

表 2 模型组小鼠 RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER和 RFIR 给药前后测定结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of RBC-C3b, RBC-ICRR, RFER and RFIR of model group mice by pre- and post-administration ($\bar{x} \pm s, n=10$)

模型组	RBC-C3b/%	RBC-ICRR/%	RFIR/%	RFER/%
疗前	6.28±2.64	22.54±4.53	45.14±11.88	34.7±10.99
疗后	6.00±2.46	22.97±3.94	48.14±8.11	29.57±9.22

部位,每个红细胞上大约有 500个 CRI, Siegel算出循环系统中红细胞的 C3b 受体数为白细胞的 20倍,即 C3b 受体总数的 95% 分布在红细胞膜上,循环免疫复合物 (CIC) 与红细胞膜相遇的机会比白细胞大 500~1000倍,然而红细胞黏附的强弱不仅与红细胞补体受体的数目有关,而且与血清中存在的红细胞免疫调节物质有关。

消红散低剂量组的小鼠 C3b 受体花环率明显升高, CIC 的花环率明显降低;与模型组相比,差异有显著性 ($P < 0.01$),这说明消红散低剂量能明显地增强红细胞的黏附作用,促进红细胞的免疫功能,从而减少免疫复合物的形成,抑制肾小球损伤。与模型组相比消红散各剂量组小鼠的 RFER 明显提高,而 RFIR 显著降低,亦说明消红散可增强红细胞的免疫功能。

方中黄芪对免疫系统具有双向调节作用,能使紊乱的免疫功能恢复。黄芪当归二者配伍有抗氧化

自由基作用,可以减轻肾组织细胞在缺血、缺氧和炎症反应时的损伤^[6]。白术有免疫增强、免疫调节的作用,临床应用白术煎剂可使玫瑰花环形成率明显上升。茯苓多糖有明显的促进免疫功能的作用,是一种免疫促进剂。甘草能够补气和中、调和诸药。三七的根、叶皂苷可提高红细胞黏附免疫复合物能力和红细胞 C3b 受体活性,有利于清除免疫复合物,以维持机体的正常免疫功能。茜草具有活血化瘀功能。实验结果表明,该方具有免疫双向调节作用,其作用是通过调节紊乱的免疫功能而实现的。

References

- [1] Beijing Medical College. *Basic and Clinical Immunology* (基础与临床免疫学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1981.
- [2] Liu H W, Hou J Y. Development of experiment study of traditional Chinese medicine on chronic nephritis [J]. *J Guiyang Coll Tradit Chin Med* (贵阳中医学院学报), 1989 (2): 54-56.
- [3] Su Z Z, He Y Y. Clinical and experimental research of Manshenling treating chronic nephritis [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1993, 13 (5): 269-272.
- [4] Guo F. Determination of RFIR of serum [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1987, 7(3): 133.
- [5] Guo F. Determination of RFER of serum [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1988, 8(6): 440.
- [6] Zhang Y K, Wang H Y. Experiment research of *Astragalus* and *Angelica* treating different pathological nephritis [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 1986, 25(4): 222-224.

金荞麦 Fr₄抑瘤和拮抗环磷酰胺毒性的作用

陈洁梅¹, 顾振纶¹, 梁中琴¹, 周文轩², 郭次仪^{2*}

(1. 苏州大学医学院 药理学教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

金荞麦 *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn. 又称野荞麦、苦荞头, 为蓼科植物, 是民间常用中草药, 具有活血化瘀的功效, 临床上用于肺癌的治疗, 金荞麦还具有清热解毒、抗菌作用^[1]。金荞麦 Fr₄系从金荞麦根茎中提取的多酚类物质, 本实验研究了金荞麦 Fr₄的体内外抑瘤作用和拮抗环磷酰胺 (CTX) 的骨髓抑制作用。

1 材料与方法

1.1 药品: 金荞麦 Fr₄由苏州中药研究所植化研究室从购自上海药材公司的云南产金荞麦根茎中提取

所得的有效部位, 为棕褐色粉末, 主要含多酚类化合物 (含量为 64.25%)。体内实验时, 用蒸馏水配制成 1% 和 2% 的溶液。

1.2 试剂: CTX, 南通制药厂出品, 批号 970409

1.3 动物: 昆明种小鼠, 体重 (20±2) g, 雌雄兼用, 每一批实验为同一性别。由苏州大学医学院实验动物中心提供, 合格证编号: 苏动(环)98008, 苏动(质)98018

