

旱生香茶菜总二萜体外对10株人源性肿瘤细胞增殖的影响

田庆镔¹, 李玛琳², 孙汉董³

(1. 湘潭市中心医院临床药理学室, 湖南湘潭 411100; 2. 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 350204)

摘要:目的:研究旱生香茶菜总二萜(Diterpenoids of *Isodon Xerophilus*, IXD)体外对10株人源性肿瘤细胞增殖的影响。方法:采用改良MTT法或SRB法测试其在体外对10株人肿瘤细胞增殖的影响。结果:IXD对K562、CA、CNE、BGC、MKN、A549、T-24七株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值分别为5.42、6.17、11.05、19.20、24.00、24.04、25.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均小于30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对SKOV3、HeLa、GLC三株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值分别为735.3、740.5、 $2.13 \times 10^8 \mu\text{g}/\text{mL}$,均大于30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论:IXD在体外显示较强且广谱的细胞毒性。

关键词:旱生香茶菜总二萜; MTT; SRB; 细胞增殖**中图分类号:**R979.1**文献标识码:**B**文章编号:**1009-5276(2006)06-1097-03

二萜类化合物在自然界中广泛存在,生物活性多样,具有较强的抗微生物、抗肿瘤、抗氧化和清除自由基等作用。在众多天然产物中,二萜类化合物被认为是最有希望找到抗癌新药的五大类化合物(二萜、木脂体、苦木素、柄型化合物和生物碱)之一^[1]。从旱生香茶菜中分离出来的总二萜主要含有对映贝壳杉烷型二萜类化合物^[1]。本研究按照国家有关抗肿瘤药物评价的指导原则要求,对从旱生香茶菜中分离出来的总二萜IXD在体外进行了较系统的筛选。

1 材料和方法

1.1 细胞株 K562(人红细胞白血病细胞株),购自中国科学院昆明动物研究所;CA(人肝癌细胞株)、CNE(人鼻咽癌细胞株)、BGC-823(人低分化胃腺癌细胞株)、MKN28(高分化人胃腺癌细胞株)、A549(非小细胞肺癌细胞株)、T-24(人膀胱癌细胞株)、SKOV3(人卵巢癌细胞株)、HeLa(人宫颈癌细胞株)、GLC-82(人肺腺癌细胞株)等均购自中国科学院上海药物研究所。

1.2 样品 从旱生香茶菜中分离到的总二萜IXD(下文中“旱生香茶菜总二萜”均用英文缩写“IXD”),棕黄色粉状结晶,味苦,室温下水溶性较差,热水(50~70℃)中溶解性较好,有清香。室温下醇溶性较好,溶液呈棕黄色。由中国科学院昆明植物所孙汉董院士提供。

1.3 主要试剂 顺铂:注射剂,购于云南省肿瘤医院。云南个旧生物药业有限公司,批号:030601,生产日期:20030617。DMSO(二甲基亚砜):Merck生产。MTT(二甲基四氮唑盐):Sigma生产,批号:9710。SRB(磺酰罗丹明B):Sigma生产,批号:101K3645。特级无支原体新生牛血清:杭州四季青生物工程材料研究所生产,中国药品生物制品检定所检测,批号:20020114。Tris-HCL(三羟甲基氨基甲烷):Promega(USA)公司生产,批号:110116。TCA(三氯乙酸):分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心生产,批号:20030220。冰乙酸:分析纯,广东汕头市西陇化工厂生产,批号:030606。

1.4 IDX及顺铂的配制 IDX先用DMSO配制成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- [9] 李萍萍,徐博,杨新宇,等. 益气消症冲剂对放疗减毒作用的实验研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 1995, 4(2): 108
- [10] 罗志勇, 谭孟群, 王绮如, 等. 补益中药复方对环磷酰胺处理小鼠粒系造血的影响[J]. 中草药, 1998, 29(3): 181
- [11] 迟文, 徐静, 郭凌燕, 等. 杨梅多酚对血细胞与造血组织损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(1): 20
- [12] 王炳胜, 刘秀芳, 王涛, 等. 益气活血方治疗恶性肿瘤放射损伤的临床及实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(7): 43
- [13] 周爱香, 郭淑英, 田甲丽, 等. 生血康口服液升血作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1): 44
- [14] 朱燕, 张秀芹, 解砚英, 等. 扶正液的药效学研究[J]. 山东医药工业, 1997, 16(6): 36
- [15] 王劲, 杨锋, 沈翔, 等. 伸筋风抗肿瘤的实验研究[J]. 浙江中医

