

· 药理实验与临床观察 ·

瑞香狼毒水提物小鼠药物血清 对小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞增殖、克隆形成和 DNA 合成的影响

贾正平¹, 樊俊杰², 王彦广¹, 谢景文², 徐丽婷, 王 荣²

(1. 浙江大学 化学系, 浙江 杭州 310027; 2. 兰州军区兰州总医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 从整体水平探讨瑞香狼毒水提物(SCLA)的抗癌作用及机制。方法 以不同剂量 SCLA ig 给药后, 不同时间采集小鼠血清, 处理体外培养的小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞, 观察肿瘤细胞 MTT 还原, 克隆形成能力和 DNA 合成的改变。结果 SCLA 3, 6, 12 g/kg 给药 1, 2, 4, 8 h 后的药物血清处理肿瘤细胞后, 其 MTT 还原及克隆形成率均显著降低; 给药 2 h 时的药物血清表现出更强的抑制肿瘤细胞增殖作用。SCLA 小鼠药物血清也显著抑制 [³H] TdR 掺入 L₁₂₁₀ 细胞 DNA。结论 直接抑制癌细胞增殖及 DNA 合成是瑞香狼毒的重要抗癌机制。

关键词: 瑞香狼毒; 血清药理学; L₁₂₁₀ 细胞; 克隆细胞; DNA 合成

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)09-0807-03

Effect of serum Ruixiang Langdu (*Stellera chamaejasme*) extract on proliferation, clonal formation and DNA synthesis of mouse L₁₂₁₀ leukemic cells

JIA Zheng-ping¹, FAN Jun-jie², WANG Yan-guang¹, XIE Jing-wen², WANG Rong²

(1. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027, China; 2. General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Lanzhou Gansu 730050, China)

Abstract: **Object** To explore, on the whole, the anticancer activity and mechanism of the aqueous extract of Ruixiang Langdu (*Stellera chamaejasme* L.) (SCLA). **Methods** Mice were given different i. g. doses of SCLA and their serum collected at different intervals after drug administration. The effects of the serum on the proliferation of mouse L₁₂₁₀ leukemic cells were observed with MTT assay, clone formation and incorporation of [³H] TdR into DNA of the cells. **Results** Serum SCLA collected 1, 2, 4, 8 h after administration of 3, 6, and 12 g/kg SCLA showed significant decrease of MTT formazans and clone formation. Serum SCLA collected 2 h after drug administration showed more strong inhibition of cancer cell proliferation. It also inhibited the incorporation of [³H] TdR into DNA of L₁₂₁₀ cells. **Conclusion** SCLA showed a remarkable inhibitory effect on proliferation and DNA synthesis of cancer cells cultured *in vitro*, which may be the main anticancer mechanisms of SCLA.

Key words: Ruixiang Langdu (*Stellera chamaejasme* L.); serum-pharmacology; L₁₂₁₀ cells; clone cells; DNA synthesis

瑞香狼毒 *Stellera chamaejasme* L. 为瑞香科植物瑞香狼毒的根^[1]。我们以往的研究结果表明, 瑞香狼毒水提物(SCLA)对小鼠移植肿瘤 S₁₈₀ 肉瘤, 肝癌 HePS 和 Lewis 肺癌生长有显著抑制作用^[2,3]。为了从整体水平探讨其抗癌机制, 本研究采用血清药理学方法, 研究了 SCLA 对体外培养的小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞 MTT 还原, 克隆形成和 DNA 合成的影响。

1 材料与方

1.1 动物: Balb/c 小鼠, 体重 18~22 g, SPF 级(医动字第 14-006 号), 由兰州生物制品研究所实验动物中心提供, 标准实验室(医动字第 14-002 号)喂养、实验。

1.2 SCLA 的制备: 将瑞香狼毒(兰州市药材供应站) 200 g 制粗粉后加水 400 mL 煮沸 20 min, 2 次, 上清液混合后过滤、浓缩, 制成口服液, 每毫升含生药 1.0 g。

1.3 主要试剂: RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品;

