

- of anxiety [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, (52): 297-303.
- [2] Roders R J, Cole J C, Aboualfak, *et al.* Ethopharmacological analysis of the effects of putative anxiogenic agents in the mouse elevated plus-maze[J]. *Pharmacol Biochem Behav* 1995, (52): 805-813.
- [3] Matumoto K, Ojima K, Watanabe H. Noradrenergic denervation attenuates desipramine enhancement of aggressive behavior in isolated mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, (50): 481-489.
- [4] 吴普. 神农本草经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [5] 熊谷朗. 药用人参 [M]. 东京: 共立出版株式会社, 1995.
- [6] Sodati F, Sticher O. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from *Panax quinquefolium* and from ginseng drug preparations [J]. *Planta Medica*, 1980, (38): 348-357.
- [7] Ni X H, Tai B S, Zhao F L, *et al.* Effect of crude saponin extracted from the leaf and stem of *Panax ginseng* on scopolamine-induced memory disruption in rats [J]. *Journal of Traditional Medicines*, 1995, (12): 118-123.

13种生药提取物及化学成分的抗真菌活性筛选

王理达, 胡迎庆, 屠鹏飞, 吴之伟, 郑俊华, 果德安*
(北京大学药学院, 北京 100083)

摘要: 目的 对 13种生药的醇提取物及 13种单体化合物进行啤酒酵母突变性 GL7和威克海姆原藻敏感性测试。方法 采用显微镜直接计数法和 MTT(噻唑蓝)法确定微生物的最低抑菌浓度(MIC)及其抑菌效果。结果 黄柏、丁香、乌梅、黄连、山豆根对二者均有强烈抑制作用。澳洲茄对威克海姆原藻(*Prototheca wickerhamii*)的 MIC比啤酒酵母突变型 GL7(*Saccharomyces cerevisiae* GL7)的 MIC低 40倍。结论 各种生药提取物及化学成分对不同微生物的抑制效果有显著不同, 澳洲茄胺是甾醇生物合成途径的阻断剂, 紫檀芪、7-羟基-4-甲氧基黄烷和白鲜碱对 2种微生物中的甾醇生物合成途径没有影响。

关键词: 生药; 抗真菌; 甾醇生物合成; 啤酒酵母; 威克海姆原藻

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0200-03

Antifungal activity screening on 13 crude drug extracts and chemical constituents

WANG Li-da, HU Ying-qing, TU Peng-fei, WU Zhi-wei, ZHENG Jun-hua, GUO De-an

Key words crude drug; antifungal activity; sterol biosynthesis; *Saccharomyces cerevisiae*; *Prototheca wickerhamii*

致病真菌对人类的危害是广泛而严重的。寻找高效低毒的抗真菌药物已成为当务之急。很多具有抗真菌活性的传统中药是值得开发的重要资源。

麦角甾醇作为真菌细胞膜的构建成分, 没有或缺少麦角甾醇, 真菌就不能正常生长甚至死亡, 通过寻找麦角甾醇生物合成的阻断剂是寻找抗真菌药物的重要手段之一。目前对抗真菌化学合成药物的研究也主要集中在设计麦角甾醇的生物合成抑制剂, 但从生药中寻找麦角甾醇生物合成抑制剂作为抗真菌药物的研究尚未见报道。

威克海姆原藻(*Prototheca wickerhamii*)寄生或腐生于木材、蔬菜和粪便中, 引起人皮肤、皮下组织、口腔、鼻、浆膜等处病变, 统称无绿藻病(prototheco-

sis), 偶尔可引起系统性感染^[1]。临床上把它归为真菌病, 用抗真菌药物进行治疗。自 Davies等^[2]1964年报道首例无绿藻病例, 目前该病仍有上升趋势, 尚无特别有效的治疗药物, 往往需要手术治疗。啤酒酵母突变型 GL7(*Saccharomyces cerevisiae* GL7)自身不能合成甾醇, 需饲喂甾醇以维持正常生长, 因此可对其生物合成途径进行监测。这两种微生物的生物合成途径已被阐明^[3,4], 二者的甾醇生物合成途径不同, 因此应用这两种微生物有利于研究抗真菌天然产物对甾醇生物合成途径的影响。

