

## 甘草黄酮对 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响

李宇彬<sup>1</sup>, 姜 薇<sup>2</sup>, 尚 明<sup>1</sup>, 王宏亮<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学 药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**目的 观察甘草黄酮对 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 及 RNA 的影响。方法 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠随机分为甘草黄酮高、中、低剂量 (25, 11.25, 5.58 mg/kg) 组, 阳性对照 (环磷酰胺 25 mg/kg) 组和阴性对照 (生理盐水) 组, 各组均 sc 给药。运用激光扫描共聚焦显微镜技术与吖啶橙 (AO) 荧光探针技术结合检测单一肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的变化情况。结果 不同剂量甘草黄酮组和环磷酰胺组的 DNA 及 RNA 荧光强度较生理盐水组有不同程度的减弱; 甘草黄酮高、低剂量组 RNA/DNA 值与生理盐水组比较差异无显著性; 甘草黄酮中剂量组、环磷酰胺组 RNA/DNA 值较生理盐水组有非常显著提高 ( $P < 0.01$ )。结论 甘草黄酮与肿瘤细胞 DNA 和 RNA 结合后抑制其进一步复制与合成, 可能是其抗肿瘤作用的途径之一。

**关键词:** 甘草黄酮; 肿瘤细胞; 激光扫描共聚焦显微镜; 吖啶橙 (AO)

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)10-1518-03

### Effect of *Glycyrrhiza* flavonoids on DNA and RNA in tumor cell of S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> tumor-bearing mice

JI Yu-bin<sup>1</sup>, JIANG Wei<sup>2</sup>, SHANG Ming<sup>1</sup>, WANG Hong-liang<sup>2</sup>

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract: Objective** To observe effects of *Glycyrrhiza* flavonoids on DNA and RNA in tumor cell of S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> tumor-bearing mice. **Methods** S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> mice were randomly divided into *Glycyrrhiza* flavonoids (25, 11.25, and 5.58 mg/kg) groups, positive control (cytoxan 25 mg/kg) group, and negative control (NS) group, whom were given drugs by sc. DNA and RNA in tumor cells were examined, respectively by Laser Scanning Confocal Microscope and fluorescent probe of acridine orange (AO) technology. **Results** All different dosage of *Glycyrrhiza* flavonoids, cytoxan reduced the brightness of fluorescence of DNA and RNA; low and high dosage of *Glycyrrhiza* flavonoids had no significant effect on the fluorescence pixels of RNA/DNA; Both middle dosage of *Glycyrrhiza* flavonoids and cytoxan had significant effect on the fluorescence pixels of RNA/DNA ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The duplication and synthesis of DNA and RNA in tumor cells are restrained after *Glycyrrhiza* flavonoids binding with them. This effect may be one of the mechanisms of antitumor effect of *Glycyrrhiza* flavonoids.

**Key words:** *Glycyrrhiza* flavonoids; tumor cell; Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM); acridine orange (AO)

甘草黄酮 (*Glycyrrhiza* flavonoids) 是从豆科甘草属植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 的根和根茎中提取分离出的总黄酮。据报道其有抗氧化、抗肿瘤、保肝、抗溃疡、抗心律失常和抑制 HIV、抗血栓、抗动脉硬化等作用<sup>[1]</sup>。文献报道甘草黄酮类混合物 G<sub>9315</sub> 具有抗促癌、抗致突变作用<sup>[2,3]</sup>。但甘草黄酮抗肿瘤的作用机制至今尚未见报道。本实验室前期研究发现甘草总黄酮能显著延长 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷

瘤小鼠的生存时间, 其抑瘤率与生理盐水组比较差异显著。为进一步探讨甘草黄酮抗肿瘤作用机制, 本实验研究了甘草黄酮对肿瘤细胞核酸的影响。

#### 1 材料

1.1 实验动物: 昆明种小鼠 (20±2) g, 雌雄各半, 哈尔滨医科大学动物中心提供, 许可证号 SCXK (黑) 20020001。

1.2 瘤株: S<sub>180</sub>、H<sub>22</sub>瘤株 (黑龙江省肿瘤医院, 由本

收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300284, 30400352); 黑龙江省教育厅科技项目 (10541080)

