

白头翁体外抗肿瘤实验研究

解放军第 454 医院(南京 210002) 蔡 鹰* 唐永明 梁秉文

摘 要 通过活细胞计数法、MTT 法、集落形成试验,研究了白头翁水提液(PWE)和醇提液(PAE)的体外抗肿瘤作用。结果:活细胞计数表明 PWE 对 7721、Hela、MKN-45 细胞株 72 h IC_{50} 分别为 0.88、0.28、0.86 mg/mL, PAE 5 mg/mL 对 3 种细胞 48 h 生长抑制率分别为 78.7%、89.5%、58.9%;PWE 对 3 种细胞降解 MTT IC_{50} 值分别为 0.82、0.60、0.81 mg/mL, PAE 5 mg/mL 对 3 种细胞降解 MTT 抑制率分别为 90.3%、95.6%、62.1%;PWE 2 mg/mL 对 3 种细胞集落抑制率分别为 47.8%、63.4%、43.6%;PAE 5 mg/mL 对 3 种细胞集落抑制率分别为 61.7%、54.6%、45.3%。提示 PWE、PAE 有直接细胞毒作用,并和时间、剂量呈正相关,且 PWE 作用比 PAE 强。

关键词 白头翁 人肝癌 7721 细胞株 人宫颈癌 Hela 细胞株 人胃癌 MKN-45 细胞株 抗肿瘤

白头翁为毛茛科植物 *Pulsatilla chinensis* (Bge) Regel 的干燥根,有清热解毒、凉血止痢的功效,多用于热毒血痢症(如细菌性痢疾、阿米巴痢疾),药理实验证明其有抗阿米巴原虫、抗菌、抗滴虫作用。曾有报道对肺部鳞癌、黑色素瘤有一定疗效^[1],但临床一般不作重要抗癌中草药使用,笔者在进行体外抗肿瘤药物筛选时,发现其有较高的抗癌活性,现报道如下。

1 材料

1.1 药物:白头翁为本院中药房提供,南京中医药大学中药学院刘文亮教授鉴定,符合药典正品标准。①水提液(PWE)的制备:白头翁 5 g,加蒸馏水适量,100℃加热 6 h,过滤,滤液浓缩至 1 g 生药/mL 浓缩液,过滤除菌,用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基稀释成不同浓度的药液(根据预试验结果而定,浓度均以相当的生药量表示),4℃冰箱保存备用。②醇提液(PAE)的制备:白头翁 5 g,95%乙醇浸泡 48 h,滤液浓缩至干,用 5 mL 蒸馏水溶解,过滤除菌,用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基稀

释成不同浓度的药液,4℃冰箱保存备用。

1.2 瘤株及试剂:人肝癌 7721 细胞株由解放军 81 医院提供;人宫颈癌 Hela 细胞株由南京师范大学生物学系提供;人胃癌 MKN-45 细胞株由上海细胞所提供。RPMI 1640, GIBCO 产品,MTT, Sigma 产品。

2 方法与结果

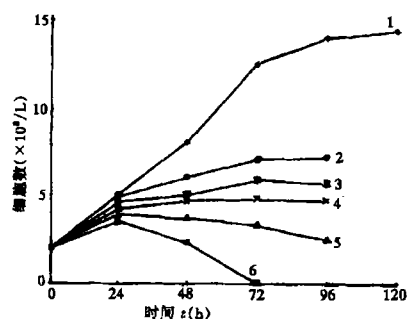
2.1 细胞计数法试验:取对数生长期形态佳的 3 种瘤细胞,分别用 0.25%胰酶消化后,用含 10%小牛血清 1640 培养液将瘤细胞制成 2×10^5 /mL (7721 细胞)、 1.5×10^5 /mL (Hela 细胞)、 4×10^5 /mL (MKN-45 细胞)的悬液,加入 24 孔培养板,每孔 1 mL,置 5% CO_2 、37℃的培养箱中,培养 24 h 后,吸出培养液,按实验设计分别加入药液,阴性对照用相应培养液代之,每 24 h 镜检、照相记录,台盼蓝染色法作活细胞计数,绘制细胞的生长曲线,并计算细胞生长抑制率 $[\% = (1 - \text{给药组细胞数} / \text{对照组细胞数}) \times 100\%]$ 。

