

诺丽果提取物对 Wistar 大鼠的脾脏淋巴细胞及肝细胞 辐射损伤的保护作用

张洪财¹ 于纯淼¹ 王宇¹ 陈佳² 刘树民¹

¹ (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

² (杭州泰格医药科技股份有限公司 杭州 200051)

摘要 将破碎的诺丽果用 95%乙醇提取后,分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇梯度萃取,得到萃取物。将正丁醇萃取物应用硅胶柱色谱法和 ODS 柱色谱法分离得到单体芦丁和黄酮苷。观察不同浓度萃取物、单体 Rutin 和 Flavanol glycoside 对于 Wistar 大鼠脾脏淋巴细胞及肝细胞的抗 γ 射线辐射的保护作用。 γ 射线吸收剂量为 10 Gy ($1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$)。照射后分别于 24 h、36 h 和 48 h 时间点用 MTT 法检测细胞存活率。结果表明:不同组份对不同的细胞存活率在 100%–400%之间变化,明显高于对照组,差别有统计学意义($p < 0.0001$)。提示诺丽果提取物有抗辐射作用,可被视为辐射保护剂。

关键词 诺丽果,淋巴细胞,肝细胞,抗辐射

中图分类号 TL71

随着肿瘤发病率的逐年上升,放射治疗在临床被广泛应用,如何减低放射治疗对人体淋巴细胞的损伤,加快放疗后机体免疫功能的恢复成为国内外研究的热点。有文献报道诺丽果提取物有抗氧化、抗辐射、清除自由基等多种生物活性^[1-5]。为探讨诺丽果提取物对脾脏淋巴细胞及肝细胞放射损伤后的保护作用,本文对诺丽果提取物进行萃取后,验证不同极性部位的抗辐射作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 Wistar 大鼠(体重 (200 ± 20) g, 12–14 周),从哈尔滨兽医研究所获得。新鲜诺丽果于 2010 年 7 月 20 日采自海南,经黑龙江中医药大学中药鉴定学教研室孙慧峰副教授鉴定为茜草科巴戟天属植物诺丽(*Morinda citrifolia* L.)的新鲜果实,标本保存在黑龙江中医药大学中医药研究院(编号 20100720)。

1.2 试剂和仪器

过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲

液($\text{pH}=8.0$)、氮蓝四唑(NBT)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、硫酸亚铁三氯乙酸、2-巯代巴比妥酸、 $9.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢、 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水杨酸、硫酸铜、 NH_4Ac 、Neocuprine、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe^{3+} /铁氰化钾磷酸盐缓冲液($\text{pH}=6.6$)、10%三氯乙酸、0.1%氯化铁、MEM 培养基。Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水、PBS、RPMI、1640 培养基中: $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺、10%胎牛血清。Krebs-Henseleit 缓冲液、HEPES、四甲基偶氮噻唑蓝 MTT、DMSO、塑料盘子、不锈钢丝网、血细胞计数仪、ELISA 酶标仪(Bio-Rad 550, Hercules, CA, USA)、ODS、硅胶(200–300 目)和 Bruker AMX-400。

1.3 诺丽果提取物的制备

新鲜诺丽果 12 kg,用 95%的乙醇溶液加热回流提取 3 次,每次 2 h、乙醇用量 10 L,过滤,减压回收溶剂至无醇味,得干燥浸膏 91 g。将浸膏混悬于 10 L 水中,分别用等体积的石油醚($60-90^\circ\text{C}$)、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇梯度萃取,每种溶剂萃取 3 次,减压浓缩,得到氯仿组份 2.4 g、乙酸乙酯组份

第一作者:张洪财,男,1983年3月出生,2009年于黑龙江中医药大学获硕士学位,主要研究方向为中药化学,助理研究员, E-mail: zhanghongcai-237@163.com

通讯作者:刘树民,男,教授,博士研究生导师, E-mail: lsm@hljnm.net

收稿日期:收稿 2013-12-13; 修回 2014-02-13

3.2 g、正丁醇组份 65 g、水组份 80 g。将正丁醇萃取物应用硅胶柱色谱和 ODS 柱色谱分离得到单体化合物 Rutin (45 mg)与 Flavanol glycoside (53 mg)。最后将正丁醇萃取物、Rutin 和 Flavanol glycoside 配成实验所需的各个浓度。