作者简介: 李宇彬 (1956—), 男, 教授, 博士后, 博士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物研究。

实验室移植传代)。

1.3 药物与试剂:甘草黄酮(质量分数 96%,哈尔滨商业大学药物研究所博士后工作站提供);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 05062611);吖啶橙(AO,Sigma 公司产品)。

1.4 仪器:细胞计数板;激光扫描共聚焦显微镜(Leica);HH-S 恒温水浴箱(江苏省金坛市医疗仪器厂);LD<sub>4</sub>-2A 型台式低速离心机(北京医用离心机厂);QL-861 型涡旋混合振荡器(上海博停经贸有限公司)。

## 2 方法

2.1 接种、分组和给药:将实验小鼠按《全国抗肿瘤药物体内筛选规程》方法腹腔接种 H<sub>22</sub> 腹水型瘤株(S<sub>180</sub>操作相同)。于接种 24 h 后将小鼠随机分成 5 组,分别为甘草黄酮高、中、低剂量组,环磷酰胺阳性对照组和生理盐水阴性对照组,每组 10 只小鼠。甘草黄酮各组分别 sc 甘草黄酮 25、11.25、5.58 mg/kg,阳性对照组 sc 环磷酰胺 25 mg/kg,阴性对照组 sc 同体积生理盐水。无菌连续给药 7 d。

2.2 样本制备:停药次日,在冰台上处死小鼠,取出肿瘤细胞,加培养液洗涤离心(800 r/min)一次。弃上清液,用培养液将下层细胞制备成一定浓度的细胞悬液。

2.3 黏附细胞:均匀滴加 1% 明胶液至载玻片一面,于 37 °C 培养箱中干燥,将细胞悬液滴加其上,放置 37 °C 培养箱中贴壁 10~15 min,同时以光学显微镜观察贴壁情况,培养液洗去未贴壁细胞。

2.4 荧光染色:滴加 0.01% AO 染料 12 μL,避光 37 °C 孵育 15 min,用培养液洗去多余染料。

2.5 观察方法:将载玻片倒置于激光共聚焦显微镜上,使用 488 nm 氩离子激光激发荧光染料 AO,在高倍镜(×40,NA0.55)和 7% 中性滤光镜下进行检测。进入 Z-Image 程序,直接在光学显微镜下寻找贴壁良好的细胞。扫描参数为:小孔孔径 225 μm, X 轴扫描点数 200, Y 轴扫描点数 150,扫描步径 0.3 μm, Z 轴扫描次数 1,镜扫描速度 20 mm/s,扫描强度 50%,激光强度 4.2 mW,每点采样次数 24,检测器 1 和检测器 2 灵敏度均为 45%。激光沿 Z 轴扫描,获得细胞断层的扫描信息<sup>[5,6]</sup>。

2.6 统计学方法:数据用 SPSS11.0 进行方差分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

本实验结果显示不同剂量甘草黄酮及环磷酰胺组 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA、RNA 荧光强

度较生理盐水组有不同程度的减弱。甘草黄酮中剂量组、环磷酰胺组 RNA/DNA 值较生理盐水组明显升高,差异显著( $P < 0.01$ );甘草黄酮低、高剂量组 RNA/DNA 值与生理盐水组比较无显著差异( $P > 0.05$ ),结果见表 1。

表 1 甘草黄酮对 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肿瘤细胞 RNA 和 DNA 比值的影响

Table 1 Effect of Glycyrrhiza flavonoids on ratio of RNA and DNA in tumor cell of S<sub>180</sub> and H<sub>22</sub> tumor-bearing mice

