

重楼抗肿瘤作用研究

王艳霞, 李惠芬*

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

重楼以蚤休之名史载于《神农本草经》, 为百合科重楼属植物的干燥根茎。因虫蛇之毒, 得此治之即休, 故有蚤休之名。又因本品茎单一, 七叶轮生, 花单生顶端而得七叶一枝花之名。本品味苦, 性微寒, 有小毒, 归肝经。具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效, 用于疗肿癰肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等证。现代药理研究表明, 重楼具有抗菌、抗病毒、止血、镇静、镇痛、止咳、平喘、抗肿瘤、免疫调节及心血管作用等^[1]。近年来, 该药在抗肿瘤方面的研究, 引起学者的广泛关注。

1 抗肿瘤化学成分

早在1962年就报道了滇重楼的皂素配基为薯蓣皂苷元; 1965年又报道了6种云南产的重楼属植物除含薯蓣皂苷元外, 还含有3种偏诺皂苷元; 1966年Singh等报道了从重楼中分离出薯蓣皂苷元的单糖苷; 1972年日本学者Nohara等从尼泊尔产的重楼中分离出3个薯蓣皂苷元的苷及一个C₂₁甾体皂苷。1974年Nohara等又从四叶重楼中分离得到偏诺皂苷元连接着三分子鼠李糖和一分子葡萄糖的苷。1981—1995年对云南重楼进行了研究, 先后分离出十几种甾体皂苷。

根据以往研究, 重楼皂苷的苷元主要为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元(Diosgenin)和偏诺皂苷元(Pennogenin)。此外, 尚有24 α -羟基偏诺皂苷元、27-羟基偏诺皂苷元、25S-异组替皂苷元、组替皂苷元以及呋甾烷醇类皂苷元、C₂₁甾体皂苷元等。它们多在3位与糖连接成苷, 所连接的糖主要有D-葡萄糖、L-鼠李糖、L-呋喃阿拉伯糖^[2]。

同时有报道认为, 重楼甾体皂苷为其抗肿瘤有效成分, 甾体骨架的不同使得其抗肿瘤活性表现出明显差异。因此, 笔者将近年来, 从重楼中分离的甾体皂苷归纳如下。

1.1 薯蓣皂苷: 薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-阿拉伯呋喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、薯蓣皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(gracillin)。

1.2 偏诺皂苷: 偏诺皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)-

α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、偏诺皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-阿拉伯呋喃糖(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-阿拉伯呋喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、24 α -羟基偏诺皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、27-羟基-偏诺皂苷元-3-O-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、23 β , 27-二羟基-偏诺皂苷元-3-O-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)]-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

1.3 组替皂苷: 25S-异组替皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷、26- β -D-葡萄糖吡喃糖-组替皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

2 重楼抗肿瘤作用研究

2.1 体外抗肿瘤作用研究

2.1.1 重楼皂苷: Ravikumar等^[3]对从云南白药中分得的平重楼皂苷单体I和VI的研究, 认为其具有较强细胞毒性, 对白血病P388、L1210和鼻咽癌KB细胞的ED₅₀分别为0.94、0.14、0.16 μ g/mL和0.22、0.43、0.029 μ g/mL。石小枫等^[4]研究重楼总皂苷体外对³H-TdR、³H-UR掺入H₂₂瘤细胞的影响, 结果5、10 μ g/mL重楼总皂苷对H₂₂动物移植性肿瘤细胞DNA、RNA的生物合成有较强的抑制作用, 而1 μ g/mL无作用。

2.1.2 重楼提取物: 王强等^[5]用七叶一枝花的甲醇和水提取物作用L-929细胞(小鼠成纤维细胞), 发现其具有很强的细胞毒活性, 且随质量浓度的增大而增强。甲醇提取物的作用明显, 一样品在10⁻⁵g/mL的抑制率就达到58.3%, 所有的样品在10⁻⁴g/mL时的抑制率均高达95%以上, 表现了强的生理活性。水提物的细胞毒活性相对较小, 但在10⁻³g/mL时, 所有的样品抑制率也达到75%以上。季申等^[6]对重楼进行了细胞毒活性物质测定, 报道重楼的水、甲醇和乙醇提取物对A-549(人肺癌)、MCF-7(人乳腺癌)、HT-29(人结肠腺癌)、A-496(人肾腺癌)、PACA-2(人胰腺腺癌)、PC-3(人前列腺腺癌)6种肿瘤细胞均有明显的抑制作用, 并证明其中成分gracillin, methylmotogracillin对肿瘤细胞有抑制作用。

收稿日期: 2004-06-30

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(023617011)