1.4 制备 Wistar 大鼠脾脏淋巴细胞及肝细胞

将用剪刀切碎的 Wistar 大鼠脾脏置于 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水中,通过不锈钢网格粉碎。脾细胞悬浮液在 1000 g 下离心分离 10 min。沉积物与红细胞裂解液融合 3–5 min,并轻轻地用 PBS 洗涤两次。最终的单淋巴细胞悬浮液(1×10^6 – 1.5×10^6 mL⁻¹)被置于补充有 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素、2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中^[6-7]。通过胶原酶灌流法将肝细胞从 Wistar 大鼠肝脏中分离出来^[8]。台盼蓝排斥法检测细胞存活率,存活率大于 90%可用于实验。在 MEM 培养基条件下,肝细胞接种于 35 mm 的塑料培养皿中,以 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶原覆盖 4 h 后,除去不贴壁细胞。用 MEM 培养基培养贴壁细胞。每 2 mL 培养基中的初始密度为(1×10^6 mL⁻¹)个细胞。

1.5 测定细胞存活率

用 MTT 法确定 SMP 对细胞活力的影响。应用 RPMI 1640 培养基,将 100 μL 淋巴细胞以 5×10^4 mL⁻¹ 浓度接种于 96 孔板中。在 5% CO₂, 37 °C 条件下孵育 2 h,然后将细胞进行 γ 射线照射,然后进一步温育,等待 24 h、36 h 和 48 h 后辐射。肝细胞辐射方法同淋巴细胞。实验重复 6 次。

将 MTT 储备溶液(PBS 中浓度为 5 mg·mL⁻¹)加入到各孔,反应总体积为 110 μL 。孵育 4 h 后,将上清液离心分离以除去未转化的 MTT。每孔加入 100 μL DMSO 以溶解甲臞晶体。使用 ELISA 酶标仪(Bio-Rad 550, Hercules, CA, USA)于 540 nm 波长处检测光密度(d)。

辐射对照组、正常对照组、阳性对照组(维生素 C)和药物不同剂量组的细胞存活率对比以光密度比值的形式表达,具体使用下面的公式计算。对细胞存活率(R_{cell} , %)的差异进行了比较,并采用配对 t 检验。

$$R_{\text{cell}} = \frac{d_{\text{exp}} - d_{\text{blank}}}{d_{\text{con}} - d_{\text{blank}}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 照射 24 h 后脾淋巴细胞和肝细胞的存活率

图 1 为辐照 24 h 后脾淋巴细胞和肝细胞的存活率曲线。由图 1 可知,乙酸乙酯组份的脾细胞存活率在浓度为 0.1–0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 277.01%±13.85%。在 0.4–12.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时脾细胞的存活率成下降趋势。与其他组对比($p < 0.0001$)。

乙酸乙酯组份的肝细胞存活率在浓度在 0.1–3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 376.16%±18.08%。在 3.2–12.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时肝细胞的存活率成下降趋势。与其他组对比($p < 0.0001$)。

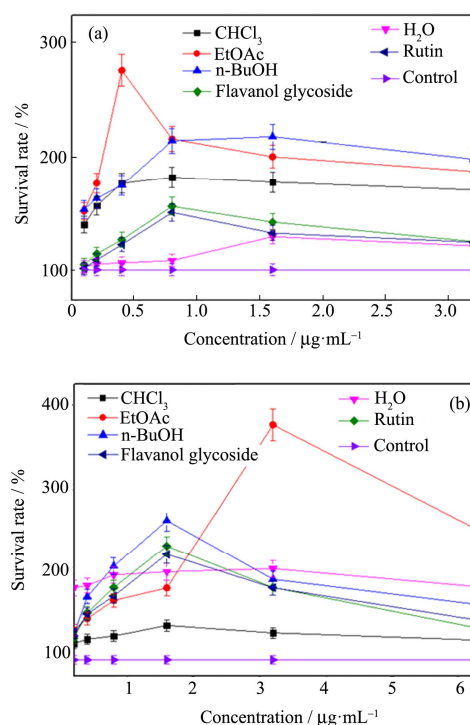


图 1 辐照 24 h 后脾淋巴细胞(a)和肝细胞(b)的存活率
Fig.1 The survival rate of spleen lymphocytes cells (a) and hepatocytes cells (b) 24 h after irradiation with γ -rays

2.2 照射 36 h 后脾淋巴细胞及肝细胞的存活率

图 2 为辐照 36 h 后脾淋巴细胞和肝细胞的存活率曲线。由图 2 可知,乙酸乙酯组份的脾细胞存活率在浓度为 0.1–1.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 1.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 141.77%±7.49%。在 1.6–12.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间时脾细胞的存活率呈下降趋势。与其他组对比($p < 0.0001$)。

