

mg/kg 能剂量依赖性降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠和正常小鼠血糖,提示 Jat 也是黄连治疗糖尿病的有效成分之一。但其降糖作用不及同量的 Ber,推测可能是 Ber 对 α 肾上腺素受体的阻断作用强于 Jat^[7],而更强地降低交感神经张力,抑制肾上腺皮质功能,从而抑制糖异生。为进一步研究 Jat 与 Ber 以天然比例配伍是否存在相互作用,本实验又观察了按 Ber 和 Jat 天然比例配制的模拟方对小鼠血糖的影响。结果表明,模拟方的降糖作用与单用同剂量的 Ber 相当,提示 Ber 和 Jat 以天然比例配伍未见明显协同或拮抗作用,但不能排除黄连中可能还存在其他的重要成分与 Ber、Jat 之间有着复杂的相互作用,或 Ber 和 Jat 之间存在更佳的比例组合,仍须进一步研究验证。而 HLD 的降血糖作用比单用 Ber、Jat 和模拟方都强,恰好提示了黄连中除了 Ber 和 Jat 之外,可能还有其他成分起着重要作用。

References:

- [1] Chen Q M, Xie M Z. Studies on the hypoglycemic effect of *Cortis chinensis* and berberine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1986, 21(6): 401-406.
- [2] Hu F G, Du B X. Clinical study on treatment of type 2 diabetes with berberine [J]. *Pract J Integration Chin West Med* (实用中西医结合杂志), 1995, 8(6): 358-359.
- [3] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理学实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [4] Chen Q M, Xie M Z. Effects of berberine on blood glucose regulation of normal mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, 22(3): 161-165.
- [5] Tao Y, Cui X L. Clinical study on treatment of type 2 diabetes with berberine plus Chinese herbal medicines [J]. *Pract J Integration Chin West Med* (实用中西医结合杂志), 1995, 8(10): 602.
- [6] Gao C R, Zhang J Q, Huang Q L. Experimental study on berberine raised insulin sensitivity in insulin resistance rat models [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1997, 17(3): 162-164.
- [7] Han H, Fang D C. The blocking and partial agonistic actions of jatrorrhizine on α -adrenoceptors [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1989, 10(5): 385-389.

川芎嗪含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂ 增殖的抑制作用

丰俊东, 徐晓玉

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 400050)

摘要:目的 观察川芎嗪(TMP)含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖的影响。方法 选用 SD 雄性大鼠 30 只,随机分成 3 组,分别 ip TMP 143.0、71.5 mg/kg、生理盐水 0.8 mL,制备 TMP 大、小剂量组及生理盐水组含药血清,采用 RP-HPLC 法测定含药血清中 TMP 的质量浓度。将各组含药血清作用于人肝癌细胞 Hep G₂ 48 h,MTT 法测定不同质量浓度 TMP 含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖的抑制作用。结果 TMP 大剂量组血清(20%、10%、5%),TMP 小剂量组血清(20%、10%)对人肝癌细胞 Hep G₂增殖较生理盐水组有显著抑制作用($P < 0.05$),最高抑制率可达 46.1%。结论 TMP 含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂增殖有一定的抑制作用。

关键词:川芎嗪;人肝癌细胞 Hep G₂;高效液相色谱;MTT 法

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)04-0551-03

Inhibition of tetramethylpyrazine-containing serum on proliferation of human liver cancer cells Hep G₂

FENG Jun-dong, XU Xiao-yu

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To observe the effects of rat tetramethylpyrazine (TMP)-containing serum on the proliferation of human liver cancer cells Hep G₂. **Methods** Thirty SD male rats were divided into three groups randomly and the serum was collected after ip TMP with the dosage of 143.0, 71.5 mg/kg or NS 0.8 mL to prepare the TMP-containing serum in large- and small-dose groups and NS group as well. A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was used to determine the TMP concentration in rat serum. Human liver cancer cells Hep G₂ was treated with rat TMP-containing serum for 48 h. Inhibition of the TMP-containing serum on proliferation of Hep G₂ was detected by MTT

收稿日期:2004-07-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070915)

作者简介:丰俊东(1978—),女,黑龙江人,在读博士,主要从事中药药理研究。

Tel: (023) 89014331 E-mail: FengJunDong2001@sohu.com

assay. **Results** The serum of large dose TMP (20%, 10%, and 5%) and small dose TMP (20% and 10%) could obviously inhibit Hep G2 multiplication ($P < 0.05$), the maximum inhibitory rate was 46.1%.

Conclusion The TMP-containing serum can inhibit the proliferation of human liver cancer cells Hep G2.