作者简介: 王艳霞(1974—), 女, 天津人, 天津医科大学2002级硕士研究生, 研究方向为中草药成分分析及活性筛选。

* 通讯作者 Tel: (022)23529243 E-mail: tj13F@sina.com

詹锋等^[7]对部分抗癌中药作了体外实验,其中七叶一枝花水煎液 10、1、0.1 mg/mL(按生药量计算)对Hela(宫颈癌)细胞的抑制率分别为100%、100%、71.6%,而同样质量浓度的药物对正常人胚肺成纤维细胞未见损害。韦金育等^[8]采用体外抗肿瘤药物筛选MTT法,对50种广西常用中草药、壮药进行抗肿瘤作用筛选实验,其中七叶一枝花稀释浓度1:100时对肝癌细胞的抑制率为30.11%。

2.2 体内抗肿瘤作用研究:重楼有效成分皂苷对动物移植性肿瘤S₁₈₀、S₃₇、EAC、ARS、L₇₅₉等有明显的抑制作用。石小枫等^[4]观察重楼总皂苷对H₂₂动物移植性肿瘤生长的影响,发现重楼总皂苷水溶液,350 mg/kg ig及10、5 mg/kg ip均能明显抑制H₂₂瘤细胞的生长;350 mg/kg ig使H₂₂动物肿瘤的倍增时间延长约2 d,连续给药后4 d作用达高峰,抑瘤比为2.14;核酸同位素前体掺入实验表明,5 mg/kg ip能干扰³H-TdR、³H-UR掺入H₂₂瘤细胞形成DNA、RNA,同时还能干扰荷瘤小鼠脾组织DNA、RNA的生物合成。李延^[9]采用肉瘤S₁₈₀小鼠模型观察8种中草药的抗肿瘤作用,其中七叶一枝花提取物1.5 g/mL(按照生药量计算)的抑制率为33.5%。

2.3 临床抗肿瘤作用研究:肖毅良^[10]观察以重楼为君药的菊藻丸抗肿瘤作用,结果总缓解率为55%,脑瘤、大肠癌、食管癌疗效较明显,肝癌无效。高尚社^[11]用含七叶一枝花的莲花宝胶囊治疗中晚期恶性肿瘤118例,发现其疗效可靠,适用于多种肿瘤的治疗,其中七叶一枝花可针对性的杀灭癌细胞,抑制和控制肿瘤的发展,达到稳定病情、缩小病灶、抗癌消瘤之效。许玲等^[12]观察了益肺抗癌饮(含七叶一枝花)对94例Ⅲ期肺癌患者远处转移的影响,结果益肺抗癌饮能够抑制肺癌患者远处转移,提高患者外周血中NK细胞活性,抗人T淋巴细胞分化抗原CD₃、CD₄的单克隆抗体(OKT₃、OKT₄)值。张蓓等^[13]报道鼻咽清毒颗粒为鼻咽癌放疗患者良好的辅助药物,该药主要由菊花、重楼等组成,具有清热解毒、活血祛瘀、消肿止痛之功效。陈乃杰等^[14]应用莲蓬胶囊配合化疗治疗中晚期消化道肿瘤,结果其对化疗具有增效、减毒作用,并能调节细胞免疫功能,方中应用重楼清热解毒而抗癌。此外,近年发现,以重楼为主药的著名云南白药具有抗癌作用,临床用于治疗胃癌、肺癌、肝癌、宫颈癌、白血病等已取得了一定的疗效。

3 重楼抗肿瘤作用机制

3.1 直接杀伤肿瘤细胞:祖国医学对肿瘤的治疗包括扶正和祛邪两方面,清热解毒法是主要祛邪手段之一。重楼为清热解毒类中药,主要对恶性肿瘤病人的热症、实证,有消炎、杀菌、抑癌、退热、解毒的作用^[15]。石小枫等^[4]采用核酸同位素前体掺入实验,体内外均表明重楼能抑制DNA、RNA的生物合成,干扰物质代谢,降低更新速率,抑制肿瘤生长繁殖。高冬等^[16]发现重楼能显著提高Hela细胞内基础钙的水平。胞内钙离子信号系统与细胞凋亡的调控有密切关系,钙离子作为第2信使,是细胞凋亡信息传递的关键环节,刺激因素激活细胞受体-G蛋白-磷酸肌醇系统,引起外钙内流、胞内储存钙释放,从而激活多种蛋白酶,最终导致凋亡发生。

3.2 调节机体免疫功能:重楼皂苷Ⅰ~Ⅲ在小鼠成纤维细胞L-929培养基中可引起刀豆球蛋白A诱导的小鼠淋巴细胞增殖效应,并能促进小鼠粒/巨噬细胞克隆形成细胞(GM-CFC)增殖。重楼皂苷Ⅱ尚对植物血凝素(PHA)诱导的人外周全血细胞有促进有丝分裂作用;体内实验能增强C3H/HeN小鼠的自然杀伤细胞活性,诱导干扰素产生;并可抑制S-抗原诱导的豚鼠实验性自身免疫性眼色素膜炎(EAU)发生发展,认为重楼皂苷Ⅱ是较强的免疫调节剂^[17]。

