

3.4.1 ig 给药后,部分小鼠先后出现伏下少动,呼吸加深加快,精神萎靡,食欲下降,粪便深褐色,对死亡小鼠尸检,无肉眼可见的病变器官。结果经改良寇氏统计, $LD_{50} = 3\ 535\text{ mg/kg}$, 95% 的可信限为: $3\ 089 \sim 4\ 046\text{ mg/kg}$ 。

3.4.2 ip 给药后,部分小鼠先后出现扭体,伏下少动,精神萎靡,食欲下降。对死亡小鼠尸检,小鼠腹腔中有原花青素细小颗粒,无其它肉眼可见的器官病变。结果经改良寇氏法统计, $LD_{50} = 144.7\text{ mg/kg}$, 95% 的可信限为: $122.3 \sim 171.2\text{ mg/kg}$ 。

4 讨论

小鼠皮肤二阶段诱癌试验是研究癌发生和癌变机制的经典模型,它包括启动和促癌阶段。常用此模型来研究致癌物和促癌物,也用于研究抗致癌物和抗促癌物。本实验用昆明种小鼠,以 DMBA 和巴豆油分别作为启动剂和促癌剂,诱发出小鼠皮肤乳头状瘤,观察到原花青素有明显的抑制乳头状瘤生成作用,其抑瘤作用主要在促癌阶段。

80 年代末发现,内皮细胞舒张因子(EDRF)就是 NO 后,有关 NO 的研究蓬勃兴起。作为一种介质,在形成有致癌作用的亚硝酸盐、DNA 损伤和与慢性感染及炎症有关的基因突变方面具有重要作用。若 NO 持续高浓度地存在于细胞中,则可损伤 DNA 并导致基因突变,最终形成肿瘤^[4]。本研究结果显示小鼠皮肤乳头状瘤 NO 含量显著增高,提示

NO 可能在乳头状瘤的形成过程中起一定作用。原花青素能显著性降低促癌阶段小鼠皮肤中 NO 的含量,而对启动阶段小鼠皮肤中 NO 的含量未见显著性影响,这也与原花青素能对抗促癌阶段小鼠皮肤乳头状瘤的形成实验结果一致,进一步表明 NO 可能参与小鼠皮肤乳头状瘤的形成。

皮肤组织受巴豆油或佛波酯类促癌剂处理后,引起的最明显的反应之一是炎症反应^[5]。佛波酯类促癌剂引起细胞产生和释放一些炎性物质(包括前列腺素、花生四烯酸等),并使吞噬细胞渗出,产生大量活性氧自由基,它们在促癌过程中起着重要作用。由于几乎所有的佛波酯诱发小鼠耳廓肿胀的抑制剂均极可能是有效的抗促癌剂,因此这一体内实验已成为目前抗促癌剂的常用筛选模型之一^[2]。小鼠耳廓肿胀实验证实,原花青素对巴豆油引起的炎症反应有明显的抑制作用,提示原花青素具有较强的抗促癌效果。

参考文献

- 1 Clarke E, Hecker E. *Naturwissenschaften*, 1965, 52(15):446
- 2 Gschwendt M, Kittstein W, Frstenberger G, *et al.* *Cancer Lett*, 1984, 25 (2):177
- 3 Nishino H, Yoshioka K, Iwashima A, *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 1986, 77 (1):33
- 4 Ohshima H, Bartsch H. *Mutat Res*, 1994, 305 (2):253
- 5 Marks F. *Tumor Promotion in Skin: Are Active Oxygen Species Involved?* In: Sies H, ed. *Oxidative Stress*. Academic Press Inc (London) Ltd., 1985:43

(2000-05-22 收稿)

蟾蜍灵对人胃癌细胞系 MGc-803 的细胞毒作用

中国人民武装警察部队医学院(天津 300162) 陈小义* 徐瑞成 陈 莉
天津药物研究院 钱 进

摘 要 蟾蜍灵(bufofin)是我国传统中药蟾酥中蟾毒的主要成分之一,研究其抑癌作用及机制具有重要意义。采用台盼蓝染色法、噻唑蓝还原法和光镜观察 bufofin 对人低分化胃腺癌细胞系 MGc-803 的生长抑制作用。结果显示, $0.01\ \mu\text{mol/L}$ 及以上浓度 bufofin 对 MGc-803 细胞具有显著的抑制作用, IC_{50} 值约为 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 。bufofin 抑制 MGc-803 生长的机制是致使细胞核染色质凝缩、碎裂, DNA 损伤, 胞浆 RNA 含量下降, 导致细胞死亡。

关键词 蟾蜍灵 细胞毒作用 胃癌细胞系

Studies on the Cytotoxicity of Bufalin on Human Gastric Cancer Cell MGc-803 *in vitro*

Medical College of Chinese People's Armed Police Forces (Tianjin 300162) Chen Xiaoyi, Xu Ruicheng, Chen Li
Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Qian Jin

Abstract To study the cytotoxic activity of bufofin, one of the components of bufadienolides in the

