

- [2] 洪遵. 洪氏集验方[M]. 上海: 上海科技出版社, 2003: 4-4.
- [3] Gafni A. Proteomics in Aging-related Research [J]. Sci Aging Knowledge Environ, 2004(45): 41.
- [4] 邱柏程, 刘庆丰. D-半乳糖大鼠衰老模型的评价[J]. 广西医学, 2009, 31(7): 918-920.
- [5] 张星, 谢雁鸣. 后基因组时代中医药研究思路方法新探[J]. 中医药学报, 2001, 19: 426-427.
- [6] 孟庆宏, 王常松, 傅晓倩, 等. 蛋白质组学技术引入中医论证的可行性研究[J]. 中医学报, 2011, 2(26): 170-172.

(编辑: 邓响潮)

泽泻不同提取物对 SGC-7901 细胞线粒体能量代谢的影响

林文津, 徐榕青, 张亚敏, 李主泉, 张园秀, 郭娜 (福建省医学科学研究院 福建省医学测试重点实验室, 福建 福州 350001)

摘要: **目的** 比较泽泻不同提取物对细胞线粒体能量代谢的影响。**方法** 分别制备泽泻水提取物(WRE)、乙醇提取物(ERE)、超临界 CO₂ 萃取物(SFE), 以 SGC-7901 胃癌细胞为研究对象, 阳离子荧光羰花青染料 JC-1 染色, 采用倒置荧光显微镜观察结合流式细胞仪检测 3 种提取物对细胞线粒体膜电位的影响; 应用酶标仪检测 3 种提取物对琥珀酸脱氢酶(SDH)活性的影响。**结果** 红色荧光减弱(或绿色荧光增强)的程度: ERE < SFE < WRE。流式细胞仪检测结果显示, 正常对照组、WRE 组、ERE 组、SFE 组的单阳细胞比例分别为 3.5 %、14.8 %、9.8 %和 17.3 %, 与正常对照组比较, 3 组提取物单阳细胞比例均有增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 与 ERE 组比较, WRE 组单阳细胞比例更高($P < 0.01$)、SFE 组单阳细胞比例最高($P < 0.01$); SDH 检测结果显示, SFE 组对细胞 SDH 活性有抑制作用, 而 ERE 组和 WRE 组均有不同程度的促进作用, 且 ERE 组对 SDH 的促进作用大于 WRE 组; 与正常对照组比较, ERE 组和 WRE 组的 SDH 活性差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 ERE 组比较, WRE 组、SFE 组的 SDH 活性差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 泽泻醇提取物对线粒体膜电位的损害较小, 对 SDH 活性促进作用较显著, 提示泽泻醇提取物具有较明显改善线粒体能量代谢的作用。

关键词: 泽泻; 提取物; 线粒体能量代谢; 膜电位; 琥珀酸脱氢酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0036-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.010

Effect of Rhizoma Alismatis Extracts on SGC-7901 Cell Mitochondrial Energy Metabolism

LIN Wenjin, XU Rongqing, ZHANG Yamin, LI Zhuquan, ZHANG Yuanxiu, GUO Na (Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Measurement, Fuzhou 350001 Fujian, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Rhizoma Alismatis (RA) extract on cell mitochondrial energy metabolism. **Methods** RA extracts were prepared by the water reflux extraction (WRE), ethanol reflux extraction (ERE) and the supercritical CO₂ fluid extraction (SFE), respectively. Human gastric carcinoma SGC-7901 cells were treated with the above three extracts, and then dyed by cation fluorescence carbocyanine JC-1. The mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells was determined by the inverted fluorescence microscope and flow cytometer, and the succinate dehydrogenase (SDH) activity was detected by microplate reader. **Results** The red fluorescence weakening (or green fluorescence strengthen) in the ERE, SFE, WRE groups was in increasing sequence, ERE <

收稿日期: 2013-09-26

作者简介: 林文津, 男, 副研究员, 研究方向: 中药资源开发利用与新药研究。Email: lwj680@139.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102875); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2013R0034-3)。

SFE < WRE. Single positive cell proportions of normal control(NC), WRE, ERE, SFE groups were 3.5 %, 14.8%, 9.8 %, 17.3 %, respectively. Compared with the NC group, single positive cell proportions of WRE, ERE, SFE groups were increased($P < 0.01$), and SFE group had the highest proportion($P < 0.01$). The result of SDH detection showed that SFE inhibited the activity of SDH, but the ERE and WRE promoted the activity of SDH ($P < 0.01$, $P < 0.05$ compared with normal control group), and the effect of ERE was stronger than that of WRE ($P < 0.05$).

Conclusion Ethanol extract of Rhizoma Alismatis has less damage on mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells, but can promote SDH activity, indicating that ethanol extract could improve the mitochondrial energy metabolism, and this will lay the foundation for investigating mitochondrial energy metabolism in vivo.