1.4 瘤种: 小鼠肉瘤 S₁₈₀, 肝癌 H₂₂由中国科学院上海药物研究所提供

* 收稿日期: 2002-11-25

基金项目: 香港保健协会资助项目 (HK 2000918)

作者简介: 陈洁梅 (1969-), 女, 江苏张家港人, 苏州第三人民医院主治医师, 硕士, 研究方向为药理学。

1.5 细胞株:人白血病细胞 HL-60,中国科学院上海细胞生物学研究所提供,胃腺癌细胞 SGC-7901 肾癌细胞 786-B 由本所保存。用含 100 g/L 灭活小牛血清 RPMI1640 培养基在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养,每两天传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.6 方法

1.6.1 对小鼠移植瘤 S₁₈₀ 的抑制作用^[2]: 无菌条件下抽取荷肉瘤 S₁₈₀ 鼠的腹水液,用生理盐水稀释至 $\times 10^7$ /mL,鼠传代 7~9 d,无菌条件下抽取肉瘤 S₁₈₀ 鼠的腹水液,瘤细胞用生理盐水稀释并计数后,每鼠右腋皮下接种 $\times 10^6$ /mL 细胞,称重后随机分组。设对照组(生理盐水组),Fr₄ 200, 400, 800 mg/kg 组,CTX 25 mg/kg 组,Fr₄ 200 mg/kg+ CTX 25 mg/kg 合用组,接种次日开始 ip 给药 7 d,对照组 ip 生理盐水,对照组及 Fr₄ 组每天给药 1 次,CTX 间断给药 2 次。给药体积均为 0.1 mL/10 g。停药后次日处死动物,称小鼠体重和瘤重,计算抑瘤率。两个单药是否增效,按 Burgi 修正公式算出 q 值。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \frac{\text{实验组瘤重}}{\text{对照组瘤重}}) \times 100\%$$

$$q = \frac{E_{A+B} / E_{A+} + (1 - E_A) \times E_B}{E_{A+} + E_{B+}}$$

其中 E_{A+B} 表示两药合用抑瘤率; E_A 和 E_B 表示各药单用抑瘤率。q 值在 0.85~1.15 表示两药作用相加, q > 1.15 表示两药作用增强, q < 0.85 表示两药相互拮抗。整个实验重复 3 次。

1.6.2 对小鼠肝癌 H₂₂ 抑制作用: 同 1.6.1 项。

1.6.3 对 CTX 致骨髓抑制的拮抗作用^[3]: 小鼠 60 只,随机分成 6 组,每组 10 只。设对照组 (A), CTX 100 mg/kg 模型组 (B), Fr₄ 200 mg/kg+ CTX 100 mg/kg 合用组 (C), Fr₄ 400 mg/kg+ CTX 100 mg/kg 组 (D), Fr₄ 200 mg/kg 预先给药+ CTX 100 mg/kg 组 (E), Fr₄ 400 mg/kg 预先给药+ CTX 100 mg/kg 组 (F)。CTX 各组均 1 次给药, E 和 F 组 Fr₄ 给 5 d 后给 CTX,再继续给 Fr₄ 3 d, C 和 D 组给生理盐水 5 d 后给 CTX,再给 Fr₄ 3 d。各种药物均按 0.1 mL/10 g 给药。停止给药次日,取血后处死动物,迅速剖取一侧股骨,除净软组织,用 0.005 mol/L CaCl₂ 10 mL 将全部骨髓冲入离心管中,置 4℃ 冰箱中 30 min, 2 500 r/min 离心 15 min,弃上清,将沉淀物与 HClO₄ 5 mL 混合,加热 15 min,冷却,滤过,各滤液用 752-C 型紫外分光光度仪在 268 nm 波长处测定吸光度 A 值。计算每根股骨所含 DNA (μg) 的量(每根股骨所含 DNA = 40 × 5 × A 值)。血液标本计白细胞 (WBC) 数。

1.6.4 对 3 种人肿瘤细胞株体外增殖抑制试验^[4]:

分别收集对数生长期的人白血病细胞 HL-60 胃腺癌细胞 SGC-7901 及肾癌细胞 786-B 肿瘤细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度为 $\times 10^6$ /mL,种入 96 孔培养板,每孔 50 μL,同时加入不同浓度的 Fr₄ 50 μL,使药物的终浓度分别为 500, 250, 125, 62.5, 31.25 μg/mL,每组设 6 个平行孔, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 48 h,实验终止前 4 h 加入 10 μL MTT (5 mg/mL, PBS 配制,无菌滤过), 4 h 后用酸化的 10% SDS (10% SDS 29.7 mL + 0.1 mol/L HCl 0.3 mL) 中止反应,放置 24 h 后,以 DG3032A 酶标仪测吸光度 (A) 值 (实验波长 570 nm),按公式计算对瘤细胞的抑制率,并求得 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率} = (1 - \frac{\text{用药组 A 值}}{\text{对照组 A 值}}) \times 100\%$$

