

抑菌,用“++”表示;抑菌圈直径为 6.0~8.0mm 者为弱抑菌,用“+”表示;无抑菌作用用“-”表示

从实验结果可以看出,4 个浓度的狼紫草水提取物对乙型溶血性链球菌均无抑制作用(表 2),而对大肠埃希氏菌则有明显的抑制作用,0.04ml 狼紫草水提取物对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌也有一定的抑制作用,0.08ml 浓度对大肠埃希氏菌则有明显抑制作用。

3 讨论

体表溃疡创面极易感染细菌,溃疡面上大量的细菌生长、繁殖,需要消耗大量的生长因子和各种维生素等营养物质,造成局部甚至全身免疫功能下降,影响溃疡愈合。此外,细菌毒素具有溶解蛋白质和胶原纤维作用,可引起出血和血栓形成;感染细胞的蛋白质合成发生障碍,引起皮肤溶解、坏死,使溃疡进一步扩大;还可抑制成纤维细胞的生长,延缓损伤组织的修复,从而影响溃疡的愈合,造成溃疡迁延难愈。

天然药物是目前发现新药的重要源泉,已经引起世界各国的广泛重视。中医中药是其重要的组成部分,也是我国新药开发的优势领域。早在 20 世纪 50 年代我国医药工作者即开始了中药抑菌作用与抑菌成分研究,并发现许多具有抗菌作用的中药。目前国内研究已经证明,清热药绝大部分具有抑菌作用,其他如止血药、解表药也有一定抑菌作用,而补养药、安神药则极少具有抑菌作用^[6]。在中药体外抑菌实验的研究中,一方面在进行具有抑菌作用中草药物的筛选工作,另一方面也试图发现其中的有效抑菌成分。但是有关抑菌成分的研究,直到 20 世纪 80 年代以来,由于各种理化手段的使用才更加精细和深入。目前就成分而言,可将其大致分为有机酸、生物碱、黄酮、挥发油、醌类多以及萜类等^[7]。

大肠埃希氏菌、乙型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌均为院内感染或交叉感染的重要病原菌群^[8-9],根据有关研究结果已知它们均已发展出多药抗药性,许多过去有效的抗生素现在已失去了作用,筛选、开发出有效的抗生素或抑菌活性物质已成为当前面临的

重要工作。基于我们前期对狼紫草水提取物抗炎作用的认知,对其水提取物的体外抑菌作用进行了研究。我们的实验提示,不论是从 MIC 实验还是从纸片法结果都可以看出,狼紫草水提取物原液对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的生长均具有抑制作用,其中对大肠埃希氏菌的抑制作用最强,对粪肠球菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用其次,但对乙型溶血性链球菌的抑菌作用则不明显。狼紫草对抗大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌感染的良好的抑制作用,彰显出提取狼紫草的有效抑菌活性成分治疗临床感染病菌的极大运用前景。但体外抗菌试验具有抑菌作用只是初步说明药物单纯的抗菌作用,不足以阐明药物对整个机体的影响,其抗菌作用还需进行体内的抗菌实验和最终的临床验证。

参考文献

- [1]孙文晓,张海港,李晓辉,等.狼紫草水提取物抗皮肤溃疡与镇痛作用的实验研究[J].第三军医大学学报,2007,10(19):1892-1893.
- [2]吴瑕,陈东辉,雷玲,等.竹节人参抗炎镇痛作用研究[J].中药药理与临床,2007,23(1):43-45.
- [3]王燕燕,陈超,杨洪发.虎参痛风胶囊对大鼠足肿的抗炎作用[J].中国医院药学杂志,2005,25(3):206-208.
- [4]胡成穆,李俊.非甾体抗炎药的临床应用及不良反应研究进展[J].安徽医药,2001,5(3):161-163.
- [5]罗学娅,李明辉,吕莉,等.紫草的药理作用与应用研究进展[J].大连大学学报,2004,25(2):80-83,92.
- [6]山东医学院微生物学教研组.110 种中药抗菌谱试验的初步结果[J].山东医学院学报,1959,7(2):42-45.
- [7]王嵩.中草药抗细菌感染研究[J].北京中医杂志,2002,21(4):249-250.
- [8]冯笑峰,郭红琴.医院感染的调查[J].中华医院感染学杂志,2000,10(2):113-114.
- [9]刘春蓝.浅谈院内感染的因素与预防措施[J].中华中西医杂志,2006,4(3):109-110.

