

取法。本实验采用了蛋白沉淀法^[2], 考察了醋酸乙酯、氯仿、乙醚 3 种试剂处理血浆样品。计算用 3 种不同试剂处理血浆样品的瑞香素提取率大小为醋酸乙酯> 乙醚> 氯仿, 而用乙醚处理的血浆杂峰较多, 故选用醋酸乙酯为萃取溶剂。

4.3 药动学结果的探讨: 瑞香素 iv 给药后在大鼠体内符合一室开放模型, 而 ig 给药后在大鼠体内也符合一室开放模型。

瑞香素 iv 后的 $t_{1/2(e)}$ 为 0.091 和 ig 后的 $t_{1/2(e)}$ 为 0.106, 说明瑞香素属于快速消除药物, 且两种给药途径使瑞香素在大鼠体内的保留时间不同, ig 给药比 iv 给药在体内停留时间长些。iv 给药曲线下

面积 (AUC) 为 $0.252 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{mL}$, ig 给药为 $0.204 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{mL}$, 两者差异不大, 但在给药剂量上, ig 给药为 iv 给药剂量的数倍, 提示瑞香素 iv 给药的药物利用率大于 ig 给药。

由此可知, 瑞香素在临床用药上需要采取相应的制剂手段增加其在体内的保留时间, 才可确保其疗效。静注和口服给药各有优势。

参考文献:

- [1] 钱桂英, 单进军, 狄留庆. 瑞香素大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(3): 177-178
- [2] Tsai T H, Chou C J, Chen C F. Pharmacokinetics of paeonol after intravenous administration in rats [J]. J Pharm Sci, 1994, 83(9): 1307-1309

珍珠菜提取物对肝癌抑制作用的研究

唐丽华¹, 王祎茜¹, 梁中琴², 游本刚¹, 杨世林¹

(1 苏州大学医学部 药学院, 江苏 苏州 215123; 2 苏州大学医学部 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 目的 观察珍珠菜提取物 (ZE4) 对肝癌体内外的抑制作用。方法 体外采用 MTT 法、³H-TdR 掺入法、集落形成实验观察 ZE4 对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤作用; 采用划痕实验法与内皮细胞黏附实验观察 ZE4 对 SMMC-7721 细胞迁移的抑制作用。体内以抑瘤率和脏器指数为指标观察 ZE4 对小鼠肝癌 H22 的作用。结果 ZE4 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖和转移; 体内实验显示 ZE4 可显著抑制小鼠肝癌 H22 的增殖, 抑瘤率均在 30% 以上, 其中中剂量 (200 mg/kg) 组的效果最好, 可达到 57.8%。结论 ZE4 对肝癌有很好的抑制作用。

关键词: 珍珠菜; 肝癌; 转移; 凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0108-04

肝癌在我国癌症发病率中高居第 2 位, 且在某些地区呈逐年增高趋势。由于肝癌恶性程度高, 病情发展快, 治疗难度大, 成为严重威胁人类健康和生命的“癌症之王”。虽然手术治疗是首选, 但并不能解决肿瘤的扩散与转移。所以药物治疗成为中、晚期肝癌常用的治疗方法。中药因不良反应小, 且有去邪扶正之功效, 更易被患者接受, 因此从中草药中寻找抗肿瘤药物已成为人们关注的焦点。

珍珠菜为报春花科植物虎尾珍珠菜 *Lysimachia clethroides* Duby 的根或全草^[1], 具有清热解毒、活血调经、利水消肿等功效; 在民间广泛用于治疗咽喉肿痛、虫蛇咬伤、跌打损伤、妇女月经不调等症。珍珠菜的化学成分研究较多, 而药理作用研究却少见报道^[2]。早在 1977 年就有报道显示珍珠菜总黄酮苷具有良好的抗肿瘤作用^[3], 但其后报道甚

少。本课题组通过对珍珠菜抗肿瘤有效部位的进一步纯化, 提高了提取物中总黄酮的量, 观察了该提取物 (ZE4) 体外对人肝癌细胞 (SMMC-7721) 的作用和体内对荷瘤 H22 小鼠的抑瘤作用。

1 材料与仪器

1.1 药物: 珍珠菜采用醇提水沉法提取后, 浓缩至一定浓度, 经大孔吸附树脂分离纯化, 经体外筛选得到活性部位 (ZE4), 其中总黄酮质量分数为 33.35%。