1.7 统计处理: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数用配对 t 检验。

2 结果

2.1 对小鼠移植瘤 S₁₈₀ 的抑制作用: 金荞麦 Fr₄ 3 个剂量对 S₁₈₀ 都有抑制作用,其中 400, 800 mg/kg 组对 S₁₈₀ 的抑瘤率分别为 29.56%~55.84%, 32.77%~38.52%,与对照组相比差异具有显著性 (P < 0.05, 0.01)。单用 Fr₄ 200 mg/kg 对 S₁₈₀ 的抑瘤率为 15.76%~24.84%,单用 CTX 25 mg/kg 为 37%~59.12%,两药合用达到 63.05%~65.84%, q 值为 1.2~1.80, 3 次平均为 1.43,说明两药合用对 S₁₈₀ 抑瘤作用增强。结果见表 1。

表 1 Fr₄ 对小鼠移植瘤 S₁₈₀ 的抑制作用 (n = 3)

Table 1 Inhibitory effect of Fr₄ on S₁₈₀ in mice (n = 3)

组别	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	动物 / 只		平均体重 变化 / g	平均瘤重 / g	抑瘤率 %
		始	末			
对照	-	10	9	+ 7.80	2.23 ± 0.86	-
Fr ₄	200	10	10	+ 8.34	1.68 ± 0.47	24.84
	400	10	10	+ 5.12	1.52 ± 0.68	32.28
	800	10	8	+ 8.00	1.50 ± 0.73	32.77
CTX	25	10	9	+ 5.26	0.92 ± 0.34*	59.12
Fr ₄ + CTX	200+ 25	10	10	+ 4.90	0.76 ± 0.44*	65.84

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group

2.2 对小鼠移植瘤 H₂₂ 的抑制作用: Fr₄ 200, 400, 800 mg/kg 对 H₂₂ 都有抑制作用。单用 Fr₄ 200 mg/kg 对 H₂₂ 的抑瘤率为 26.61%~36.46%,单用 CTX 25 mg/kg 抑瘤率为 36.46%~37.83%,两药合用抑瘤率达到 43.83%~68.24%, q 值为 1.35~1.70, 3 次平均为 1.50,说明两药合用对 H₂₂ 有增强抑瘤作用。结果见表 2。

2.3 对 CTX 致骨髓抑制的拮抗作用: CTX 100 mg/kg 明显降低小鼠骨髓 DNA 含量与外周血

表 2 Fr₄对小鼠移植瘤 H₂₂的抑制作用 (n= 3)

Table 2 Inhibitory effect of Fr₄ on H₂₂ in mice (n= 3)

组别	剂量 I/(mg·kg ⁻¹)	动物只		平均体重 变化/g	平均瘤重 /g	抑瘤率 /%
		始	末			
对照	-	10	10	+ 5.18	1.25± 0.29	-
Fr ₄	200	10	10	+ 3.60	1.03± 0.01*	36.46
	400	10	9	+ 5.64	0.90± 0.43	38.75
	800	10	10	+ 3.63	0.74± 0.39	68.24
CTX	25	10	9	+ 5.19	0.92± 0.41*	36.46
Fr ₄ + CTX	200+ 25	10	10	+ 3.65	0.79± 0.57*	68.24

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group

WBC数 与对照组相比,模型组骨髓 DNA含量下降近 80.36%,外周血 WBC数下降近 80%。Fr₄对此有拮抗作用,无论是预先给药还是与 CTX同时给药,Fr₄均能明显提高骨髓 DNA含量 (P < 0.05, 0.01),预先给药比同时给药更能提高骨髓 DNA含量 (P < 0.05),但无明显的剂量依赖关系。Fr₄给药 3 d不能拮抗 CTX所致 WBC数下降,预先给药组 WBC计数显著升高 (P < 0.05),也无明显的剂量依赖关系 结果见表 3

表 3 Fr₄对 CTX致 DNA合成和白细胞减少的拮抗作用 (x̄± s, n= 10)

Table 3 Effect of Fr₄ on both DNA synthesis and WBC decreased by CTX in mice (x̄± s, n= 10)

