

苦草提取物 Pft-d 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤、肝癌 Heps 的抗癌作用及体外细胞毒活性实验研究

王奇志, 陈 雨, 王 鸣, 冯 煦*

(江苏省中国科学院植物研究所 药用植物研究开发中心, 江苏 南京 210014)

摘要:目的 研究苦草 *Picria fel-terrae* 乙醇提取物 30% 乙醇洗脱部位(Pft-d)的抗癌活性。方法 通过在体抗肿瘤实验和体外细胞毒实验, 考察 Pft-d 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤、肝癌 Heps 肿瘤生长的抑制作用、对荷瘤小鼠免疫器官质量的影响及其细胞毒活性。结果 Pft-d 对小鼠 S₁₈₀、Heps 肿瘤的生长均有明显的抑制作用, 剂量为 10、20、40 mg/(kg·d) 时, 对 S₁₈₀ 肉瘤生长的抑制率分别为 44.44%、52.14%、61.97%, 对肝癌 Heps 生长的抑制率分别为 34.64%、41.55%、56.03%, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。对荷瘤小鼠免疫器官无明显影响。在体外, Pft-d 高剂量时, 对胃窦癌、胃癌、残胃癌等癌细胞显示细胞毒活性, 但低剂量时活性不明显。结论 Pft-d 具有强的抗癌活性, 值得进一步研究。

关键词:苦草; 抗癌; S₁₈₀ 肉瘤; 肝癌 Heps; 细胞毒活性

中图分类号: R282.710.7; R979.19

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)02-0134-04

Study on antitumor activities of extracts Pft-d from *Picria fel-terrae*

WANG Qi-zhi, CHEN Yu, WANG Ming, FENG Xu*

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: **Objective** To study the antitumor activity of Pft-d from *Picria fel-terrae* Lour. **Methods** Experiments of *in vitro* cell toxicity and *in vivo* antitumor were conducted. The inhibitive effect of Pft-d on tumor growth of sarcoma 180 (S₁₈₀) and Heps were observed. The effects of Pft-d on immune organs of tumor-bearing mice were also studied. **Results** At the doses of 10, 20, and 40 mg/(kg·d), the inhibitory rates of Pft-d on S₁₈₀ were 44.44%, 52.14%, and 61.97% respectively, and the inhibitory rates on Heps were 34.64%, 41.55%, and 56.03% respectively. There were significant differences in the inhibitory rates between control group and experimental group ($P < 0.05, P < 0.01$ and $P < 0.001$). However, there was no obvious effect on the immune organs of tumor-bearing mice. *In vitro* studies showed that high dose of Pft-d demonstrated cell toxic effects on patients of gastric antrum cancer, gastric cancer and so on. Low dose of Pft-d did not show obvious cell toxic effects. **Conclusion** Pft-d has significant antitumor activities on S₁₈₀ and Heps, and worthy of further study.

Key words: *Picria fel-terrae* Lour; antitumor; sarcoma 180; Heps; cell toxicity

苦草系玄参科植物苦玄参 *Picria fel-terrae* Lour. 的全草^[1], 《广西本草选编》称为落地小金钱, 具有清热解毒、消肿、镇静和镇痛功效, 用于治疗胃痛、痢疾、感冒、高烧、急性扁桃体炎、肝炎、跌打损伤、腮腺炎等症。有文献报道^[2] 其含有苦玄参苷 (picfeltaarraenin) I A、I B、II, 苦玄参苷元 (picfeltaarraenin) I ~ VI, 苦玄参酮 (picfeltaarraenone),

均属四环三萜皂苷成分。皂苷类化合物具有多样性生物活性, 尤其在抗肿瘤、细胞毒和免疫调节等方面的作用^[3-5] 引起了广泛的关注。为此, 笔者对苦草的生物活性及其化学成分进行了深入研究。本实验主要考察苦草乙醇提取物 30% 乙醇洗脱部位 (Pft-d) 对荷瘤 (S₁₈₀、Heps) 小鼠肿瘤生长的作用, 对免疫器官的影响及体外对人胃窦癌、胃癌、残胃癌等癌细胞

* 通讯作者 冯 煦, 博士, 研究员。Tel/Fax: (025) 84347084, E-mail: fengxu@mail.cnbg.net

株的细胞毒活性,旨在明确 Pft-d 的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 动物

昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,由南京青龙山动物饲养中心提供,实验动物许可证号 SCXK(苏)2002-0018。

