

S₁₈₀和H₂₂小鼠肿瘤细胞均可使DNA和RNA荧光强度较生理盐水组有不同程度的降低。说明药物已经与肿瘤细胞DNA和RNA产生了不同程度的结合,抑制了AO与DNA和RNA的结合,导致AO与核酸结合的复合物荧光强度有不同程度的降低;甘草黄酮低剂量组对RNA/DNA无影响($P>0.05$);甘草黄酮中剂量组的RNA/DNA值较生理盐水组明显升高,可能是DNA损伤严重,合成量减少,而RNA合成抑制程度较轻,DNA减少的程度超过RNA;甘草黄酮高剂量组RNA/DNA值较生理盐水组无显著差异,分析原因可能是随剂量增加RNA损伤加重,致使RNA/DNA值与生理盐水组接近。提示药物作用后可能是肿瘤细胞DNA先受损,随后RNA由于没有模板合成才开始下降。环磷酰胺组DNA和RNA荧光强度较生理盐水组降低;RNA/DNA值较生理盐水组显著升高。有报道环磷酰胺对体外淋巴细胞AO-DNA荧光抑制率很低^[9]。结合起来看这与环磷酰胺的作用机制是非常吻合的。环磷酰胺原无烷化活性,需在体内经代谢成有活性的磷酰胺氮芥后发挥烷化作用。磷酰胺氮芥性质活泼,能与DNA发生交叉联结,抑制DNA合成,干扰DNA和RNA功能。从而达到很好的抗肿瘤作用。综上所述,甘草黄酮可明显抑制S₁₈₀和H₂₂荷瘤小鼠肿瘤细胞DNA和RNA复制与合成,这可能是其抗肿瘤作用的机制之一。

References:

- [1] Ji Y B, Jiang W, Fan Y L, et al. Advances in studies on *Glycyrrhiza flavonoids* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 5-5-6.
- [2] Fu N W, Liu Z Y, Zhang R Y, et al. Antipromoting tumor and suppressing lipid peroxidation of G9315 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(8): 411-413.
- [3] Fu N W, Liu Z Y, Zhang R Y, et al. Studies on anti promoting tumor, antimitation, and antioxidant effect of *Glycyrrhiza flavonoids* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1995, 7(4): 29.
- [4] Ji Y B, Gao S Y. Effects of Haimiding on the functioning of red cell membrane of FC and H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, 39(12): 913-916.
- [5] Ji Y B, Gao S Y, Cheng W P. Effect of Haimiding on the functioning of red cell membrane of FC and H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(6): 823-830.
- [6] Ji Y B, Gao S Y, Kong Q, et al. Influence of sea pyrimidine on apoptosis of SGC-7901 human stomach cancer cells [J]. *J Harbin Inst Technol* (哈尔滨工业大学学报), 2002, 34(1): 91-94.
- [7] Wei W, Feng Y X, Zhang S X, et al. Simultaneous determination of cellular DNA/RNA and G₀ from G₁ phase with acridine orange stain by Flow-cytometry [J]. *Chin J Phys Med* (中华物理医学杂志), 1994, 16(3): 166-169.
- [8] Ji Y B, Gao S Y, Ji H R, et al. Anti-neoplastic efficacy of Haimiding on gastric carcinoma and its mechanisms [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 484-490.
- [9] Chen B, Tang H W, Chen G Q, et al. Study on screening of anticancer drugs by lymphocyte nuclear FNDA-acridin orange system fluorescence inhibition [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 1997, 1(13): 1-5.

