国 Nicolet 公司产品;LXI-B 低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器厂产品;TG328A 电光分析天平,上海天平仪器厂产品。

白细胞计数由福建医科大学内科基础教研室检测。⁶⁰Co 辐射在福建省肿瘤医院放疗中心进行。

2 方法

2.1 徐长卿多糖的分离纯化及红外分析

2.1.1 徐长卿多糖的分离纯化^[5-7]:徐长卿根茎干燥粉末用95%乙醇回流脱脂,残渣用10倍体积沸水提取4h,重复3次,滤过,残渣再用10倍体积5%NaOH于4~10℃浸泡12h,上清液用稀盐酸中和。合并滤液,透析,未透过部分减压浓缩,按Sevag法除蛋白后,4倍体积95%乙醇沉淀、静置、

离心,得沉淀,再经过多次水提醇沉,将最后所得沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤得固体,干燥称质量,得棕黑色颗粒粗品(CPB)。

称粗品CPB 10mg溶于10mL双蒸水中,4h过夜溶解,滤过,取滤液5mL上DEAE-Sephrose FF柱。洗脱液配制:A液为双蒸水;B液为含2mol/L氯化钠溶液。利用梯度混合器进行线性洗脱,洗脱速度为3mL/8min,收集3mL/管。测定487nm吸光度值(A₄₈₇)绘制洗脱曲线。按峰合并收集液,得溶液CPBA和CPBB。

2.1.2 定量测定^[8]:称取干燥葡萄糖标准品10mg,加蒸馏水溶解得0.1mg/mL的葡萄糖标准液。精密量取标准液1.0、2.0、4.0、5.0、6.0、8.0、9.0mL,置10mL量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,分别精密量取1mL,置于10mL具塞比色管中,加入1mL5%苯酚液、5mL浓硫酸,摇匀反应20min,以蒸馏水1mL、5%苯酚1mL、浓硫酸5mL混合液按上述操作做空白。置UV-2501PC紫外-可见分光光度计中,于487nm处测定吸光度值。以葡萄糖标准液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,制备葡萄糖溶液标准曲线并求其回归方程。

CPBA和CPBB依上述操作分别测定吸光度值,代入回归方程,求出质量分数及提取率。

2.1.3 IR分析:称取干燥样品2mg,以KBr压片,在4000~400cm⁻¹内进行扫描。

2.2 CPBB对小鼠⁶⁰Co辐射所致骨髓抑制的影响^[9,10]:取体质量18~22g的小鼠50只,雌雄各半,随机分为5组:对照组(无辐射)igNS20mL/(kg·d);模型组igNS20mL/(kg·d);CPBB高剂量组igCPBB100mL/(kg·d);CPBB低剂量组igCPBB50mL/(kg·d);阳性对照组ig复方阿胶浆20mL/(kg·d)(分上下午两次)。辐射前连续给药10d,每两天称体质量,根据最新体质量调整给药量。第10天将各组小鼠(对照组除外)安放在蛇毒研究所自行设计研制的有机玻璃制成的放射状鼠笼中,经7.5Gy⁶⁰Co射线正面及背面照射,辐射后继续给药6d,第7天称其体质量。小鼠眼眶取血,检查白细胞数。并将小鼠处死,取胸腺、脾、股骨分别称质量。计算胸腺系数[胸腺质量(mg)/体质量(g)],脾系数[脾质量(mg)/体质量(g)]。股骨称质量后,剪开股骨头,用5mmol/L氯化钙10mL将全部骨髓冲入离心管中,置4℃冰箱30min,2500r/min离心15min,弃去上清液,将沉淀物加0.2mol/L高氯酸5mL充分混合,90℃加热15

min, 冷却, 滤过, 滤液用紫外分光光度仪于 260 nm 处测定 A_{260} 值, 计算 DNA 系数 [A_{260} / 股骨质量(g)]。

2.3 CPBB 对小鼠 CTX 所致骨髓抑制的影响^[9,10]: 取体质量 18~22 g 的小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分为 6 组: 对照组 (NS + NS) ig NS 20 mL/(kg · d); 模型组 (CTX + NS) ig NS 20 mL/(kg · d); CPBB 高、中、低剂量 (CTX + CPBB) 组分别 ig CPBB 200、100、50 mg/kg; 阳性对照组 (CTX + 阿胶浆) ig 复方阿胶浆 20 mL/(kg · d); 实验共 14 d。阳性对照组每天分上下午各给药 1 次, 其余各组每天 ig 给药 1 次, 第 7 天对照组加 ip NS 20 mg/kg 1 次, 其余各组 ip CTX 100 mg/kg 1 次。每两天称小鼠体质量一次, 根据最新体质量给药。第 14 天小鼠眼眶取血, 检查白细胞数。

2.4 统计学处理方法: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理, 采用 One-Way ANOVA 方法进行组间分析比较, 选择 Dunnett 法进行单侧检验, 处理组内部比较采用 LSD 法进行检验。