Keywords: Rhizoma Alismatis; Extracts; Mitochondrial energy metabolism; Membrane potential; Succinate dehydrogenase

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎, 其性寒, 味甘、淡, 入肾、膀胱经, 具有利水渗湿、泄热、化浊降脂的功效^[1]。线粒体是真核生物进行氧化代谢的部位, 是糖类、脂肪和氨基酸最终氧化释放能量的场所。线粒体功能障碍与心血管疾病^[2]、神经系统疾病^[3]、糖尿病^[4-5]、老年病^[6]及中医脾虚等具有一定的相关性。已有文献^[7-9]报道中药泽泻或其活性成分对线粒体的影响, 由于传统中药使用的是水煎剂, 而现代药理实验表明其活性成分为脂溶性成分, 故本实验制备了泽泻水提物、乙醇提取物及超临界 CO₂ 萃取物, 参考文献方法^[10], 以人胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象, 探讨泽泻不同提取物对胃癌细胞线粒体活性的影响, 优选影响线粒体能量代谢的泽泻提取物, 为深入研究泽泻对线粒体能量代谢作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 药材及细胞 泽泻药材产自福建建瓯吉阳泽泻 GAP 基地, 经建瓯市吉阳镇农技站葛培盛站长鉴定为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。人胃癌细胞株 SGC-7901 由福建省医学科学院免疫研究所陈金烟老师赠送。

1.2 试剂及仪器 HyClone 高糖型 DMEM, 批号: NXH0686, 赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司; 胎牛血清(批号: 1205332)、0.25 % 胰酶(批号: 1234954), 线粒体膜电位检测试剂盒(批号: 4-3614-8)及琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒(批号: 3-41323-8), 上海杰美基因医药科技有限公司。HEPA Class 100 型 CO₂ 水套培养箱, 美国热电公司; 生物安全柜, 上海上净净化设备有限公司; FC 500 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特公司; 倒置相差荧光数

码图像系统, 日本 OLYMPUS 公司; Synergy2 型多功能酶标仪, 美国 BIO-TEK 公司; HA220-50-06 型超临界 CO₂ 萃取装置, 江苏南通华安超临界萃取有限公司。

1.3 方法

1.3.1 泽泻水提物的制备 取泽泻干燥粗粉适量, 过 40 目筛, 用 12 倍量的水加热回流提取 2 次, 每次 40 min, 提取液抽滤后混合, 减压浓缩成浸膏(得率: 37.6 %), 4 ℃ 储存, 备用, 实验时用细胞培养液稀释至所需浓度。

1.3.2 泽泻醇提物的制备 取泽泻干燥粗粉适量, 过 40 目筛, 用 12 倍量的 80 % 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 40 min, 提取液抽滤后混合, 减压浓缩成浸膏(得率: 24.6 %), 4 ℃ 储存, 备用, 实验时用细胞培养液稀释至所需浓度。

1.3.3 泽泻超临界 CO₂ 萃取物的制备 取泽泻干燥粗粉适量, 过 40 目筛, 装入 1L 的萃取罐中, 萃取温度 45 ℃, 萃取压力 25 MPa, 萃取时间为 2 h, 从解析釜中收集萃取物(得率: 1.96 %), 4 ℃ 储存, 备用, 实验时用细胞培养液稀释至所需浓度。

1.3.4 供试药液的制备 泽泻不同提取物按泽泻水提、醇提、超临界萃取的提取得率折算, 称取相当于泽泻生药粉 0.1 g 的不同提取物, 加入 1 mL DMSO 助溶, 用新鲜配制的含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养液超声溶解, 定容至 10 mL, 相当于泽泻生药粉 10 mg·mL⁻¹, 过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 即为供试药液溶液。

1.3.5 细胞培养 人胃癌 SGC-7901 细胞以 10 % 胎牛血清的高糖型 DMEM 培养液, 在 37 ℃、5 % CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 取对数生殖期细胞进行试验。

1.3.6 细胞线粒体膜电位检测

(1)倒置荧光显微镜检测膜电位：取 24 孔细胞培养板 1 块，加入 SGC-7901 细胞，待每孔铺满率达 70 %，抽去细胞培养液，加入 1mL 清理液，覆盖培养孔表面，抽去清理液，加入 450 μ L 染色工作液，覆盖培养孔表面，37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 20 min 后，抽去染色工作液，加入 500 μ L 清理液清理。泽泻水提取物、醇提取物及超临界 CO_2 萃取物浓度分别为 36.7，24.7，2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，各试验组给药 24 h 后，即刻在倒置荧光显微镜下观察其红、绿荧光变化，红色荧光强度显著减弱，说明表面线粒体膜电位受到破坏，绿色荧光强度显著增强，表明线粒体膜电位受到破坏。

