维普资讯 http://www.cqvip.com

K_{562}细胞有杀伤作用。

目前我们正进行苦参液有效作用成份的提取、纯化及诱导分化调控机制的研究苦参液的有效成份可望用于临床白血病的诱导分化治疗。

参 考 文 献

1.王振义，等.中华血液学杂志 1994;15:105
2.徐建国，等.中国中药杂志 1990;15(10):49
3.汤为学，等.重庆医科大学学报 1992;17(2):103
4.Sydney E.Salmen. Cancer Treat Rep 1984;68(1):117
5.B.B.Lozzio, et al. Proceedings of The Society For Experimental Biology And Medicine 1981;166:546
6.A.R.Green, et al. Exp Hema 1993:21:525
7.张守芳.苦参研究概况(续)，中草药通讯 1997;2:30
8.柴忆欢，等.苏州医学院学报 1992;(92):74
9.刘云鹏，等.中国医科大学学报 1989;(814):300
10.穗积本男.国外医学肿瘤分册 1992;19(1):37
11.姜绪荣，等.大连医学院学报 1991;13(4):151

(收稿日期 1998－09－21)

The effect of sophoa extract on induced differentiation of K_{562} cell strain

Qing Jianping, et al
Radiologic interventional group of radiology, chengdu army general hospital

Using culture assay in Vitro, K_{562} cell strain as anexperimental model, We observed the effect of sophoa extract on induced differentiation of K_{562} cell strain by cell growth curve, cell morphology, Latic dehydrogenase activity assay and hemoglobin determination. The effective concentration and time by MTT assay combined with cell morphology was studied. Results showed that K_{562} cell had been acted on by sophoa extract 12mg/ml for two days. Its morphology and metabolism were changed. Their LDH activity lowered obviously; the Hb was produced by these cells; the proliferation of the cell was suppressed. Electron microscopy showed: the cells differentiate toward the primitive cell with erythrocyte, granulocyte and monocyte lineages

KEY WORDS Sophoa flavescans Ait; K_{562} cell strain; Induction of differentiation

123-126

苦参碱的氚标记、鉴定

R273.37
R286.97
R286.0

临床生化教研室 许相儒* * 蒋纪恺 张 彦 刘北忠 张莉萍 刘小珊

提 要 苦参碱(matrine)是提纯于中药苦参、山豆根等豆科槐属植物的一种生物碱活性成分，经现代研究证实其有多种药理作用，尤以其诱导人类白血病细胞分化引人关注。为探明其作用机制，根据其结构特点、理化性质，并结合研究需要，我们尝试用同位素催化置换法对苦参碱进行氚(^3H)标记，标记结果：放射性总活度(RTA)>1.85×10⁹Bq;放射性比活度(S)=10.06×10¹Bq/μg;放射性化学纯度(RCP)=95.2%，并对标记产物的理化性能及生物学效应作以鉴定，证明用氚标记苦参碱的方法是成功的，能满足进一步研究的要求。

关键词 苦参碱; 氚标记 白血病 中药
中图分类号 R286.02

* 本课题为国家自然科学基金资助项目，编号:39670881
* * 男，1970－03出生，研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

苦参碱(matrine)是苦参(Sophora Flavescens)、山豆根等豆科槐属植物的干燥根中提取的一种生物碱活性成分。近代研究证实[1]，苦参碱有抗炎症、抗过敏、抗病毒、抗心率失常及抗肿瘤等多种药理作用。本课题组新近的研究表明，一定浓度的苦参碱可诱导人类红白血病细胞株K_{562}细胞向成熟方向分化；并显著影响K_{562}细胞的细胞周期和端粒酶活性。另外，也有苦参碱对人肝癌SMMC－7721细胞系在体外有较理想分化作用的报道[2]。那么，苦参碱究竟是通过何种方式去对肿瘤细胞发挥其多样性生物学效应的？我们有兴趣深入研究，试图从生物化学的角度阐明苦参碱的作用机理。首要问题便是探寻其作用点，拟用同位素氚(^3H)标记苦参碱研究之。