* 华中科技大学同济医学院附属梨园医院骨科(430077)

蜂房提取物中抗肿瘤成分的活性研究

张 坤* 魏金荣* 关一夫*

中草药蜂房由蜂蜡、蜂胶和蜂房油三种物质组成。其化学成分复杂,以树脂、油脂、色素、鞣质、糖类、有机酸、脂肪酸、苷类、酶和昆虫激素等为主。蜂房不仅具有攻毒疗疮、消肿散结以及祛风通络的药用功效,而且还表现出了抗肿瘤作用^[1]。已有文献报道蜂房或蜂胶的不同溶剂提取物对荷瘤鼠的 S180 实体瘤及 H22 肝癌细胞均有明显抑制作用^[2],并且在与放疗或化疗的配合使用时还表现出了增加疗效的作用。动物实验还证明提取物无毒副作用,不损伤正常组织^[3-5]。这些实验结果表明,蜂房或蜂胶的不同溶剂提取物中含有多种抗肿瘤的活性成分^[6-10]。本文报道了蜂房甲醇提取物的抗肿瘤效用的检

测作以简单介绍和论述。本研究对蜂房甲醇提取物的抗肿瘤效用进行了初步的探讨。我们将蜂房甲醇提取物的膏状物溶于 DMSO,制备成不同浓度作用于不同组织来源的肿瘤细胞。结果表明蜂房甲醇提取物具有抗肿瘤活性,并与浓度呈明显的量效关系。

1 实验材料与方法

1.1 主要药品及试剂

河北产蜂房购于天士力大药房;RIMPI1640 购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;FBS 购于 TBD;MTT 购于沃宏;PBS 购于北京中杉金桥;胰蛋白酶购于 SIGMA;AnnexinV-FITC 购于欣博盛生物;其他试剂

为国产分析纯。

1.2 蜂房甲醇提取法

将河北产蜂房粉碎后,称取 80g 粉末,与 1100ml 甲醇混合,浸泡过夜,将混合液超声 30 分钟 3 次后。将浸泡液离心 3000rpm/15min,取得棕色上清约 600ml;真空抽干后,得棕色膏状物,将蜂房的甲醇提取物溶于 25ml DMSO 中,振荡 10 分钟,抽滤后质量增加 0.5018g,得到浓度为 20.07mg/ml 的提取物,置于 4℃ 避光保存。

1.3 细胞培养

人胃腺癌细胞(SGC7901)、口腔上皮癌细胞(KB)、人宫颈癌细胞(HeLa)、人非小细胞肺癌细胞(H460)和人肝癌细胞(HepG2)均由我教研室传代培养,用含有体积分数 10% 的胎牛血清 RPMI1640 培养液在 CO₂ 培养箱中培养,培养温度为 37℃。其具体方法参见文献^[11]。

1.4 MTT 法测定蜂房甲醇提取物对肿瘤细胞的抑制效应^[11-12]

取对数生长期的肿瘤细胞,以 2.5×10^4 个/ml 细胞浓度接种于 96 孔培养板中,每孔加入 200μl 细胞悬液;24h 后换液,加入 200μl 用 RPMI-1640 培养基稀释的蜂房甲醇提取物,其稀释倍数分别为 100、200、400、800 和 1000。并作空白对照和 200 倍稀释的 DMSO 阴性对照加等量的培养基,每种药物浓度均做 6 个平行孔。置 37℃,CO₂ 培养箱中分别培养 24h 和 48h。实验终止前每孔加入 20μl MTT,继续培养 4h,弃上清,每孔加入 150μl DM-SO。充分振荡 10min,待孔内结晶溶解后,测量在 490nm 的 OD 值,利用空白对照组调零。根据下面公式计算蜂房甲醇提取物对肿瘤细胞增殖的抑制作用(肿瘤细胞存活率=实验组 OD 值/空白对照 OD 值×100%)。

1.5 SGC7901 凋亡的检测

取对数生长期细胞,以 1.25×10^5 个/ml 密度接种于培养瓶中,24h 后加入各浓度提取物(mg/ml)培养 48h,200 倍镜下观察并收集所有细胞;根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明,流式细胞仪检测 SGC7901 凋亡。以提取物浓度为 0.050mg/ml 为处理组,DMSO 浓度 0.100mg/ml 为对照组。

1.6 主要仪器

CO₂ 培养箱(Thermo, USA);倒置显微镜(麦克-奥迪,上海);电热恒温水浴锅(DK-S12,上海森信);微量高速离心机(TG16-W,湖北湘仪);pH 计(DELTAA320,梅特勒);磁力搅拌器(GL-3205B,其林贝尔);超声仪(KQ5200DE 型,昆山超声仪器厂);酶标仪(ST360,上海科华);流式细胞仪(FACSCalibur, BD 美国)。