轮叶婆婆纳中二萜类化学成分的体外抗癌活性研究

张富康¹, 胡人杰², 张韶瑜³, 张彦文³, 高文远¹, 段宏泉^{3*}

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津医药科学研究所, 天津 300070;
3. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要:目的 研究轮叶婆婆纳 *Veronica sibirica* 中二萜类成分的体外抗癌作用。方法 以 TJ905 和 HeLa 细胞为研究对象, 采用 MTT 法对获得的化合物进行抗癌活性初筛并对初筛活性高的化合物进行剂量依赖性实验, 测定其 IC₅₀ 值。结果 对轮叶婆婆纳石油醚及醋酸乙酯提取物中的 7 个二萜类化合物: 二氢丹参酮 I (I)、丹参酮 I (II)、丹参酮 II_A (III)、隐丹参酮 (IV)、婆婆纳对醌 A (V)、婆婆纳对醌 B (VI)、弥罗松酮 (VII) 进行了体外抗肿瘤活性考察, 表明化合物 I 和 IV 具有显著的抗癌活性, 化合物 I 对 TJ905 及 HeLa 细胞生长的 IC₅₀ 值分别为 1.038、1.816 μg/mL, 化合物 IV 对 TJ905 及 HeLa 细胞生长的 IC₅₀ 值分别为 3.637、4.391 μg/mL。结论 轮叶婆婆纳中的二氢丹参酮 I 和隐丹参酮对 TJ905 及 HeLa 细胞具有较强的生长抑制活性。

关键词: 轮叶婆婆纳; 二萜类化合物; 抗癌活性

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)10-1520-04

收稿日期: 2005-01-09

基金项目: 天津医科大学科研基金资助

* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022) 23542838 Fax: (022) 23528891 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn

Anticancer activity of diterpenes from *Veronica sibirica* in vitroZHANG Fu-geng¹, HU Ren-jie², ZHANG Shao-yu³, ZHANG Yan-wen³,
GAO Wen-yuan¹, DUAN Hong-quan³

(1. College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300070, China; 3. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Key words: *Veronica sibirica* L.; diterpenes; anticancer activity

轮叶婆婆纳 *Veronica sibirica* L. 为玄参科婆婆纳属植物,又名草本威灵仙,主要分布于东北、华北、陕西北部、新疆西北部、甘肃东部、山东等省区,具有祛风除湿、清热解毒的功效,主要用于治疗感冒风热、咽喉肿痛、腮腺炎、风湿痹痛、虫蛇所伤^[1]。文献报道轮叶婆婆纳的乙醇提取物具有较强的抗炎、镇痛作用,并从中分离出异阿魏酸、3-*O*-乙酰齐墩果酸、3,4-二甲氧基桂皮酸、胡萝卜苷、 β -谷甾醇、甘露醇等6个化合物^[2],其他化学成分及药理作用研究均未见报道。

本课题组在轮叶婆婆纳的化学成分研究中分离了7个二萜类化合物:二氢丹参酮 I (I)、丹参酮 I (II)、丹参酮 II_A (III)、隐丹参酮 (IV)、婆婆纳对醌 A (sibiriquinone A, V)、婆婆纳对醌 B (sibiriquinone B, VI)、弥罗松酚 (VII),其中化合物 V 和 VI 为新化合物^[3]。本实验对轮叶婆婆纳的石油醚、醋酸乙酯和正丁醇提取物及7个二萜类化合物进行抗癌活性研究,结果表明提取物和化学单体均有不同程度的抗癌生物活性,其中以化合物 I 和 IV 作用最强,进而对其进行了剂量依赖性实验研究。

1 材料

芬兰 LABSYSTEMS Multiskan MS 酶标仪;美国 REVCO CO₂ 培养箱。胎牛血清为 Hyclone 公司产品;RPMI-1640 为 Gibco 公司产品;MTT 和 DMSO 为 Sigma 公司产品;其余试剂均为分析纯。轮叶婆婆纳于2001年9月采自中国东北,经佳木斯医学院王良信教授鉴定为玄参科婆婆纳属植物轮叶婆婆纳 *V. sibirica* L. Pennell, 标本存放于天津医科大学药学院。TJ905 和 HeLa 细胞均由天津医药科学研究所提供。

2 方法与结果

2.1 提取与分离:将轮叶婆婆纳药材 2 kg 粉碎,95% 乙醇 50 °C 温浸提取,减压回收溶剂,得浸膏 0.5 kg。依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇进行萃取;将各部分萃取物减压浓缩后,得浸膏分别为:石油醚部分 24.3 g、醋酸乙酯部分 48.2 g、正丁醇部分 150.9 g。将石油醚和醋酸乙酯提取物反复经过

硅胶柱色谱分离,最后以反相制备 HPLC 分离纯化,得化合物 I ~ VII (质量分数均 > 95%)。

2.2 体外抗癌活性实验:

2.2.1 石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取物的体外抗癌活性:取对数生长期的 TJ905 或 HeLa 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释成 5×10^4 mL 单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 180 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,加入不同质量浓度样品液 20 μ L,样品用 DMSO 溶解 (DMSO $\leq 0.05\%$,实验证实该浓度对细胞生长无影响)后,配制成终质量浓度为 400、200、100 μ g/mL 溶液,每个质量浓度平行 4 孔,对照组加入等体积的 RPMI-1640 培养液。培养 72 h 后,小心吸去上清液,每孔加入以无血清培养液新鲜配制的 1 mg/mL MTT,37 °C 温育 4 h,弃去 MTT,每孔加入 150 μ L DMSO,于酶标仪 570 nm 处测吸光度 (A) 值,并计算细胞增殖抑制率,结果见表 1。

$$\text{细胞增殖抑制率} = [1 - (A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}})] \times 100\%$$

表 1 轮叶婆婆纳萃取物对 TJ905 和 HeLa 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 1 Inhibition of *V. sibirica* extracts on TJ905 and HeLa cell growth ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

萃取物	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	抑制率 / %	
		TJ905	HeLa
石油醚萃取物	400	84.11 $\pm$ 1.10	94.85 $\pm$ 1.64
	200	67.96 $\pm$ 3.76	87.63 $\pm$ 3.24
	100	40.03 $\pm$ 2.53	76.08 $\pm$ 2.02
醋酸乙酯萃取物	400	79.18 $\pm$ 2.54	95.09 $\pm$ 1.26
	200	58.35 $\pm$ 2.79	96.18 $\pm$ 2.01
	100	45.24 $\pm$ 5.77	92.15 $\pm$ 2.49
正丁醇萃取物	400	78.06 $\pm$ 6.87	96.76 $\pm$ 1.38
	200	8.87 $\pm$ 2.25	94.74 $\pm$ 2.07
	100	3.38 $\pm$ 1.48	83.21 $\pm$ 2.27

结果显示轮叶婆婆纳的各萃取部位均有较强的抑制癌细胞生长作用,其对于 HeLa 细胞作用相似,但对 TJ905 细胞,以石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物抑制作用较强。

2.2.2 化合物的体外抗癌活性:应用 MTT 法对从石油醚萃取物和醋酸乙酯萃取物分离获得的 7 个化合物进行体外抗癌活性初筛,药品用 DMSO 溶解

(DMSO $\leq 0.01\%$)后,配制成终浓度为30和10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液,作用于TJ905细胞,每个质量浓度平行4孔,其余操作方法同2.2.1项。结果见表2。结果表明,化合物I和N对TJ905细胞生长的抑制作用较强。根据美国NCI推荐的细胞增殖抑制率为50%时,药物质量浓度在10 $\mu\text{g/mL}$ 以下值得进一步研究的原则,对化合物I和N进一步进行剂量依赖性实验。

2.2.3 化合物I和N体外抗癌活性剂量依赖性实验:应用MTT法进行体外抗癌活性剂量依赖性实验,给药剂量为终质量浓度30、20、10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{g/mL}$,每个质量浓度平行6孔,测定A值。重复3次。计算细胞增殖抑制率及 IC_{50} ,结果见表3。结果显示,化合物I和N对TJ905和HeLa细胞具有较强的细胞杀伤作用,与对照组比较,两化合物(2.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上的药物质量浓度)均显示出显著

表2 化合物I~VII对TJ905细胞生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 2 Inhibition of compounds I~VII on TJ905 cell growth ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

化合物	$p/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	抑制率/%	化合物	$p/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	抑制率/%
I	30	99.65 $\pm$ 0.44	V	30	13.08 $\pm$ 4.88
	10	93.59 $\pm$ 2.03		10	12.34 $\pm$ 5.13
II	30	32.16 $\pm$ 2.48	VI	30	19.50 $\pm$ 4.55
	10	26.99 $\pm$ 6.56		10	10.89 $\pm$ 2.17
III	30	87.25 $\pm$ 2.00	VII	30	81.77 $\pm$ 4.52
	10	31.74 $\pm$ 5.24		10	18.70 $\pm$ 5.49
IV	30	92.98 $\pm$ 1.07			
	10	59.53 $\pm$ 3.58			

的细胞生长抑制作用($P<0.001$)。根据化合物I和N的药物质量浓度及所对应的抑制率,推算出化合物I对TJ905和HeLa细胞的 IC_{50} 值分别为1.038、1.816 $\mu\text{g/mL}$,化合物N对TJ905和HeLa细胞的 IC_{50} 值分别为3.637、4.391 $\mu\text{g/mL}$ 。