组别	Fr ₄	CTX	DNA		WBC计数
	I/(mg·kg ⁻¹)	I/(mg·kg ⁻¹)	/g		I/(10 ⁹ ·L ⁻¹)
A	0	0	218.28± 52.61*	52.61*	6.23± 1.06*
B	0	100	42.85± 28.08	28.08	1.29± 0.52
C	200	100	131.49± 33.61*	33.61*	1.34± 0.42
D	400	100	141.90± 36.04*	36.04*	1.58± 0.68
E	200	8	187.98± 31.77*	31.77*	1.88± 0.46
F	400	8	142.73± 51.02*	51.02*	1.92± 0.49*

与 B组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs B group

2.4 对 HL-60, SGC-7901, 786-B细胞体外增殖的影响: 金荞麦 Fr₄呈剂量依赖性抑制 HL-60和 SGC-7901肿瘤细胞体外增殖,对 786-B则无明显细胞毒作用。Fr₄作用 24 h后对 HL-60, SGC-7901, 786-B的 IC₅₀依次为 112.6, 160.2, 399 mg/lmL 结果见表 4

3 讨论

结果表明单用 CTX 或金荞麦 Fr₄均能抑制移植瘤 S₁₈₀ 肝癌 H₂₂的生长,金荞麦 Fr₄和 CTX 联合应用能起到相加的作用。但是金荞麦 Fr₄恢复骨髓 DNA含量与外周血 WBC数不够一致,这可能因为给药时间或观察时间较短,骨髓 DNA与外周血

表 4 Fr₄对 HL-60, SGC-7901, 786-B细胞体外增殖的抑制作用 (x̄± s, n= 6)

Table 4 Antiproliferation effect of Fr₄ on HL-60, SGC-7901, 786-B cells in vitro (x̄± s, n= 6)

组别	浓度 I/(mg·mL ⁻¹)	抑制率 %		
		HL-60	SGC-7901	786-B
对照	-	-	-	-
Fr ₄	31.25	8.4	1.1	10.0
	62.50	17.8	7.4	15.0
	125.00	56.1	41.5	26.0
	250.00	83.2	70.2	39.0

WBC合成尚未表现出同步化 文献报道,用 FCR (金荞麦根部乙醇提取的有效成分)作体内试验治疗动物肿瘤,对胰腺腺泡细胞癌、肺癌、黑色素瘤、肝癌、U14宫颈癌、小鼠移植 S₁₈₀肉瘤均有抗癌作用,且毒性较小^[5],本实验结果与文献报道相符。金荞麦 Fr₄抑制肿瘤细胞的生长可能是通过直接或间接作用于 DNA代谢的某一环节来实现^[6]。在一定剂量和范围内金荞麦 Fr₄可诱导 HL-60 细胞凋亡,诱导细胞凋亡可能为其抗肿瘤作用的机制之一。金荞麦 Fr₄拮抗 CTX所致骨髓抑制的机制可能与其能增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,增强机体的免疫能力,以及抑制血小板聚集,降低血液黏滞度有关^[2],具体机制有待进一步研究。金荞麦 Fr₄可能通过某种机制提高 P-450代谢酶活性,而发挥协同抗癌作用。本实验研究表明:金荞麦 Fr₄具有一定的抑瘤作用,与 CTX 合用有协同抑瘤作用,还可拮抗 CTX造成的骨髓抑制,提示金荞麦 Fr₄是值得开发研究的抗癌药物

References

- [1] Peng Y, Sun Z M, Xiao P G. Research and development of Jingqiaomai (*Fagopyri dibotrys*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(10): 629-631.
- [2] Ling X J, Huang Z Q, Li C C. Antitumor activity of digoxin in vivo and its enhancing effect [J]. *J Fujian Med Coll* (福建医学院学报), 1996, 30(2): 113-115.
- [3] Liu W J, Gu Z L, Zhou W X, et al. Anti-tumor effect of secuninine and its resistance to toxicity of cyclophosphamide [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1997, 13(6): 531-533.
- [4] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid method for measuring cell growth/cell kill [J]. *Immun Methods*, 1989, 119: 203-205.
- [5] Chen X F, Gu Z L. Advances in the study on antitumor effect of *Fagopyrum cymosum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 715-718.
- [6] Ma Y P, Xi N, Chen J, et al. Interaction of component (E) with tumor cellular DNA [J]. *Chin J Oncol* (中华肿瘤杂志), 1989, 11(3): 95-99.