3 结果

3.1 徐长卿多糖的分离纯化

3.1.1 CPB 粗品 DEAE-Sephrose FF 柱离子交换色谱: CPB 粗品经 DEAE-Sephrose FF 离子交换色谱得到 CPBA 和 CPBB 两个峰。

3.1.2 徐长卿多糖的定量测定: 应用苯酚-硫酸法, 将不同浓度的葡萄糖标准液置 UV-2501 PC 紫外可见分光光度计中, 测定 A_{487} , 可看出 A_{487} 值随葡萄糖标准液浓度的增加而增加, 以葡萄糖标准液浓度为横坐标, A_{487} 值为纵坐标, 求出葡萄糖标准液标准曲线的回归方程: $Y = 0.0106 X - 0.0034$ ($r^2 = 0.9971$)。得 CPBA 和 CPBB 的质量浓度分别为 65.02、69.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 提取率分别 16.57%、7.80%。接下来的生物学活性选用质量浓度较高的 CPBB 进行观察。

3.1.3 IR 分析: CPBA 和 CPBB 的 IR 谱结果显示, 除含有多糖特征吸收峰外, CPBB 在 1733 cm^{-1} 处吸收峰示有羟基成环结构。

3.2 CPBB 对小鼠 ^{60}Co 辐射所致骨髓抑制的影响: 经 ^{60}Co 照射, 模型组小鼠外周血白细胞数、骨髓 DNA 系数、胸腺系数、脾系数与对照组比较均有明显下降 ($P < 0.01$), 见表 1。说明 ^{60}Co 照射致小鼠骨髓抑制模型制备成功。CPBB 100 mg/(kg · d) 组小鼠白细胞数、骨髓 DNA 系数与模型组相应指标比较均明显增高 ($P < 0.05$); CPBB 50 mg/(kg · d) 组小鼠胸腺系数及脾系数与模型组相应指

表 1 CPBB 对 ^{60}Co 辐射小鼠白细胞数、骨髓 DNA 水平及胸腺、脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of CPBB on peripheral WBC, DNA coefficient of bone marrow, and indexes of thymus and spleen of mice irradiated with ^{60}Co ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	白细胞数/($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	骨髓 DNA 系数/(g ⁻¹)	胸腺系数/(mg · g ⁻¹)	脾系数/(mg · g ⁻¹)
对照	-	7.97 \pm 3.88	0.19 \pm 0.06	4.14 \pm 1.38	2.71 \pm 0.84
模型	20 mL	0.33 \pm 0.17	0.08 \pm 0.02	0.70 \pm 0.32	0.34 \pm 0.15
CPBB	100	0.66 \pm 0.42 *	0.11 \pm 0.03 *	2.08 \pm 0.49	0.97 \pm 0.48 **
	50	0.31 \pm 0.17	0.09 \pm 0.02	2.10 \pm 0.89 **	0.92 \pm 0.32 **
复方阿胶浆	20 mL	0.37 \pm 0.16	0.08 \pm 0.01	1.32 \pm 0.52 **	0.58 \pm 0.48

与对照组比较: $P < 0.01$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group

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

标比较均明显增高 ($P < 0.01$)。提示 CPBB 有防止辐射引起的白细胞降低和骨髓 DNA 水平降低的作用和明显保护 ^{60}Co 辐射引起胸腺和脾脏缩小的作用。

3.3 CPBB 对小鼠 CTX 所致骨髓抑制的影响: 模型组小鼠 ip CTX 100 mg/kg 1 次, 外周血白细胞数与对照组比较明显下降 ($P < 0.01$), 见表 2, 说明 CTX 致小鼠骨髓抑制模型制备成功。CPBB 高、中剂量组小鼠外周血白细胞数与模型组比较均有明显提高 ($P < 0.01$); CPBB 高、中、低剂量组与阳性对照组比较均无显著差异 ($P > 0.05$)。表明 CPBB 对 CTX 所致骨髓抑制小鼠白细胞减少均有对抗作用, 与传统治疗药复方阿胶浆效果相当。

表 2 CPBB 对 CTX 致骨髓抑制小鼠外周血白细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of CPBB on peripheral WBC number of mice with bone marrow inhibition induced by CTX ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	白细胞数/($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	20 mL	7.50 \pm 1.26
模型	20 mL	5.57 \pm 1.30 **
CPBB	200	8.19 \pm 2.30
	100	7.57 \pm 1.20
	50	6.35 \pm 1.88
复方阿胶浆	20 mL	7.39 \pm 1.08 *

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

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

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

4 讨论

植物多糖是由许多相同或不同的单糖以 或糖苷键所组成的化合物, 其相对分子质量一般为数万甚至数百万, 是构成生命活动的四大基本物质之

一,与维持生命功能密切相关。近年来研究表明多糖除具有免疫调节、抗肿瘤的生物学活性外,还有抗衰老、降血糖、抗凝血等作用,且其对机体不良反应少,因此对多糖的研究已成为医药界的热点领域。多糖的提取一般在提取前做脱脂预处理,去除组织细胞中脂质,然后用水、盐或稀碱在不同浓度下提取,所得多糖提取液可直接或离心除去不溶物。本实验采用 95% 乙醇回流脱脂,沸水、稀碱 4~10 提取徐长卿多糖,并用透析法除去小分子物质,以 Sevag 法除去蛋白,经 DEAE-Sephrose FF 阴离子交换色谱纯化,获得徐长卿多糖,该分离纯化工艺快速简便、重复性较好,是分离徐长卿多糖较好的方法。

