

[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 H₂₂ 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 H₂₂ 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(H₂₂)小鼠由广州中山大学医科大学肿瘤研究中心提供。

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 H₂₂ 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 H₂₂ 细胞(1.0×10⁹ 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

μL, 轻轻振荡混匀, 然后用全自动酶标仪 (Bio-Rad, 3550 型) 测各孔吸光度(A), 检测波长为 550 nm, 参比波长为 690 nm, 以每组测得的 A 值作为药效效应值。

2.4 体内抑瘤实验: 参照移植性肿瘤研究方法^[5]进行。

2.4.1 对小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 的作用: 取小鼠 60 只, 于小鼠右腋下皮下接种肉瘤 S₁₈₀ 细胞悬液 (1.0 × 10⁷ cfu/mL) 0.2 mL, 接种次日随机分为 6 组, 实验组于接种 24 h 后每鼠 ip 海星总皂苷 0.2 mL, 对照组在同样条件下 ip 生理盐水 0.2 mL, 连续 10 d, 停药次日处死动物, 称量体重、胸腺及脾脏重量, 按下式计算抑瘤率, 实验重复 3 次。

抑瘤率 (%) = (1 - 给药组平均瘤重 / 对照组平均瘤重) × 100%

2.4.2 对 H₂₂ 腹水小鼠生存期的影响: 取小鼠 50 只, 于小鼠腹腔内接种 H₂₂ 细胞悬液 (1.0 × 10⁷ cfu/mL) 0.2 mL, 接种次日随机分为 5 组, 给受试样品量同 2.4.1, 连续 10 d, 记录腹水小鼠自然死亡的天数, 按下式计算其生命延长率, 实验重复 3 次。

生命延长率 (%) = (实验组平均生存天数 / 对照组平均生存天数 - 1) × 100%。

3 实验结果

3.1 海星总皂苷对体外培养的 S₁₈₀ 和 H₂₂ 细胞的影响: 结果如表 1 所示。各浓度组的海星总皂苷与 S₁₈₀ 和 H₂₂ 瘤细胞孵育 48 h, 对瘤细胞的生长均有明显的剂量依赖性抑制作用, 提示其有直接的细胞毒抑瘤作用。

表 1 海星总皂苷对体外培养的 S₁₈₀ 和 H₂₂ 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度 (μg/mL)	吸光度(A)	
		H ₂₂	S ₁₈₀
空白对照	—	0.769 ± 0.055	0.860 ± 0.054
海星总皂苷	1	0.696 ± 0.038*	0.738 ± 0.045**
	10	0.432 ± 0.046**	0.512 ± 0.092**
	100	0.108 ± 0.033**	0.166 ± 0.075**

与空白对照组比: * P < 0.05 ** P < 0.01

3.2 海星总皂苷对小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 的抑制作用: 结果如表 2 所示。海星总皂苷 1 ~ 100 mg/kg 连续应用 10 d, 对 S₁₈₀ 肉瘤有显著的剂量依赖性抑制作用, 其低剂量组抑瘤率为 21.8%, 与对照组比较差异有显著意义 (P < 0.05), 中及高剂量组抑瘤率

分别为 42.2% 和 71.1%, 瘤重与对照组相比差异有极显著意义 (P < 0.01)。

表 2 海星总皂苷对小鼠移植性肉瘤 S₁₈₀ 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 (mg/kg)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	体重变化 (g)
空白对照	—	1.66 ± 0.37	—	+ 4.7
海星总皂苷	1	1.30 ± 0.39*	21.8	+ 3.8
	10	0.96 ± 0.35**	42.2	+ 2.9
	100	0.48 ± 0.29**	71.1	+ 1.7

与空白对照组比: * P < 0.05 ** P < 0.01

3.3 海星总皂苷对 H₂₂ 腹水小鼠生存期的影响: 结果如表 3 所示。海星总皂苷组的 H₂₂ 腹水小鼠的生存时间有剂量依赖性的延长, 10 mg/kg 组生存期与空白组比, 差异有显著意义 (P < 0.05)。100 mg/kg 组的海星总皂苷与空白组比较, 差异有极显著意义 (P < 0.01)。

表 3 海星总皂苷对 H₂₂ 腹水小鼠生存期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	生存天数 (d)	生命延长率 (%)
空白对照	—	11.3 ± 3.6	—
海星总皂苷	1	13.3 ± 4.0	17.7
	10	16.4 ± 5.0*	45.1
	100	19.0 ± 5.6**	68.1

与空白对照组比: * P < 0.05 ** P < 0.01

4 讨论

实验结果表明, 海星总皂苷不仅对体外培养的肿瘤细胞有直接的细胞毒作用, 明显地抑制肿瘤细胞的生长, 而且能显著地抑制 S₁₈₀ 肉瘤的生长, 延长 H₂₂ 小鼠的生存时间, 有明显的体内抗肿瘤作用, 提示海星总皂苷具有明显的抗肿瘤活性, 对肿瘤的治疗可具有重要的意义。其具体的作用机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘美正, 郭忠武, 惠永正. 皂苷研究新进展[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 81-83.
- [2] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 第二版. 上海: 上海科技出版社, 1983.
- [3] 王楠, 汤仲明. MTT 方法测定培养细胞抗药水平的评价[J]. 中国药理学通报, 1996, 9(1): 78-81.
- [4] Carmichael J, DeGraff W G, Gazder A F, et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production [J]. Cancer Res, 1987, 47(4): 936-941.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994.