为此作者选择了已有报道的有较好抗真菌活性的中药川芎^[5]、栀子^[6]、黄柏^[5,6]、丁香^[6]、紫草^[6]、乌梅^[7]、使君子^[5,7]、白芷^[6]、黄连^[6]、龙胆^[5]、秦艽^[5]、防

* 收稿日期: 2000-03-23

基金项目: 中华医学基金专项人才基金和教育部跨世纪优秀人才培养基金

作者简介: 果德安, 男(1962-04), 山东邹城人, 北京大学药学院教授, 博士生导师。现任北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室副主任, 天然药物学系副主任。先后在国内外杂志上发表论文 100余篇, 其中有 28篇 SCI收录论文, 被 SCI引用 120余次。获得包括国家杰出青年基金、国家教育部跨世纪优秀人才培养基金等 5项人才基金。通讯地址: 北京海淀区学院路 38号北京大学药学院。电子邮件: gda@mail.bjmu.edu.cn

己^[5]、山豆根^[7]等药材的醇提取物及天然产物进行了啤酒酵母突变型 GL7和威克海姆原藻的敏感性测试,以期从天然产物中寻找作用靶点在甾醇生物合成途径上的抗真菌药物,为开发高效低毒的抗真菌天然药物奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料:啤酒酵母突变型 GL7(*Saccharomyces cerevisiae* GL7)和威克海姆原藻(*Prototheca wickerhamii*)菌种均由 W. David Nes 博士(Department of Chemistry and Biochemistry, Texas Tech University, Lubbock 79409, TX, USA)赠送

1.2 仪器:HZQ-Q全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发公司),酶标仪(BioRad550型)。

1.3 药品与试剂:蛋白胨(Peptone,购自DIFCO公司),酵母提取物(Yeast Extract,购自OXOID公司),葡萄糖(汕头市光华化学厂),两性霉素B(AmB,购自GIBCO公司),噻唑蓝(MTT,购自北京原平生物技术公司),酮康唑(西安杨森制药有限公司),试剂均为分析纯。

1.4 方法

1.4.1 微生物细胞培养:培养基为蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,酵母提取物 1%,每瓶接种适量微生物细胞,终浓度为 10⁴ cfu/mL。置于 30℃,100 r/min 摇床培养。

1.4.2 生药粗提物的制备:生药各 250 g,粉碎,过 20目筛,分次用 70%乙醇浸 72 h,每次加 5倍量乙醇,共 3次,滤过,滤液合并,减压回收乙醇得流浸膏。流浸膏用 70%乙醇配成 1:1药液,用培养基分别稀释成 1/10, 1/20, 1/40, 1/80浓度,于 4℃冰箱保存备用。

1.4.3 检测药物对微生物细胞抑制效果的方法:

(1)显微镜直接计数法^[8],用血球计数板在镜下(400X)计数。为了区分死细胞和活细胞采用活体染色法。用美蓝配成一定的浓度,再与等体积的细胞悬液混合,经一段时间后,活细胞表现出无色,而衰老或死亡的细胞呈蓝色或淡蓝色。(2)MTT法^[9],MTT用磷酸缓冲液(0.2 mol/L PBS, pH7.2)溶解配成 1 mg/mL溶液,药物配成 3 mg/mL母液,MTT及药液均用 0.45μm微孔滤膜过滤灭菌。96孔细胞培养板在紫外灯下照射 40 min。第一孔药物终浓度为 1 mg/mL,依次稀释 10倍或对倍稀释,以不加药液为阴性对照,两性霉素 B为阳性对照。每孔加 0.1 mL菌悬液(细胞终浓度为 10⁴ cfu/mL),作 3组重复。置 30℃培养 3 h,每孔加 50μL MTT,15 min后产生蓝色颗粒,3 000 r/min离心 10 min,吸弃上清液,每孔加 100μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min以彻底溶解颗粒,用酶标仪 570/630 nm读取吸光度值。(3)MIC₈₀与 MIC₁₀₀的确定, MIC₈₀为与对照相比抑制 80%生长的最低药物浓度。MIC₈₀作为抗真菌剂(fungistatic)的最低抑菌浓度,即虽未杀死细胞但抑制其生长。MIC₁₀₀为没有可见的细胞生长的最低药物浓度。MIC₁₀₀为杀真菌剂(fungicide)的最低抑菌浓度。精确称取一定量的药品,用 DMSO溶解,配成一定浓度的药液,再稀释成不同浓度。将处于对数生长期的细胞接种含药的培养基中,细胞终浓度为 10⁴ cfu/mL,于 30℃恒温箱中培养,48 h在不搅动情况下用肉眼观察,溶液澄清透明视为无细胞生长,取完全不生长管最低药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与讨论