2.1.1 PWE 对 3 种瘤细胞生长增殖曲线的影响:见图 1~3。

2.1.2 PWE 对细胞倍增时间(t_D)的影响:

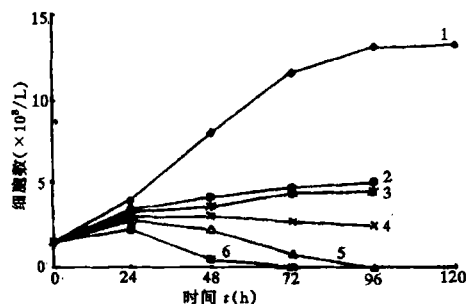
* Address: Cai Ying, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing

蔡 鹰 女,南京中医药大学中药学硕士研究生毕业,现在解放军第 454 医院工作,任主管药师,从事新药(中成药)开发质量标准制订研究工作和中药降血糖作用的实验研究。近年来,从事于抗肿瘤中草药筛选工作,发表论文 10 余篇。



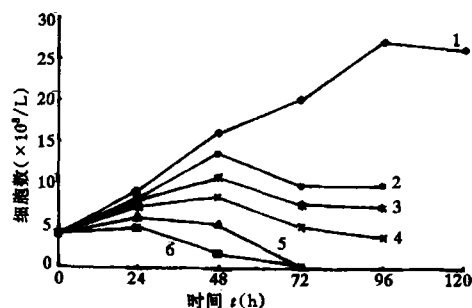
1-对照 2-0.651 mg/mL 3-0.911 mg/mL
4-1.276 mg/mL 5-1.786 mg/mL 6-2.500 mg/mL

图1 PWE对7721细胞生长增殖曲线的影响



1-对照 2-0.651 mg/mL 3-0.911 mg/mL
4-1.276 mg/mL 5-1.786 mg/mL 6-2.500 mg/mL

图2 PWE对Hela细胞生长增殖曲线的影响



1-对照 2-0.911 mg/mL 3-1.276 mg/mL
4-1.786 mg/mL 5-2.500 mg/mL 6-3.500 mg/mL

图3 PWE对MKN-45细胞生长增殖曲线的影响

在指数生长期细胞生长 $t_D = 0.301 t / \log N_t - \log N_0$, t 为细胞培养时间(h), N_0 及 N_t 分别代表接种时及培养 t h 的细胞数。PWE 2.5 mg/mL t_D 及延长率见表1, 表明PWE能明显延长3种细胞倍增时间, 影响存活活细胞的生长特性。

表1 PWE对3种细胞 t_D 的影响

细胞种类	对照组 t_D (h)	用药组 t_D (h)	延长率 (%)
7721	18	31	72
Hela	17	39	124
MKN-45	21	41	95

2.1.3 对细胞生长抑制率的影响: 随着时间和剂量的增加, PWE、PAE对3种细胞生长抑制率也增加, 呈量效时效关系。PWE对3种细胞生长24、48、72 h的半数抑制浓度 IC_{50} 见表2, PAE(5 mg/mL)对3种细胞生长抑制率见表3, 说明PWE作用比PAE强。

表2 PWE对3种细胞生长不同时间的半数抑制浓度 IC_{50} (mg/mL)

细胞种类	24 h	48 h	72 h
7721	3.61	1.60	0.88
Hela	3.04	0.79	0.28
MKN-45	3.78	1.97	0.86

表3 PAE(5 mg/mL)对3种细胞生长抑制率(%)

细胞种类	24 h	48 h
7721	33.6	78.7
Hela	46.2	89.5
MKN-45	21.2	58.9

2.2 MTT法测细胞增殖抑制率: 分别收集对数生长期的3种细胞(1×10^4 /mL), 种入96孔培养板, 每孔100 μ L, 置5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的培养箱中, 培养24 h后, 吸出培养液, 分别按设计加入药液, 阴性对照用相应培养液代之, 72 h后, 每孔加入10 μ L MTT (5 g/L), 37 $^{\circ}C$ 作用4 h, 除去上清液, 加入DMSO溶解, 平板振荡仪振荡10 min, 酶联免疫仪570 nm波长检测各孔吸光度(A)值, 按公式计算抑制率[$\% = (1 - \text{实验组A值均数} / \text{对照组A值的均数}) \times 100\%$]. PWE作用结果见表4。PAE 5 mg/mL对7721、Hela、MKN-45细胞降解MTT抑制率分别为90.3%、95.6%、62.1%。