* Address: Chen Xiaoyi, Medical College of CPAPF, Tianjin
陈小义 37 岁,副教授,第三军医大学分子生物学研究生毕业,主要从事细胞与分子遗传学的教学与科研,曾于 American Journal of Medical Genetics 等国内外期刊上发表论文 10 余篇。获得军队科技进步二等奖等 4 项。

TCM “Chansu”, and its mechanism of action. Human gastric cancer cell line MGc-803 was used as target cells. Inhibition of tumor cell growth was assessed by trypan blue exclusion and thiazole blue absorbance and light microscope examination. Result showed that bufalin at concentrations of 0.01 $\mu\text{mol/L}$ and above could remarkably inhibit the growth of MGc-803 tumor cell, with IC_{50} of about 0.1 $\mu\text{mol/L}$. Further study showed that its mechanism of action involved necrotic changes of nuclear chromatin and fragmentation of chromosomal DNA leading to cell death.

Key words bufalin cytotoxicity human gastric MGc-803 cancer cell

蟾酥是具有多种功效的传统中药,近年来蟾酥细胞毒成分的研究日益受到重视^[1],蟾蜍灵(bufalin)是从蟾酥中提取的蟾毒的主要成分之一,分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$,相对分子量为 386.5,我们发现 bufalin 作用于体外培养的胃癌细胞,可显著抑制肿瘤细胞生长,报道如下。

1 材料

1.1 药物:bufalin(纯度大于 99%)由天津药物研究院从中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 中提取,用无水乙醇配成储备液,过滤除菌,分装保存。实验时,用 *D*-hank's 稀释到终浓度的 10 倍,再按 1:10(工作液:培养基)的比例加入培养基中,乙醇终浓度小于 0.1%,预实验证实,0.1%的乙醇对细胞几乎没有毒害作用。

1.2 胃癌细胞系:人低分化胃腺癌细胞系 MGc-803 引自北京市肿瘤防治研究所,培养于含 10%小牛血清的 DMEM(Gibco 公司)培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱(美国 Napco),培养基中加双抗。细胞接种后于指数生长期进行不同浓度的 bufalin 处理,相应时间后取材,进行各种指标的测定。

2 方法和结果

2.1 bufalin 对 MGc-803 细胞的生长抑制作用:台盼蓝染色法进行活细胞计数,细胞接种于 25 mL 培养瓶,分用药组和对照组,每种处理于不同时间每次取 3 瓶细胞分别计数,取平均值。活细胞数量变化见表 1。其中大多为台盼蓝染色阳性细胞(死细胞),细

胞增殖速度下降,0.01 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度处理组,细胞在 0~48 h 之间数目先有小幅增长,之后,细胞数下降,直到近乎全部崩解。

表 1 bufalin 作用 MGc-803 活细胞数量的变化
($\times 10^5$ CFU/mL)

用药时间 (h)	药物浓度($\mu\text{mol/L}$)				
	0.000	0.001	0.010	0.100	1.000
0	0.70				
24	1.02	0.51	0.25	0.19	0.14
48	1.40	1.75	0.82	0.24	0.35
72	2.84	1.66	0.38	0.00	0.00
96	4.70	2.60	0.21		

2.2 bufalin 抑制 MGc-803 细胞的剂量效应:将 MGc-803 胃癌细胞于对数生长期用 0.125%胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10^3 CFU/mL,接种于 96 孔培养板,每孔加 200 μL 细胞悬液,培养 24 h 后,药物处理 4 组,分别加入不同浓度的 bufalin,并设对照组(不加药)和空白组(只有培养,无细胞),每组均设 8 个复孔;继续培养 48 h,加入噻唑蓝(MTT) 20 μL (1 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 4 h,离心,加入 DMSO 200 μL ,避光振荡 5 min,全自动酶标仪(上海三科仪器公司)测 570 nm 处吸光度(A 值)。抑制率按以下公式计算:

$$\text{抑制率} = (\text{A}_{\text{对照}} - \text{A}_{\text{实验}}) / (\text{A}_{\text{对照}} - \text{A}_{\text{空白}}) \times 100\%$$

由表 2 可见,bufalin 处理 48 h,0.01 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度对 MGc-803 细胞具有显著的抑制作用, IC_{50} 值在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 附近。

表 2 bufalin 作用 MGc-803 细胞的剂量效应

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	吸光度 A 值($\bar{x} \pm s, n=8$)			抑制率 (%)
	实验组	对照组	空白组	
0.001	1.32 $\pm$ 0.14	1.43 $\pm$ 0.10	0.44 $\pm$ 0.06	11.1
0.010	1.23 $\pm$ 0.13*			20.2
0.100	0.77 $\pm$ 0.70** Δ			66.7
1.000	0.48 $\pm$ 0.07** Δ			96.0

与对照组比:* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$; 与 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组比: $\Delta P < 0.01$; 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组比: $\Delta P < 0.001$

