

制之一。

中性白细胞活性氧生成系统是一种 NADPH 氧化酶, PAF 与其受体结合可激活此酶, 从而促进中性白细胞释放 \dot{O}_2^- [9]。银杏内酯 B 在 $0.1 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ 对 $2 \mu\text{mol/L}$ PAF 刺激的中性白细胞 \dot{O}_2^- 的产生有明显的抑制作用, 可能是其抗炎作用机制之一。进一步地证实银杏内酯 B 可拮抗 PAF 的生物学活性

Hoike 曾报道, 浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ PAF 即可增加中性白细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 峰值, 随后细胞内钙水平下降。fMLP 也可诱导快速的中性白细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 且能使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 维持在较高的水平。一般认为, 在中性白细胞, 细胞内钙水平升高首先是内钙储库的释放, 然后是外钙的内流, 从而导致细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的进一步提高。选择性 PAF 受体拮抗剂 WEB2086 抑制 PAF 刺激引起的 IP_3 产生及内钙储库的钙释放; 而在 fMLP 诱导的细胞反应中, WEB2086 不抑制 IP_3 的产生及内钙储库的钙释放, 但抑制外钙的内流 [8]。本研究结果表明, 银杏内酯 B 明显抑制 1

$\mu\text{mol/L}$ PAF 刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 而对 $1 \mu\text{mol/L}$ fMLP 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高抑制作用较弱, 这一结果与上述文献报道相一致。

综上所述, 银杏内酯 B 的抗炎作用可能与其抑制中性白细胞溶酶体酶的释放、超氧阴离子的产生以及细胞内钙水平的升高有关。

参考文献

- 1 Smith P F, Maclellan K, Darlington C L. J Ethnopharmacol, 1996, 50(3): 131
- 2 Braquet P, Hosford D. J Ethnopharmacol, 1991, 32(1-3): 135
- 3 Shukla S D. FASEB J, 1992, 6 2296
- 4 Yue T L, Varma D R, Powell W S. Biochim Biophys Acta, 1983, 751: 332
- 5 Feinmark S J, Lindgrn J A, Claesson H E, et al. FEBS Letters, 1881, 136 141
- 6 王文杰, 白金叶, 程桂芳, 等. 中国医学科学院学报, 1997, 19(3): 220
- 7 Stewart A G, Dublin P N, Harris T, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 3215
- 8 Koike H, Imanishi N, Natsume Y, et al. Eur J Pharmacol, 1994, 269 299
- 9 Shaw J O, Pinckard R N, Ferrigni K S. et al. J Immunol, 1981, 1279(3): 1250

(2000-01-21收稿)

板蓝根二酮 B 体外抗癌活性研究[△]

广西医科大学(南宁 530021) 梁永红* 侯华新 黎丹戎** 秦 箐 邱 莉 吴华慧

摘要 目的: 板蓝根二酮 B 抗人肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞体外活性研究。方法: MTT 法测定板蓝根二酮 B 对肝癌 BEL-7402 细胞和卵巢癌 A2780 细胞的抑制作用, 集落形成实验观察药物的诱导分化作用, PCR-ELISA 试剂盒测定细胞的端粒酶活性。结果: 板蓝根二酮 B 具有抑制肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞增殖的能力, 其 IC_{50} 分别为 $8.2 \mu\text{g/mL}$ 和 $7.8 \mu\text{g/mL}$; 且具有诱导分化作用, 可降低端粒酶活性的表达。结论: 研究结果提示板蓝根二酮 B 具有体外抗肿瘤活性。

关键词 板蓝根二酮 B 抗肿瘤活性 肝癌 卵巢癌

Studies on *in vitro* Anticancer Activity of Tryptanthrin B

Guangxi University of Medical Sciences (Nanning 530021) Liang Yonghong, Hou Huaxin, Li Danrong, Qin Jing, Qiu Li and Wu Huahui

Abstract To study the *in vitro* anticancer activity of tryptanthrin B, one of the active constituent of the root of *Isatis tinctoria* L. on BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cell and A2780 human ovarian cancer cell. Cytotoxicity assay was tested by MTT method. Signs of induction differentiation was observed by colony forming units assay. Telomerase activity in cell was determined by PCR-ELISA method. IC_{50} of tryptanthrin B on BEL-7402 and A2780 cell lines were $8.2 \mu\text{g/mL}$ and $7.8 \mu\text{g/mL}$ respectively. Telomerase activity was dramatically declined and defferentiation of both cancer cell lines was observed. Tryptanthrin B possessed antitumor activity *in vitro*.