(2)流式细胞仪分析检测膜电位：采用细胞流式仪双通道分析，观察 5×10^4 个以上细胞。流式细胞仪检测参数：绿色荧光使用激发波长 488 nm，发射波长 525 nm，该荧光增强说明线粒体膜电位损伤；红色荧光使用激光波长 488 nm，发射波长 575 nm，该荧光减弱说明膜电位损伤。泽泻水提取物、醇提取物及超临界 CO_2 萃取物浓度分别为 36.7，24.7，2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，各组给药 24 h 后，进行流式细胞仪检测，观察各试验组单阳细胞比例。

1.3.7 多功能酶标仪检测细胞 SDH 活性 按照 SDH 检测试剂盒使用说明书准备好待测样品，给药 24 h 后按试剂盒说明书方法测定 SDH 酶活性，平行测定 6 次，酶标仪检测参数设定：温度 25 $^{\circ}$ C，波长 600 nm，间隔 60 s，读数 6 次，共 5 min。

1.4 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析，多组间比较用方差分析，数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置荧光显微镜观察荧光强度 见图 1。与正常对照组比较，泽泻水提物组、泽泻醇提物组、泽泻超临界 CO_2 萃取物组的绿色荧光都有不同程度的增强，其中水提取物组增强最明显，其次是泽泻超临界 CO_2 萃取物组，最后是泽泻醇提物组；各组红色荧光检测结果显示，泽泻醇提物组绿色荧光增强最明显，其次是泽泻超临界 CO_2 萃取物组，最后是泽泻水提物组。

2.2 流式细胞仪分析及细胞 SDH 活性检测结果 见表 1。与正常对照组比较，泽泻水提物组、泽泻醇提物组、泽泻超临界 CO_2 萃取物组的单阳细胞比例升高，差异均有统计学意义($P < 0.01$)，其中泽泻醇提物组单阳细胞比例上升幅度明显低于泽泻醇提物组及泽泻超临界 CO_2 萃取物组更低，差异有统计学意义

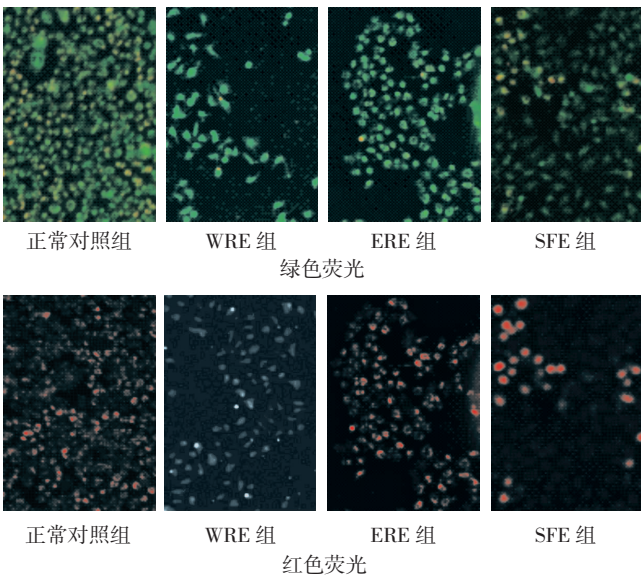


图 1 泽泻不同提取物作用 SGC-7901 细胞 24 h 后倒置荧光显微镜观察红绿荧光变化($\times 10$)

Figure 1 Red and green fluorecence changes of SGC-7901 cells treated with different extracts of Rhizoma Alismatis for 24h under inverted fluorecence microscope($\times 10$)

($P < 0.01$)。SDH 活性检测表明，与正常对照组比较，超临界 CO_2 萃取物组 SDH 变化不大，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；泽泻水提物组 SDH 升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；泽泻醇提物组 SDH 活性最高，与其他 3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 1 各给药组单阳细胞比例与 SDH 活性测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 1 Single positive cells propotions and SDH activity of different extracts of Rhizoma Alismatis

组别	单阳细胞比例 /%	SDH 酶活性 / $\mu\text{mol o min}^{-1}$
正常对照组	3.5 ± 0.1	0.045 ± 0.0051
泽泻乙醇提取物组	$9.8 \pm 0.4^{**}$	$0.077 \pm 0.0106^{**}$
泽泻水提取物组	$14.8 \pm 0.5^{**\Delta\Delta}$	$0.056 \pm 0.0098^{*\Delta}$
泽泻超临界 CO_2 萃取物组	$17.3 \pm 0.6^{**\Delta\Delta}$	$0.038 \pm 0.0088^{\Delta}$