生药醇提取物及生药活性成分对 *P. wickerhamii* 及 *S. cerevisiae* GL7的抑制效果如表 1, 2所示。

表 1 生药醇提取物对 *S. cerevisiae* GL7和 *P. wickerhamii*的抑制效果 (%)

生药	1/10		1/20		1/40		1/80	
	P	S	P	S	P	S	P	S
川芎	100	74.6	100	61.0	83.3	29.7	74.6	7.6
栀子		83.9	70.6	58.5	50.2	20.3	45.0	8.5
黄柏	100	84.8	100	66.9	85.9	55.1	77.3	61.0
丁香	100	100	100	100	84.2	100	84.2	86.4
紫草		100	24.1	100	-	100		100
乌梅			65.1	47.7	62.1		51.7	44.4
使君子		15.0	18.2	-	-			
白芷		8.5	60.6	-	60.2			
黄连	100	84.2	100	84.9	100	68.4	100	77.6
龙胆	-	81.8		40.9		40.9		40.9
秦艽		97.0	68.4	92.5	56.1	80.6	36.0	37.3
防己			83.3	47.9	75.4	32.4	74.6	-
山豆根	100	100	100	100	75.8	81.4	59.5	68.6

- : 无抑制 P *Prototheca wickerhamii*, S *Saccharomyces cerevisiae* GL7

从表中可知黄柏、丁香、乌梅、黄连、山豆根对二者均有强烈抑制作用,紫草、龙胆对 *S. cerevisiae* GL7抑制作用很强,而对 *P. wickerhamii* 则无作用。反之,白芷对 *P. wickerhamii* 有较好的抑制作用,却对 *S. cerevisiae* GL7的生长无影响。可见各种药物对细胞作用机制不同,导致其对不同种类细胞抑制效果的差异。如果能阐明一种药物对微生物的作用机制,则用其作为治疗药物可减少盲目性,提高治疗效率。

表 2 生药活性成分对 *S. cerevisiae* GL7和 *P. wickerhamii* 的抑制效果 (%)

样品	100 μ g/mL		10 μ g/mL	
	S	P	S	P
小檗碱	55.7	94.0	9.0	32.1
紫草素	70.4	48.2	51.9	-
药根碱	19.2	45.4	9.0	7.1
麻黄碱	45.3	46.0	-	21.4
浙贝素乙	25.9	17.9	14.6	-
贝母素甲	27.4	29.6	16.1	18.5
鬼臼毒素	34.5	22.2	28.7	14.8
巴马汀	48.7	-	-	-
苦参碱	36.8	-	21.9	-

-: 无抑制 P. *Prototheca wickerhamii*, S *Saccharomyces cerevisiae* GL7

几种生药活性成分对两种微生物的抑制效果如表 2所示,小檗碱对 *P. wickerhamii* 的抑制效果好于对 *S. cerevisiae* GL7的抑制效果,紫草素则相反,对 *S. cerevisiae* GL7有较好的抑制效果。其他几种天然产物则未表现出好的抗真菌活性。经作者实验证明这几种天然产物的作用靶点也不在甾醇生物合成途径上。

