

体无功能, 严重影响到细胞代谢, 进而启动凋亡信号, 最终细胞发生凋亡^[2~3]。茯苓酸是否能够调节细胞线粒体跨膜电位仍未见相关报道。有研究证实, 在活体动物中茯苓酸能够通过肠道进行吸收^[4], 但是, 在活体动物中茯苓酸的药理学作用是否与体外培养相同, 能否调节细胞线粒体跨膜电位的相关文献也未见报道。

1 材料和方法

1.1 茯苓酸提取

茯苓酸由黑龙江中医药大学从白茯苓中提取^[5], 150 kg 白茯苓制成粉末, 经过提取、提纯得到 1 500 mg 茯苓酸, 茯苓酸的质量由郑州大学检测合格。将提纯的茯苓酸以 1 g/L 和 10 g/L 2 种剂量溶于橄榄油中, 待用。CsA 以 5 g/L 浓度溶于橄榄油中。

1.2 动物

24 只雄性 SD 大鼠 (体重 250~300 g, 清洁级), 购自上海斯莱克有限公司 [SCXK (沪) 2003-0003]。动物饲养在 22℃, 湿度 (60±10)%, 12 h 照明, 12 h 停止照明的环境中适应性饲养 3 周, 动物实验按照国家有关法律实施。大鼠被随机分为 4 组, 茯苓酸 1 组 [茯苓酸 10.0 (mg/kg) · d⁻¹灌胃, PA1 组], 茯苓酸 2 组 [茯苓酸 1.0 (mg/kg) · d⁻¹灌胃, PA2 组], CsA 组 [5.0 (mg/kg) · d⁻¹灌胃] 和对照组 (橄榄油 0.5 mL/d), 每组 6 只。第 7 天取外周血进行检测。

1.3 外周血淋巴细胞的分离

从用于取材的受体大鼠尾静脉中抽取 2 mL 外周血, 加入到乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝管中。加入同体积磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS), 混匀, 小心加入到预先准备好的 2 mL 大鼠淋巴细胞分离液 LTS 1083 (天津灏洋生物技术公司) 液面之上, 室温下离心, 2 300 r/min, 15 min。小心吸取间层的淋巴细胞, 用 4 mL PBS 清洗细胞 2 次, 备用。

1.4 测量细胞线粒体跨膜电位

使用 MitoCapture Apoptosis Detection 试剂盒 (BioVision USA) 测量细胞线粒体跨膜电位, 将 2 mL 孵育专用缓冲液分 2 管分别预热至室温, 各加入 1 μL MitoCapture, 混匀, 分别加入到提取的外周血淋巴细胞沉淀中, 37℃, 5% CO₂ 孵箱中孵育 15~20 min。流式细胞仪送检。线粒体去极化 (即早期凋亡) 的外周血淋巴细胞用波长 525 nm 的异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 通道检测, 正常的外周血淋巴细胞用波长 625 nm 的聚异戊二稀 (polyisoprene, PI) 通道检测。空白组用相同条件下饲养的健康雄性 SD 大鼠外周血淋巴细胞检测。

1.5 统计学分析

外周血淋巴细胞线粒体跨膜电位变化百分比使用秩和检验 (Newman-Keuls), $P < 0.05$ 时认为有阳性意义。

2 结果

数据提示, 较大剂量茯苓酸 [10.0 (mg/kg) · d⁻¹, PA1 组] 稳定外周血淋巴细胞线粒体跨膜电位, 避免其去极化。较其他 3 组而言, PA1 组显示了更好的稳定外周血淋巴细胞线粒体跨膜电位效应 ($P < 0.05$) (如表 1 所示)。

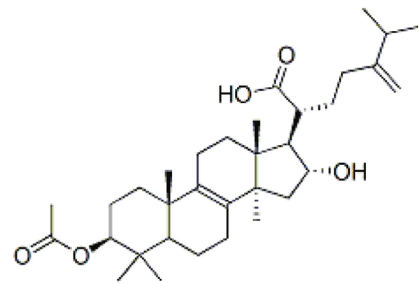


图 1 茯苓酸的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of pachymic acid

表 1 各组 PBLs 跨膜电位变化百分比

Tab. 1 Percentage of mitochondrial membrane potential variation of PBLs in each group

	PA1 组	CsA 组	PA2 组	对照组
$\bar{X} \pm S$	23.32 ± 9.50	48.02 ± 20.43*	51.77 ± 9.50*	56.65 ± 7.13*