1 氚(^3H)标记苦参碱

1.1 方法原理

同位素催化置换法

苦参碱溶解于氚水(^3H_2O)中，在一定的pH值、催化剂和适当的温度下，置于特定的真空系统里，其分子中的氢原子(^1H)与氚水中的氢原子(^3H)发生置换反应。之后除去不稳定氢原子，经纯化后即获得氚标记的苦参碱。反应式：

AH＋B＊H－A＊H＋BH(AH代表苦参碱；A＊H代表氚标记苦参碱)

1.2 试剂、仪器

标记用苦参碱由本室用醇提法[3]提取(纯度99%)；苦参碱标准品(纯度99.9%)由日本大正制药惠赠。氚水(^3H_2O)、闪烁液(含0.4%PPO及0.01%POPOP甲苯液)、展开剂(正丁醇：盐酸：水5:1:1v/v)、流动相(0.05M磷酸二氢钠－乙腈－甲醇－过氯酸钠940:50:10:20v/v)；美国Beckman LS1801液闪仪，日本岛津LC－6A HPLC(配SPD－6AV紫外检测器及C－R3A数据处理装置)、中国上海ZF－2型紫外透射仪，真空玻璃系统、层析缸、Whatman 3#滤纸，

1.3 标记方法

置换标记(苦参碱和氚水在实验条件下充分反应)→纸层析纯化产物(利用纸层析来分离氚标记苦参碱并去除杂质)→标记物的放射性比活度及放射性化学纯度测定(利用液闪仪、HPLC仪分析标记产物)。

1.4 标记结果

标记物的放射性总活度(RTA)＞1.85×10^9Bq

标记物的放射性比活度(S)＝10.06×10^3Bq

标记物的放射化学纯度(RCP)＝95.2%

2 氚标记苦参碱的鉴定

2.1 理化鉴定

2.1.1 外观 氚标记苦参碱的水溶液呈无色、清亮、无沉渣及悬浮物。贮存水溶液的pH值为4.0(广泛pH值试纸检测)。

2.1.2 纸层析分析

参照文献[4]，用正丁醇：盐酸：水(5:1:1v/v)作为展开剂，以Whatman3#滤纸作固相载体对标准苦参碱和氚标记苦参碱进行分析。在实验条件下展开10cm，紫外透射仪上确定其迁移距离，计算比移值(Rf)。结果：

Rf标准苦参碱＝0.8148

Rf标记前苦参碱＝0.8146

Rf氚标记苦参碱＝0.8163

2.1.3 反相离子对HPLC测定

为确保标记物的质量，苦参碱标记前后均以刘北忠等[5]建立的反相离子对HPLC方法测定。结果(见图1)

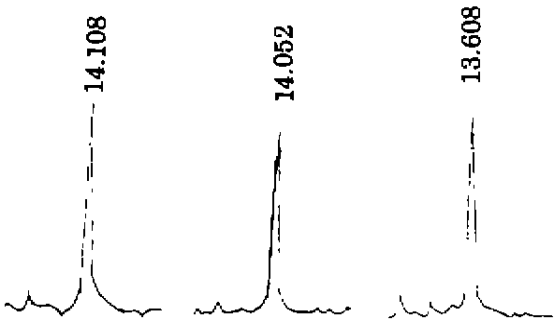


图1 A:标准苦参碱的HPLC图谱 (T_r＝14.108min)
B:标记前苦参碱的HPLC图谱 (T_r＝14.052min)
C:氚标记苦参碱的HPLC图谱 (T_r＝13.608min)

2.2 生物鉴定(生物学效应观察)

取对数生长期的K_{562}细胞、PRMI 1640(GIBCO、USA)培养液(含10%小牛血清)调整细胞浓度为1×10^5个/ml，一瓶加上氚标记苦参碱贮存液，使终浓度为0.1mg/ml。另一瓶不加药作对照，置37°C、5%CO_2孵箱中培养3天，取出涂片做瑞

维普资讯 http://www.cqvip.com

氏染色光镜观察(见图2)发现:对照组形态基本无变化,仍为细胞大小不一,多数细胞较大,核仁不明显,核膜不清。细胞质呈少量蓝色。加药组细胞形态则发生了变化,胞体变小,核浆比减小,染色质固缩致密。有分化趋势。