几种抗真菌生物活性成分对 *P. wickerhamii* 和 *S. cerevisiae* GL7的最低抑菌浓度如表 3所示。酮康唑 (ketocoazole)是临床上广泛应用的治疗系统性真菌病的药物,作用靶点是甾醇生物合成途径中的 14位去甲基酶 24-(R,S)-25-epiminolanosterol 是一种化学合成的 24-甾醇甲基转移酶的真菌甾醇生物合成抑制剂。为此本实验以酮康唑和 24-(R,S)-25-epiminolanosterol为阳性对照样品。从表中可见各种抗真菌剂对两种微生物的敏感性有差异,其中澳洲茄胺与 24-(R,S)-25-epiminolanosterol对 *P. wickerhamii* 和 *S. cerevisiae* GL7的最低抑菌浓度差异更大,*P. wickerhamii* 和 *S. cerevisiae* GL7的甾醇生物合成途径有较大差异,经作者研究表明

表 3 抗真菌剂抑制浓度 (μ g/mL)

样品	<i>P. wickerhamii</i>			<i>S. cerevisiae</i> GL7		
	MIC ₈₀	MIC ₁₀₀	IC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₁₀₀	IC ₅₀
澳洲茄胺	2.5	5	1.25	100	200	-
白鲜碱	50	100	-	125	250	62.5
7-羟基-4'-甲氧基黄烷	50	-	25	100	-	-
紫檀芪	32.5	50	2.03	75	-	37.5
24-(R,S)-25-epiminolanosterol	0.125	0.25	-	100	400	50
酮康唑	> 250	-	-	250	500	-

澳洲茄胺抗真菌作用的主要靶点在甾醇生物合成途径中的关键酶 24-甾醇甲基转移酶 (sterol C-24 methyl transferase)上。澳洲茄胺对 *P. wickerhamii* 的 MIC是 *S. cerevisiae* GL7的 MIC 1/40,在 *P. wickerhamii* 中甾醇生物合成途径中 24位甲基化反应是第一步反应,在 14位去甲基反应和 8(9)位双键移位之前,此步被抑制后累积前体环屯醇 (cycloartenol),其不但不能支持微生物的生长,反而对细胞膜有损害作用。而在 *S. cerevisiae* GL7中甲基化酶抑制剂的加入将引起酵母甾醇的累积,酵母甾醇的结构与麦角甾醇更多相似之处,可部分地起到麦角甾醇的细胞膜骨架作用,但酵母甾醇不是细胞膜的最佳构建成分,不能完全替代麦角甾醇,从而影响了的正常生长代谢,所以澳液茄胺对 *S. cerevisiae* GL7仍表现出一定的生长抑制。紫檀芪、7-羟基-4'-甲氧基黄烷和白鲜碱显示了较好的抑菌作用,但

研究表明它们对 2种微生物中的甾醇生物合成途径没有影响,其抗真菌作用机现有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴绍熙. 现代医学真菌检验手册 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [2] Davies R R, Spencer H, Wakelin P O. A case of human protothecosis[J]. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 1964, 58(5): 448-451.
- [3] Nes W D, Guo D, Zhou W. Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-L-methionine $\Delta^{24(25)}$ -to $\Delta^{24(28)}$ -sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 342(1): 68-81.
- [4] Mangla T M. Doctoral Dissertation titled "Mechanism and Structural Requirement for Transformation of Substrates by the (S)-Adenosyl-L-methionine $\Delta^{24(25)}$ -Sterol Methyl transferase from *Prototheca wickerhamii*", The Graduate School, Texas Tech University, Lubbock 79409, TX, U.S.A.
- [5] 曹仁烈, 孙在原, 王仲德, 尹效忠. 中药水浸剂在试管内抗皮肤真菌的观察 [J]. 中华皮肤科杂志, 1957, 5: 286-290.
- [6] 阴健. 中药现代研究与临床应用 (1) [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [7] 阴健. 中药现代研究与临床应用 (2) [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1995.

- [8] 钱存柔. 微生物学实验 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1985.
 [9] 范青山, 马振亚. 防腐抑菌中药的微量快速筛选法研究及其应

用 [J]. 微生物通报, 1991, (18): 114-118.