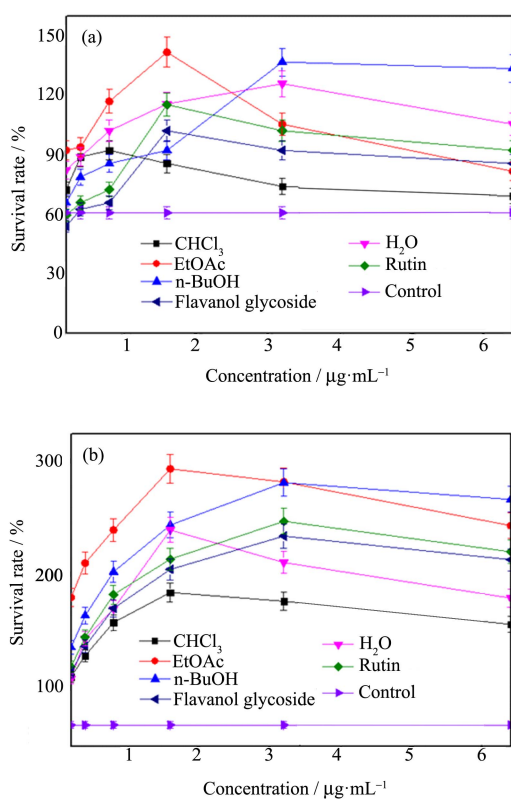


图2 辐照 36 h 后脾淋巴细胞(a)和肝细胞(b)的存活率
Fig.2 The survival rate of spleen lymphocytes cells (a) and hepatocytes cells (b) 36 h after irradiation with γ -rays

乙酸乙酯组份的肝细胞的存活率在浓度为 $0.1\text{--}1.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 $1.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 $294.24\%\pm 12.71\%$ 。在 $1.6\text{--}12.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时肝细胞的存活率呈下降趋势。与其他组对比 ($p<0.0001$)。

2.3 照射 48 h 后脾淋巴细胞及肝细胞的存活率

图 3 为辐照 48 h 后脾淋巴细胞和肝细胞的存活率曲线。由图 3 可知,乙酸乙酯组份的脾细胞的存活率在浓度为 $0.1\text{--}0.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 $0.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 $112.07\%\pm 5.20\%$ 。在 $0.4\text{--}12.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时脾细胞的存活率呈下降趋势。与其他组对比 ($p<0.0001$)。

乙酸乙酯组份的肝细胞的存活率在浓度为 $0.1\text{--}0.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时保持增长,在 $0.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达到顶峰 $378.98\%\pm 15.95\%$ 。在 $0.8\text{--}12.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间,肝细胞的存活率呈下降趋势。与其他组对比 ($p<0.0001$)。

3 讨论

随着放射医学的广泛应用如医学影像学,放疗

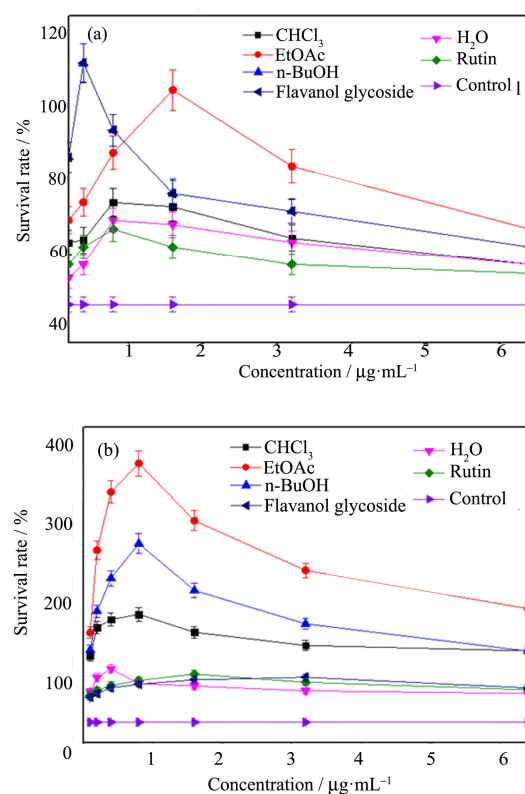


图3 辐照 48 h 后脾淋巴细胞(a)和肝细胞(b)的存活率
Fig.3 The survival rate of spleen lymphocytes cells (a) and hepatocytes cells (b) 48 h after irradiation with γ -rays

科学,核医学等,人们有更多接触辐射的机会,以至受到放射性伤害。因此抗辐射药物的研究,尤其是对含有黄酮类化合物、香豆素类化合物、木脂素类化合物天然产物抗辐射的研究引起广泛关注。作者发现诺丽果提取物中含有黄酮类,香豆素类,木脂素类以及萜类化合物,利用 MTT 法证实诺丽果提取物不同极性组份的抗辐射作用。在不同时间段内受辐射的脾脏淋巴细胞生存率随提取物浓度增加而逐渐上升,于提取物浓度最大有效剂量处达到最高值,而后呈逐渐衰减趋势。其中以乙酸乙酯组份较为显著,与其他组对比 ($p<0.0001$)。并且 Rutin 和 Flavanol glycoside 这两种单体也呈现相同趋势,这可能与含有的酚羟基、双键有关^[9]。因此也可推测诺丽果提取物不同极性部位的抗辐射活性与诺丽果中大量含有酚羟基的黄酮、香豆素及含有双键的其他类化合物关系密切。本实验将诺丽果提取物已分离出的单体(黄酮醇糖苷及芦丁)与不同极性部位进行生物学活性类比。证实诺丽果提取物抗辐射生物学活性确切,并提出其中各种化合物所共同含有的酚羟基可能是诺丽果提取物抗辐射生物学活性的有效部位。为探讨广泛应用诺丽果产品,开