Key words: tetramethylpyrazine (TMP); human liver cancer cells Hep G₂; HPLC; MTT assay

中医的活血化瘀法是治疗肿瘤的重要方法之一。我国是肝癌的高发区之一,从中医理论出发,“气滞血瘀”是其病机关键。川芎活血行气,是搜风定痛、调经活血的常用药,川芎嗪(TMP)是其有效成分之一。在以往的实验中已证实TMP具有抑制黑色素瘤生长^[1]、体外抑制血管内皮细胞增殖等作用^[2]。本实验采用MTT法观察TMP对人肝癌细胞Hep G₂增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料:盐酸川芎嗪注射液,天津金耀氨基酸有限公司,40 mg/2 mL,批号 0206151。川芎嗪对照品,购自中国药品生物制品检定所,批号 817200104。氯化钠注射液,西南药业股份有限公司,批号 66040023。人肝癌细胞株 Hep G₂由重庆医科大学超生研究所引进。RPMI-1640 培养基(Gibco 产品),新生小牛血清(杭州四季青公司),胰蛋白酶(Amresco 公司),MTT(Sigma 公司)。甲醇(色谱纯)。Agilent 1100 高效液相色谱仪、Mettler Toledo AG135(十万分之一)电子天平、超声清洗器。

1.2 含药血清制备:将体重 250~400 g 清洁级 SD 雄性大鼠(购自第三军医大学大坪医院实验动物中心)30 只,随机分成 3 组,即 TMP 大、小剂量组和生理盐水组(阴性对照组),3 组大鼠体重经统计学处理差异无显著性($P > 0.05$)。TMP 大、小剂量组分别 ip 盐酸川芎嗪注射液 143.0、71.5 mg/kg,生理盐水组每只 ip 生理盐水 0.8 mL,各组每日 ip 1 次,连续 7 d。末次给药后 0.5 h,3.5% 水合氯醛(0.9 mL/100 g)麻醉,在严格无菌条件下经股动脉取血。血液经 4 °C 静置过夜后,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,取上清液,同组血清混合,再经 0.45 μm 滤膜抽滤除菌,分装,-20 °C 保存备用。

1.3 RP-HPLC 法测定血清中 TMP^[3]

1.3.1 色谱条件:色谱柱 Lichrospher C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为含 0.5 mmol/L 三乙胺的 50% 甲醇水溶液;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:279 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL;理论塔板数按川芎嗪峰计不低于 8 000。

1.3.2 血清预处理:取 TMP 大剂量组含药血清 0.5 mL,加 4 倍体积甲醇,摇匀,超声震荡 5 min,

1 000 r/min 离心 10 min,将溶液转移至烧杯中,空气中挥去溶剂,再加 0.5 mL 甲醇复溶,备用。

1.3.3 线性关系考察:精密称取川芎嗪对照品 15.1 mg,加甲醇溶解并稀释至 10 mL 量瓶中,作为对照品储备液。分别精密量取该储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。在前述色谱条件下进样分析。

1.3.4 样品测定:取 1.3.2 项处理后的血清样品进样检测。

1.4 细胞培养:人肝癌细胞株 Hep G₂常规培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中。置 CO₂恒温培养箱(37 °C、5% CO₂、饱和湿度)中常规培养,3~4 d 传代 1 次。

1.5 MTT 法检测细胞增殖抑制:将处于对数生长期的 Hep G₂细胞进行消化,以 1×10^4 /mL(含 20% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养基)接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μL,培养 24 h 使细胞贴壁。弃原液,换用含 0.5% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液,培养 24 h。弃旧液,换用 TMP 大、小剂量组及生理盐水组大鼠血清,分别以体积分数 20%、10%、5% 血清作用于细胞。并设立空白对照组(用含 20% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养)。每组设 6 个重复孔。作用 48 h 后,96 孔培养板离心,弃原液,每孔加入 200 μL 无血清的 RPMI-1640 培养液及 20 μL MTT 液,继续孵育 6 h。离心弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μL,振荡 15 min,以酶联免疫检测仪在 590 nm 波长下测定各孔吸光度(A)值^[4,5],计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.6 统计学处理:各项参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS11.0 软件分析,并用 Newman-Keuls 和 Dunnett's 进行组间比较。

2 结果

2.1 RP-HPLC 法测定血清中的 TMP:以 TMP 质量浓度为横坐标,以峰面积积分为纵坐标进行回归计算。回归方程为 $Y = 0.14 X - 0.75$, $r = 0.999 3$ 。表明 TMP 在 75.5~604.0 μg/mL 与峰面积积分值呈良好线性。血清样品的峰面积积分为

2 755.8, 根据回归方程计算得 TMP 大剂量组血清中含 TMP 385.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。色谱图见图 1。