1.2 试剂和仪器: 培养基 RPMI 1640 培养基, Gibco 产品; 超级新生小牛血清 (FBS), 杭州四季青生物材料研究所生产; 胰酶、四氮唑蓝 (MTT) 为 AMRESO 分装; 氟尿嘧啶注射液 (5-FU, 南通精华制药有限公司, 批号 051002); 注射用盐酸柔比星 (DSR, 深圳万乐有限公司, 批号 0505E1); ³H-TdR

¹ 收稿日期: 2008-05-10

基金项目: 江苏省苏州市社会发展基金资助项目 (ZS0307); 苏州大学医学发展基金项目 (EE132609)

作者简介: 唐丽华 (1952—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理、中药新制剂及新剂型研究。

Tel: (0512) 65880029 E-mail: tanglihua@suda.edu.cn.

购自上海原子能研究所; 注射用环磷酰胺 (CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 05121621); Heraeus 试剂盒, 购自碧云天公司; 其余试剂均为国产分析纯。Heraeus BB16UV 型 CO₂ 孵箱, Heraeus 公司; XDS-1B 型倒置显微镜, 重庆光学仪器厂; eclipse TE2000-U 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; DG3002 型酶联免疫检测仪, 国营华东电子管厂; 766-3 型远红外干燥箱, 上海浦东跃欣科学仪器厂生产; Wallac 1409 型液体闪烁测量仪, 瑞典法玛西亚公司生产。

1.3 细胞株与瘤株: 人肝癌细胞株 SMMG-7721 由本实验室保存, 小鼠移植肝癌 H₂₂ 瘤株由南京中医药大学提供。

1.4 动物: 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 由苏州大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2002-0008, 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2002-0037。

2 实验方法

2.1 体外对人肝癌 SMMG-7721 细胞的作用

2.1.1 细胞培养: SMMG-7721 细胞用含 10% 灭活 FBS 的 RPMI-1640 培养基 (另加葡萄糖 0.03%, Hepes 0.06%, NaHCO₃ 0.2%) 于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, 3 d 传代, 取对数生长期细胞进行实验。

2.1.2 MTT 法^[4]: MTT 法检测 ZE4 对 SMMG-7721 细胞存活的抑制作用。取对数生长期肿瘤细胞, 用完全培养基调整细胞浓度为 7×10^4 /mL, 接种于 96 孔培养板中, 100 μ L/孔, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养过夜, 次日进行分组: 给药组、阳性和阴性对照组。给药组加入 ZE4 (终质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125 μ g/mL), 阳性对照组加入 5-FU (25 μ g/mL), 阴性对照组加入完全培养基, 每组均设 6 复孔, 培养 24、48、72 h。终止培养前 4 h 加入 MTT (5 mg/mL), 10 μ L/孔, 培养结束后每孔加入酸化的 10% SDS 100 μ L, 放置过夜, 于酶标仪检测 570 nm 时的吸光度 (A) 值。重复 3 次。

2.1.3 ³H-TdR 掺入法: 接种细胞到 24 孔培养板中, 1 mL/孔分组同 MTT 法。培养 24 h 后给药组给予不同浓度的 ZE4 (终质量浓度同 MTT 法), 阳性对照组加入 DSR (10 μ g/mL), 阴性对照组加入等体积完全培养基, 同时加入稀释的 ³H-TdR (2.4×10^4 Bq) 10 μ L, 继续培养 48 h。收获细胞: 在培养孔中加入蒸馏水, 吹打均匀, 将细胞转移至

49 型玻璃纤维滤膜上, 依次用生理盐水、5% 三氯醋酸、无水乙醇洗涤。取下 49 型玻璃纤维滤膜, 置红外干燥箱干燥, 80 ℃, 20~30 min。将滤膜片置入闪烁瓶底部, 加入闪烁液 3 mL, 在液体闪烁测量仪上测量每个样品的 cpm 值。

2.1.4 集落形成试验^[5]: 取对数生长期细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 2.5×10^2 /mL 于 35 mm 培养皿, 2 mL/孔, 每组均设 3 复孔, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养过夜, 次日进行分组, 分组及给药同 MTT 法, 在含 37 ℃、5% CO₂ 条件下静置 10 d, 弃去培养基, 用 Gimesa 染色后镜下计数含 50 个细胞以上的集落, 并摄影。普通光镜放大两倍拍照。