- 杂志, 1999, 34(10): 450
- [16] 张勇. 中药神龙液对小鼠S180肉瘤的放射增敏作用的研究[J]. 广西医科大学学报, 2000, 17(4): 549
- [17] 王伯先, 亢寿海, 张琴芬, 等. 扶正抑瘤冲剂对放疗的增效减毒作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(15): 1417
- [18] 白雅珍, 吴荣, 张银娟, 等. 小柴胡汤合并放疗对C57/BL荷瘤小鼠的实验研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2001, 15(3): 177
- [19] 许立, 张良, 王志刚, 等. 补肾升白液对荷瘤小鼠放疗增效减毒作用的实验研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2002, 4(4): 315
- [20] 王崇道, 强亦忠, 崔凤梅, 等. 中药方剂“三生养阴饮”的抗氧化和清除自由基作用[J]. 工业卫生与职业病, 2001, 27(6): 359
- [21] 刘健, 王慧颖, 沈英森, 等. 养胃方对荷瘤小鼠放疗损伤的防护作用研究[J]. 上海中医药大学学报, 2001, 15(4): 45
- [22] 李明, 蒋晓萌, 曹于平, 等. 养正合剂对化疗及放疗的减毒作用研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 847
- [23] 周宜强, 孙宏新, 孙君. 增效减毒口服液对恶性肿瘤患者放疗增效减毒作用的实验研究[J]. 中医杂志, 2002, 43(1): 63

收稿日期:2005-12-12

作者简介:田庆镔(1969-),男(土家族),湖南湘潭人,主管药师,硕士,研究方向:肿瘤药理学。

的母液后,再用生理盐水倍比稀释成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 个浓度,其中 DMSO 的浓度分别为 1%、0.1%、0.0%、0.001%、0.0001%。阳性对照药顺铂用生理盐水配制为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液后,再用生理盐水倍比稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度。所有样品均溶解充分,未见析出。样品和阳性对照的最高浓度组溶液呈浅黄色。

1.5 细胞培养^[2] K562 在含 15% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。取对数生长长期的细胞离心,用 4 g/L 台盼蓝染色后计算细胞活率 (Via > 98%),调整细胞悬液密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,备用。A549、BGC-823、CA、T-24、CNE、MKN-28、SKOV3、HeLa、GLC-82 九个细胞株在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长长期的细胞用 0.05% 胰蛋白酶消化离心,用 4 g/L 台盼蓝染色后计算细胞活率 (Via > 98%),并计数细胞,A549、BGC-823、CA、T-24、CNE、MKN-28、SKOV3、HeLa、GLC-82 的细胞浓度调整为 $4 \times 10^4/\text{mL}$,备用。

1.6 改良 MTT 法^[3] 将备用的 K562 细胞悬液接种于 96 孔板,90 $\text{mL}/\text{孔}$ 。加完细胞后直接加入受试样品,每孔 10 mL 。阴性对照为等体积的 N.S,阳性对照为等体积的顺铂。各加药组及对照组均设 6 个平行孔,每块板设 12 个调零孔(只加 RPMI1640 完全培养基)。样品的终浓度分别为 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 及 $10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$,相应 DMSO 的终浓度分别为 0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%。阳性对照药顺铂的终浓度为 10^{-1} 、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别孵育 48h 后,分别加入 MTT 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,10 $\text{mL}/\text{孔}$ 。继续培养 4h 后,加入三联液 [10% SDS - 5% 异丁醇 - 0.012 mL/L HCL (w/v/v)],100 $\text{mL}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12h 后,用酶标仪在 570 nm 、630 nm 双波长下测定各孔的 OD 值。

1.7 SRB 法^[3] 将备用的 A549、BGC-823、CA、T-24、CNE、MKN-28、SKOV3、HeLa、GLC-82 细胞悬液加入 96 孔板中,90 $\text{mL}/\text{孔}$ 。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4h 后,加入不同浓度的待测样品,每孔 10 mL 。阴性对照为等体积的 N.S,阳性对照为等体积的顺铂。各加药组及对照组均设 6 个平行孔。每块板设 12 个调零孔(只加 RPMI1640 完全培养基)。样品的终浓度分别为 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 及 102 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相应 DMSO 的终浓度分别为 0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%。阳性对照药顺铂的终浓度为 10^{-1} 、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别孵育 72h 后,分别加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 、50% 的 TCA (三氯乙酸) 50 $\text{mL}/\text{孔}$,加完 TCA 后,将 96 孔培养板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h,取出培养板,轻轻倾去板内液体。用自来水轻轻冲洗 5 遍(将自来水由烧杯中轻轻倒入板中,轻晃后,再将水倒去)。置于空气中风干至不见水痕。然后加入配制好的 0.4% SRB (用 1% 乙酸稀释),50 $\text{mL}/\text{孔}$,于室温下静置染色 30min 后,倾去 SRB 溶液,用 1% 乙酸冲洗 4 遍,除去未与蛋白质结合的染料。置于空气中风干至无水痕后,加入 10 mmol/L 未缓冲 Tris 溶液 150 $\text{mL}/\text{孔}$ (pH = 10,用三蒸水配制),将染料溶解后,振荡器上振荡 5min,570 nm 波长读取各孔 OD 值。