* Address: Liang Yonghong, Guangxi University of Medical Sciences, Nanning
梁永红 大学本科毕业, 理学学士, 高校讲师, 现从事天然药物化学方面研究工作。

** 广西肿瘤防治研究所

[△]本课题为广西教育科研资助项目, 桂 1999[383]-5

Key words *Isatis tinctoria* L. tryptanthrin B hepatocellular carcinoma BEL-7402 ovarian cancer A2780

板蓝根为菘蓝 *Isatis tinctoria* L. 的根,有镇痛、凉血和解毒之功效。从 80年代开始,已从板蓝根中分离、提取出几十种脂溶性组分,并发现这些组分具有抗内毒素、活血、降血压、抗炎等作用^[1,2]。而板蓝根的抗癌活性国内外尚未见报道。我们课题组在筛选抗肿瘤药物过程中发现,脂溶性板蓝根提取物——板蓝根二酮 B在体外对人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌 A2780细胞有较强的杀伤力。

1 材料

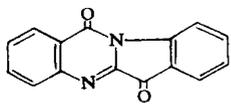


图 1 板蓝根二酮 B (tryptanthrin)

1.1 受试药物:板蓝根二酮 B,吡啶并[2,16]隆唑啉酮-6,12-二酮,其结构式如图 1。板蓝根二酮 B由本课题组分离提纯鉴定。MTT(噻唑蓝)为 Sigma 公司产品, RPMI1640

为 Gibco 公司产品,端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。MR-300 酶标仪为美国产。黑马 480DNA 扩增仪为珠海产。

1.2 细胞株:人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌 A2780 细胞由广西肿瘤防治研究所免疫室传代保株。

2 实验方法和结果

2.1 细胞毒实验:取对数生长的人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌 A2780 细胞 1.0×10^5 /mL,分装于 96 孔板,每孔 0.1 mL,细胞板内的细胞常规培养于含 10% 小牛血清,10 mg/L 青霉素和 10 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 下培养 24 h 后,分别加入不同浓度的板蓝根二酮 B,各组设 3 个平行孔,空白对照为生理盐水。加药完毕继续孵育 48 h,实验终止前加入 2 mg/mL MTT 液,再培养 4 h,测试前加入 DMSO,充分振匀后,测定每孔 490 nm 下的吸光度 (A) 值,按下列公式求出生长抑制率 (IR) 和半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{\text{用药组平均 } A \text{ 值}}{\text{对照组平均 } A \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

从表 1 可见,在 3.10、6.20、12.5、25.0、50.0 μg/mL 浓度下,板蓝根二酮 B 对人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌 A2780 细胞生长抑制率随药物浓度的升高而升高,IC₅₀ 分别为 8.2 和 7.8 mg/L。

2.2 端粒酶活性测定:肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌 A2780 细胞用半数抑制浓度的板蓝根二酮 B 处

表 1 板蓝根二酮 B 对人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌细胞 A2780 的 IR 及 IC₅₀ 值 (n=3)

药物浓度 (mg/L)	抑制率 (%)		IC ₅₀ (μg/mL)	
	BEL-7402	A2780	BEL-7402	A2780
3.0	34.26	36.12		
6.2	40.38	47.20		
12.5	74.22	78.12	8.2	7.8
25.0	82.38	85.22		
50.0	88.02	89.16		

理不同时间后,制备端粒酶提取液。取细胞提取液 5 μL 加入 25 μL TRAP PCR 扩增液,在 PCR 扩增仪上按以下步骤进行引物的延伸及扩增反应:25℃ 30 min 90℃ 5 min 循环一个周期,再以 94℃ 30 s 变性,50℃ 30 s 72℃ 90 s 延伸,共循环 30 个周期,平衡 72℃ 10 min。取上述 PCR 产物 5 μL 加变性液 20 μL 混匀,置室温 10 min,加入杂交液 225 μL 混匀后取出 100 μL 包被于抗地高辛的酶标板中,室温作用 2 h,加入过氧化物酶并与底物显色作用 30 min 后终止反应,测定 450 nm 和 690 nm 的吸光值 (A)。结果经板蓝根二酮 B 处理的 BEL-7402 细胞和 A2780 细胞分别培养 1, 3, 5 d 后,进行端粒酶活性测定,其 A 值分别为 0.381, 0.276, 0 和 0.341, 0.277, 0, 而未经药物处理的肝癌细胞、卵巢癌细胞其 A 值为 1.60 和 1.46。

2.3 集落形成实验:实验组和对照组各 3 例,前者加入一定浓度的药物,后者加入等量溶剂,接种于培养瓶中,每瓶 5 万个细胞,加培养液 1 mL,于 37℃、5% CO₂ 培养 1~3 d,瑞氏染色,记数集落数,多于 50 个细胞者记为集落,按下式计算集落抑制率,经相应的半数抑制浓度板蓝根二酮 B 处理后的肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞集落形成数明显少于空白细胞的集落。结果见表 2。

$$\text{集落抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{用药组集落数}}{\text{对照组集落数}}\right) \times 100\%$$

3 讨论

3.1 从板蓝根二酮 B 抗肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞活性表明,板蓝根二酮 B 有体外抑制肝癌 BEL-7402 细胞和卵巢癌 A2780 细胞的能力,抑制作用均与浓度呈梯度关系,且抑制卵巢癌 A2780 细胞的能力比肝癌 BEL-7402 细胞强,这可能是由于肝癌 BEL-7402 细胞为诸多恶性肿瘤细胞中增殖速度最快且又难以控制的种类之一,与许多临床结果相一致^[3]。