组别	剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	动物/ 只	细胞/ 个	RNA 和 DNA 荧光像素比值( $\bar{x} \pm s$ )	
				S <sub>180</sub>	H <sub>22</sub>
甘草黄酮	22.50	10	100	0.90 ± 0.18	1.11 ± 0.28
	11.25	10	100	1.54 ± 0.23**	1.44 ± 0.16**
	5.625	10	100	0.88 ± 0.15	0.98 ± 0.20
环磷酰胺	25	10	100	1.71 ± 0.11**	1.53 ± 0.18**
生理盐水	-	10	100	0.85 ± 0.21	0.97 ± 0.27

与生理盐水组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs NS group

## 4 讨论

DNA 是一切生物遗传的主要物质基础,遗传信息通过 DNA 转录成 RNA,然后由 RNA 翻译成特定的蛋白质,通过蛋白质执行各种生命功能。肿瘤细胞 DNA 和 RNA 是体内抗癌药物作用的主要靶标,药物与肿瘤细胞 DNA 和 RNA 结合后抑制其进一步复制与合成,从而抑制癌细胞的恶性生长。

激光扫描共聚焦显微镜是在荧光显微镜成像的基础上附加了激光扫描装置,使用紫外线或可见光激发荧光探针,对细胞进行非创伤性扫描,可在亚细胞水平观察细胞内物质代谢的变化。本实验所采用的荧光探针 AO 是一种三杂环芳香类染料,常用于细胞内 DNA 和 RNA 的定量测量,低浓度的 AO 与核酸有较好的结合力,其浓度在 1:500~1:10 000 可以对活细胞内 DNA 和 RNA 进行双重染色。AO 与核酸的结合方式有两种<sup>[7]</sup>:一种是嵌入核酸双链的碱基对之间,形成 AO-DNA 复合物发出黄绿色和绿色荧光;另一种是与单链核酸的磷酸发生静电相互作用,形成 AO-RNA 复合物发出橙色和红色荧光。药物与 AO 可能会出现竞争络合反应,抑制 AO-DNA 和 AO-RNA 的形成,从而降低复合物荧光强度,跟踪此体系的荧光变化,可以推测药物与核酸作用情况,从而对药物是否具有抗癌活性做出判断。激光共聚焦显微镜技术与荧光探针技术结合可以使单一细胞核酸变化的观测更为直观、快速、简便<sup>[8]</sup>。

本实验结果显示,各剂量组的甘草黄酮作用于

S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>小鼠肿瘤细胞均可使 DNA 和 RNA 荧光强度较生理盐水组有不同程度的降低。说明药物已经与肿瘤细胞 DNA 和 RNA 产生了不同程度的结合,抑制了 AO 与 DNA 和 RNA 的结合,导致 AO 与核酸结合的复合物荧光强度有不同程度的降低;甘草黄酮低剂量组对 RNA/DNA 无影响 ( $P > 0.05$ );甘草黄酮中剂量组的 RNA/DNA 值较生理盐水组明显升高,可能是 DNA 损伤严重,合成量减少,而 RNA 合成抑制程度较轻,DNA 减少的程度超过 RNA;甘草黄酮高剂量组 RNA/DNA 值较生理盐水组无显著差异,分析原因可能是随剂量增加 RNA 损伤加重,致使 RNA/DNA 值与生理盐水组接近。提示药物作用后可能是肿瘤细胞 DNA 先受损,随后 RNA 由于没有模板合成才开始下降。环磷酰胺组 DNA 和 RNA 荧光强度较生理盐水组降低;RNA/DNA 值较生理盐水组显著升高。有研究报告环磷酰胺对体外淋巴细胞 AO-DNA 荧光抑制率很低<sup>[9]</sup>。结合起来看这与环磷酰胺的作用机制是非常吻合的。环磷酰胺原无烷化活性,需在体内经代谢成有活性的磷酰胺氮芥后发挥烷化作用。磷酰胺氮芥性质活泼,能与 DNA 发生交叉联结,抑制 DNA 合成,干扰 DNA 和 RNA 功能。从而达到很好的抗肿瘤作用。综上所述,甘草黄酮可明显抑制 S<sub>180</sub>和 H<sub>22</sub>荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 复制与合成,这可能是其抗肿瘤作用的机制之一。

References:

[1] Ji Y B, Jiang W, Fan Y L, et al. Advances in studies on Glycyrrhiza flavonoids [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 5-5-6.