表3 不同质量浓度的化合物I和N对TJ905和HeLa细胞生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Inhibition of compounds I and N at different concentrations on TJ905 and HeLa cell growth ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	$p/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TJ905		HeLa	
		A值	抑制率/%	A值	抑制率/%
对照		1.247 $\pm$ 0.064	—	1.624 $\pm$ 0.087	—
化合物I	30	0.023 $\pm$ 0.037***	98.16 $\pm$ 2.99	0.016 $\pm$ 0.006***	99.00 $\pm$ 0.38
	20	0.048 $\pm$ 0.030***	96.16 $\pm$ 2.37	0.021 $\pm$ 0.005***	98.71 $\pm$ 0.28
	10	0.089 $\pm$ 0.041***	92.82 $\pm$ 3.28	0.010 $\pm$ 0.012***	99.37 $\pm$ 0.74
	5	0.104 $\pm$ 0.027***	91.69 $\pm$ 2.12	0.026 $\pm$ 0.006***	98.40 $\pm$ 0.40
	2.5	0.221 $\pm$ 0.553***	82.32 $\pm$ 4.22	0.478 $\pm$ 0.095***	70.55 $\pm$ 5.82
	1.25	0.455 $\pm$ 0.100***	63.55 $\pm$ 8.01	1.091 $\pm$ 0.382***	32.84 $\pm$ 23.52
	0.625	1.055 $\pm$ 0.091**	15.40 $\pm$ 7.29	1.458 $\pm$ 0.141*	10.21 $\pm$ 8.69
化合物N	30	0.270 $\pm$ 0.080***	78.33 $\pm$ 6.34	0.036 $\pm$ 0.027***	97.79 $\pm$ 1.68
	20	0.241 $\pm$ 0.072***	80.70 $\pm$ 5.77	0.046 $\pm$ 0.023***	97.19 $\pm$ 1.44
	10	0.237 $\pm$ 0.050***	80.99 $\pm$ 4.01	0.035 $\pm$ 0.022***	97.84 $\pm$ 1.37
	5	0.497 $\pm$ 0.119***	60.17 $\pm$ 9.53	0.831 $\pm$ 0.348***	48.82 $\pm$ 21.46
	2.5	0.699 $\pm$ 0.111***	43.95 $\pm$ 8.37	1.395 $\pm$ 0.149***	14.13 $\pm$ 9.15
	1.25	0.831 $\pm$ 0.133***	33.33 $\pm$ 10.63	1.463 $\pm$ 0.252	9.90 $\pm$ 15.51
	0.625	1.139 $\pm$ 0.138	8.67 $\pm$ 11.03	1.581 $\pm$ 0.203	2.67 $\pm$ 12.49

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

3 讨论

应用TJ905和HeLa细胞株对轮叶婆婆纳石油醚、醋酸乙酯、正丁醇提取物的体外抗癌活性初筛结果显示,3部分均有明显的体外抗癌细胞生长的活性。进一步实验表明从石油醚和醋酸乙酯萃取物中分离得到的二氢丹参酮I(I)和隐丹参酮(IV)两个丹参酮类化合物具有很强的体外抗癌活性。对于丹参酮类化合物的抗癌作用,大量研究集中于丹参酮II_A^[4~6],Mosaddik^[7]的体外试验研究表明,与丹参酮I和丹参酮II_A相比,二氢丹参酮I和隐丹参酮对P388淋巴细胞白血病细胞具有微弱的细胞毒

活性,药物质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 所产生的抑制率仅为13.71%和39.21%,并认为这类二萜类化合物不饱和的C-15位以及饱和的A环是产生细胞杀伤作用的重要结构。但亦有研究表明,二氢丹参酮I对人肝癌细胞株(QGY-7703)和人肺腺癌细胞株(SPC-A-1)有较强的细胞毒作用,半数致死剂量 LD_{50} 分别为8.86和7.736 $\mu\text{mol/L}$,且其与X射线联合作用能增强细胞对射线的敏感性^[8]。本实验结果表明化合物I和N对TJ905和HeLa细胞具有强大的杀伤作用,与不加药物仅加等体积RPMI-1640培养液的对照组比较,两化合物2.5 $\mu\text{g/mL}$

