

用相当,强于其他配伍组合,与方中的酸性药相互溶出的影响、酸性与碱性药相互影响及各药的药效累加效应有关。

4 讨论

复方中药物配伍后引起抑菌作用变化,无论其增强、加合还是拮抗,与配伍后煎液中的有效成分变化有关,有效成分增多,抑菌作用相应增强,反之则减弱。GQD拆方研究中葛根、黄连、黄芩、炙甘草比例为 15∶9∶9∶6,其中葛根、黄芩、炙甘草呈酸性,而黄连有效成分呈碱性。四药配伍时相互之间的影响,以酸性药对碱性药的溶出率影响最大,而酸性药物之间亦会相互影响^[4]。

GQD具有抑菌作用,其体外对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、肺炎双球菌均有一定的抑制作用^[5,6],体内实验表明对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、肺炎双球菌亦有明显的抑制作用^[5]。

本实验从药效学角度侧重比较了 GQD不同配伍煎液对肺炎链球菌抑菌作用差异,从而为结合方

剂配伍、化学成分变化进而全面探讨方剂配伍规律打下基础。

References

- [1] Luo J B, Yu L Z, Tan X M. Methods of studying regularity of recipe composition [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1999, 15(3): 48-49.
- [2] Zhou B J. *Bacteriostasis and Evaluation Methods of Some Common Chinese Herbs* (常用中药的抗菌作用及其测定方法) [M]. Chongqing: Chongqing Science and Technology Publishing House, 1987.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1984.
- [4] Lin S L, Zhao L H, Wu Z N, et al. Study on mutual effect of rhubarb, *Coptis chinensis*, amur corktree bark and *Scutellaria baicalensis* Georgi when in a decoction—Effect of compound change on the dissolve rate of efficient composition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 20(6): 10.
- [5] Tong L, Xu J J, Huang T Y, et al. Study on bacteriostasis and defibrillation of Gegen Qinlian Decoction [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1987(6): 49.
- [6] Lin S M, Chen Y R, Luo J B, et al. Study of Gegen Qinlian Pill on bacteriostasis and respiratory virus [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2000, 16(3): 10-13.

红豆杉细胞提取物抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡的实验研究

鲁翠涛¹,赵应征^{2*},梅兴国^{2*}

(1. 华中科技大学生命科学与技术学院,湖北 武汉 430074; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:目的 研究红豆杉细胞提取物对肝癌细胞 SMMC-7721的生长抑制作用及其机制。方法 运用台盼蓝拒染法测定肿瘤细胞生长曲线,流式细胞仪和 Giemsa 染色分析肿瘤细胞周期和细胞凋亡。结果 红豆杉细胞二氯甲烷提取物对肝癌细胞 SMMC-7721的生长有明显的抑制作用,流式细胞仪分析发现 G₂/M 期肿瘤细胞数量增多,经 Giemsa 染色发现肿瘤细胞有凋亡发生。结论 红豆杉细胞提取物可以通过诱导细胞发生凋亡而抑制肝癌细胞 SMMC-7721的生长。

关键词: 红豆杉细胞; SMMC-7721; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-1013-03

Extract from cultured cells of *Taxus chinensis* on proliferation inhibition and apoptosis induction of tumor cells

LU Cui-tao¹, ZHAO Ying-zheng², MEI Xing-guo²

(1. School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2. Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Object To study the inhibitory effect and mechanism of extract from cultured cell of *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd. on hepatocarcinoma cell line SMMC-7721. **Methods** Trypan blue stain assay was

* 收稿日期: 2003-02-16

基金项目: “九五”国家攻关项目 (96-C02-03-01)

作者简介: 鲁翠涛 (1974-),女,湖北天门人,华中科技大学生命科学与技术学院 2000级博士研究生,研究方向为红豆杉细胞药理筛选及大规模细胞培养研究。E-mail: letzyx@sina.com

* 通讯作者 Tel: (010) 66932654

used to determine tumor cell growth curve, flow cytometry and Giemsa staining were used to analyze cell cycle and cell apoptosis. **Results** Inhibitory effect happened on tumor cell line SMMC-7721, G₂/M stage of tumor cells increased with the addition of *T. chinensis* cell extract by carrene and apoptosis happened. **Conclusion** The extracts from cultured cell of *T. chinensis* have inhibitory effect on SMMC-7721 cells and can further induce cell apoptosis.