表 2 板蓝根二酮 B 对人肝癌细胞 BEL-7402 卵巢癌细胞 A2780 集落形成的影响

t (d)	空白细胞集落		给药组集落		集落抑制率	
	(个)		(个)		(%)	
	BEL-7402	A2780	BEL-7402	A2780	BEL-7402	A2780
0	76	66	—	—	—	—
1	109	98	86	74	21.10	24.48
2	234	219	46	37	80.34	83.10
3	388	298	19	10	95.10	96.64

3.2 板蓝根是临床上常用的药物,但目前从板蓝根中提取的化合物为数不多,尤其是象板蓝根二酮 B 这类具有抗肿瘤作用的活性物质尚未见报道。MTT 实验结果表明,板蓝根二酮 B 对肝癌 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞具有较强的体外杀伤能力,其半数抑制量分别为 $8.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $7.8 \mu\text{g}/\text{mL}$,符合 $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 被认为有研究价值的要求^[4]。同时集落形成实验也表明:板蓝根二酮 B 具有逆转肿瘤细胞向正常细胞转化的能力。

3.3 端粒酶的激活是恶性肿瘤学上的一个共同途径,而端粒酶则是各种恶性肿瘤细胞的一个共同的

分子标志物,大多数肿瘤细胞的增殖与端粒酶的活化有关,抑制端粒酶的活性可以影响肿瘤的生物行为。大量实验表明,端粒酶的作用是在 DNA 复制期线性染色体末端添加 TTAGGG 重复序列,从而使细胞无限增殖,导致肿瘤发生和细胞永生^[5,6]。本实验结果表明 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞具有非常高的端粒酶活性,而板蓝根二酮 B 能抑制 BEL-7402 细胞、卵巢癌 A2780 细胞的端粒酶活性,且随着板蓝根二酮 B 作用时间越长,其端粒酶表达越弱。提示板蓝根二酮 B 可能具有抑制肿瘤活性能力,在临床抗肿瘤方面有潜在价值。对我们正在进行板蓝根二酮 B 构效关系的研究具有积极意义。

参考文献

- 1 刘云海. 中国药科大学学报, 1995, 26(5): 297
- 2 Honda G. Planta Med, 1980, 38(Mar): 275
- 3 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 4
- 4 徐叔云主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982 1443
- 5 赵冬兵, 张伟, 金顺钱, 等. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(3): 199
- 6 Jerry W S, Wooding E W. Curr Opin Oncol, 1996, 8 66

(2000-01-27收稿)

金复康治疗肝癌的实验研究

上海中医药大学附属龙华医院 (200030)

李和根*

上海医药工业研究院

陈秀华 姚玉龙 任文龙

摘要 金复康口服液是治疗肺癌的中药验方,根据中医“异病同治”的原则,对金复康口服液进行了实验性肝癌的治疗作用和对小鼠免疫功能影响的研究。金复康口服液对小鼠肝癌 HAC 和接种于裸鼠的人体肝癌 QGY 的疗效试验结果表明,金复康口服液对动物及人体移植性肝癌有一定的抑制作用;对小鼠体内脾淋巴细胞增殖、IL-2 和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 的活性试验表明,金复康口服液有明显的促进免疫功能的作用。

关键词 金复康口服液 移植性肝癌 NK 细胞 淋巴细胞 IL-2

金复康口服液是根据上海中医药大学附属龙华医院刘嘉湘教授的处方研制的治疗肺癌的中药验方^[1],主要成分为生黄芪、北沙参、女贞子、麦冬、石见穿、石上柏、七叶一枝花等十二味中药。我们根据中医“异病同治”的原则,研究了金复康口服液对实验性肝癌的活性,显示了一定的治疗作用。

1 实验材料

1.1 动物: 昆明种小鼠,由上海医药工业研究院动物房提供,♀,体重 19~21 g BALB/C 裸鼠,由上海肿瘤研究所提供,♂,体重 17~18 g C57BL/6 小

鼠,由 BK 公司提供,♀,体重 18~20 g

1.2 药物: 金复康口服液,江西上饶制药厂提供,批号为 961112,含量为 3 g 生药/mL 环磷酰胺 (CTX),华联制药公司生产,批号 940106 香菇多糖,福州梅峰制药厂生产,批号 911026,每毫升含香菇多糖 2 mg

1.3 细胞株及动物移植性肿瘤: YAC-1 细胞,小鼠肝癌 HAC,人体肝癌 QGY

1.4 其它材料: 培养基: RPMI 1640 内含 15% NBS 巯基乙醇等。³H-TdR 上海原子核研究所,放

* Address: Li Heg en, Affiliated Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai
李和根 男,1988年毕业于上海中医学院,获学士学位。主治医师。主要从事肿瘤临床及实验研究。参与多项国家“七·五”、“八·五”、“九·五”及市局级科研课题。曾获上海市科技进步三等奖。