

白英甾体皂苷对肿瘤细胞的体外增殖抑制作用

★ 刘淑华 魏仙凤 白美姣 (浙江省杭州市余杭区第三人民医院 杭州 311115)

摘要:目的:研究白英甾体皂苷体外对 HeLa 等肿瘤细胞的抑制作用。方法:采用 MTT 法检测白英甾体皂苷体外对小鼠原代腹水型肉瘤 S₁₈₀ 细胞、小鼠肝癌 H₂₂ 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人卵巢癌 HO-8 910 细胞和人类白血病 K562 细胞以及正常小鼠脾细胞的抑制作用。结果:白英甾体皂苷对人卵巢癌 HO-8 910 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、小鼠原代腹水型肉瘤 S₁₈₀ 细胞均有较好的抑制作用,而对小鼠肝癌 H₂₂ 细胞和人类白血病 K562 细胞抑制作用稍弱。对 HeLa 细胞的试验表明呈现良好的浓度-效应依赖关系。对小鼠正常脾细胞的 IC₅₀ 为 32.27。结论:白英甾体皂苷体外对 HO-8 910、人宫颈癌 HeLa 细胞、小鼠原代腹水型肉瘤 S₁₈₀ 细胞有较好的抗肿瘤作用。

关键词:白英甾体皂苷;抗肿瘤;MTT 法;肿瘤细胞

中图分类号:R 246.5 **文献标识码:**A

茄科植物白英(*Solanum lyratum* Thunb),主产于江苏、浙江、江西,具有清热解毒,祛风利湿,化痰等作用。临床常用于治疗感冒发热、胆囊炎、胆石病、癌症、子宫颈糜烂、白带等病症^[1]。白英与红枣以 1:1 混合制成的煎剂、糖浆剂对小鼠艾氏腹水癌及梭形细胞肉瘤的实体型及腹水型有抑制作用,临床上对子宫癌有效^[2]。有研究表明白英水提物能抑制小鼠肉瘤 S₁₈₀、小鼠肝癌 H₂₂ 细胞的增殖^[3],脂溶性提取物能抑制人肝癌 BEL-7402 细胞及人胃腺癌 SGC-7901 细胞^[4]。本研究进一步对白英甾体皂苷提取物体外抗肿瘤作用进行研究,为更好的开发利用白英提供依据。

1 材料

1.1 仪器

细胞培养箱 MCO-15AC(日本三洋公司);超净工作台 SW-CJ-1F/D 型(上海博迅实业有限公司);酶标仪 Model 680 型(BIO-RAD 公司);电子天平 HR-120 型(日本 AND 公司);倒置显微镜 BH2-RF-CA 型(日本 olympus 公司)。

1.2 试剂

RPMI 1640(GIBCO);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT 美国 Amresco 公司);顺铂(DDP,齐鲁制药有限公司)。

1.3 肿瘤细胞株

小鼠肉瘤 S₁₈₀ 细胞、小鼠肝癌 H₂₂ 细胞、人宫颈

癌 HeLa 细胞、人卵巢癌 HO-8 910、人红白血病 K562 细胞购于上海细胞所。用含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、链霉素的 RPMI 1 640 的完全培养液,于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中传代培养,取对数生长期的细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI 1 640 完全培养液制成单个细胞悬液,以台盼蓝拒染方法计数后,将细胞悬液稀释成所需的浓度。

1.4 动物

昆明种小鼠,雌性,体重 18 ~ 22 g,购自浙江省药品检验所。

1.5 药品配制

白英通过 90% 乙醇冷浸提取,浓缩、硅胶柱粗分离、氯仿-甲醇梯度洗脱等步骤提取白英甾体皂苷组分,使用时用 DMSO 溶解。

2 方法

2.1 白英甾体皂苷对肿瘤细胞的体外增殖抑制活性

用 MTT 法测定白英甾体皂苷对肿瘤细胞增殖抑制率及 IC₅₀。方法如下:取对数生长期的小鼠原代腹水型肉瘤细胞 S₁₈₀、小鼠肝癌细胞 H₂₂、人宫颈癌细胞 HeLa、人卵巢癌细胞 HO-8 910 和人类白血病细胞 K562 细胞,以 1 × 10⁵ 个/ml 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL,埋板 12 小时后加药。白英甾体皂苷设 3 个剂量,分别为 5、20、40 μg /mL,阳性对照药 DDP 25 μg /mL,每个剂量均设 3 个复孔。给

药 48 小时后,每孔加 MTT 液 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 保湿继续孵育 4 小时后中止培养,离心,小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 分钟,使结晶物充分溶解。用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(OD 值)。

细胞生长抑制率(%) = [(溶剂平均 OD 值 - 实验平均 OD 值) / 溶剂对照平均 OD 值] \times 100 %

IC_{50} 计算采用软件进行, LOGIT 方法求出 IC_{50} 。

2.2 对 HeLa 细胞生长的影响

取对数生长期 HeLa 细胞按 3×10^4 /ml 接种于 24 孔细胞培养板,每孔接种 1 ml,分成 4 组,其中 3 组分别加入 50 μL 白英甾体皂苷各浓度稀释液,使细胞培养体系药物终浓度分别为 5、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,另一组为阴性对照组,加入 50 μL PBS,每组重复 3 次,期间不换液。分别于细胞培养的第 1、2、3、4 天取实验组和对照组细胞,用台盼蓝拒染法,用血球计数板在光镜下计算活细胞数(无色的为活细胞,蓝色为死细胞),取活细胞数与培养时间作图得生长曲线。