Key words cell of *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd.; SMMC-7721; cell proliferation; cell apoptosis

红豆杉细胞培养作为可再生资源,被认为是解决紫杉醇药源紧张的重要途径之一^[1]。目前大量的研究工作主要集中在如何提高红豆杉细胞中紫杉醇等次生代谢产物的含量以及保持其产量稳定性等方面,而国内有关红豆杉细胞抗肿瘤的体内体外研究工作相对较少。本实验以红豆杉细胞为材料,对红豆杉细胞提取物体外抑制肿瘤细胞增殖及诱导细胞凋亡进行了初步探讨。

1 药品与仪器

台盼蓝、碘化丙啶 (PI)、RNase A 购自美国 Sigma 公司; Giemsa 染料 (上海试剂三厂)。流式细胞仪 (美国 Becton dickinson 公司)。

2 方法

2.1 红豆杉愈伤组织细胞的诱导及培养: 实验用细胞株来源于中国红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd., 经本实验室反复驯化的细胞系 F4 红豆杉幼嫩茎尖经改良 MS 培养基诱导获得愈伤组织^[2], 继代培养基采用本室改良的 MS 液体培养基, 其中 NAA 0.5 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L, 2, 4-D 0.08 mg/L。接种新鲜愈伤组织, 于摇床 120 r/min 进行悬浮暗培养, 30 d 后收获细胞。将细胞用蒸馏水冲洗 3 次, 抽滤, 真空冻干。

2.2 红豆杉愈伤组织细胞中抗癌物质的提取: 精密称取 100 mg 冻干粉末, 用甲醇提取 (分 3 次提取, 每次 2 mL 甲醇, 超声 40 min, 静置过夜), 合并提取液, 浓缩至干。然后加入二氯甲烷-水 (1: 1) 4 mL, 充分混匀后静置, 吸出二氯甲烷层 (下层)。重复前步骤 2 次, 合并所有二氯甲烷浸提液, 浓缩, 得二氯甲烷浸膏。浸膏用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 然后用 DMEM 培养液 (含 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/mL) 稀释至所需浓度。DMSO 在溶液中的最大浓度不超过 0.5%。

2.3 肿瘤细胞生长曲线测定: 肝癌细胞系 SMMC-7721 由军事医学科学院提供, 细胞用含 10% 小牛血清 (外加青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/mL) DMEM 培养液传代培养^[3]。生长曲线测定参照司徒镇强方法^[4]。取指数生长期细胞, 以 DMEM 配成

4×10^4 /mL 细胞悬液, 接种于 24 孔平底细胞培养板 (Costar, Charlotte, NC), 每孔 1 mL, 置 37℃ 培养箱中培养 12 h 后, 换含不同浓度红豆杉细胞二氯甲烷粗提物的培养液, 使终浓度分别为 0.01, 0.1, 1, 10 mg/mL [红豆杉细胞提取物浓度是指在单位溶液中 (mL) 的红豆杉细胞干质量 (mg)], 实验对照为无药培养液 (含药物最大浓度时相应溶剂量)。每种浓度设 3 个平行孔, 分别于用药后 12, 24, 48, 72 h 用台盼蓝拒染法进行活细胞计数。

2.4 流式细胞仪分析: 每个培养瓶含 SMMC-7721 细胞约 1×10^6 个, 加入一定浓度的红豆杉细胞二氯甲烷提取物 0.5, 1 mg/mL, 实验对照组为相应药物浓度的溶剂。细胞继续在培养箱中培养, 分别于 6, 24 h 后用流式细胞仪分析细胞周期分布^[5]。

2.5 肿瘤细胞形态观察

2.5.1 倒置显微镜直接观察细胞形态变化

2.5.2 Giemsa 染色观察细胞形态变化: 取指数生长期的细胞, 以 DMEM 配成 4×10^4 /mL 细胞悬液, 接种于直径 3 cm 培养皿, 每皿 1.5 mL, 置 37℃ 培养箱中培养, 次日加入不同浓度红豆杉细胞二氯甲烷粗提物, 使终浓度分别为 0.01, 0.1, 1 mg/mL, 3 d 后进行如下处理: 以醋酸甲醇固定 30 min, 经 Giemsa 染液与 Sorensen 磷酸缓冲液以 1: 9 合成的工作液染色 15 min (室温), 冲净多余染液, 晾干后用显微镜观察^[6]。

3 结果

3.1 红豆杉细胞提取物对肿瘤细胞作用的时间剂量效应关系: 笔者曾以不同溶剂提取红豆杉细胞, 发现二氯甲烷粗提物对肝癌细胞 SMMC-7721 的毒性作用远高于其他溶剂提取物, 因此本实验以二氯甲烷提取物为实验药物。实验显示, 在所加药物浓度为 0.01 mg/mL, 培养 48 h 后肝癌细胞的生长开始呈现抑制现象; 随着所用药物浓度的加大, 对肿瘤细胞的抑制作用增强, 与对照相比, 均呈现差异显著性。在 1, 10 mg/mL 药物对肿瘤细胞的生长抑制情况很相似, 两者之间差异无显著性, 见图 1。