2.1.5 划痕试验: 细胞接种于六孔板, 培养过夜使其完全贴壁, 用枪尖在孔中央部划一条直线, PBS 洗一遍, 加入 ZE4 (100 μ g/mL) 2 mL, 同时以加入等体积完全培养基为对照组, 分别培养 24、48、72 h, Gimesa 染色, 显微镜下观察。

2.1.6 人肝癌细胞与内皮细胞黏附试验: 取对数生长期 ECV304 细胞, 调整细胞浓度后接种于 96 孔培养板中, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, 次日待细胞贴壁并长满单层后, 加入不同质量浓度 ZE4 (12.5、25、50、100、200、400 μ g/mL) 孵育 60 min 后的 SMMG-7721 细胞, 以加入未经药物孵育的 SMMG-7721 细胞为对照, 继续培养 60 min, 用 Dulbecco's PBS 清洗细胞 4 次, 除去未黏附的细胞, 黏附细胞用 20% 甲醇稀释的 0.5% 结晶紫染色固定, 漂洗, 空气晾干。用比例 1:1 的乙醇和 0.1 mmol/L 枸橼酸钠溶液溶解染色细胞, 酶标仪在 540 nm 处测吸光度值。

2.2 体内抑瘤作用的药效学研究: 抽取小鼠移植肿瘤 H₂₂ 腹水细胞 (4×10^7 /mL), 按每只小鼠 0.1 mL 接种于小鼠右侧腋下, 接种后随机分组, 阴性对照组, ZE4 高、中、低剂量 (400、200、100 mg/kg) 组, CTX (25 mg/kg) 组。第 2 天起 ig 给药, 每天 1 次, 共 10 d。各组给药容积均为 0.02 mL/g, 对照组给予相同体积的蒸馏水。末次给药 24 h 后处死小鼠, 分别称取瘤质量、肝质量、脾质量、胸腺质量。计算抑瘤率和脏器指数。

抑瘤率 = (阴性对照组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 阴性对照组平均瘤质量 $\times$ 100%

2.3 数据统计: 采用 SPSS 统计程序进行单因素方差分析处理, 组间比较采用 Student's t 检验。

3 实验结果

3 1 体外对人肝癌 SMMG-7721 细胞的作用

3 1 1 MTT 法: 与对照组相比不同质量浓度的 ZE4 对 SMMG-7721 细胞增殖均有明显的抑制作用, 且呈时间、浓度依赖性。24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 46. 19、24 0、14 6 μg/ mL, 结果见表 1。

表 1 ZE4 对 SMMG-7721 细胞存活的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Inhibition of ZE4 on viability of SMMG-7721 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂量/ (μg · mL ⁻¹)	A		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照	-	0. 175 ± 0. 024	0. 205 ± 0. 035	0. 654 ± 0. 034
ZE4	3. 125	0. 168 ± 0. 020	0. 274 ± 0. 044	0. 556 ± 0. 031
	6. 25	0. 160 ± 0. 018	0. 263 ± 0. 036	0. 476 ± 0. 033
	12. 5	0. 148 ± 0. 032	0. 217 ± 0. 023*	0. 440 ± 0. 034* *
	25	0. 126 ± 0. 005*	0. 164 ± 0. 027* *	0. 352 ± 0. 017* *
	50	0. 081 ± 0. 019* *	0. 113 ± 0. 015* *	0. 178 ± 0. 032* *
	100	0. 046 ± 0. 001* *	0. 024 ± 0. 004* *	0. 008 ± 0. 003* *
	5-FU	0. 108 ± 0. 009* *	0. 302 ± 0. 039* *	0. 080 ± 0. 011* *

与阴性对照组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs negative control group

3 1 2 ³H-TdR 掺入法: 观察 ZE4 对 SMMG-7721 细胞增殖的抑制作用, 结果表明, ZE4 作用 48 h 可有效抑制细胞增殖, 其中 25、50、100 μg/ mL 剂量组的抑制率分别为 43. 5%、74. 2%、83. 9%, 且与阴性对照组相比具有极显著性差异 ($P < 0. 01$), 见表 2。