发天然抗辐射药物提供可靠依据。至于抗辐射机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 刘海青, 刘银才, 胡文婷. 海巴戟果水溶性多糖的分离纯化及清除自由基活性 [J]. 生物加工过程, 2008, 6(3): 44-47.
- 2 LIU Haiqing, LIU Yinai, HU Wenting. Isolation water soluble polysaccharid from *Morinda Citrifolia* and its scavenging free radical activity [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, 6(3): 44-47.
- 3 马德禄, 张俊, 高建华, 等. 诺丽果汁的抗氧化作用及对免疫功能的影响 [J]. 中国医学研究与临床, 2008, 6(6): 8-10.
- 4 MA Delu, ZHANG Jun, GAO Jianhua, *et al.* The effect of tahitian noni juice on antioxidation and immune function [J]. Chinese Medical Research Clinical, 2008, 6(6): 8-10.
- 5 张伟敏, 符文英, 李楠, 等. 诺丽叶化学成分与提取物抗氧化性质研究 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(5): 543-548.
- 6 ZHANG Weimin, FU Wenying, LI Nan, *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of Noni leaf [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Science, 2009, 35(5): 543-548.
- 7 谢文利, 朱江, 晋玉章. 诺丽果汁对D-半乳糖胺致肝损伤的保护作用 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 17-19.
- 8 XIE Wenli, ZHU Jiang, JIN Yuzhang. The protection of TNJ to the liver damaged with D-galan in food research and development, 2008, 29(9): 17-19.
- 9 刘印忠, 马德禄, 高建华, 等. 诺丽果汁对四氯化碳引起肝损伤小鼠的肝保护作用 [J]. 天津药学, 2008, 20(2): 6-8.
- 10 LIU Yinzong, MA Delu, GAO Jianhua. Protection of Tahitian noni juice on liver injury induced by carbon tetrachloride in mic [J]. Tianjin Pharmacy, 2008, 20(2): 6-8.
- 11 Huamao Yuana, Jinming Songa, Xuegang Lia, *et al.* Immunomodulation and antitumor activity of k-carrageenan oligosaccharides [J]. Cancer Letters, 2006, 243: 228-234.
- 12 Lei Yao, Zhenyu Wang, Haitian Zhao, *et al.* Protective Effects of Polysaccharides from Soybean Meal Against X-ray Radiation Induced Damage in Mouse Spleen Lymphocytes [J]. International Journal of Molecular Science, 2011, 12: 8096-8104.
- 13 Santhosh A, Mathew S, Sudhakaran P R. Synthesis of sulphated proteoglycans by primary cultures of rat hepatocyte modulation by matrix substratum [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1996, 165 (1): 1-7.
- 14 Dugas A J, Castaneda-Acosta J, Bonin G C, *et al.* Evaluation of the total peroxyl radi-calscavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63: 327-331.

Noni extract's protective effects against radiation on wistar rates' spleen lymphocytes and hepatocytes

ZHANG Hongcai¹ YU Chunmiao¹ WANG Yu¹ CHEN Jia² LIU Shumin¹

¹(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

²(Hangzhou Taige Medical Technology Co., Ltd., Hangzhou 200051, China)

ABSTRACT The broken noni was extracted with 95% ethanol, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol in order. The n-butanol extraction was separated by silica gel column chromatography and ODS column chromatography to get single rutin and flavonoid glycosides. Different-concentration extraction, monomer rutin, and flavanol glycoside in protecting spleen lymphocytes and liver cells of Wistar rats from gamma-ray irradiation were observed. The cells were irradiated by gamma-rays with absorbed dose of 10 Gy (1 Gy/min). MTT method was used to detect the cell survival rate at 24, 36, and 48 h after irradiation. The results showed that different cell survival rates varied at 100%–400% according to different polar fractions, which were significantly higher than those in the control group ($p < 0.0001$). The noni extracts has anti-radiation effect, and can be deemed as radioprotective agents.

KEYWORDS Noni, Lymphocytes, Hepatocytes, Anti-radiation

CLC TL71