

的应用日趋广泛,尤其在新抗肿瘤药物的筛选、对特定类型肿瘤的药效学评价、及肿瘤导向治疗研究中具有重要的作用^[2]。

药物对异种移植的人体肿瘤的作用与药物的临床疗效有良好的相关性^[3]。可见,人癌裸鼠移植模型的建立,开辟了直接针对人癌进行抗肿瘤药物研究的新途径。研究结果表明,AP对荷人鼻咽癌裸鼠具有明显的抗癌作用。

近年来研究表明,细胞凋亡在肿瘤的发生、发展和治疗中有重要意义。目前认为肿瘤的发生和发展既与细胞的异常增殖有关,同时也与细胞凋亡异常有关^[4]。放疗、热疗、抗体、淋巴因子等均可促进肿瘤细胞凋亡。对细胞凋亡的研究,为肿瘤治疗寻找新靶点、制定新策略带来了新希望。

电镜观察是鉴定细胞凋亡的最佳选择之一^[5]。本实验结果可见 AP 20 mg/kg 剂量组的癌细胞主要出现凋亡现象,AP 40 mg/kg 剂量组的癌细胞的死亡方式则主要为变性坏死。而 AP 20和 40 mg/kg

剂量对裸鼠移植人鼻咽癌均有明显的抑制作用,抑瘤率为 36.64%~46.72%。由此可见,AP抑瘤作用机制之一是 AP能诱导癌细胞死亡,包括凋亡和坏死。其中癌细胞以哪种死亡的方式为主依用药剂量不同而异,与有关报道相似^[6]。

研究表明,AP对荷人鼻咽癌裸鼠具有明显的抗癌作用,给予 AP的裸小鼠在实验中一般状况良好,在本实验条件下,尚未见 AP出现毒副作用。提示 AP在海洋抗癌药物中具有开发价值和应用前景。

参考文献

- 1 李忠.药学报,1988,23(8):455
- 2 曾知真.上海第二医科大学学报,1992,12(2):162
- 3 Fujita M, Hayata S, Taguchi T. J Surg Oncol, 1980, 15(3): 211
- 4 Kerr J F R, Winterford C M, Harmon B V. Cancer, 1994, 73: 2013
- 5 Claire M P, Harris B, Harinder G. Ultrastruct Pathol, 1995, 19: 221
- 6 Matsuzaki, Kurokawa N, Terai S. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(2): 170

(2000-02-29收稿)

白首乌甾体总苷的体外抗肿瘤作用[△]

浙江省医学科学院(杭州 310013) 张如松* 叶益萍 刘雪莉

摘要 体外用细胞生长曲线法、MTT 试验、蛋白质含量测定法及形态学观察研究了白首乌甾体总苷(CG)的抗肿瘤作用。结果表明:CG对 Hce-8693 PC₃、Hela PAA 4种实体瘤细胞均有较强的体外细胞毒作用,且呈浓度依赖性。CG作用于 Hela细胞 4 d,形态观察表现为细胞膜皱缩、细胞核固缩、浓聚。

关键词 白首乌 白首乌甾体总苷 细胞毒活性

Studies on *in vitro* Antitumor Activity of Total Steroidal Glycoside from the Root of *Cynanchum auriculatum*

Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences (Hangzhou 310013) Zhang Rusong, Ye Yiping and Liu Xueli

Abstract *In vitro* cytotoxicity of total steroidal glycoside (CG) from the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight was studied on Hce-8693, PC₃, Hela and PAA solid tumor cells by determining cell growth curve, MTT test, protein content assay and morphological observation. The results showed that CG exhibited potent cytotoxic effect on all four solid tumor cells lines in a concentration-dependent manner. After 4d of treatment with CG, Hela cells proliferation distinctly declined with dramatic morphologic alteration, including some cell membrane shrinkage and nuclei pyknosis.

Key words the root of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight total steroidal glucoside from the root of *Cynanchum auriculatum* (CG) cytotoxic activity

Address: Zhang Rusong, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou

张如松 副研究员,硕士生导师,浙江省跨世纪学术和技术带头人培养人员。1977年毕业于浙江医科大学药学院,1992年获日本大阪大学药理学博士。主要从事天然药物活性成分的研究,特别对萝藦科植物含有 C₂₁甾体类成分有较深入的研究,已分离确定了 9种新的 C₂₁甾体类成分。近 3年来,主持浙江自然科学基金项目 2项及其它基金项目多项。在国内外杂志发表论文 20余篇。

[△]浙江省自然科学基金资助 No 396484

白首乌系萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根,为著名传统中药,具有补血益精、延年益寿的功效^[1],在民间用于滋补药膳,是一有前途的抗衰老药物。现代研究表明白首乌中含有磷脂类、氨基酸、C₂₁甾体苷、维生素、无机盐及30多种微量元素等成分。药理实验研究发现白首乌甾体总苷具有抗肿瘤和免疫增强作用^[2,3],但从未有人对白首乌甾体总苷活性成分进行过系统的研究。我们在以体外抗肿瘤试验为导向,对白首乌甾体总苷进行系统的化学成分研究中发现白首乌甾体总苷对 Hce-8693 PC₃、Hela PAA 4种实体瘤细胞具有明显的体外抗肿瘤作用。