收稿日期: 2000-12-04

作者简介: 贾正平(1960-), 男, 山西忻州人, 主任药师, 教授, 理学博士。现在浙江大学化学系做博士后研究。主要研究方向: 抗肿瘤药理学。完成的鬼臼毒素衍生物抗肿瘤药理学研究获军队科技进步二等奖。Tel: (0931) 8975478

MTT 为 Sigma 产品; [³H]TdR (740 GBq/mmoL, 37 MBq/mL) 为中国原子能科学研究所产品。

1.4 细胞系: 小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞引自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库, 用 RPMI-1640 培养液(含 10% 小牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素), 37 ℃、5% CO₂ 培养, 传代。

1.5 药物血清制备: Balb/c 小鼠 56 只, 随机分成 7 组, 禁食 12 h 后分别 ig 给药, 设 SCLA 3, 6, 12 g/kg 3 个剂量组, 对照组 ig 等量生理盐水; 6 g/kg 组设 4 个采血时相, 即给药后 1, 2, 4, 8 h 无菌条件下采血; 其余给药组给药 2 h 后采血。血样 1 000 g 离心 20 min 取血清, 56 ℃, 30 min 灭活, 用 RPMI-1640 配制成 10% 的小鼠血清培养液。用含 10% 正常小鼠血清的 RPMI-1640 培养液为对照。

1.6 克隆形成试验^[3]: 将生长旺盛的 L₁₂₁₀ 细胞用含 10% 小鼠药物血清和 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液处理 12 h, 用 Hanks 液洗涤 2 次, 用 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液制成 1 000/mL 的细胞悬液, 取 4 mL 置入试管, 加入 L₁₂₁₀ 细胞培养上清液和 56 ℃ 融化状态的 2% 琼脂各 0.5 mL, 迅速混匀, 按每皿 1 mL 液分装到直径 35 mm 培养皿中, 置 CO₂ 培养箱培养 10 d 后取出, 倒置显微镜下计克隆数(50 个细胞以上者为 1 克隆), 每组 4 皿, 按均值, 据公式: 克隆形成率= 克隆数/接种细胞数 × 100%, 计算克隆形成率。

1.7 MTT 比色法^[4]: 将生长旺盛的 L₁₂₁₀ 细胞用不同剂量 SCLA 处理不同时间所制备的小鼠血清 RPMI-1640 培养液制成 1 × 10⁵/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板(200 μL/孔), 37 ℃、饱和湿度培养 44 h 后, 加入 MTT (5 g/L, 10 μL/孔), 继续培养 4 h 后, 弃上清, 加入二甲基亚砷(DMSO) 200 μL, 溶解 MTT formazan, 于酶标仪(Dynatech MR580) 540 nm 测定吸光度值(A₅₄₀)。细胞增殖抑制率(%) = A 对照 - A 药物 / A 对照 × 100。

1.8 [³H]TdR 掺入试验: 参照文献^[7], 细胞处理同上, 每孔 1 mL 分装到 24 孔培养板中, 置 CO₂ 培养箱 37 ℃、饱和湿度培养 24 h, 加入 [³H]TdR 达终浓度 37 kBq/mL 继续培养 16 h 后, 将各孔细胞收集到玻璃纤维纸上, 置 FJ-2100 型液体闪烁计数器测定, 计算 dpm 值。

2 结果

2.1 不同剂量药物血清对小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞的影响: SCLA 3~12 g/kg 处理小鼠 2 h 的药物血清对 L₁₂₁₀ 细胞克隆形成、MTT formazan 的产生均有

显著的抑制作用; 随着给药剂量的增加, 药物血清的细胞增殖抑制作用增强。SCLA 小鼠药物血清对 [³H]TdR 掺入 L₁₂₁₀ 细胞 DNA 也呈显著抑制作用(表 1)。