1.8 结果处理^[3] 计算各个受试样品不同测试浓度 OD

值的均数及标准差,并用下公式计算细胞存活率和增殖抑制率。细胞存活率 = (OD 样品 + 细胞 - OD 空白) / (OD 样品 + 阴性对照 - OD 空白) $\times 100\%$ 。细胞增殖抑制率 = 100% - 细胞存活率。

2 数据处理

用 GWBASIC 软件计算受试样品在体外对不同肿瘤细胞株细胞增殖的 IC_{50} , 相关系数 r 。

3 结果

改良 MTT 法测试结果显示,在浓度 0.01、0.1、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,IXD 对 K562 细胞株增殖的抑制率均 < 40%,当浓度增至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率 > 50%,分别为 56.47%、99.94%,且呈浓度依赖性,抑制率随浓度增加而增加;对 K562 细胞株的 IC_{50} 值为 5.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数 r 值为 0.96。SRB 法测试结果显示,在浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,IXD 对 CA、BGC-823、A549 三株细胞增殖的抑制率均 > 50%,当浓度增至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,IXD 对 CA、CNE、BGC-823、MKN-28、A549、T-24 六株人肿瘤细胞增殖的抑制率均 > 50%。IXD 对 CA、CNE、BGC-823、MKN-28、A549、T-24 七株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 6.17、11.05、19.20、24.00、24.04、25.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均小于 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数 (r) 分别为 0.88、0.95、0.89、0.47、0.82、0.47。且 CA、CNE、BGC-823、A549 四株细胞相关系数 r 值均大于 0.8。在浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,IXD 对 SKOV3、HeLa、GLC-82 三株人肿瘤细胞增殖的抑制率虽然均 > 80%,但 IC_{50} 值分别为 735.3、740.5、 $2.13 \times 10^8 \mu\text{g}/\text{mL}$,均大于 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数 (r) 分别为 0.28、0.28、0.20。

对 MTT、SRB 法测试结果 IC_{50} 值小于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 7 株细胞作柱形图比较,如图 1 所示。

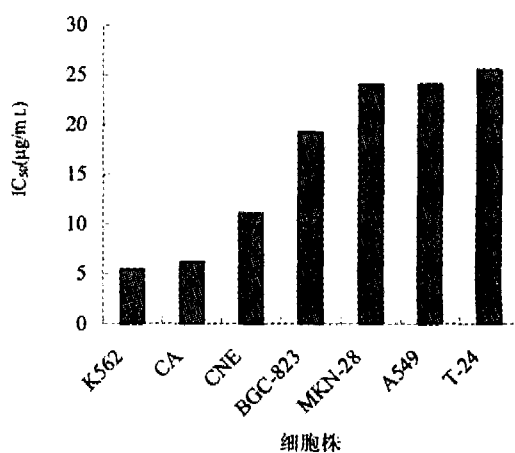


图 1 IXD 对 7 株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值比较

从图 1 可以看出,IXD 对 7 株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值均小于 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中效果最明显的是悬浮的人红细胞白血病细胞株 K562 和实体瘤人肝癌细胞株 CA。

4 讨论

根据国家新药(西药)研究指南规定,当植物提取物对肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 小于 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,化合物对肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 小于 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 才视为体外具有抗肿瘤活性^[5]。本研究受试样品 IXD 为植物提取物,在 IXD 体外抗

K562 肿瘤活性的研究结果发现, IC_{50} 值为 $5.42 \mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数 r 值为 0.96, 说明 IXD 对 K562 细胞有很强的细胞毒活性, 不同浓度的受试药 IXD 与其对 K562 的抑制率两变量之间呈正相关, 而且 r 值绝对值接近 1, 说明相关密切。

按照上述体外抗肿瘤活性的评价标准, 用 9 株 (A549、CA、BGC-823、CNE、T-24、MKN-28、GLC-82、SKOV3、HeLa) 常见人实体瘤细胞株对 IXD 的 5 个浓度 ($10^{-2} \sim 10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$) 以 SRB 法进一步进行体外细胞毒活性测试。IXD 对 CA、CNE、BGC-823、MKN-28、A549、T-24 六株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 6.17、11.05、19.20、24.00、24.04、25.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 均小于 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数 (r) 分别为 0.88、0.95、0.89、0.47、0.82、0.47, 说明 IXD 对上述六株人肿瘤细胞均有很强的细胞毒活性, 不同浓度的受试药 IXD 与其对相应人肿瘤细胞的抑制率两变量之间均呈正相关, 且 CA、CNE、BGC-823、A549 四株人肿瘤细胞相关系数 r 值均大于 0.8, 表明该四株人肿瘤细胞受试药浓度与抑制率密切相关。IXD 对 SKOV3、HeLa、GLC-82 三株人肿瘤细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 735.3、740.5、 $2.13 \times 10^8 \mu\text{g}/\text{mL}$, 均大于 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数 (r) 分别为 0.28、0.28、0.20, 说明 IXD 对上述三株人肿瘤细胞体外无抗增殖活性, 且相关不密切。