表 2 ZE4 对 SMMG-7721 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Inhibition of ZE4 on proliferation of SMMG-7721 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	³ H-cpm
阴性对照	-	1106. 0 ± 154. 0
ZE4	3. 125	1023. 9 ± 100. 1
	6. 25	1197. 7 ± 65. 2
	12. 5	804. 0 ± 87. 9*
	25	624. 7 ± 47. 5* *
	50	285. 5 ± 25. 0* *
	100	177. 6 ± 17. 6* *
DXR	10	69. 4 ± 19. 5* *

与阴性对照组比较: * $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$

* $P < 0. 05$ ** $P < 0. 01$ vs negative control group

3 1 3 集落形成试验: ZE4 对 SMMG-7721 细胞克隆形成的抑制作用, 阴性对照组集落形成率为 54. 9%, ZE4 12. 5~ 100 μg/ mL 及 5-FU 组无集落形成, ZE4 6. 25 μg/ mL 剂量组集落形成率为 10. 2%, 抑制率为 79. 8%; 3. 125 μg/ mL 剂量组集落形成率为 36. 0%, 抑制率为 28. 5%。普通光镜拍照结果见图 1。

3 1 4 划痕试验: ZE4 体外对肝癌 SMMG-7721 细

胞迁移的影响, 在各时间点, ZE4 (100 μg/ mL) 组细胞的迁移距离均小于对照组, Giemsa 染色后普通光学显微镜观察并拍照, 结果见图 2。

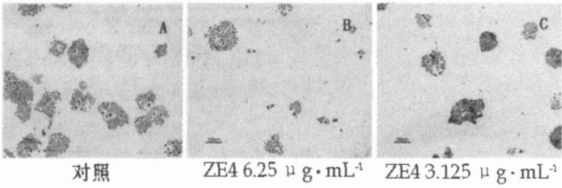
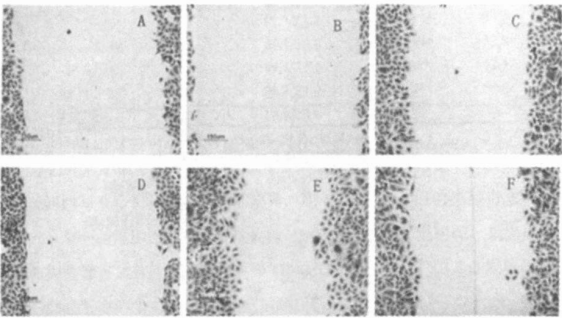


图 1 ZE4 对 SMMC-7721 细胞克隆形成的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of ZE4 on colony-forming units of SMMC-7721 cells



A、C、E-24、48、72 h 阴性对照组 B、D、F-ZE4 100 μg/ mL 24、48、72 h 给药组

A, C, E-SMMC-7721 cells left untreated for 24, 48, and 72 h; B, D, F-SMMC-7721 cells treated with ZE4 100 μg/ mL for 24, 48, and 72 h

图 2 ZE4 体外对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移的影响

Fig. 2 Effects of ZE4 on migration of SMMC-7721 cells in vitro

3 1 5 内皮细胞黏附试验: 试验结果显示, 随给药剂量增加, 对内皮细胞 ECV 304 黏附的抑制作用提高, 100 μg/ mL ZE4 对 ECV 304 黏附的抑制率为 51. 5%, 且与对照组比较具有极显著性差异 ($P < 0. 01$), 结果见表 3。

表 3 ZE4 对内皮细胞黏附的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effects of ZE4 on adhesion of endothelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂量/(μg · mL ⁻¹)	A
对照	-	2. 667 ± 0. 544
ZE4	12. 5	2. 258 ± 0. 156
	25	1. 688 ± 0. 066* *
	50	1. 569 ± 0. 340* *
	100	1. 293 ± 0. 238* *
	200	0. 566 ± 0. 276* *
	400	0. 256 ± 0. 051* *

与阴性对照组比较: ** $P < 0. 01$

** $P < 0. 01$ vs negative control group

3 2 体内抑瘤作用的药效学研究

3 2 1 ZE4 对小鼠 H₂₂ 肝癌的增殖抑制作用; 实验

结果显示 ZE4 可显著抑制小鼠 H₂₂ 肝癌的增殖, 抑制率均在 30% 以上, 且与对照组相比差异显著或非常显著 ($P < 0.05$, 0.01) 其中 200 mg/kg 剂量组的抑瘤效果最好, 可达到 57.8%, 见表 4。