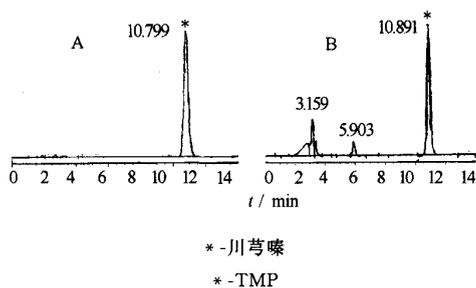


图 1 川芎嗪对照品(A)和血清样品(B)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of TMP reference substance (A) and serum sample (B)

2.2 TMP 对人肝癌细胞 Hep G₂ 的增殖抑制作用: 结果显示, 生理盐水组各体积分数血清之间比较, A 值差异不显著 ($P > 0.05$), TMP 大剂量组血清 (20%、10%、5%), TMP 小剂量组血清 (20%、10%) 与生理盐水组相比对 Hep G₂ 细胞增殖有显著抑制作用 ($P < 0.05$), TMP 小剂量组血清 (5%) 与生理盐水组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。说明 TMP 大剂量组血清 (20%、10%、5%), TMP 小剂量组血清 (20%、10%) 抑制 Hep G₂ 细胞增殖。见表 1。

表 1 TMP 含药血清对人肝癌细胞 Hep G₂ 增殖的抑制作用 ($n=6$)

Table 1 Inhibition of TMP-containing serum on proliferation of Hep G₂ cells ($n=6$)

组别	血清体积分数/%	A ($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
空白对照	—	1.083 \pm 0.08	—
生理盐水	20	1.080 \pm 0.04	—
	10	1.077 \pm 0.03	—
	5	1.074 \pm 0.08	—
TMP 143.0 mg/kg	20	0.795 \pm 0.07 * \blacktriangle	26.2
	10	0.584 \pm 0.06 * \blacktriangle	46.1
	5	0.801 \pm 0.01 * \blacktriangle	26.1
TMP 71.5 mg/kg	20	0.880 \pm 0.04 * \blacktriangle	18.3
	10	0.982 \pm 0.07 * \blacktriangle	9.0
	5	1.072 \pm 0.06	0.2

与空白对照组比较: * $P < 0.05$

与生理盐水组比较: $\blacktriangle P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank control group

$\blacktriangle P < 0.05$ vs NS control group

3 讨论

近年来 TMP 应用于治疗肿瘤的报道越来越

多, TMP 被用于治疗肝炎, 其对肝癌细胞增殖的影响尚未见报道。本实验采用血清药理学方法, 它可以反映药物中可吸收部分的直接作用, 药物代谢产物、药物诱生的机体内源性物质的间接结果, 最大程度地模拟体内环境, 其所得结果较直接体外药物实验更为可信。在血药浓度高峰期取血, 采用新鲜的含药血清。结果显示 TMP 大剂量组血清 (20%、10%、5%)、TMP 小剂量组血清 (20%、10%) 具有抑制肝癌细胞 Hep G₂ 增殖的作用, 最高抑制率可达 46.1%。以往血清药理学研究中对于血清中有效作用成分的浓度多未检测, 这对药理学与毒理学研究是不全面的。而且机体的不同状态对药物有不同的敏感性, 血清中的药物浓度、代谢产物和诱生内源性物质的质和质量会有所不同, 需要进行血清中有效成分的定量分析。本实验在这方面进行尝试, 使实验结果更为全面可靠。TMP 在体内可直接吸收, 以原形直接发挥作用, 本实验采用 HPLC 法对 TMP 大剂量组含药血清中 TMP 进行检测, 结果显示 TMP 质量浓度为 385.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 则 TMP 大剂量组血清 20%、10%、5% 作用于 ECV304 细胞的 TMP 质量浓度分别为 77.0、38.6、19.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对其通过何种途径发挥作用有待进一步研究。TMP 无明显毒性, 能抑制人肝癌细胞的增殖, 提示 TMP 在治疗肝癌方面可能具有较好的应用价值。

References:

- [1] Liu J R, Ye S B. Antimetastasis effect of tetramethylpyrazine to tumor and its mechanism [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学和毒理学杂志), 1993, 7(2): 149-152.
- [2] Yang L R, Xu X Y, Chen G. Effects of tramethylpyrazine and *radix salviae miltiorrhizae* on vascular endothelial cell growth *in vitro* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2004, 20(2): 7-8.
- [3] Ding M Y, Luo S Z, Liu H, et al. Determination of tetramethylpyrazine in animal serum and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2000, 18(1): 46-48.
- [4] Kayano K, Sakaida I, Uchida K, et al. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 1998, 29: 642-649.
- [5] Li J C, Zhao J B, Liu Y G, et al. Danggui Buxue Decoction in inhibiting proliferation of human liver cancer SMMC-7721 cells *in vitro* [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2003, 24(5): 436-437.