香茶菜属植物^[1]是我国民间广泛使用的草药, 供药用的约有 30 余种, 如河南省的冬凌草 (*I. rubescens*) 曾被收入《中国药典》, 特别是生产于河南省的冬凌草和毛叶香茶菜 (*I. japonica*) 具有明显的抗肿瘤活性。广东用溪黄草 (*I. serra*) 制成的溪黄草茶等制剂为保肝、肝炎和肝癌的保健治疗药已有商品, 也是消炎利胆片的主要成分。根据赵长琦^[4]等人的统计, 香茶菜属许多二萜类成分具有抗肿瘤活性。早生香茶菜在民间广泛作为清热解毒的凉茶饮用。IXD 是从植物早生香茶菜的茎叶中分离到的一个有效部位, 本研究显示, IXD 对人肿瘤细胞株具有强而较广谱的细胞毒活性。这也提示从植物类群, 依据植物亲缘关系与化

学成分相关性原理寻找新药仍不失为捷径^[6]。

虽然 IXD 具有细胞毒性强、抑瘤谱较广的特性, 但由于单体结构各异, IXD 成分复杂, 使它们对肿瘤细胞的抑制作用因肿瘤细胞类型的不同而异, 此外发挥作用的时间、浓度也因肿瘤细胞类型的不同而不同。因此进一步对单体的构效关系、单体和 IXD 体内作用以及作用机理进行深入的探讨都将有重要意义。

5 结论

体外实验表明, IXD 对 K562、CA、CNE、BGC-823、MKN-28、A549、T-24 七株人肿瘤细胞增殖均有很强的抑制作用。IXD 对 SKOV3、HeLa、GLC-82 三株人肿瘤细胞均无抗增殖活性。

参考文献:

- [1] Sun H D, Xu Y N, Jiang B. Diterpenoids form Isodon Species (香茶菜属植物二萜化合物) [M]. Beijing: Science Press, 2001. 93-105
- [2] Song JD, Zhang JB, Zhang SF, et al. Organization and cell train technology (组织和细胞培养技术) [M]. The third edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. 134-135
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. Methodology in Pharmacological Experiment (药理实验方法学) [M]. The third edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. 1784-1789
- [4] Ministry of Health of the People's Republic of China's medicine political situation. Study the guideline to collect before the new medicine (Western medicine) is clinical (新药(西药)临床前研究指导原则汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993. 137-139
- [5] Zhao CQ, Xu YL, Wang YZ. Antitumor plant medicine and effective composition (抗肿瘤植物药及其有效成分) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing House, 1997. 203
- [6] Sun MQ, Zhou YC. Chinese medicine research and development (中国药物研究与发展) [M]. Beijing: Science Press, 1996. 18-25

The Cytotoxicity of Diterpenoids of Isodon Xerophilus (IXD) in Ten Human Tumor cell Lines in Vitro

Tian Qinge¹, Li Malin², Sun Handong³

(1. The Xiangtan Central Hospital Clinical Pharmacy Room, Xiangtan 411100, Hunan, China;

2. Kunming Medical College Key Laboratory of the Natural medicine pharmacology, Kunming 650204, Yunnan, China;

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, Yunnan, China)

Abstract: *Objective:* The antitumor activity of Diterpenoids of Isodon Xerophilus (IXD) was studied in ten human tumor cell lines in vitro. *Methods:* The cytotoxicity of Diterpenoids of Isodon Xerophilus (IXD) in ten human tumor cell lines was measured by modified MTT or SRB assay in vitro. *Results:* The IC_{50} in seven human tumor cell lines K562、CA、CNE、BGC、MKN、A549、T-24 was 5.42、6.17、11.05、19.20、24.00、24.04、25.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ separately, the above-mentioned values were less than 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$; While there were little affection to cell proliferation in SKOV3、HeLa、GLC cell lines, the IC_{50} in three human tumor cell lines SKOV3、HeLa、GLC was 735.3、740.5、 $2.13 \times 10^8 \mu\text{g}/\text{mL}$ separately, the above-mentioned values were more than 30.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *Conclusion:* The above results indicated IXD had strong cytotoxicity for 7 human tumor cell lines in vitro, with wide active spectrum.

Key words: Diterpenoids of Isodon Xerophilus (IXD); MTT; SRB; cell proliferation