2.3 白英甾体皂苷对正常细胞的毒性作用

以 MTT 方法测定白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的毒性。无菌取小鼠脾脏,加适量的 Hanks 研磨,以绸布过滤,1 500 rpm 离心 5 分钟,弃上清,加 Hanks 洗涤 2 次。收集脾脏细胞加适量 RPMI 1 640 培养液混悬,以 0.4% 台盼蓝拒染方法计数,活细胞比例不小于 95%,加 RPMI 1 640 完全培养液稀释,并调整细胞浓度至 3×10^4 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内孵育 24 小时,加入 100 μl 不同浓度的白英甾体皂苷稀释液(2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每个浓度重复 3 孔。继续培养 48 小时,各孔加入 50 μl MTT 溶液(2 mg/ml),再继续培养 2 小时。弃去各孔培养液,分别加入 150 μl 酸性 DMSO 溶液,震荡 10 分钟使结晶紫溶解,于室温暗处放置 10 分钟,用酶标仪于波长 570 nm 测定 OD 值,计算抑制率及 IC_{50} 。

3 结果

3.1 白英甾体皂苷对各肿瘤细胞的增殖抑制作用

用 MTT 方法测定了白英甾体皂苷对小鼠肉瘤

S_{180} 细胞、小鼠肝癌 H_{22} 细胞、人宫颈癌 HeLa 细胞、人卵巢癌 HO-8 910、人红白血病 K562 细胞等 5 个具有代表性的肿瘤细胞株的增殖抑制率,以顺铂(DDP)为阳性对照, IC_{50} 结果见表 1~5。结果表明白英甾体皂苷体外对 5 个试验细胞株都有明显的增殖抑制作用,尤其对人 HeLa 细胞和 HO-8 910 细胞的作用更明显。

表 1 白英总苷对 S_{180} 细胞的增殖抑制作用

| 药物 | 药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 抑制率(%) | IC_{50} 值 |
|-----|--|------------------|--------------------|
| 白英甾 | 5 | 17.31 \pm 0.99 | 18.34 \pm 0.51 |
| 体皂苷 | 20 | 34.55 \pm 2.06 | |
| | 40 | 83.14 \pm 2.22 | |
| 顺铂 | 25 | 81.37 \pm 2.36 | |

表 2 白英总苷对 H_{22} 细胞的增殖抑制作用

| 药物 | 药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 抑制率(%) | IC_{50} 值 |
|-----|--|------------------|--------------------|
| 白英甾 | 5 | 23.36 \pm 2.87 | 22.21 \pm 1.52 |
| 体皂苷 | 20 | 45.53 \pm 2.81 | |
| | 40 | 63.27 \pm 2.05 | |
| 顺铂 | 25 | 75.44 | |

表 3 白英总苷对 HeLa 细胞的增殖抑制作用

| 药物 | 药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 抑制率(%) | IC_{50} 值 |
|-----|--|------------------|--------------------|
| 白英甾 | 5 | 15.25 \pm 2.83 | 14.53 \pm 0.84 |
| 体皂苷 | 20 | 66.94 \pm 1.5 | |
| | 40 | 80.61 \pm 1.35 | |
| 顺铂 | 25 | 83.2 | |

表 4 白英总苷对 HO-8 910 细胞的增殖抑制作用

| 药物 | 药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 抑制率(%) | IC_{50} 值 |
|-----|--|------------------|--------------------|
| 白英甾 | 5 | 33.96 \pm 2.51 | 14.55 \pm 4.04 |
| 体皂苷 | 20 | 53.49 \pm 2.58 | |
| | 40 | 73.81 \pm 2.97 | |
| 顺铂 | 25 | 83.93 | |

表 5 白英总苷对 K562(悬浮)细胞的增殖抑制作用

| 药物 | 药物浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 抑制率(%) | IC_{50} 值 |
|-----|--|------------------|--------------------|
| 白英甾 | 5 | 29.86 \pm 0.59 | 20.58 \pm 1.19 |
| 体皂苷 | 20 | 43.82 \pm 2.22 | |
| | 40 | 64.42 \pm 2.7 | |
| 顺铂 | 25 | 73.92 | |