表 1 SCLA 处理小鼠 2 h 的药物血清对小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞 MTT 还原、克隆形成能力和 DNA 合成的影响($\bar{x} \pm s$)

剂量 (g/kg)	克隆数	A ₅₄₀	DNA 掺入量 (dpm)
0	139 ± 28	0.897 ± 0.113	32 611 ± 2 735
3	83 ± 21*	0.452 ± 0.057*	14 283 ± 2 059*
6	31 ± 10*	0.236 ± 0.031*	5 429 ± 1 108*
12	21 ± 6*	0.209 ± 0.018*	4 371 ± 1 315*

n = 4, 与对照组比较: * P < 0.01

2.2 SCLA 不同处理时间的药物血清的作用: 以 6 g/kg 处理小鼠不同时间的药物血清处理 L₁₂₁₀ 细胞发现, 给药 2 h 后的药物血清表现出更强的抑制 L₁₂₁₀ 细胞 MTT 还原、克隆形成能力和 DNA 合成效果, 而 1, 4 h 的血清抑制作用较弱。8 h 后的药物血清对肿瘤细胞增殖无显著抑制作用(表 2)。

表 2 SCLA(6 g/kg) 不同处理时间的药物血清对小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞 MTT 还原、克隆形成能力和 DNA 合成的影响($\bar{x} \pm s$)

处理时间 (h)	克隆数	A ₅₄₀	DNA 掺入量 (dpm)
对照组	139 ± 28	0.897 ± 0.113	32 611 ± 2 735
1	67 ± 13*	0.384 ± 0.102*	11 742 ± 1 266*
2	31 ± 10*	0.236 ± 0.031*	5 429 ± 1 108*
4	63 ± 17*	0.429 ± 0.084*	12 583 ± 1 387*
8	115 ± 31	0.723 ± 0.121	28 325 ± 3 021

n = 4, 与对照组比较: * P < 0.01

3 讨论

近年来中草药治疗肿瘤越来越受到国内外医药界的重视, 不仅可改善患者生存质量, 而且在延长患者生存期等方面也确有疗效^[7]。然而中草药所含化学成分复杂, 故其抗癌机制难以探讨清楚。由于人和动物属不同宿主, 人肿瘤与动物肿瘤株也有差异, 单一的小鼠体内实验难以确切阐明药物的抗癌效果与抗癌机制。有人借助中草药提取物直接实验, 以探讨其抗癌作用机制, 常以粗提物直接加于体外培养的人癌细胞, 这就存在着 2 个难以解决的问题: ① 非生理环境的影响: 中药粗制剂的杂质、电解质或鞣质引起细胞培养液渗透压、pH 等的改变, 影响细胞生存环境; ② 无效成分的作用: 体内非吸收物质, 或经体内代谢失活的物质影响细胞生长, 这些都会影响药物的实际效果。以整体动物灌胃给药采集血清, 作用于培养的肿瘤细胞, 则可以克服以上诸多缺点, 较好

地反映中草药的药理作用机制。本研究结果表明, SCLA 药物血清对小鼠白血病 L₁₂₁₀ 细胞增殖的抑制作用与药物剂量呈正相关, 与我们所做的体内抑瘤实验结果一致。给药后 2 h 的药物血清表现出更强的抑制肿瘤细胞增殖作用, 而给药后 1, 4, 8 h 血清抑制作用较弱, 这可能与机体吸收不全和代谢造成血清中的药物浓度不同有关。瑞香狼毒对肿瘤细胞增殖的抑制作用, 可能是该药抗癌的重要机制之一。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.