1.2 瘤株

肉瘤 180(S₁₈₀)、肝癌(Heps)细胞株均从中国科学院上海药物研究所引进,江苏省肿瘤防治研究所传代接种。

1.3 药品与试剂

苦草购自广西桂林药材公司,经江苏省中国科学院植物研究所袁昌齐研究员鉴定原植物为苦玄参 *Picria fel-terrae* Lour.。取苦草地上部分 2 kg,粉碎成粗粉,80%乙醇提取 4 次,提取液合并,经活性炭脱色后滤过,滤液减压(<50℃)回收溶剂至近 500 mL,加水稀释 1 倍,通过非极性大孔树脂 YWD 03F 柱,依次用水,30%、50%乙醇洗脱。收集 30%乙醇洗脱部位,减压(<50℃)浓缩至干,即为 Pft-d (20 g)。阳性对照药为 5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(CTX)、甲氨喋呤(MTX)、顺氯氨铂(PDD)、甲氧乙氯汞(MMC)、依托泊苷(VP16)、氟尿苷(FUDR)、紫杉醇(TAX)、羟基喜树碱(HCPT),均由江苏省肿瘤防治所提供。端粒酶试剂盒购自北京五洲元业生物工程有限公司。

1.4 仪器

YJ875 超净台,苏州净化设备公司;电子分析天平,赛多利斯公司,恒温 CO₂ 培养箱,酶标仪均为美国 Bio-RAD 产品。

2 方法

2.1 Pft-d 的抗癌作用及对荷瘤小鼠免疫器官的影响

按《抗癌药物药效学研究指导原则》方法进行。选择 S₁₈₀、Heps 肿瘤生长良好且无溃破的荷瘤小鼠,在无菌条件下取出肿瘤,按肿瘤:生理盐水为 1:4 稀释制成瘤细胞悬液(10⁸/mL)。100 只小鼠每只于前肢腋窝皮下接种 0.2 mL 瘤细胞悬液,然后随机分为 10 组,每组 10 只,雌雄各半,各组平均体质量差不超过 1 g。每个瘤谱分别设阴性对照组、阳性对照药 5-FU(25 mg/kg)组,Pft-d 低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)组,共 5 组(2 个瘤谱共计 10 组)。各组于接种次日开始给药,每日一次,连续 8

d,第 9 天称体质量,解剖并剥离瘤块,称质量;取出脾脏、胸腺,计算抑瘤率、脾指数和胸腺指数。

抑瘤率(%)=(1-给药组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%

脾指数=脾脏质量(mg)/体质量(g)×10

胸腺指数=胸腺质量(mg)/体质量(g)×10

2.2 Pft-d 的体外细胞毒活性

将胃窦癌、胃癌、残骨癌 3 种癌症病人手术切除的癌标本分别制成细粒,接种于 96 孔细胞培养板中。将胃窦癌、胃癌、残骨癌 3 种癌细胞分别分成 6、7、10 组。各癌细胞标本均设 Pft-d 低、中、高剂量(每孔 5、10、20 μg)3 组,阴性对照组(加等体积的培养液),溶媒对照组(加等体积的 DMSO),余下为阳性对照药组。每组均设 3 个复孔,在 37℃、5% CO₂ 的温箱中培养 24 h,待细胞生长良好后,吸去原培养液,更换新鲜培养液,每日给药一次,连续 5 d,在 37℃、5% CO₂ 的温箱中培养 5 d 后,加 MTT (5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h 后,离心弃上清液,每孔加 DMSO 150 μL,振摇 10 min,使其溶解,在酶标仪上于 570 nm 处测各孔的吸光度(A)值,按以下公式计算杀伤率。

杀伤率(%)=(1-加药孔平均 A 值/空白孔平均 A 值)×100%

2.3 Pft-d 对端粒酶活性的影响

采用 PCR-ELISA 法,按试剂盒说明书进行操作。

2.3.1 端粒酶提取

分别收集经 Pft-d 40 mg/L、5-FU 25 mg/L 作用 48 h 后的胃窦癌手术标本组织约 30 mg,经生理盐水漂洗,于 4℃、10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,将沉淀组织用手术刀切成碎片,加入 150 μL 洗液洗涤,同上条件离心 1 min,弃洗液,沉淀加入 50 μL 裂解液悬浮,置冰浴 30 min,4℃、14 000 r/min 离心 20 min,取上清液,置-70℃保存待用。