3.3 抑制RNA肿瘤病毒逆转录酶:逆转录酶即RNA指导下的DNA聚合酶,于1970首次由Baltimore等从RNA肿瘤病毒粒子中发现,现已从人的白血病和淋巴瘤的T-细胞中分离出逆转录酶。现代分子生物学研究表明,逆转录酶在人的肿瘤发生变化过程的初期发挥了重要作用,白血病、淋巴瘤及其他一些肿瘤的发生与RNA肿瘤病毒有直接关系。王强等^[18]报道重楼属8个种和变种以及10种市售药材的甲醇、水提取物对该酶均有一定的抑制作用,同一样品的甲醇提取物的抑制作用一般强于水提取物,不同样品的抑制作用与它们的作用方式,即阻断不同的碱基配对的能力是否有关,还有待进一步的研究。

以上仅仅是对重楼抗肿瘤机制的初步探讨,关于其抗肿瘤机制的阐述尚少,有待于进一步扩展和深入。近几年来药物诱导肿瘤细胞凋亡是研究的热点。此外日本学者发现,凡能降低细胞膜脂质流动性的皂苷都能抑制癌细胞增殖^[19],因此其对细胞膜及钙离子的影响也值得今后进行深入的研究。

4 结语

重楼作为民间抗癌药,广泛应用于恶性淋巴瘤、肺癌、鼻咽癌、脑肿瘤及消化系统肿瘤等。尽管其成分和作用机制仍未完全清楚,但在不久的将来,其在抗癌方面的作用将引起人们的重视,有望在中医理论指导下,采用现代分子药理学及分子生物学知识和方法,提取筛选其有效成分,开发出新的抗肿瘤药物。

References:

- [1] Zhang X L, Liu Y C. Studies and applications of *Rhizoma Paridis* [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2000, 7(5): 346-347.
- [2] Tang H F, Zhao Y P. Research survey of plants of *Paris* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, (29)12: 839-842.
- [3] Ravikumar P R. Cytotoxic saponins from the Chinese herbal drug *Yunnan Bai Yao* [J]. *J Pharm Sci*, 1979, 68(7): 900-903.
- [4] Shi X F, Du D J, Xie D C, et al. Effect of steroidal saponins in *Rhizoma Paridis* on H₂₂ animal transplant tumor [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1992, 15(2): 33-36.
- [5] Wang Q, Xu G J. Research on cytotoxicity of *Paris polyphlla* Sm. var. against L-929 cell [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18(11): 526.
- [6] Ji S, Zhou T S, Zhang J Z. Determination of anti-tumor cytotoxic active substance—Gracillin in *Rhizoma Paridis* and *Yunnan White* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(3): 212-215.
- [7] Zhan F Li Z H, Liu H Q. Experiment on inhibition of some anticancer Chinese medicinal herb on Hela cell [J]. *J Lanzhou Med Coll* (兰州医学院学报), 2003, 29(4): 15-16.
- [8] Wei J Y, Li Y, Wei T, et al. Screening research on anti-cancer activity of 50 kinds of Chinese medicinal herb and *Zhuangyao* [J]. *J Guangxi Coll Tradit Chin Med* (广西中医学院学报), 2003, 6(4): 3-7.

- [9] Li Y. Experiment of the anticancer functions of 8 kinds of Chinese medicinal herb [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(7): 587-588.
- [10] Xiao Y L. Clinical application of Juzawon on anti-tumor in 240 cases [J]. *Chin J Surgery Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合外科杂志), 1997, 3(2): 132.
- [11] Gao S. Recent observation of Lianhuabao capsule in treating advanced malignant tumor in 118 cases [J]. *China's Naturopathy* (中国民间疗法), 2000, 8(7): 28-29.
- [12] Xu L, Liu J X. Effect of YiFei Kangliu Yin on lung cancer metastasis and immune function [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1997, 17(7): 401-403.
- [13] Zhang B, Hu P L, Huang G X, et al. Effect observation of Qingduliyan Pill on nasopharyngeal carcinoma radiation induced acute oropharyngitis [J]. *Guangdong Med J* (广东医学), 2003, 24(6): 658-659.
- [14] Chen N J, Jin Y, Lai Y Q. Clinical observation of Loulian capsule in treating advanced gastrointestinal malignant tumor with a combination of chemotherapy [J]. *Fujian Med J* (福建医药杂志), 1999, 21(6): 42-43.
- [15] Xu Q Y. Pharmacological research survey of Chinese anti-cancer medicine [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(2): 165.
- [16] Gao D, Gao Y L, Bai P. Influence of *Rhizoma Paridis* on calcium messenger system in Hela cell [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 2003, 13(4): 26-28.
- [17] Bian H R, Li X N, Wang H M. Advances in studies and applications of *Rhizoma Paridis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(3): 218-220.
- [18] Wang Q, Xu G J. Inhibition of *Paris polyphlla* Sm. var. on reverse transcription polymerase [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1987, 18(3): 195-198.
- [19] Zhang C L, Wu Z K, Ma H L, et al. Development of studies on the natural steroidal saponins biological activities [J]. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2003, 18(2): 95-100.

氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析在中草药研究中的应用

罗晓健¹, 吴志鹏¹, 黄璐琦², 吕爱平¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

中药中含有大量的多种人类所需的氨基酸, 它不仅是人类补充营养的重要来源, 更在发挥药效时起着不可或缺的作用。因此, 氨基酸分析是中药有效成分分析的重要组成部分。早期的氨基酸分析是通过离子交换树脂分离, 再进行柱后衍生生化反应, 衍生物以紫外检测器检测, 但该方法的分析时间长、操作复杂、灵敏度低, 且仪器价格昂贵, 严重限制了它的推广应用。近年来, 随着色谱法的迅猛发展, 分析速度、灵敏度以及自动化程度不断提高, 氨基酸分析方法也有了长足的进步, 不论是检测手段, 还是衍生方法都趋于完善。本文主要介绍分析中药中氨基酸应用较广的几类反相高效液相色谱分析方法。

1 邻苯二甲醛(OPA)法

OPA法是由Roth等于1971年首先提出, 用OPA加上巯基试剂, 30 s内与初级氨基酸在碱性条件下反应生成1-硫代-2-烷基异吲哚, 可作高灵敏度的荧光检测, 也可作紫外检测, 其检测限可分别达到 10^{-15} 和 10^{-12} mol水平。巯基试剂早期多采用2-巯基乙醇, 但考虑到样品分离及实验安全, 继而改进使用3-巯基丙酸代替。衍生时间一般控制在2 min之内, 加入一定量的磷酸(pH 3.0)缓冲液可以中止衍生生化反应, 采用梯度洗脱, 可在15 min内分离18种氨基酸^[1]。本方法的优点是衍生反应迅速, 分辨率、灵敏度高, 成本低, 且过量衍生试剂不干扰分离; 主要缺点是不能与二级氨基酸(如脯氨酸、羟脯氨酸等)直接反应, 必要时需配合其他技术(如氯甲酸苄甲酯法^[2]), 并且氨基酸衍生物极不稳定, 信号衰减极快。朱智甲^[3]用此方法在32 min内分离测定珍珠母中的8

种氨基酸含量, 线性良好, 相关系数在0.998 4~0.99 4, 加样回收率在95%~105%。陈健等^[4]以该法联合氯甲酸苄甲酯法分离了野马追中的17种游离、结合氨基酸, 花蕾中总氨基酸为65.10 mg/g, 人体必需氨基酸占总氨基酸的32.44%, 且花蕾中的氨基酸质量分数普遍较高, 大约是茎叶中的2~4倍。羚羊角和水牛角都具有清热解毒的功效, 但羚羊角药材较为贵重, 为作有效鉴别, 李晓蒙等^[5]使用该法对羚羊角和水牛角中的氨基酸进行测定, 发现羚羊角中天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、酪氨酸含量相对较高, 水牛角中则丙氨酸、缬氨酸含量相对较高, 为这两种药材的鉴别提供了依据。

2 2,4-二硝基氟苯(FDNB)衍生法

FDNB与氨基酸在碱性环境中于60℃下衍生30 min, 生成2,4-二硝基苯氨基酸, 有很好的稳定性, 4℃下避光保存一个月响应值无明显变化。生成的衍生物由于硝基苯环的引入, 在350 nm处有强的紫外吸收, 紫外检测灵敏度可达 10^{-12} mol。同时色谱分离时间较短, 分析结果的准确性、重复性均较好^[6]。该法的主要缺点是衍生生化副产物会影响分离效果; FDNB熔点低, 室温下即熔融, 影响操作。红景天具有抗疲劳、抗衰老、恢复体脑机能等功效, 是较理想的环境适应和滋补强身药, 王陆黎等^[7]应用此法比较不同产地、栽培方式红景天的18种水解氨基酸的质量分数, 发现各地氨基酸总量野生红景天根皆高于园栽; 其中10种药效、12种必需、半必需和13种香甜味氨基酸分别占总量的36.0%~64.9%、50.6%~70.4%、69.8%~77.9%。虎眼万年青多用全草或球茎入药, 用于消炎和抗癌。杨智蕴等^[8]利用此法检测到虎眼万年青含

收稿日期: 2004-09-13

作者简介: 罗晓健(1960—), 教授, 博士, 现工作于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 主要研究中药新药制剂。

Tel: (0971)7119619 E-mail: luoxj98@yahoo.com.cn