1 实验材料

1.1 药物:白首乌甾体总苷为白首乌块根经甲醇回流提取,提取物回收甲醇后用氯仿提取,氯仿可溶部分回收溶剂后投入正己烷中,正己烷不溶部分即白首乌甾体总苷(简称CG)

1.2 细胞系及培养条件:人前列腺癌细胞 PC₃,购自中国科学院上海细胞研究所细胞库(ATCC引进);人大肠癌细胞 Hce-8693,由浙江省肿瘤医院赠送,为浙江省医学科学院病理研究室传代细胞株;人肺癌细胞 PAA,人宫颈癌细胞 Hela,购自浙江医科大学第二附属医院肿瘤研究所。各细胞系均接种于含10%小牛血清、4 U/mL庆大霉素的DMEM培养基中,置37℃、含5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 试剂:DMEM培养基,Gibco公司产品;MTT(噻唑蓝四氮唑),Sigma公司产品;胰酶,Gibco公司产品;考马斯亮蓝 G-250,英国进口分装,新生小牛血清,杭州四季青生物材料公司产品。

2 方法

2.1 PAA细胞生长曲线的测定^[4],在24孔细胞培养板上加入对数生长期PAA细胞混悬液(细胞密度为 5×10^4 个/毫升)每孔1.0 mL;培养1 d后加入不同浓度的药物每孔1.0 mL,均设3复孔。于加药同时及加药后不同时间,用0.25%的胰酶液消化,收集细胞,于细胞计数板上计数,以每毫升细胞数为纵坐标,时间为横坐标画出细胞生长曲线。

2.2 MTT显色法测定CG对肿瘤细胞的抑制率^[5]:在96孔细胞培养板上加一定密度的细胞混悬液每孔100 μ L,培养1 d(细胞贴壁)后加入不同浓度的药物每孔100 μ L,均设复孔,另设对照孔(只加细胞,不加药物)和调零孔(只加培养液,不含细胞和

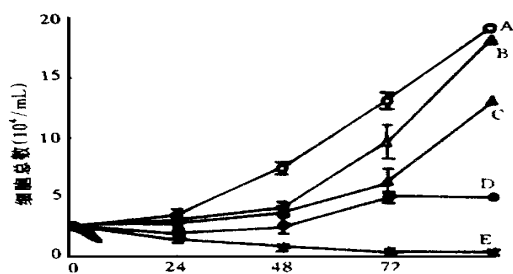
药物)。在37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养4 d,取出,加入1.0 mg/mL的MTT每孔100 μ L;继续培养2 h后,倾去各孔内液体,再加入0.04 mol/L盐酸异丙醇每孔150 μ L,于37℃放置1 h后,以酶标仪在570 nm处测各孔吸光度。

2.3 考马斯亮蓝蛋白质含量测定法测定CG对Hela细胞的影响^[6]:在24孔细胞培养板上加入一定密度的细胞混悬液每孔1.0 mL;培养1 d后,加入不同浓度的药物,于培养箱中培养4 d后,倾去各孔内液体,经0.25%胰酶消化,PBS冲洗,离心收集细胞,加0.3 mol/L NaOH 0.5 mL,于100℃水浴加热30 min后(裂解细胞),取0.2 mL加2 mL考马斯亮蓝溶液,摇匀,以754分光光度计在595 nm处测吸光度。

2.4 形态学观察CG对Hela细胞的影响^[7]:将Hela细胞接种于盖玻片上,给药组同时加入CG 80 μ g/mL,培养4 d后取出盖玻片以HE染色法染色,在光镜下观察并拍照。

3 结果

3.1 CG对PAA细胞生长的影响:用不同浓度的CG处理PAA细胞,可见PAA细胞的生长均受到抑制,且呈浓度和时间依赖性。由图1看出150 μ g/mL的CG对PAA细胞具有明显的细胞毒作用。



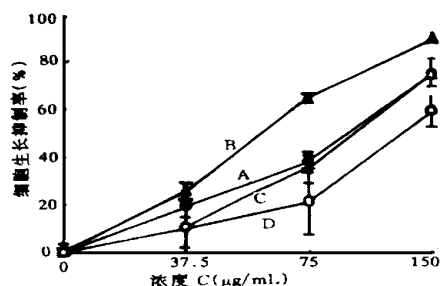
A-对照 B-CG 18.75 μ g/mL C-CG 37.5 μ g/mL
D-CG 75 μ g/mL E-CG 150 μ g/mL

图1 CG对PAA细胞生长抑制作用($n=3$)