3.2 对 HeLa 细胞生长的影响

不同浓度白英甾体皂苷作用于 HeLa 细胞生长的结果表明各浓度的白英甾体皂苷对 HeLa 细胞增殖均有抑制作用,并呈现浓度和时间依赖性。结果见表 6。

表 6 白英甾体皂苷对 HeLa 细胞生长的影响

| 组别 | 剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 细胞数 | | | | |
|---------|--------------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 0 小时 | 24 小时 | 48 小时 | 72 小时 | 96 小时 |
| 空白对照组 | 0 | 3×10^4 | 4.13×10^4 | 7.5×10^4 | 15.27×10^4 | 27.4×10^4 |
| | 5 | 3×10^4 | 3.8×10^4 | 6.27×10^4 * | 12.53×10^4 * | 20.47×10^4 * |
| 白英甾体皂苷组 | 20 | 3×10^4 | 3.73×10^4 | 3.33×10^4 Δ | 5.17×10^4 Δ | 8.3×10^4 Δ |
| | 40 | 3×10^4 | 3.43×10^4 * | 3.13×10^4 Δ | 3.53×10^4 Δ | 2.83×10^4 Δ |

注:与空白对照且比较,* $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$ 。

反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄制剂牛黄上清胶囊中胆红素的含量

★ 刘海涛 (江西天施康中药股份有限公司 鹰潭 335000)

摘要:目的:建立反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄制剂牛黄上清胶囊中胆红素的含量的方法。方法:固定相:Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:二甲基亚砜-乙腈-0.5 mol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 值为 5.3)(6:6:7);流速 1.0 mL/min;检测波长 452 nm。结果:胆红素在 7.30~72.93 μg/ml 的浓度范围内,线性关系良好($r=0.9999$);胆红素平均回收率($n=6$)99.4%($RSD=1.33%$)。结论:该含量测定方法快速、准确、有效,可以用于含体外培育牛黄的牛黄上清胶囊的质量控制。

关键词:胆红素;体外培育牛黄;牛黄上清胶囊;反相高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**B

牛黄上清胶囊是根据 90 版《中国药典》所载的牛黄上清丸剂改而成的中药新药。该药处方由牛黄、薄荷、菊花等 19 味中药组成。具有清热泻火,

散风止痛功效。牛黄具有清心、开窍、豁痰、凉肝、息风、清热解毒的作用,为该药之君。

在牛黄上清胶囊质量标准中,作为君药的牛黄

3.3 白英甾体皂苷对正常脾细胞的毒性作用

用 MTT 方法测定了白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的细胞毒性,试验结果见表 7。结果显示白英甾体皂苷对小鼠脾细胞亦显示一定的细胞毒性,但对比肿瘤细胞的 IC₅₀ 值可见,白英甾体皂苷对正常细胞毒性相对较低。

表 7 白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的毒性 IC₅₀

| 药物浓度(μg/ml) | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 |
|------------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 抑制率 | 2.31±1.04 | 4.49±2.03 | 8.64±1.34 | 24.9±1.35 | 57.85±2.71 |
| IC ₅₀ | 32.27±1.77 | | | | |

4 讨论

肿瘤防治方法主要有手术治疗、化学药物治疗、放射治疗治疗、中医治疗、生物治疗、基因治疗等方法,中医治疗具有副作用小等优点。本试验结果表明,白英甾体皂苷对 S₁₈₀ 细胞等五个有代表性的肿瘤细胞都有增殖抑制作用,尤其对 HeLa 细胞、人白血病 HO-8 910 细胞的抑制作用更加显著。表明白英甾体皂苷的抑制肿瘤生长具有普遍性,只是抑制程度稍有不同。任氏^[5]等人的研究也表明白英总苷对人肝癌 BEL-7402 细胞及人胃腺癌 SGC-7901 有显著的抑制作用。因此白英甾体皂苷的抑制肿瘤的作用还是比较广泛的。

为了进一步研究白英甾体皂苷抑制肿瘤细胞增殖的时效和量效关系,本试验以台盼蓝拒染细胞方法测定了白英甾体皂苷处理 HeLa 细胞后的生长曲线,试验结果显示白英甾体皂苷以浓度和时间依赖

性地抑制肿瘤细胞增殖。在作用 48 小时后作用已经比较明显,继续作用到 72、96 小时作用更加明显,显示白英的抗癌作用有比较长的药效作用。

现在临床上的很多药物由于对肿瘤细胞的选择性不强、全身用药毒性较大,而限制了其进一步的使用。本实验进一步研究了白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的细胞毒性,结果显示白英甾体皂苷对小鼠脾细胞虽然有一定的细胞毒性,但是对比对 HO-8 910、HeLa、S₁₈₀ 等肿瘤细胞的 IC₅₀ 值可见,白英甾体皂苷对于正常细胞的毒性相对较小,此结果提示白英甾体皂苷对肿瘤细胞的抑制作用有一定的选择性。

总之,本试验显示白英甾体皂苷具有较强的抗肿瘤作用,这种作用呈现一定的时效和量效关系,白英甾体皂苷对正常细胞毒性很小。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:291.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:700.
- [3] 孙立新,任靖,王敏伟,等. 白英水提物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 中草药,2006,37(1):98-100.
- [4] 任靖,冯国楠,王敏伟,等. 白英乙醇提取物抗肿瘤作用初步研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(6):497-500.
- [5] 任靖,冯国楠,王敏伟,等. 白英总苷抗肿瘤作用初步研究肿瘤防治研究[J]. 2006,33(4):262-264.

(收稿日期:2009-04-09 责任编辑:查青林)