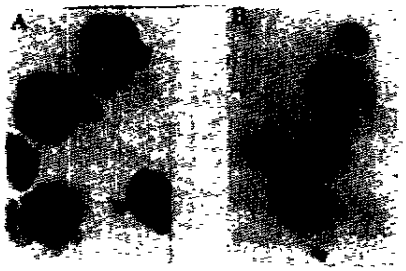
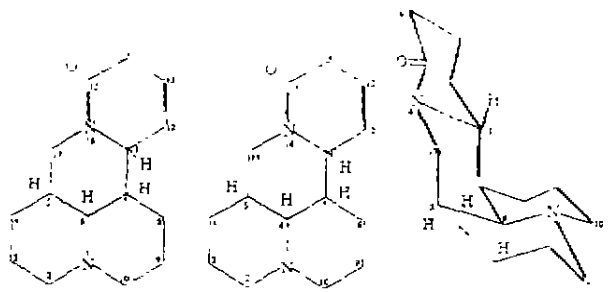


图2 A: 对照组K_{562}细胞瑞氏染色结果
B: 加药组K_{562}细胞瑞氏染色结果

3 讨论

同位素标记药物的成功与否通常要涉及两方面的问题。一是标记同位素的选择。氚标记化合物的方法比较简单,且氚标记的化合物具有一些较突出的特点,其半衰期长达12年,可以提供给研究者充裕的工作时间;氚所发射的β射线的能量低,操作时易于防护,做自显影实验可以得到较高的分辨率;最重要的是经氚标记后通常药物本身的结构与功能不受影响,能保持其原有的生物活性。这一点与我们的研究需求相吻合。另一个重要前提便是被标记的化合物结构应清楚,性质应明确。苦参碱分子式为$C_{15}H_{24}N_2O$,分子量248.36,结构式(见图3)。其分子中有两个氮原子,N_1处于骈合环之间,立体效应的影响比较小,是正常的叔胺,极性极大,亲水性也强,能与酸结合成盐。N_{16}则呈酰胺状态,几乎不显碱性,所以苦参碱只相当于一元弱碱(PKa=8.24-0.01[6]),性质较稳定。立体构象显示:苦参碱分子中C_5、C_6、C_7三个手性碳原子都是顺式的状态,而C_{11}碳原子则呈反式排列。加之苦参碱的光谱学(红外光谱、质谱、核磁共振氢谱、碳谱)特性均已得到确认[7]。因而对苦参碱进行氚标记从理论上分析是合理、可行的。



平面结构式 构象式

液相的催化同位素置换标记法是以氚水为氚化试剂,用钯、铂等作催化剂,在溶液中进行氢与氚的交换反应。此法属非定位标记,常用于标记中草药的有效成分。标记及产物的分离纯化都比较简单、易行。缺点是标记物易发生歧化反应、消旋作用、降解反应等现象,从而影响标记物的生物活性和有效期[8]。基于此原因,我们才对标记的苦参碱作了进一步鉴定,以确保下面研究工作的顺利开展。

从纸层析分析结果看,标准苦参碱与标记前后苦参碱的Rf值基本一致,说明经氚标记后的苦参碱迁移属性同标记前及标准苦参碱。但与林启寿报告[9]的Rf值(Rf苦参碱=0.74)有差别。笔者以为这可能与所使用的固相载体的性能以及展开距离的不同有关。滤纸的厚度、纸孔径的大小和纯净程度等都影响纸中固定相和流动相的比例,因而影响着Rf值。标准及标记前后苦参碱的HPLC测定结果显示Tr略有不同,主要原因在于标记后测定时重新配制了流动相,所使用的试剂纯度、批号有差别所致。所幸在检测标记物时我们还增加了一个苦参碱标准样,其Tr=13.642 min(文中未图示),证明了氚标记苦参碱的属性未发生变化。另外,标记物中因有杂质混入,使得杂峰较标记前增多。