3.2 CG对体外培养的肿瘤细胞的影响:用MTT法观察了CG对体外培养的人大肠癌 Hce-8693 人前列腺癌细胞 PC₃ 人肺癌细胞 PAA 和人宫颈癌细胞 Hela 4种实体瘤细胞的影响,如图2所示,CG对肿瘤细胞有较强的细胞毒作用。考马斯亮蓝蛋白质含量测定结果也表明:CG对Hela细胞有抑制作用,如表1所示,且呈明显的浓度依赖性。

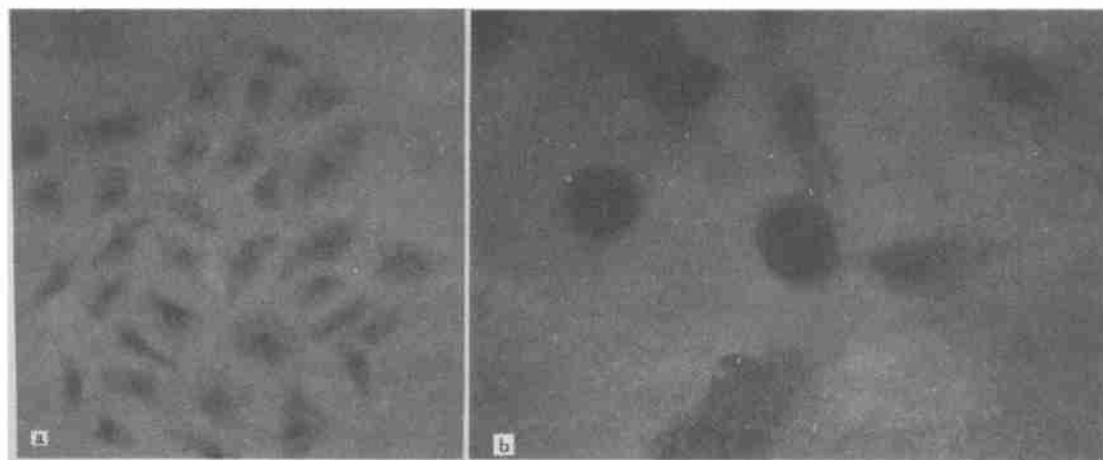
3.3 CG对Hela细胞形态的影响:细胞形态学观察表明,对照组细胞生长旺盛,呈多边形。给药组细胞生长明显受抑,细胞变圆,核固缩、浓聚,图3所示。

4 讨论



A-Hela B-PAA C-PC₃ D-Hce

图 2 CG对肿瘤细胞的细胞毒作用 ($n=3$)



a 未经药物处理的细胞 b 经 CG 80 μ g/mL处理 4 d 的细胞

图 3 HeLa细胞形态

PAA 4种实体瘤细胞有较强的细胞毒作用,可见白首乌甙体总苷具有广谱抗肿瘤作用。此外,白首乌甙体总苷还有增强机体免疫功能的作用^[3]。因此对白首乌甙体总苷的抗癌作用及其机制值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 (第三册). 北京: 科学出版社, 1974 473
- 2 顾立刚, 龚树生, 陶君娣, 等. 中国医药学报, 1987, 2 (5): 25

表 1 CG对 HeLa 细胞蛋白含量的影响

浓度 (μ g /m L)	蛋白减少率 (%)
37.5	5.46 $\pm$ 3.06
75	20.79 $\pm$ 1.36
150	46.10 $\pm$ 2.58

从植物中寻找抗肿瘤药物及抗肿瘤辅助药物, 在国内外均为抗肿瘤药物研究的重要组成部分。据文献报道白首乌甙体总苷对 EAG S-180 Lewis 肺癌等瘤株在体内外均有明显的抑制作用^[8]。本实验发现白首乌甙体总苷还对 Hce-8693 PC₃、Hela

- 3 赵 瑾, 韩进红, 王少军, 等. 中国药理学通报, 1990, 6 (2): 126
- 4 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京: 北京出版社, 1995 87
- 5 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 中国医药工业杂志, 1993, 24 (10): 455
- 6 Marion M. Anal Biochem, 1976, 72 248
- 7 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 1996 198
- 8 赵 瑾, 韩进红, 王少军. 中国医药学报, 1988, 3 (2): 29

(1999-12-01收稿)

《中草药》杂志 2000年增刊征订启事

为了加速中药产业的技术创新,经国家科技部 (国科发财字 [2000]25号文)批准,我部编辑、出版了以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容的《中草药》杂志 2000年增刊。本增刊共收载论文 112篇,其中特邀国内中药化学、药理、制剂、分析等方面的知名专家和中青年学科带头人就“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”撰写专论文章 14篇。本增刊选题广泛,内容新颖,学术水平较高,科学性较强。

增刊为大 16开本,200页左右 (约 40万字),天津市报刊增刊特许准印证 (2000)第 (112)号,定价 65元,另加包装费、邮费 5元。凡订阅者请直接向我部邮购。

地址:天津市鞍山西道 308号 邮编:300193 电话:022-27474913

《中草药》杂志编辑部