表 4 ZE4 对小鼠 H₂₂ 肝癌的增殖影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of ZE4 on multiplication of H₂₂ in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物体质量/g	瘤质量/ g	抑瘤率/ %
		前/后		
阴性对照	—	19.9/23.4	1.47 ± 0.87	—
ZE4	400	19.7/23.2	0.66 ± 0.34 [*]	54.6
	200	20.1/22.6	0.62 ± 0.34 [*]	57.8
	100	19.1/23.1	0.85 ± 0.44 [*]	42.1
CTX	25	20.4/22.9	0.45 ± 0.17 [*]	69.0

与阴性对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs negative control group

表 5 ZE4 对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effects of ZE4 on indexes of organ in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物体质量/g	肝指数/ (g · kg ⁻¹)	脾指数/ (g · kg ⁻¹)	胸腺指数/ (g · kg ⁻¹)
		前/后			
阴性对照	—	19.9/23.4	55.67 ± 7.98	7.88 ± 2.26	2.68 ± 1.27
ZE4	400	19.7/23.2	51.75 ± 6.51	8.48 ± 1.75	2.43 ± 1.04 [#]
	200	20.1/22.6	51.35 ± 5.72	8.31 ± 1.65	1.95 ± 1.24 [#]
	100	19.1/23.1	54.77 ± 8.69	7.94 ± 2.49	2.44 ± 1.06 [#]
CTX	25	20.4/22.9	55.66 ± 8.69	8.62 ± 2.13	1.17 ± 0.30 [*]

与阴性对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 CTX 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs negative control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs CTX group

点^[6]。本研究的体外实验结果表明 ZE4 对肝癌 SMMG-7721 细胞的增殖和迁移有明显抑制作用, 提示其治疗肿瘤转移方面有很大的潜力。体内实验结果表明, ZE4 可显著抑制小鼠 H₂₂ 肝癌的增殖, 其中中剂量 (200 mg/kg) 组的抑瘤效果最好, 可达到 57.8%。而且 ZE4 各剂量组对小鼠的肝指数、脾指数、胸腺指数的影响与空白组相比均无显著性差异, 说明 ZE4 在发挥抗癌作用的同时不会对机体的免疫功能造成影响。而其体内肿瘤转移的作用及其机制还有待深入研究。以上研究结果为 ZE4 临床应用、新药开发提供了一定的实验数据、理论依据和较好的参考价值, 也说明该药具有很好的推广、应用前景。

3.2.2 ZE4 对小鼠脏器指数的影响: ZE4 各剂量组对小鼠的肝指数、脾指数、胸腺指数的影响与阴性对照组相比均无显著性差异, 而 CTX (25 mg/kg) 组的胸腺指数明显下降, 且与阴性对照组相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。与 CTX 组相比, ZE4 各剂量组胸腺指数都有显著性或极显著性差异 ($P < 0.05$, 0.01), 说明 ZE4 在发挥抗癌作用的同时不会产生 CTX 那样的免疫抑制, 结果见表 5。

4 讨论

每年有 90% 的癌症病人死于肿瘤的转移。如何抑制肿瘤细胞由原发病灶迁移到其他器官已成为肿瘤治疗的一大挑战。目前抗肿瘤药物的研究通常集中在对癌细胞增殖的抑制方面, 而对血管生成和细胞迁移的研究正逐步成为抗肿瘤药物的研究热

参考文献:

- [1] 《中华本草》编委会主编. 《中华本草》[M]. 第一版. 第 6 卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999
- [2] 常海涛, 孔维梁, 屠鹏飞. 珍珠菜属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 295-298
- [3] 空军汉口医院肿瘤防治小组. 珍珠菜黄酮甙抗肿瘤作用的实验研究[J]. 新医学, 1977, 8(3): 112-113
- [4] 戴滨, 崔燎, 吴铁, 等. 半边旗有效成分 5F 注射液体内抗肿瘤药理作用研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(5): 508-511
- [5] Debeir O, Van Ham P, Kiss R, *et al.* Tracking of migrating cells under phase-contrast video microscopy with combined mean-shift processes[J]. *IEEE Transactions Med Imag*, 2005, 24(6): 697-711
- [6] Hayot C, Debeir O, Van Ham P, *et al.* Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 211(1): 30-40