2.3 细胞形态学观察

2.3.1 倒置光显微镜原位观察培养细胞的形态学变化:倒置光显微镜下观察培养瓶中细胞生长的动态,可见对照组细胞多贴壁生长,呈纤维细胞型,加

入 bufalin,细胞起鼓、变圆、脱壁,悬浮细胞增多(图 1)。

2.3.2 荧光显微镜观察细胞核染色质和胞浆 RNA 的变化:细胞接种于洁净盖玻片铺底的 6 孔培养板,

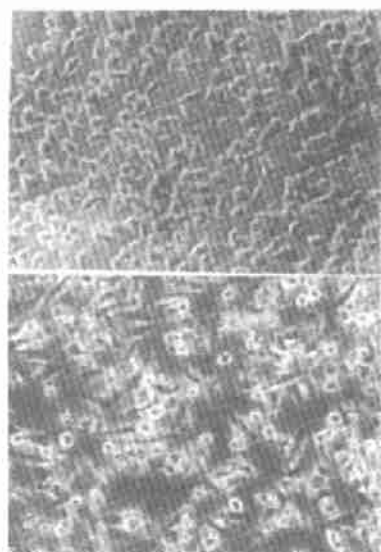


图1 bufalin 作用 MGc-803 细胞形态学改变
(A-对照组;B-用药组)倒置光显微镜

24 h 后加药,药物作用 24 h,取出盖玻片,改良的吖啶橙染色法按天津医科大学许屏教授试剂盒说明书进行。在荧光显微镜下可见,对照组细胞核染色质被染成均匀的黄绿色,胞浆 RNA 被染成深的橙红色,分裂相细胞多,而药物作用组细胞,核染色质凝缩,碎裂成不均一的小块,于胞内呈微核样,胞浆橙红色变浅,说明 RNA 含量下降(图 2)。

4 讨论

蟾酥是传统中药,具有多方面作用^[2],曾报道蟾酥水溶液总成分注射液治疗晚期消化系癌,蟾酥加其他中药制成的扶正 2 号治疗晚期胃癌,都取得显著疗效^[3];蟾酥的成分比较复杂,我们选择蟾酥的主要成分 bufalin 与胃癌细胞系 MGc-803 细胞共育时,细胞数量明显下降,台盼蓝染色阳性细胞数随药物浓度和作用时间的增加而增多。MTT 实验结果表明,bufalin 作用胃癌细胞 48 h 的 IC_{50} 值在 0.1 μ mol/L 附近,可见 bufalin 具有强细胞毒作用,可能是其抑制肿瘤的机制之一。

bufalin 对肿瘤细胞的细胞毒作用的机制还不是很清楚,实验研究发现蟾酥脂质体抑制培养的膀胱癌细胞生长,是因为细胞 DNA 合成受到抑制^[4];

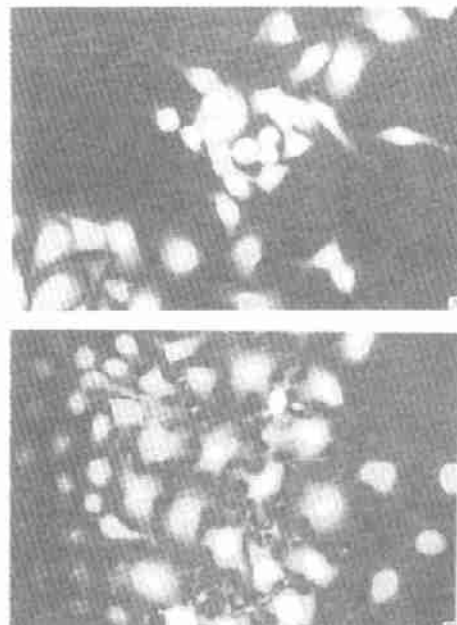


图2 bufalin 对 MGc-803 细胞 DNA 损伤和胞浆 RNA 的变化(A-对照组;B-用药组)荧光显微镜,吖啶橙染色

Numazawa 等研究发现,bufalin 可以诱导肿瘤细胞分化,从而抑制肿瘤细胞增殖^[5];Hashimoto 等使用 bufalin 作用体外培养的白血病细胞,可检测到细胞拓扑异构酶 I 的水平下降,DNA 断裂^[6];我们的初步研究从细胞形态学方面取得近似的证据,bufalin 作用 MGc-803 胃癌细胞后,贴壁细胞逐步变圆,进而脱离瓶壁,吖啶橙染色显示细胞核碎裂,细胞中分布着很多微核样的结构,可见 bufalin 损伤了细胞染色质,影响 DNA 基因的复制、转录,胞浆中 RNA 含量下降,标志着细胞的活力降低,最终导致细胞死亡。

参考文献

- 1 王正德. 医外医学-中医中药分册,1992,14(5):40
- 2 金向群. 中草药,1996,27(4):246
- 3 杨素娟. 中医药信息,1992,(5):12
- 4 田普训,南勋义,李 旭,等. 中华泌尿外科杂志,1994,15(6):432
- 5 Numazawa S, Inoue N, Nukura H, et al. Biochem Pharmacol, 1996, 52(6):321
- 6 Hashimoto S, Jing Y, Kawazoe N, et al. Leuk Res, 1997, 21(9):875

(2000-04-30 收稿)

开展公益广告宣传活 动 加强社会主义精神文明建设