有报道[10]苦参碱在pH4.2时性质最稳定,常温下可保存一年无改变。为在较长时间保持其化学稳定性,笔者将氚标记苦参碱的贮存液pH值调至4.0。同时为减缓标记物的降解,将其避光4°C冰箱贮藏。

从理化鉴定发现氚标记苦参碱的属性基本同前,可如何确证其旋光活性未发生改变,就必须从生物学效应的角度去考察标记物。作用3天后的K_{562}

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞形态学上趋于分化则说明氚标记苦参碱仍具有诱导白血病细胞向成熟分化的趋势，间接证明了其构象基本未变。

通过对氚标记苦参碱的质量鉴定，并结合标记物的RTA、S及RCP等指标，证明标记的产物能满足我们继续深入研究苦参碱诱导白血病细胞分化机制的需要。而且为苦参碱类化合物进行氚标记提供了一个成功的示例；为揭开苦参及其生物碱广泛的生物活性作用提供了可能性。

(致谢：诚挚感谢中国原子能科学院同位素研究所沈德存、廖玢二位老师的指导和帮助。参加本项工作者尚有何于娟、朱旦、戴碧涛、王一茹等。)

参 考 文 献

1.胡 烈.中西医结合杂志 1994;10(3):59
2.于喜水，等.中成药 1990;12(3):3
3.张燕军，等.陕西中医 1997;18(2):93
4.北京医学院，北京中医学院.中草药成分化学.人民卫生出版社 1980;133
5.刘北忠，等.重庆医科大学学报 1997;22(4):302
6.杨万清，等.沈阳药学院学报 1992;9(4):297
7.祝经平，等.中成药 1997;(3):36
8.王浩丹，等.生物医学标记示踪技术.北京：人民卫生出版社 1995;3
9.林启寿.纸上色谱及其在中草药成分分析中的应用.北京：科学技术出版社 1983;80
10.周浩忠，等.中国医院药学杂志 1995;15(2):57

(收稿日期 1998－03－25)

Matrine labeled by tritium and its identification

Xu xiangru, et.al
Department of clinical biochemistry, faculty of laboratory medicine

Matrine, a kind of alkaloids which purified from legume family, such as chinese herbs Sophora flavescences Ait. and Radix sophorae Tinkinensis, has multiple pharmaceutical effects. But the most one attractive to researchers is that matrine could induce the human leukemia cell line differentiation. In order to elucidate the mechanism by which the matrine acts, according to the structural and physi－chemical features of matrine, as well as the research objection, the matrine was labeled by tritium(^3H) through the methods of isotope catalyze exchange labeling. The results:RTA＞1.85×10^8Bq;S＝10.06×10^3Bq/μg;RCP＝95.2%. Meanwhile the ^3H matrine also identified by PC,HPLC and bio－effect determination. It indicates that the matrine labeled by tritium was successful, and the labeling product can meet the requirements for further study.

KEY WORDS Matrine; Tritium, labeling; Identify

126-129 (5)

双歧杆菌及其表面分子粘附肠上皮细胞的研究*

Q939.121
Q936

检验系 蒋 虹** 胡 宏 尹一兵 康格非

提 要 本文采用人结肠腺癌细胞株Lovo体外培养研究分叉双歧杆菌粘附的性质和机制。结果发现：分叉双歧杆菌的粘附具有时间依赖性和菌量依赖性。静止期菌粘附作用最强，酸性pH值可以促进其粘附。通过WPG、LTA、多糖阻断试验及胰酶处理发现，WPG、LTA、细胞壁蛋白都参与了分叉双歧杆菌对Lovo细胞的粘附，说明此粘附过程是多种分子共同参与的结果。

关键词 双歧杆菌；表面分子；粘附 肠上皮细胞
中图分类号 Q936

双歧杆菌是人体肠道中最重要的生理菌，它粘附于肠道上皮细胞上，形成稳定的菌群，对于维持宿主肠道微生态平衡，增强免疫功能，抗肿瘤、抗感染、抗衰老等方面发挥了重要的作用[1,8]。粘附是其

* 国家自然科学基金资助项目(39870007)
** 女，1971－07出生，博士生