海星总皂苷抗肿瘤作用的实验研究

王 兵¹, 郑意端^{2*}

(1. 深圳海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518054; 2. 深圳源政药业有限公司, 广东 深圳 518057)

摘要: 目的 对从南海海星 *Craspidastet hesperus* Muller et troschel 中分离提取的总皂苷进行抗肿瘤活性研究, 方法 采用体外肿瘤细胞培养和体内抗肿瘤实验方法, 测定海星总皂苷的体外和体内抗肿瘤作用。结果 海星总皂苷对体外培养的小鼠移植性肿瘤肉瘤 S₁₈₀、肝癌 H₂ 细胞有直接的细胞毒作用; 能明显的抑制小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 的生长, 延长 H₂ 腹水小鼠的生存时间。结论 海星总皂苷具有明显的抗肿瘤活性, 可望用于恶性肿瘤的治疗。

关键词: 海星总皂苷; 抗肿瘤; 细胞毒

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0244-02

Study of astersaponin on antitumor effects

WANG Bing¹, ZHENG Yi-duan²

(1. Neptunus Bioengineering, Co. Ltd., Shenzhen Guangdong 518054, China; 2. Shenzhen Yuanzheng Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen Guangdong 518057, China)

Key words astersaponin; antitumor effects; cytotoxicity

皂苷在自然界中分布很广, 具有增强免疫功能、抗幅射、抑制肿瘤生长、抗炎、降血糖等广泛的生物学活性^[1], 近年越来越受到人们的普遍关注。我国海域辽阔, 海洋生物资源十分丰富, 海洋生物中的生理活性物质是研究和发展新化学成分, 开发新药的天然宝库。海星属棘皮动物门海星纲, 是海洋中常见的无脊椎动物之一。我们对从南海海星 *Craspidastet hesperus* Muller et troschel 中提取的总皂苷进行了体外和体内抗肿瘤实验研究。

1 实验材料

1.1 动物与瘤株: NIH 纯系小鼠, 体重 (20±2) g, 雌雄各半, 由广东省卫生厅医学实验动物中心提供。腹水型肉瘤 (S₁₈₀) 和腹水型肝癌 (H₂) 小鼠由广州中山大学肿瘤医院研究中心提供。

1.2 药品与试剂: 四甲基偶氮唑盐 (3-4, 5-dimethylthiazol-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT), Sigma 公司产品, 溶于 Hank's 液, 4℃ 短期存放。RPMI-1640 购自 Gibco 公司。

2 实验方法

2.1 海星总皂苷的提取: 海星用石油醚脱脂, 然后

用 95% 乙醇回流提取 3 次, 减压浓缩至一定体积, 加水溶解, 水溶液用正丁醇提取, 抽得液经减压浓缩, 残留物溶于少量乙醇, 加大量丙酮即析出沉淀物, 加乙醇溶解, 加丙酮沉淀, 反复处理 3 次, 取沉淀干燥, 得浅棕色粉末。取少量浅棕色粉末, 经浓硫酸显色反应和溶血反应证明其为总皂苷^[2]。临用时以生理盐水配成一定浓度备用。

2.2 细胞培养: 实验时分别无菌抽取 6 d 龄 S₁₈₀ 和 H₂ 小鼠腹腔内瘤细胞, 以 Hank's 液洗涤 2 遍, 以含 100 U/ml 青霉素和链霉素, 20% 小牛血清 RPMI-1640 培养液调整成一定浓度的细胞悬液, 置 CO₂ 培养箱内, 在 5% CO₂, 37℃、充分湿化条件下培养 24 h 备用。

2.3 体外抑瘤实验: 依据文献^[3,4], 生长良好的 S₁₈₀ 细胞和 H₂ 细胞 (1.0×10⁶ cfu/L) 分别接种于 96 孔培养板, 每孔 180.0 μL, 再加入一定浓度的海星总皂苷 20.0 μL, 以生理盐水为空白对照组, 每组做 4 个平行孔, 然后于 5% CO₂, 37℃、充分湿化条件下培养 48 h 后, 每孔加入 50.0 μL MTT, 继续培养 4 h 后小心去除上清液, 加入二甲亚砜 (DMSO) 150.0

* 收稿日期: 2000-07-11

作者简介: 王 兵, 男, 中山大学药理学系硕士毕业, 现在深圳海王生物工程股份有限公司从事新药研究开发工作。Tel: 0755-6405410