3.2 流式细胞仪分析肿瘤细胞周期: 见表 1 红豆

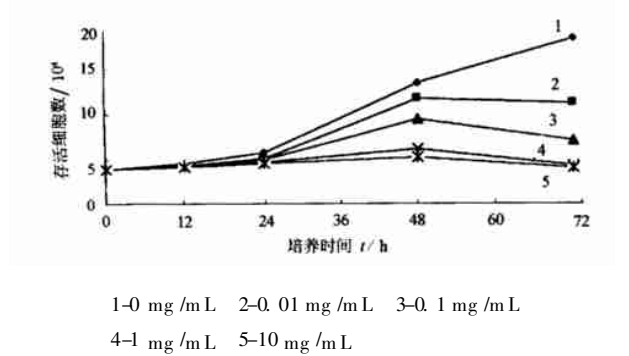


图 1 红豆杉细胞提取物对肝癌细胞 SMMC-7721 作用的时间-剂量曲线

Fig. 1 Time-dosage curve of extract from *T. chinensis* cell on SMMC-7721

杉细胞二氯甲烷粗提物处理 SMMC-7721 细胞 6 h, G₀/G₁ 期细胞分布有所降低, G₂/M 期细胞分布有所增加, 细胞凋亡率 3.49%; 处理 24 h, G₀/G₁ 期细胞分布由 69.67% 降至 46.91%, G₂/M 期细胞分布由 9.14% 增至 26.98%, 细胞凋亡率为 9.43%。

表 1 红豆杉细胞提取物对 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

Table 1 Effect of extract from *T. chinensis* cell on cell cycle of SMMC-7721

组别	终浓度 (mg·mL ⁻¹)	6 h 肿瘤细胞周期 /%			24 h 肿瘤细胞周期 /%		
		G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
对照	-	70.48	8.98	20.54	69.67	9.14	21.19
红豆杉细胞	0.5	66.85	10.79	22.36	57.14	17.08	25.78
	1	58.64	16.91	24.45	46.91	26.98	26.11

3.3 肿瘤细胞形态学变化: 在生长抑制的同时, 肝癌细胞表现出明显的形态变化。倒置显微镜下观察, 正常生长的肝癌细胞始终为多角形、棱形, 药物作用后细胞则逐渐变圆、变小, 细胞出现皱缩、变圆, 折光率增强, 少量细胞悬浮; 随时间延长漂浮细胞逐渐增多, 贴壁生长细胞变得稀疏。经 Giemsa 染色后, 肝癌细胞 SMMC-7721 的细胞核染蓝紫色, 胞浆染粉红色。在光镜下观察, 胞质中颗粒增多并可见细胞膜出泡, 核质比增大, 核变形、皱缩, 核染色质浓聚或呈月牙形边聚, 出现凋亡小体。但凋亡形态细胞存在时

间短, 且大部分死细胞很快崩解、坏死。

4 讨论

有研究指出, 紫杉醇具有很强的抗人肝癌活性^[7]。本实验以肝癌细胞系 SMMC-7721 作为受试癌细胞, 通过红豆杉细胞二氯甲烷提取物对 SMMC-7721 生长的影响作用研究, 显示其对体外肝癌细胞的生长具有剂量和时间依赖效应, 说明红豆杉细胞具有明显的体外抗肿瘤作用。通过流式细胞仪分析发现, SMMC-7721 的 G₂/M 期细胞分布随红豆杉细胞提取物处理浓度及时间的增加而增多, 细胞凋亡率也随着增加。这种作用方式与紫杉醇的抗癌机制相类似, 说明红豆杉细胞内对肝癌细胞生长起主要抑制作用的物质仍然是紫杉醇及其类似物。红豆杉作为一种珍稀药用植物资源, 其愈伤组织细胞中含有多种具生物活性的次生代谢物, 这其中包括已知的抗肿瘤 (如卵巢癌、乳腺癌等) 药物紫杉醇及紫杉烷类, 以及某些未知次生产物。这些物质对肿瘤细胞的生长是协同抑制作用, 还是独立起作用, 仍需进一步研究。

References

[1] Zhuang X L, Zhang X Q, Yu S H, *et al.* Studies on producing paclitaxel by *Taxus* cell [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(10): 794-798.

[2] Zhang C H, Mei X G, Liu L, *et al.* Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 1561-1564.

[3] Tang Z Y, Wu M C, Xia S S, *et al.* *Primary Liver Cancer* (原发性肝癌) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1989.

[4] Situ Z Q. *Cell Culture* (细胞培养) [M]. Xi'an: World Books Press Co., 1996.

[5] Dong B, Chen X H, Zhang H, *et al.* An improved method of cell preparation for cell cycle assay [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 2002, 26(2): 124-126.

[6] Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques* (抗癌药物研究及实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1997.

[7] Yuan J H, Wang X W, Luo D, *et al.* Anti-hepatoma activity of taxof: an *in vitro* study [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(5): 450-454.

段木灵芝孢子油

采用二氧化碳超临界萃取技术 (可代为加工成软胶囊)
电话: 021-54653215 13020256999 朱微鸿
上海天衡生物科技有限公司