注: * 与 PA1 组比较, $P < 0.05$

3 讨论与结论

实验研究了口服茯苓酸对大鼠外周血淋巴细胞线粒体跨膜电位的药理学作用。与阳性对照组 (CsA) 和阴性对照组相比, 实验结果提示, 口服茯苓酸具有调节大鼠外周血淋巴细胞线粒体跨膜电位的作用。茯苓酸通过稳定线粒体跨膜电位, 切断了外周血淋巴细胞通过线粒体途径凋亡的反应链, 从而起到了保护细胞的作用。在部分针对体外研究发现, 茯苓酸具有细胞膜稳定作用, 可以防止分泌型磷脂酶 A2 (sPLA2) 介导的细胞内容物渗出^[6]。在淋巴细胞凋亡过程中, 其细胞膜首先被 sPLA2 水解, 其机理是 sPLA2 通过扩大细胞膜磷脂分子间距, 使磷脂分子连接不稳固, 而且 sPLA2 又能导致细胞膜关键部位 (headgroup region) 被溶解等^[7], 茯苓酸可能通过抑制 sPLA2 的功能而减轻细胞对细胞膜的损伤。茯苓酸也可以抑制由自由基或者其他炎症物质引起的细胞损伤^[8~9]。以上文献说明茯苓酸可以通过多种方式降低炎症介质导致的损伤, 发挥稳定膜作用; 另一方面, 茯苓酸又可以通过对细胞内 Ca^{2+} , sPLA2 和 AA 的抑制作用进而诱导细胞线粒体跨膜电位去极化, 造成细胞凋亡^[1,10~12]。这些研究结果显示: 茯苓酸的药理学作用相当复杂, 不同的外界条件可能对茯苓酸的药理学活性起关键作用, 条件不同, 茯苓酸可能发挥不同甚至相反的药理学作用。

另一方面, 相对较大剂量的茯苓酸显示了更好的药理学作用, 这提示茯苓酸的药理学作用可能与使用剂量相关。在针对茯苓酸肠道吸收的模型中研究发现, 在一定剂量条件下, 茯苓酸的吸收效率与使用剂量呈正相关^[4]。实验涉及茯苓酸口服过程, 能够真正进入体内发挥药理学作用的茯苓酸剂量不同, 因此, 其药理学作用也可能不同, 这些结果与体外实验文献^{[6]~[9]}的结果一致。由于茯苓酸具有调节细胞线粒体跨膜电位的药理学作用, 可能在临床上对某些与细胞凋亡密切相关的疾病或者免疫过程 (如对组织器官的保护作用、调节免疫细胞活性和数量等) 具有一定疗效。

[参考文献] (References)

- [1] GAPTER L, WANG Z, GLINSKI J, et al. Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 332(4): 1153-1161.
- [2] SKULACHEV V P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(4): 473-485.
- [3] SMITH T A D, BLAYLOCK M G. Treatment of breast tumor cells in vitro with the mitochondrial membrane potential dissipater valinomycin increases 18F-FDG incorporation[J]. *J. Nucl. Med.*, 2007, 48(8): 1308-1312.
- [4] ZHENG Y, YANG X W. Absorption and transport of pachymic acid in the human intestinal cell line Caco-2 monolayers[J]. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2008, 6(7): 704-710.
- [5] 王丽亚, 万慧杰. 茯苓的化学成分研究[J]. *中草药*, 1998, 29(3): 145-148.
WANG L Y, WAN H J. Studies on the chemical constituents of Fuling (*Poria cocos*)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1998, 29(3): 145-148. (in Chinese)
- [6] GINER E M, MÁÑEZ S, RECIO M C, et al. In vivo studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids[J]. *Planta Med.*, 2000, 66(3): 221-227.
- [7] BAILEY R W, OLSON E D, VU M P, et al. Relationship between membrane physical properties and secretory phospholipase A2 hydrolysis kinetics in S49 cells during ionophore-induced apoptosis[J]. *Biophys. J.*, 2007, 93(7): 2350-2362.
- [8] SEKIYA N, GOTO H, SHIMADA Y, et al. Inhibitory effects of triterpenes isolated from Hoelen on free radical-induced lysis of red blood cells[J]. *Phytother Res.*, 2003, 17(2): 160-162.
- [9] KAMINAGA T, YASUKAWA K, KANNO H, et al. Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. *Oncology*, 1996, 53(5): 382-385.
- [10] CARO A A, CEDERBAUM A I. Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1[J]. *Arch Biochem. Biophys.*, 2007, 457(2): 252-263.
- [11] COSTA-JUNIOR H M, HAMATY F C, da SILVA FARIAS R, et al. Apoptosis-inducing factor of a cytotoxic T cell line; involvement of a secretory phospholipase A2[J]. *Cell Tissue Res.*, 2006, 324(2): 255-266.
- [12] MACCHIONI L, CORAZZI L, NARDICCHI V, et al. Rat brain cortex mitochondria release group II secretory phospholipase A (2) under reduced membrane potential[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(36): 37860-37869.