多糖为一大类天然产物,广泛存在于动物、植物、微生物等有机体中,具有多种生物学活性如调节机体免疫功能,防御细菌或病毒的感染;具有抗凝血活性,对抗血栓的形成;能激活脂蛋白酶,调节机体脂质代谢;血管壁上的多糖具有大的黏滞性,可保持或维持管壁坚韧性和通透性^[11]。前期研究发现徐长卿多糖 ig 给药对小鼠移植性腹水癌 H₂₂、EAC 和实体瘤 S₁₈₀ 生长具有抑制作用^[12]。目前,肿瘤的治疗仍然以放疗和化疗为主,但其引起的骨髓抑制及不良反应却严重地影响了患者的生存质量。辐射可引起机体物质代谢紊乱,造成神经系统、内分泌系统调节障碍,破坏机体组织的蛋白质、核蛋白和酶等。肿瘤化疗药的主要不良反应是骨髓抑制、脱发和消化道出血等,CTX 的主要不良反应是对免疫功能和造血系统具有抑制作用,对其目前尚无有效防治手段。多种多糖具有明显的抗辐射和免疫调节作用,其机制可能与抗免疫损伤、保护造血系统、清除自由基等方面有关^[13]。本实验观察了徐长卿多糖对放化疗引起的小鼠白细胞减少的影响,提示与放化疗同时应用能够减小放化疗对骨髓的毒性作用,预防

白细胞减少,并具有与传统治疗药复方阿胶浆相当的效果,但量效关系不明显,这可有与多糖的药效特点有关,研究发现多糖调节免疫功能呈双相性,不是浓度越大功能越强,而是存在某一最佳剂量,其量效曲线呈“钟罩型”^[14,15],而非对称“S”型。本研究初步显示徐长卿多糖有良好的抗放化疗毒性效应,但其具体的作用有效部位、作用靶点、作用机制等还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王顺春,方积年. 徐长卿多糖的分离纯化与化学结构研究 I [J]. 中国药学杂志, 1999, 34(10): 656-658.
- [2] 侯震波,崔进,杨继红. 念珠菌多糖升白细胞作用的药理学研究 [J]. 昆明医学院学报, 2004 (2): 15-20.
- [3] 陈岩菊,杜伟彬,李树臣. 人参多糖在肿瘤放射治疗中升白细胞观察 [J]. 中医医学报, 2004, 32(2): 55-56.
- [4] 崔宏波,凌秋,李延平. 细菌多糖治疗白细胞减少症的实验研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(2): 123-126.
- [5] 韩果萍,段玉峰. 我国天然活性多糖药理研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(2): 138-141.
- [6] 方积年. 多糖的分离纯化及其纯度鉴别与分子量测定 [J]. 药学通报, 1984, 19(10): 622-625.
- [7] 陈建济,刘广芬,王晴川,等. 灵芝多糖的药效学研究 [J]. 海峡药学, 2000, 12(1): 51-55.
- [8] 杨林莎,李玉贤,李明丽,等. 苯酚-硫酸比色法测定百合多糖的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(8): 704-705.
- [9] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1991.
- [10] 李仪,等. 中药药理实验方法学[M]. 第 1 版. 上海:上海科学技术出版社, 1991.
- [11] 陈立,董俊兴. 多糖抗辐射作用研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(6): 380-382.
- [12] 林丽珊,蔡文秀,许云禄. 徐长卿多糖的提取及其体内抗肿瘤活性研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(5): 40-42.
- [13] 郭剑平,张伟,李燕玲. 多糖辐射损伤防护的研究进展 [J]. 辐射防护通讯, 2006, 26(5): 28-30.
- [14] Gao X X, Wang B X, Fei X J. Effects of polysaccharides (FIO-b) from mycelium of *Canoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cell and human PBMC (D) [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(12): 1179-1192.
- [15] 王国秀,蔺威鸣,赵瑞芳,等. 6 种多糖对小鼠免疫细胞活性作用的比较研究 [J]. 卫生研究, 2008, 37(5): 577-580.

黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的改善作用

苏旭春,梁傍顺,郭晓东,闫冰川,孔嘉欣,刘晓燕

(广州医学院附属肿瘤医院 中西医结合科,广东 广州 510095)

摘要:目的 观察黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的治疗作用及其机制。方法 50 例化疗后气虚证青紫舌患者静脉注射黄芪多糖针剂,并以丹参针剂为对照。观察治疗前后两组患者舌象、气虚证症状及止血功能的变

收稿日期:2009-06-07

作者简介:苏旭春(1972—),女,湖南茶陵人,副主任医师,硕士,研究方向为中西医结合治疗肿瘤疾病。E-mail: sxc118@126.com