2 实验结果

2.1 蜂房甲醇提取物对肿瘤细胞的抑制作用

数据表明,在甲醇提取物作用下,随着提取物浓度增加,细胞存活率随之下降。在提取物浓度小于 0.025mg/ml 时,多数实验组的存活率接近或高于阴性对照组的存活率。随着提取物浓度的增加,其细胞存活率逐渐下降。在提取物浓度为 0.1mg/ml 时,其抗肿瘤作用最为显著($P < 0.05$),其中 HeLa 和 H460 存活率相对较低。与阴

性对照相比,浓度大于 0.050mg/ml 时,提取物对不同肿瘤细胞存活率的影响均有显著差异($P < 0.05$);但浓度小于 0.025mg/ml 时,其存活率变化相对较小。与 24h 相比,48h 实验组在不同浓度的提取物作用下各肿瘤细胞的存活率多数均有不同程度的降低。提取物在两个时间点的抗肿瘤作用均呈剂量依赖性,表明随着提取物作用时间的延长,存活率也存在相似的作用。在提取物作用 24h 和 48h 后,0.100mg/ml 到 0.200mg/ml 的各组肿瘤细胞的存活率均有不同程度的升高。

2.2 蜂房甲醇提取物对 SGC7901 的抑制作用

SGC7901 对蜂房甲醇提取物浓度敏感性的变化趋势与其他细胞相似,但其存活率相对较高,从对其 48h 的各浓度照片可见,当提取物浓度高于 0.1mg/ml 时,基本未见细胞形态,多为细胞碎片;在浓度为 0.05mg/ml 组,可见少量单个细胞,未见呈集落生长;随着浓度降低,细胞数量明显增加,0.02mg/ml 组与阴性对照形态相近,但生长面积略小于空白对照。

2.3 流式细胞仪检测 SGC7901 凋亡

SGC7901 在提取物 0.05mg/ml 作用 48h 后,其存活率约为 50%,将细胞收集,FITC-PI 双染后,FCM 检测。与阴性对照相比,实验组凋亡特征区的细胞凋亡率随着提取物浓度增加而升高,呈一定的剂量依赖性。

2.4 SGC7901 在不同浓度(mg/ml)蜂房甲醇提取物作用 48h 后的细胞周期检测

与阴性对照相比,随浓度升高至 0.05mg/ml, S 期比例由 22.4% 降至 0, G2 期明显增加,说明在该浓度范围细胞周期受阻于 G1 期,并呈剂量依赖;但 D 组的 S 期未见明显变化,而 G1 期则出现明显下降,可能提示在高浓度作用下,细胞周期发生 G2 期阻滞;随提取物浓度升高,凋亡率明显增加,呈剂量效应关系,与凋亡检测结果趋势一致。

3 讨论

中药蜂房的攻毒祛风和止痒止痛功效早已在中医临床中得到了广泛的应用^[13]。运用现代生物技术对蜂房的研究表明,蜂房单用或与其他中药联合应用于肝癌、肺癌、结肠癌、宫颈癌及胃癌等多种癌症的治疗,均收到了满意的疗效^[1]。

蜂房甲醇提取物对不同肿瘤细胞均表现抑制作用,并存在相近的量效关系。0.100mg/ml 组与阴性对照的稀释倍数相同,因而可排除 DMSO 的毒性,初步推断其可能存在有效的体外抗肿瘤活物质;但多次重复实验结果均显示,5 种肿瘤细胞不同时间点上,0.100mg/ml 的存活率均略低于 0.200mg/ml,呈显著性差异(t 检验, $P < 0.05$),可能是由于其抗肿瘤物质的有效浓度在 0.100mg/ml 到 0.025mg/ml 之间呈量效关系,在高于 0.100mg/ml 浓度其抗肿瘤活性未见增加。但当提取物浓度低于 0.025mg/ml,其对肿瘤细胞的细胞毒性作用与阴性对照接近,细胞形态与空白对照相近,未见存在有显著时效和量效的关系,这可能是由于粗提物溶剂 DMSO 的毒性所致。当进行时效关系对比时,浓度小于

0.050mg/ml 时肿瘤细胞的 24h 存活率均高于 48h。

Annexin V-FITC/PI 凋亡检测结果显示,在提取物作用 SGC7901 细胞 48h 后,其凋亡率随着浓度的增加而升高,作用明显,说明蜂房提取物对 SGC7901 的生长抑制作用很可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。但由于高浓度的 C2、D2 区的细胞比例最高,说明在该浓度作用下,其存活率降低可能还存在其他原因导致肿瘤细胞进入凋亡晚期或坏死。其存活率的降低,很可能存在多种途径:其中 PI 染色的细胞周期检测结果显示,蜂房提取物可导致 SGC7901 发生 G1 期及 G2 期阻滞,诱导细胞凋亡的作用,其作用呈剂量依赖性。

作为蜂房的组分,蜂胶的抗肿瘤活性已被多篇文献报道,但对蜂房的研究相对较少。本实验结果显示,蜂房确有体外抗肿瘤的活性成分存在,对五种肿瘤细胞均具有生长抑制作用,并且存在部分的时效和量效关系,与上述蜂胶研究的结果相似。在其有效浓度范围内,不同肿瘤细胞 48h 的存活率均低于 24h,呈时效关系,说明其抗肿瘤物质并未因溶剂成分及温度的改变而失去活性,提示其粗提物所含有的抗肿瘤活性物质可能具有相对稳定的化学性质以及可溶于极性溶剂的性质;根据现有对蜂胶的研究,初步推断可能含有萜类及黄酮类的物质。

参考文献

- [1] 蔡新. 蜂房治疗肿瘤的临床应用[J]. 江苏中医, 1993, 14(6): 33.
- [2] 魏金荣, 张坤, 关一夫, 等. 蜂房提取物对荷瘤鼠放化疗的增效作用[J]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(5): 462-464.
- [3] 赵维成, 肖伟, 于德泉, 等. 蜂房抗肿瘤成分的提取及分析检测[J]. 实用肿瘤学杂志, 2000, 14(1): 14.
- [4] 魏金荣, 潘忠诚, 张玉魁, 等. 蜂巢提取物抗肿瘤作用的研究. 2003 年 8 月东北三省生物化学与分子生物学学会, 会议

交流

- [5] 赵维成, 逯晓波, 陈立群, 等. 蜂房挥发油的提取、分析及生物活性的检测[J]. 中国新医药, 2003, 2(3): 10-11.
- [6] Wang CD, Chen P, Jin HJ, et al. Nidus vespaee protein inhibiting proliferation of HepG2 hepatoma cells through extracellular signal-regulated kinase signaling pathways and inducing G1 cell cycle arrest[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40(11): 970-978.
- [7] Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities[J]. J Nat Prod, 1998, 61(7): 896-900.
- [8] Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, et al. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis[J]. J Nat Prod, 2000, 63(9): 1277-1279.
- [9] Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, et al. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities[J]. J Nat Prod, 2002, 65(5): 673-676.
- [10] Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 80(1): 67-73.
- [11] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2006: 190.
- [12] 赵俊霞, 袁广峰, 徐瑞雅, 等. 草菇培养物中粗三萜和黄酮含量及抗氧化抗肿瘤活性研究[J]. 菌物学报, 2007, 26(3): 426-432.
- [13] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 506-507.

* 中国医科大学生化与分子生物学教研室(110001)

首乌益智胶囊对血管性痴呆大鼠 Notch/Delta 信号通路 Notch1、Jagged1 基因表达的影响

李长生¹ 张志友² 杨晓妮¹ 王运满³

血管性痴呆(Vascular Dementia, VD)是因脑血管疾病所致的智能及认知功能障碍的临床综合征。其病理机制主要有脑梗死、小血管疾病、白质损伤、神经元损伤几方面。近来一些研究表明 Notch/Delta 信号通路可对神经干细胞增殖分化起非常重要的调控作用。Notch/Delta 信号通路上游基因的激活,可促使神经干细胞向星形胶质细胞、少突胶质细胞的分化、增殖和维持,分泌神经营养因子,修复受损神经元。Notch1 受体与 Jagged1 配体结合,经过三次切割,形成 NICD-CSL 转录复合体,启动神经祖细胞向神经中间细胞向神经干细胞向星形胶质细胞、少突胶质细胞分化、增殖、发育。首乌益智胶囊主要由制何首乌、黄芪、益智等药物组成,具有补肾填精、化瘀通窍的功能,临床治疗 VD 效果显著。本研究采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(4-VO)法制造 VD 大鼠模型,选

取 Notch/Delta 通路上 Notch1、Jagged1 基因作为研究对象,利用实时荧光定量 PCR 检测上述基因的表达,了解中药首乌益智胶囊对 Notch/Delta 通路的调控作用,进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 清洁级健康老龄大鼠 100 只(月龄>15 个月),雌雄各半,体重 300~400g。山东大学实验动物中心提供,实验动物质量合格证号:010281。

1.1.2 药物与试剂 首乌益智胶囊(药物组成:制何首乌、黄芪、益智、天麻、丹参、地龙、川芎等,0.5g/粒,相当于含生药 1.6g)由济南钢铁职工医院制剂室生产。脑复康片由济南东风制药有限公司生产(0.4g/片,批号 0307043)。用蒸馏水配置成相应浓度的混悬液,4℃保