2.3.2 端粒重复序列扩增

取 TRAP 反应管,每管各加入 45 μL 反应混合液后分 2 组,一组加 2 μL 经 Pft-d 作用 48 h 后的标本按“2.3.1”步骤处理好的上清液,另一组加 2 μL 经 5-FU 作用 48 h 后的标本按“2.3.1”步骤处理好的上清液,混匀,分别加入 30 μL 液体石蜡,离心数秒,置 25℃水浴保温 30 min,取出在 PCR 仪上循环作端粒重复序列扩增。

2.3.3 产物杂交检测

经过产物杂交反应,洗板,二次反应,显色,终

止,再测定 450、595 nm 波长的 A 值,根据 $A = A_{450} - A_{595}$ 计算。

2.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。

3 结果

表 1 Pft-d 对小鼠肉瘤(S₁₈₀)、肝癌(Heps)的抑制作用($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	S ₁₈₀		Heps	
		平均瘤质量/g	抑制率/%	平均瘤质量/g	抑制率/%
对照	—	2.24±0.61	—	2.57±0.81	—
Pft-d	10	1.30±0.41***	44.44	1.68±0.51*	34.64
	20	1.12±0.49***	52.14	1.50±0.34**	41.55
	40	0.89±0.23***	61.97	1.13±0.68**	56.03
5-FU	25	1.04±0.33***	55.56	0.41±0.14***	84.05

与对照组比较: * P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001。 “—”:未做检测,下表同

3.2 Pft-d 对荷瘤小鼠免疫器官的影响

Pft-d 对荷瘤小鼠免疫器官的影响不大,而阳性对照药 5-FU 和 CTX 能使其脾指数和胸腺指数下

3.1 Pft-d 的抗癌作用及对小鼠免疫器官的影响

Pft-d 对小鼠移植性肿瘤有明显的抑制作用,当剂量为 10、20、40 mg/(kg·d)时,对 S₁₈₀ 的抑制率分别为 44.44%、52.14%、61.97%;对 Heps 的抑制率分别为 34.64%、41.55%、56.03%,与对照组比较差异显著。结果见表 1。

降,说明 Pft-d 在发挥抗癌作用的同时,并不影响荷瘤小鼠的免疫功能,因而有利于机体的自身调节,提高抗病能力。结果见表 2。

表 2 Pft-d 对荷瘤小鼠免疫器官的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	S ₁₈₀		Heps	
		脾指数	胸腺指数	脾指数	胸腺指数
对照	—	122.25±65.02	31.76±9.95	75.07±20.24	37.30±11.12
Pft-d	10	94.60±32.41	28.36±10.77	80.96±13.43	34.90±8.97
	20	108.42±31.57	27.56±8.49	76.36±8.87	33.87±8.63
	40	101.52±45.60	29.72±8.17	67.23±14.14	30.73±8.16
CTX	10	86.25±71.47*	23.92±7.66*	—	—
5-FU	10	—	—	66.27±19.44	21.61±6.73**

与对照组比较: * P<0.05 ** P<0.01

3.3 Pft-d 的体外细胞毒活性

Pft-d 质量浓度为 20 μg/mL 时,对人胃窦癌、残骨癌细胞株的杀伤率分别为 64.34%、61.00%,与阳性对照药 MMC、TAX 的作用相当;但当质量浓度降至 5、10 μg/mL 时,其直接杀伤作用不明显(表 3)。因此,Pft-d 的抗癌作用是否为细胞毒机制还是其他机制值得进一步研究。

表 3 Pft-d 对人癌细胞的细胞毒活性(n=3)

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	杀伤率/%		
		胃窦癌	胃癌	残骨癌
Pft-d	5.0	18.99	—1.21	3.09
	10.0	23.06	1.63	30.50
	20.0	64.34	27.24	61.00
HCPT	1.25	—	—	76.45
MMC	1.5	—	—	84.89
PDD	1.5	72.76	—	59.07
MTX	2.2	42.42	31.89	—
5-FU	4.0	71.98	13.79	42.45
FUDR	4.0	—	—	47.62
VP16	4.8	—	—	48.44
MMC	10.0	64.30	61.78	—
TAX	10.0	—	—	62.93

3.4 Pft-d 对端粒酶活性的影响

端粒酶活性检测结果显示,阴性对照组 A 值为 1.33±0.27,5-FU 25 mg/L 组为 0.67±0.13,而 Pft-d 40 mg/L 组的为 0.81±0.08,表明 Pft-d 对端粒酶活性有一定的抑制作用。

4 讨论

在体内抗肿瘤实验中,恶性肿瘤动物模型的制备一般分为 3 种,即自发肿瘤模型、诱发肿瘤模型和移植肿瘤模型。而动物移植肿瘤模型具有移植成活率 100%,可同时提供大量生长均匀的肿瘤模型且无自发缓解等特点,是目前研究使用最多的肿瘤模型。在本实验中采用小鼠移植 S₁₈₀ 和 Heps 肿瘤模型观察了 Pft-d 的抗肿瘤的作用,为保证实验结果的可靠性,各项实验均重复进行 3 次。在体外细胞毒实验中,之所以采用癌症病人手术后的瘤块标本细胞,旨在得到的结果与临床有效的符合率相对更高些,为今后分离单体活性成分提供参考。为考察人癌细胞对试药的敏感性,选择了较多的抗癌药物

作阳性对照,病人瘤块标本除部分保存外,未分细胞株系。

以上结果表明,苦草提取物 Pft-d 具有强的抗肿瘤作用,此部分是苦草抗癌的有效部位,值得进一步进行单体成分的分离与精制实验,且有待进一步深入进行端粒酶活性研究。

参考文献

[1]黄燮才.常用中草药识别与应用[M].第二版.北京:化学工业出版社,2005,366.

[2]成桂仁,金静兰,文永新,等.自苦玄参分得五种新三萜成分[J].药学通报,1981,16(2):50.

[3]徐任生,叶阳,赵维民,等.天然产物化学[M].第二版.北京:科学出版社,2004,418.

[4]李忌,陈俊杰,巨勇,等.天然甾体皂甙化合物的抗肿瘤活性[J].天然产物研究与开发,1989,11(1):14-17.

[5]单磊,张卫东,张川,等.皂苷类成分抗肿瘤活性的研究进展[J].中草药,2005,36(2):295-298.

(收稿日期 2009-11-25)

养血生发胶囊对 C57BL/6 小鼠毛发生长的影响及机制

陈芙蓉,岳南,只德广,赵益桂

(天津药物研究院 新药评价中心,天津 300193)

摘要:目的 观察养血生发胶囊对 C57BL/6 小鼠毛发生长的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 采用 C57BL/6 小鼠脱发实验模型,观察毛发生长情况,并于脱毛后第 9、19 天,做脱毛区皮肤毛囊数、毛细血管数及毛囊血管内皮生长因子(VEGF)检测。结果 养血生发胶囊明显缩短小鼠皮肤变黑时间;明显增加皮肤毛囊数、毛囊毛细血管数及毛囊组织中 VEGF 表达积分吸光度(A)值。结论 养血生发胶囊通过增加毛囊组织中 VEGF 表达、毛细血管数及毛囊数,促进毛发生长。

关键词:养血生发胶囊;毛发生长;血管内皮生长因子;毛囊

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2010)02-0137-04

The effect and mechanism of Yangxue Shengfa Capsules on hair growth in mice

CHEN Fu-rong, YUE Nan, ZHI De-guang, ZHAO Yi-gui

(Center for Drug Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Yangxue Shengfa Capsules on hair growth of mice, and to detect the possible mechanism of hair growth promotion by using vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** C57BL/6 mice were chosen as experimental animals. Hair re-growth was observed, and the number of hair follicles, capillary and VEGF in hairless zone were determined on 9 and 19 day after the depilation. **Results** Yangxue Shengfa Capsules shortened significantly the time of skin darkening. Compared with model group, there was significant increase in hair follicle number and skin blood vessels as well as the integrated optical density (A) of VEGF in Yangxue Shengfa group. **Conclusion** Yangxue Shengfa Capsules can promote hair growth by increasing A of VEGF, hair follicle number and skin blood vessels.

Key words: Yangxue Shengfa Capsules; hair growth; vascular endothelial growth factor; hair follicle

脱发是临床常见疾病,可分为斑秃、脂溢性脱发、药源性脱发、产后脱发等类型,其中以斑秃和脂溢性脱发发病率最高。无论斑秃还是脂溢性脱发的发病,都是多因素综合作用的结果,既包括遗传、免疫调节等的影响,也涉及到体内激素、细胞因子和生

长因子、神经肽和神经营养因子等多方面的变化。临床上常采用口服和外用中药复方,利用其补肝益肾、活血养血、清热祛湿、祛风止痒的功效治疗该病。中药复方具有疗效确切、副作用小等优点,在中医理论的指导下,从整体出发,调节机体的阴阳平衡,标