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与泽泻乙醇提物组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究显示，泽泻水提物组、泽泻醇提物组、泽泻超临界 CO_2 萃取物组与正常对照组比较，红色荧光都有不同程度的减弱，绿色荧光都有不同程度的增强。红色荧光减弱的程度从大到小依次是泽泻水提物组、泽泻超临界 CO_2 组和泽泻醇提物组。绿色荧光增强的程度从大到小依次也是泽泻水提物组、泽泻超临界 CO_2 萃取物组和泽泻醇提物组。提示泽泻的 3 种

不同提取物中醇提取物对线粒体内膜功能(膜电位)的损伤最小。

流式细胞仪对线粒体膜电位检测结果的判断标准是: A2 象限(FL1 和 FL2 双阳性)细胞占比越高则说明细胞线粒体膜电位受损越小(越正常), A4 象限(FL1 单阳性)细胞占比越高则说明细胞线粒体膜电位受损越大。本研究提示泽泻不同提取物对线粒体内膜功能(膜电位)的损害程度: 超临界 CO₂ 萃取物组>水提取物组>醇提取物组。

两种检测方法结果表明, 泽泻水提取物、醇提取物与超临界 CO₂ 萃取物对细胞线粒体能量代谢均有影响。对线粒体内膜功能(膜电位)均有一定损害作用, 其中, 泽泻醇提取物组损害较小; 泽泻醇提取物组及水提取物组对细胞 SDH 酶活性均有一定的促进作用, 醇提取物组大于水提取物组, 而超临界 CO₂ 萃取物组则降低 SDH 活性。

作者在预实验过程中还采用 MTT 法对泽泻 3 种提取物 7 个梯度浓度(10, 1.0, 0.1, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ mg·mL⁻¹)进行了细胞毒性研究, 结果发现泽泻水提取物组细胞毒性与浓度无明显的线性相关, 为便于 3 组间比较, 我们选择了 10 mg·mL⁻¹ 浓度条件下进行比较。

泽泻不同提取物对细胞线粒体内膜功能(膜电位)和 SDH 的影响实验结果提示, 泽泻醇提取物具有较明显改善细胞线粒体能量代谢的作用, 为进一步体内

探讨泽泻改善线粒体能量代谢研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 2010: 212-213.
- [2] 熊燕, 张梅, 陈菲, 等. 线粒体功能障碍与心血管疾病[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 364-370.
- [3] 米慧, 林蓓, 管敏鑫. 线粒体功能缺陷和神经系统疾病[J]. 生命科学, 2012, 24(6): 549-556.
- [4] 张俊杰, 柯斌, 秦鉴. 从线粒体功能障碍探讨脾虚与胰岛素抵抗关系[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2947-2949.
- [5] Perry CG, Kane DA, Lanza IR, et al. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes[J]. Diabetes, 2013, 62 (4): 1041-1053.
- [6] Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(11): 1372-1381.
- [7] Huang YT, Huang DM, Chueh SC, et al. Alisol B acetate, a triterpene from Alismatis rhizoma, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells [J]. Cancer Lett, 2006, 231: 270-278.
- [8] 吴水生, 郭改革, 施红, 等. 泽泻提取物 Alisol Monoacetate A 和 B 对 HepG2 细胞胆固醇代谢的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22 (7): 475-477.
- [9] 王静, 郭春荣, 董杨, 等. 耳聋左慈丸及有效拆方拮抗庆大霉素诱导毛细胞凋亡的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2464-2468.
- [10] 王新, 陈凤玲. 线粒体的功能及检测方法[J]. 医学综述, 2011, 17 (1): 12-14.

(编辑: 邓响潮)

红背叶根不同提取物体外抑制 HBsAg 和 HBeAg 的实验研究

沈海容¹, 刘 妮², 张奉学², 杨静雯¹, 陈 淳¹, 朱晓霞¹, 刘 强¹, 黄少慧¹, 吕志平¹(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察红背叶根 4 种不同提取物对 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的影响, 探讨红背叶根不同提取物体外抗 HBV 作用。 **方法** 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察红背叶根水提取物(WE)、石油醚提取物(EE)及正丁醇提取物(BE)对 HepG 2.2.15 细胞的影响, 采用 ELISA 法检测分析红背叶根 4 种提取物对 HepG 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用。 **结果** 红背叶根正丁醇提取物在无毒浓度下对 HepG 2.2.15 分泌的 HBsAg、HBeAg 的抑制率分别达 65.2 %、94.4 %, 治疗指数分别为 > 9.8 和 > 67.1; 红背叶根乙酸乙酯提取物对 HBeAg 抑制率达 53.4 %, 治疗指数 > 2, 而对 HBsAg 的无抑制作用; 其他两种提取物对

收稿日期: 2013-08-30

作者简介: 沈海容, 女, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合肝病的临床与实验研究。Email: 415487460@qq.com。通讯作者: 吕志平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合临床肝病的临床与实验研究。Email: lzping@fimmu.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2009A030100009); 广州市科技计划项目(2008Z1-E461-1)。