2.3 集落形成试验: 将300 cell/mL对数生长期的单个分散细胞接种到6孔细胞培养板中(培养液含20%FBS), 待细胞开始分裂时, 吸出培养液, 分别加入药液, 阴性对照用相应

培养液代之,5 d 后,更换培养液和相同量药物,10 d 后用氨基黑染色,计数集落数,计算

集落抑制率 $[\%=(1-\text{给药组集落数}/\text{对照组集落数})\times 100\%]$ 。结果见表 5。

表 4 PWE 对 3 种细胞降解 MTT 的影响(n=3)

分组	浓度 (mg/mL)	吸光度 (A)	7721 抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	吸光度 (A)	Hela 抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	吸光度 (A)	MKN-45 抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
对照组	—	0.46±0.15			0.49±0.03			0.38±0.09		
PWE	1.786	0.09±0.04	80.43		0.03±0.14	93.88		0.02±0.03	94.73	
	1.276	0.15±0.12	67.39	0.82	0.09±0.02	81.63	0.60	0.08±0.04	78.94	0.81
	0.911	0.19±0.05	58.70		0.17±0.08	65.31		0.12±0.12	68.42	
	0.651	0.25±0.11	45.65		0.21±0.15	57.14		0.17±0.05	55.26	
	0.465	0.31±0.13	32.61		0.31±0.13	36.73		0.23±0.11	39.47	

表 5 PWE、PAE 对 3 种细胞集落形成的抑制率(n=3)

	浓度 (mg/mL)	细胞种类	抑制率 (%)
PWE	2	7721	47.8
	2	Hela	63.4
	2	MKN-45	43.6
PAE	5	7721	61.7
	5	Hela	54.6
	5	MKN-45	45.3

3 讨论

3 种方法结果一致,均表明 PWE、PAE 对 3 种肿瘤细胞有较强的抑制作用,PWE 2 mg/mL 左右就可产生非常显著的抑制肿瘤细胞生长作用,提示白头翁抗肿瘤作用主要通过其直接作用于肿瘤细胞所致,有无诱导细胞分化作用,有待进一步研究。

白头翁成分复杂,主要有白头翁素、白头翁英、白关翁灵、23-羟基白桦酸、白头翁皂苷 A₃、B₄ 等,白头翁英、白头翁灵,有类似洋地黄强心作用,新鲜的白头翁含原白头翁素,对皮肤粘膜有强烈刺激性,干燥久存的白头翁因原白头翁素聚合为白头翁素,局部刺激作用大为降低^[2],白头翁煎剂及其皂苷毒性很

低,对大鼠几无毒^[3],所以在临床剂量下组织药物浓度可达到有效抗肿瘤浓度。再根据 5 g 白头翁生药可制得 PWE 约 0.4 g 计算,对 3 种肿瘤细胞 72 h 的 IC₅₀ 值(实际 PWE 浓度)分别为 70.4、22.4、68.8 μg/mL,亦符合 IC₅₀ <100 μg/mL 认为有用的要求^[4],说明白头翁在临床抗肿瘤方面有潜在价值,值得进一步研究。

实验结果还表明 PWE 作用比 PAE 强,提示白头翁抗肿瘤活性成分系水溶性物质,亦可部分溶于乙醇。究竟哪些成分是抗肿瘤活性成分,现在尚难定论,小鼠体内试验正在进行,将另文发表。

参考文献

1 王浴生主编. 中药药理与应用. 北京:人民卫生出版社,1993:330
2 李仪奎主编. 中药药理学. 北京:中国医药出版社,1992:215
3 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上册. 上海:上海人民出版社,1997:705
4 徐叔云主编. 药理实验方法学. 北京:人民卫生出版社,1982:1138

(1998-11-20 收稿)

欢迎订阅 1999 年《中草药》杂志

《中草药》杂志是由国家药品监督管理局主管,中草药信息中心站、天津药物研究院主办的药科学技术学术期刊。每月 25 日出版。从 1999 年 1 月起,本刊改为 80 页,内容更加丰富,定价 9.8 元/期。
邮发代号:6—77,欢迎广大读者到当地邮局或来电编辑部办理订阅手续。