[2] Fu N W, Liu Z Y, Zhang R Y, et al. Antipromoting tumor and suppressing lipid peroxidation of G9315 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(8): 411-413.

[3] Fu N W, Liu Z Y, Zhang R Y, et al. Studies on anti promoting tumor, antimitation, and antioxidant effect of Glycyrrhiza flavonoids [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1995, 7(4): 29.

[4] Ji Y B, Gao S Y. Effects of Haimiding on the functioning of red cell membrane of FC and H<sub>22</sub> tumor-bearing mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, 39(12): 913-916.

[5] Ji Y B, Gao S Y, Cheng W P. Effect of Haimiding on the functioning of red cell membrane of FC and H<sub>22</sub> tumor-bearing mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(6): 823-830.

[6] Ji Y B, Gao S Y, Kong Q, et al. Influence of sea pyrimidine on apoptosis of SGC-7901 human stomach cancer cells [J]. *J Harbin Inst Technol* (哈尔滨工业大学学报), 2002, 34(1): 91-94.

[7] Wei W, Feng Y X, Zhang S X, et al. Simultaneous determination of cellular DNA/RNA and G<sub>0</sub> from G<sub>1</sub> phase with acridine orange stain by Flow-cytometry [J]. *Chin J Phys Med* (中华物理医学杂志), 1994, 16(3): 166-169.

[8] Ji Y B, Gao S Y, Ji H R, et al. Anti-neoplastic efficacy of Haimiding on gastric carcinoma and its mechanisms [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 484-490.

[9] Chen B, Tang H W, Chen G Q, et al. Study on screening of anticancer drugs by lymphocyte nuclear FNDA-acridin orange system fluorescence inhibition [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 1997, 1(13): 1-5.

轮叶婆婆纳中二萜类化学成分的体外抗癌活性研究

张富康<sup>1</sup>, 胡人杰<sup>2</sup>, 张韶瑜<sup>3</sup>, 张彦文<sup>3</sup>, 高文远<sup>1</sup>, 段宏泉<sup>3\*</sup>

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津医药科学研究所, 天津 300070; 3. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要:目的 研究轮叶婆婆纳 *Veronica sibirica* 中二萜类成分的体外抗癌作用。方法 以 TJ905 和 HeLa 细胞为研究对象,采用 MTT 法对获得的化合物进行抗癌活性初筛并对初筛活性高的化合物进行剂量依赖性实验,测定其 IC<sub>50</sub>值。结果 对轮叶婆婆纳石油醚及醋酸乙酯提取物中的 7 个二萜类化合物:二氢丹参酮 I (I)、丹参酮 I (II)、丹参酮 II<sub>A</sub> (III)、隐丹参酮(IV)、婆婆纳对醌 A(V)、婆婆纳对醌 B(VI)、弥罗松酚(VII)进行了体外抗肿瘤活性考察,表明化合物 I 和 IV 具有显著的抗癌活性,化合物 I 对 TJ905 及 HeLa 细胞生长的 IC<sub>50</sub>值分别为 1.038、1.816 μg/mL,化合物 IV 对 TJ905 及 HeLa 细胞生长的 IC<sub>50</sub>值分别为 3.637、4.391 μg/mL。结论 轮叶婆婆纳中的二氢丹参酮 I 和隐丹参酮对 TJ905 及 HeLa 细胞具有较强的生长抑制活性。

关键词:轮叶婆婆纳; 二萜类化合物; 抗癌活性

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)10-1520-04

收稿日期:2005-01-09

基金项目:天津医科大学科研基金资助

\* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022) 23542838 Fax: (022) 23528891 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn