

龙葵总碱对肿瘤细胞膜钠泵及钙泵活性影响的研究*

□季宇彬** 高世勇 (哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 哈尔滨 150076)
王宏亮 邹翔 (哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站 哈尔滨 150076)

摘要:目的:观察龙葵总碱对 S_{180} 小鼠及 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性的影响。方法:荷瘤小鼠分为治疗组(高剂量、中剂量、低剂量)和对照组(生理盐水组、环磷酰胺组),分别测定各组肿瘤细胞膜的 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性。结果:龙葵总碱对 S_{180} 小鼠及 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性均有明显的抑制作用,并且其抑制作用呈量效正相关。结论:龙葵总碱这一作用可能是其抗肿瘤作用机理之一。

关键词:龙葵总碱 肿瘤细胞膜 钠泵 钙泵

龙葵总碱(TA)是从茄科植物龙葵(*Solanum nigrum* L.)的全草或未成熟的果实中提取分离出的总生物碱,主要含龙葵碱(solanigrine)、澳茄胺(oslasodine)、龙葵定碱(solanigridine)等。研究表明该成分对 S_{180} 小鼠有显著的活性。前期研究工作发现,龙葵总碱能显著增加小鼠的生存时间,其抑瘤率与生理盐水组比较也十分显著^[1~2]。为进一步探讨龙葵总碱抗肿瘤作用机制,我们研究了龙葵总碱对肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性的影响。结果表明,龙葵总碱对肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 有显著的抑制作用,其抑制作用呈量效正相关,这可能是其抗肿瘤作用的机

制之一。

一、实验材料

1. **药物** 龙葵总碱(哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心提供,含量 99.5%);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 20050104);
2. **动物** 昆明种小鼠 $20 \pm 2g$, ♂ ♀ 各半,购于哈尔滨医科大学动物中心,许可证号 001010006。
3. **瘤株** S_{180} 、 H_{22} 瘤株购于黑龙江省肿瘤医院。
4. **试剂及仪器** ATPase 试剂盒、考马斯亮兰购于南京建成生物工程研究所;光学显微镜(leica);恒温水浴(HH-S);LD₄-2A 型台式低速离心机(北京医用离心机厂);QL-861 型涡旋混合振荡器(上海博博经贸有限公司);紫外可见分光光度计(尤尼柯)。

收稿日期:2006-02-20

修回日期:2006-08-15

* 国家自然科学基金项目(30400591):中药龙葵中生物碱促进转染阴离子通道(AEI)膜段域 K562 细胞凋亡作用及机制研究,负责人:高世勇;黑龙江省自然科学基金资助项目(D2004-13):龙葵总碱促进转染带 3 蛋白跨膜域 K562 细胞凋亡作用机制的研究,负责人:邹翔。

** 联系人:季宇彬,医学博士,教授,博士生导师,研究方向:分子药理学,肿瘤药理学,Tel: 0451-84866922, E-mail: zou8663202@163.com。

40 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

二、实验方法

1. 动物分组和给药 选用昆明种小鼠 50 只, 体重 $20 \pm 2\text{g}$ 。随机分成 5 组, 分别为实验组(高剂量组、中剂量组、低剂量组)和对照组(阳性对照组和阴性对照组), 每组 10 只小鼠。实验组皮下注射龙葵总碱 (37.50mg/kg 、 18.75mg/kg 、 9.37mg/kg), 阳性对照组皮下注射环磷酰胺 30mg/kg , 阴性对照组皮下注射同体积生理盐水。接瘤按《全国抗肿瘤药物体内筛选规程》方法进行^[3]。无菌连续给药 7d。

2. 肿瘤细胞 ATP 酶的制备 停药后次日, 在冰台上处死小鼠, 取出肿瘤细胞后, 加生理盐水洗涤离心 (800r/min) 1 次, 离心后弃上清, 留下层细胞, 再用生理盐水制备成一定浓度的悬液, 放入匀浆器中进行细胞破碎。制备好的细胞悬液放入 -20°C 冷藏, 或立即测定其酶活力。

3. ATP 酶活力测定

(1) 测定方法。取样 $200\mu\text{l}$ 按说明书进行 ATP 酶测试, 将紫外可见分光光度计调于 660nm 处测得 A、B、E 四管吸光度 OD 值。

(2) ATP 酶活性定义。以每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位, 即微克分子磷/毫克蛋白/小时 ($\mu\text{molPi/mgprot/hr}$)。

(3) 计算公式。ATPase 活力 = (测定管 OD 值 - 标准管 OD 值) $\times$ 标准管磷浓度 $\times$ 反应液中样品稀释倍数 $\times 6 \times$ 匀浆蛋白浓度 (酶促反应时间为 10min , 酶活力定义为 1h , 故乘以 6)。

4. 蛋白含量的测定 用考马斯亮兰试剂测定匀浆蛋白含量。

5. 统计学方法 计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示, 以 SPSS 11.0 软件统计分析, 组间差异采用方差分析。

三、实验结果

1. 龙葵总碱对 S_{180} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性的影响

龙葵总碱高剂量组 (37.50mg/kg) 与生理盐水组比较有非常显著性差异 ($p < 0.01$); 中剂量组 (18.75mg/kg) 与生理盐水组比较显著性有差异 ($p < 0.05$); 而低剂量组 (9.37mg/kg) 与生理盐水组比较无统计学意义, 可见龙葵总碱对 S_{180} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 具有明显的抑制作用, 并且抑制作用呈量效正相关 (见表 1)。

2. 龙葵总碱对 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性的影响

龙葵总碱高剂量组 (37.50mg/kg) 和中剂量组 (18.75mg/kg) 与生理盐水组比较均有显著性和非常显著性差异 ($p < 0.01$); 而低剂量组 (9.37mg/kg) 与生理盐水组比较无统计学意义 ($p > 0.05$), 可见龙葵总碱对 H_{22} 小鼠肿瘤细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 活性具有明显的抑制作用, 并且抑制作用呈量效正相关 (实验结果见表 2)。

四、讨论

ATP 酶存在于组织细胞膜及细胞器膜上, 是细胞膜蛋白的组成部分。其作用在于保持细胞膜内外的离子平衡, 保持细胞膜内外的离子浓度差; 对细胞容积, 渗透压, 营养物质的进入, 都起着重要作用。机体在疾病状态下 ATP 酶的活力会发生改变, 因此 ATP 酶的活性是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。其中 Na^+ , K^+ -ATPase 及 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 能分解三磷酸腺苷, 释放能量, 供 Na^+ , K^+ , Ca^{++} 和 Mg^{++} 的转运^[4,5]。据报道 Ca^{++} 跨膜转运与细胞膜 Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase 和 Na^+ , K^+ -ATPase 酶活性有关。

一般细胞大约半能量代谢所获得能量的 20%~30% 用于 ATP 酶的转运, ATP 酶活性最重要的意义在于它能建立起一种势能贮备, 供细胞的其它耗能过程利用。近年来, 大量研究表明, 机体患肿瘤以后, 肿瘤细胞的 ATP 酶活性显著升高, 这可能是肿瘤组织异常增生的物质基础之一^[6]。

龙葵碱有很多药理活性^[7], 但对其抗肿瘤作用的实验研究报道不多。本研究表明龙葵总碱可显著抑

表1 龙葵总碱对 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞膜 Na⁺,K⁺-ATPase 和 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 活性的影响(x±s)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (n)	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 活性 (μmolpi/mgprh)	Ca ⁺⁺ ,mg ⁺⁺ -ATPase 活性 (μmolpi/mgprh)
高剂量组	37.50	10	2.701±0.136**	2.964±0.156**
中剂量组	18.75	10	3.090±0.223*	3.290±0.169*
低剂量组	9.375	10	3.670±0.092	3.534±0.126
环磷酸胺组	30	10	2.409±0.245**	3.021±0.264**
生理盐水组	同体积	10	3.800±0.170	3.745±0.135

注:与生理盐水相比较,* p<0.05,** p<0.01,下同。

表2 龙葵总碱对 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 Na⁺,K⁺-ATPase 和 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 活性的影响(x±s)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (n)	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 活性 (μmolpi/mgprh)	Ca ⁺⁺ ,mg ⁺⁺ -ATPase 活性 (μmolpi/mgprh)
高剂量组	37.50	10	1.633±0.177**	2.869±0.095*
中剂量组	18.75	10	2.064±0.307**	1.728±0.151**
低剂量组	9.375	10	3.801±0.240	3.062±0.2502
环磷酸胺组	30	10	1.652±1.908**	2.109±0.2845**
生理盐水组	同体积	10	1.652±1.908	3.745±0.135

制 S₁₈₀、H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 Na⁺,K⁺-ATPase 及 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 的活性,其中高剂量组对 S₁₈₀、H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 Na⁺,K⁺-ATPase 活性显著降低(p<0.01),对 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞膜 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 活性也是具有显著降低作用(p<0.01),但对 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 活性降低作用并不十分显著(p<0.05);中剂量组对 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 活性降低作用十分显著(p<0.01);低剂量组则无统计学意义(p>0.05)。

综上所述,龙葵总碱对肿瘤细胞膜 Na⁺,K⁺-ATPase 及 Ca⁺⁺,Mg⁺⁺-ATPase 有显著的抑制作用,这一作用使肿瘤细胞的异常增生受阻,使其细胞代谢的能量不足,从而无法进行“正常”的细胞增殖,进而发挥抑制肿瘤细胞的作用。这可能是其抗肿瘤作用的机理之一。

参考文献

- 1 季宇彬,王胜惠,高世勇,等.龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜唾液酸含量和封闭度的影响.中草药,2005,36(1):79~81.
- 2 季宇彬,王胜惠,高世勇,等.龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响.中草药,2005,36(2):239~241.
- 3 陈淑云.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1982:1116~1117.
- 4 Missiaen L, Wuytack F, Raeymaekers L, et al. Ca⁺⁺ extrusion across plasma membrane and Ca⁺⁺ uptake by intracellular stores. Pharmacol Ther, 1991, 50(2):191~232.
- 5 Jin L Q, Shi L. Effect of saponins of panax notoginseng on sodium-potassium-adenosine triphosphatase and calcium-magnesium-adenosine triphosphatase. Acta Pharmacol Sci, 1991;12(6):504~506.
- 6 季宇彬,马英丽,马瑛,等.薏苡仁对荷瘤小鼠红细胞免疫功能及 Na⁺,K⁺-ATPase 活性的影响.黑龙江商学院学报(自然科学版),1999,15(3):3.
- 7 季宇彬,王胜惠,高世勇,等.龙葵活性成分的研究.哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(6):637~641.

The effect Effect of Total Alkaloids from Solanum nigrum on activities Activities of Na^+,K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{++},\text{Mg}^{++}$ -ATPase in tumor Tumor cell Cell membraneMembrane

Ji Yubing, Gao Shiyong

(Research Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences,
Harbin Commercial University of Commerce, Harbin, 150076)

Wang Hongliang, Zou Xiang

(Postdoctoral Programme Work Station, the Institute of Materia-medica,
of Harbin Commercial University, Harbin, 150076, China)

Objective: To observe the effect of total alkaloids (TA) from Solanum nigrum on the activities of Na^+,K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{++},\text{Mg}^{++}$ -ATPase in tumor cells' membrane of S180 and H22 mice. **Methods:** Mice were divided into treated group (high, medium and low dosage) and control group (normal saline and cyclophosphamide), and the activities of Na^+,K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{++},\text{Mg}^{++}$ -ATPase in tumor cells' membrane were examined measured respectively. **Results:** TA showed pronounced inhibition on the activities of Na^+,K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{++},\text{Mg}^{++}$ -ATPase at in tumor cells' membrane, and it showed and the inhibition showed dose-effect positive relationship. **Conclusion:** This effect may be one of the mechanisms of its antitumor effect.

Keywords: Total alkaloids from Solanum nigrum(TA); Tumor cell membrane; Na^+,K^+ -ATPase; $\text{Ca}^{++},\text{Mg}^{++}$ -ATPase

(责任编辑:付建华, 责任编审:果德安, 责任译审:凌仰之)

(Continued from Page 70)

The Determination of Senegenin Content in Radix Polygalae from Shanxi

Zhao Yunsheng, Li Zhanlin, Zhang Liping

(Institute of Cash Crop Research; Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032200, Shanxi)

Yan Zhuoyun

(College of pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine and
Materia Medica, Chengdu 610075, Sichuan)

Mao Fuying

(Fen-yang Centers for Disease Prevention & Control, Fenyang 032200, Shanxi)

Objective: To study the senegenin content in Radix Polygalae from Shanxi. **Method:** The experiment was determined by HPLC. **Result:** There is obvious difference in the senegenin content of Radix Polygalae from different climate zones of Shanxi. **Conclusion:** There is some correlation between the senegenin content of Radix Polygalae and the climate zones of habitat

Keywords: Radix Polygalae; Shanxi; senegenin

(责任编辑:周立东, 责任编审:杜力军, 责任译审:凌仰之)