以上的药物质量浓度均显示出显著的差异 ($P < 0.001$); 化合物 I 对 TJ905 和 HeLa 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.038 和 1.816 $\mu\text{g/mL}$, 化合物 IV 对 TJ905 和 HeLa 细胞的 IC_{50} 值分别为 3.637 和 4.391 $\mu\text{g/mL}$, 而丹参酮 I (I) 和丹参酮 I_A (III) 的初筛结果显示其对于 TJ905 细胞的杀伤作用并不明显, 说明丹参酮类化合物对于癌细胞的体外杀伤作用具有选择性, 其抗癌作用机制和构效关系值得进一步研究。

此外, 本实验研究从化合物单体水平证明药用植物轮叶婆婆纳具有抗癌活性, 从而为进一步对此植物的开发利用奠定了一定的理论基础。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1977.
[2] Zhou B X, Meng X S. The pharmacological research on

- Veronica sibirica* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1992, 17(8): 493-496.
[3] Gao W Y, Zhang R, Jia W, et al. Immunosuppressive diterpenes from *Veronica sibirica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(1): 136-137.
[4] Tang Z Z, Tang Y, Fu L B. Effect of tanshinone I_A on the growth behavior of human hepatoma cell line BEL-7402 *in vitro* and its mechanism [J]. *Acad J First Med Coll PLA* (第一军医大学学报), 2003, 23(6): 595-596.
[5] Chen J, Lin G J. The advance of researches on anticancer effects of tanshinones [J]. *Fudan Univ J: Med Sci* (复旦学报: 医学版), 2003, 30(6): 626-628.
[6] Yuan S L, Song Y, Wang X J, et al. The inhibiting effect of tanshinone I_A on the growth of tumor cell lines *in vitro* [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2003, 18(5): 327-329.
[7] Mosaddik M A. *In vitro* cytotoxicity of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against P388 lymphocytic leukemia cells [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(8): 682-685.
[8] Li R B, Wu Q, Xu S J. The influence of dihydrotanshinone I on the radiosensitization effect of QGY-7703 and SPC-A-1 [J]. *J Radiat Res Radiat Proces* (辐射研究与辐射工艺学报), 1986, 16(1): 29-33.

α -环丙氨酸对缺血性脑神经损伤的保护作用

赵铮蓉, 朱沁未, 朱旭祥

(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 研究中药有效成分 α -环丙氨酸 (1-aminocyclopropanecarboxylic acid, ACPC) 对缺血性脑神经损伤的保护作用。方法 采用二乙酸荧光素 (FDA) 和 Hoechst33258 DNA 染色法, 观察大鼠小脑颗粒神经元存活率及形态学特征, 用琼脂糖凝胶电泳分析神经元凋亡的生化特征; 采用小鼠断颅法和小鼠局灶性脑缺血法, 观察 ACPC 对小鼠喘息时间和脑梗死体积的影响。结果 在细胞水平上, ACPC (0.5, 1 mmol/L) 使小脑颗粒神经元的存活率明显提高; 使 200 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸 (Glu) 引起的细胞核固缩、凝聚和断裂现象消失; Glu 使神经元的 DNA 电泳图谱出现明显的“梯形”条带, ACPC 使此现象消失。在组织水平上, ACPC (200, 400 mg/kg) 明显减小小鼠脑梗死体积, 在整体水平上, ACPC (100, 200, 400 mg/kg) 显著延长小鼠断颅后的喘息时间。结论 ACPC 对缺血性脑神经损伤具有显著保护作用。

关键词: α -环丙氨酸 (ACPC); 小脑颗粒神经元; 谷氨酸

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)10-1523-05

Protection of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid against brain neurological impairment induced by ischemia

ZHAO Zheng-rong, ZHU Qin-wei, ZHU Xu-xiang

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Key words: 1-aminocyclopropanecarboxylic acid (ACPC); cerebellar granule neurons; glutamate

研究表明谷氨酸 (Glu) 是脑内主要的兴奋性神经递质, 介导绝大多数兴奋性突触的正常活动, 参与可塑性的发生机制, 是一种内源性神经毒性物质。Glu 介导的神经元兴奋性毒性死亡与许多神经系统

疾病的发生、发展有着密切的关系^[1]。在正常生理情况下, Glu 主要储存在神经元末梢突触囊内, 细胞外 Glu 水平很低 (0.6 mol/L)。当神经末梢受到刺激时, Glu 才从突触囊内释放至突触间隙内, 但很快又