[2] 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 等. 瑞香狼毒对小鼠移植肿瘤生长的影响[J]. 兰州医学院学报, 1994, 20(4): 228-230.
 [3] 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 等. 瑞香狼毒抗肿瘤作用[J]. 药学实践杂志, 1996, 14(1): 9-12.
 [4] 贾正平, 张培炎, 梁重栋. 4-[4-(2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氮氧自由基) 氨基]-4-去甲基鬼臼毒素对 L₁₂₁₀ 细胞增殖, 克隆形成和 DNA 合成的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1991, 5(1): 47-49.
 [5] 贾正平, 谢景文, 谢廷泉. MTT 快速比色法在肺癌化疗药物敏感性试验的研究[J]. 肿瘤防治研究, 1993, 20(4): 243-245.
 [6] 贾正平, 王 锐, 谢景文, 等. 自由基在鬼臼酚哌啶氮氧自由基抗肿瘤及毒性中的作用[J]. 中国药理学报, 1999, 20(6): 571-576.
 [7] 黎治平. 原发性肝癌的中医及中西医结合治疗研究进展[J]. 实用癌症杂志, 1995, 10(4): 290-294.

人参皂苷 Rg₂ 与毒毛旋花子苷 K 的强心作用及毒性比较

刘 洁¹, 孙文娟¹, 吕文伟¹, 叶金梅², 李龙云²

(1. 吉林大学新民校区基础医学院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021)

摘要: 目的 观察人参皂苷 Rg₂(简称 Rg₂) 与毒毛旋花子苷 K(SK) 对衰竭犬心的强心作用及毒性比较。方法 复制戊巴比妥钠致心力衰竭模型。给予 Rg₂ 0.5 mg/min 和 SK 0.062 5 mg/min, 观察对心功能的影响及药物毒性反应。结果 二药均能升高血压(BP)、加强心肌收缩力, 增加左室内压(LVSP)和左室内压最大变化速率(± dp/dt_{max}), 强心效力 SK 稍大于 Rg₂, 但治疗宽度及治疗指数 Rg₂ 明显大于 SK。结论 Rg₂ 是一种安全范围宽的中效强心药物。

关键词: 人参皂苷 Rg₂; 毒毛旋花子苷 K; 心力衰竭; 心功能; 安全范围

中图分类号: R286. 21; R285. 53 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)09-0809-03

Comparison of cardiotonic and toxic effects between ginsenoside Rg₂ and strophanthin K

LIU Jie¹, SUN Wen-juan¹, LU Wen-wei¹, YE Jin-mei², LI Long-yun²

(1. Preclinical Medical College, Jilin University, Changchun Jilin 130021, China; 2. Jilin Academy of TCM, Changchun Jilin 130021, China)

Abstract: Object To observe and compare the cardiotonic and toxic effects of ginsenoside Rg₂(Rg₂) and strophanthin K (SK). **Methods** In duplicated heart failure model induced by sodium pentobarbital either Rg₂ 0.5 mg/min or SK 0.062 5 mg/min were given by iv to observe the cardiotonic and toxic effects on the models. **Results** Both of them can improve blood pressure, strengthen myocardium contractility and increase LVSP and ± dp/dt_{max} SK has a stronger maximum cardiotonic effect, while Rg₂ has a broader therapeutic margin and higher therapeutic index. **Conclusion** Rg₂ is a cardiotonic of medium effect with broader therapeutic margin.

Key words: ginsenoside Rg₂; strophanthin K; heart failure; cardiac function; therapeutic margin

人参皂苷 Rg₂(简称 Rg₂) 为人参三醇系皂苷单体, 大量研究表明, 人参皂苷有加强心肌收缩性能, 升高血压, 增加冠脉流量和心输出量, 对缺血心肌有保护作用^[1-3]。我们复制失血性休克和缺血性心源性休克模型, 证明了 Rg₂ 有改善休克时血流动力学

状态, 对缺血心肌有较好的保护作用(待发表)。本文报道 Rg₂ 对戊巴比妥钠致犬心力衰竭的强心作用与毒性, 并与毒毛旋花子苷 K (strophanthin K, SK) 进行比较研究。

1 实验材料

收稿日期: 2000-12-18

基金项目: 国家科委资助项目(No. 951035)

作者简介: 刘 洁(1953-), 女, 吉林省长春市人, 副主任技师, 主要从事心血管药理研究。