

金丝桃细胞毒作用和抗肿瘤作用研究

项光亚¹, 杨 瑜², 阮金兰², 周宜开¹(1. 华中科技大学同济医学院环境医学研究所, 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030)

摘要:目的: 研究金丝桃体外细胞毒作用和体内抗肿瘤作用。方法: MTT 和 SRB 体外实验法和皮下注射给药体内抗肿瘤法。结果: 体外细胞毒研究表明, 提取物 F003、F004、F006 以及化合物金丝桃内酯丙、槲皮素、槲皮苷对不同的癌细胞具有细胞毒作用; 体内皮下注射 20mg/(kg·d) × 10d 剂量的 F003、F004、F005 对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤的抑制率分别为 20.7%、12.4%、31.4%。结论: 金丝桃在体外实验显示一定的细胞毒作用, 体内实验有抗肿瘤作用, 具有进一步研究开发的价值。

关键词: 金丝桃; 细胞毒作用; 抗肿瘤作用

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2001)01-0016-03

Studies of cytotoxic effect and antitumor effect by *Hypericum chinense*

XIANG Guang-ya¹, YANG Yu², RUAN Jin-lan², ZHOU Yi-kai¹. (1. Environmental Medical Institute of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei, Wuhan 430030, China; 2. Pharmacy College of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To study the cytotoxic effect in vitro and antitumor effect in vivo of *hypericum chinense*.

METHODS: MTT and SRB assay method in vitro and antitumor test in vivo were used. **RESULTS:** The extracts F003, F004, F006 and the compounds hyperlacton C, quercetin, quercitrin show cytotoxic effect on different carcinoma cell in vitro; Under the dose of 20.0mg/(kg·d) × 10d, the inhibitory rates of F003, F004, F005 on S₁₈₀ in mice were 20.7%, 12.4%, 31.4%. **CONCLUSION:** *Hypericum chinense* show cytotoxic effect in vitro and antitumor effect in vivo and should be studied further.

KEY WORDS: *hypericum chinense*; cytotoxic effect; antitumor effect

从植物中寻找抗肿瘤药物, 已成为国内外抗肿瘤药物研究的重要组成部分。金丝桃是藤黄科金丝桃属植物, 具有清热解毒、祛风湿、消肿等功效^[1]。从该属植物贯叶金丝桃中分离出的金丝桃素, 在体外实验中, 能抑制神经胶质细胞的生长且成剂量依赖关系^[2]。作者此前研究发现^[3] 金丝桃对 DNA 损伤有很好的保护作用。本文研究了金丝桃提取物和

从金丝桃中分离得到的化合物的体外细胞毒作用和体内抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明种小鼠, 体重 18~25g, 雌雄兼有, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

[3] Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test[J]. Anal Biochem, 1978, 86: 271.

[4] Dumont AE. Interstitial albumin-bound dye concentrations in mice with a protein-rich effusion[J]. Proc Soc Exp Biol Med 1990, 194: 221.

[5] Waagstein LM, Jivegard L, and Waljamae H. Hypertonic saline infusion with or without dextran 70 in the reperfusion phase of experimental acute limb ischaemia[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997, 13: 285.

[6] Groeneveld ABJ, Raijmakets PGHM, Rauwerda JA, et al. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect in postoperative pulmonary function[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997, 14: 351.

[7] Baue AE. MOF/MODS, SIRS: an update[J]. Shock, 1996, 6: pp. s1.

[8] Gorgen I, Hartung T, Leist M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against ipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor[J]. J Immunol, 1992, 149: 918.

1.1.2 人癌细胞株 人肝癌细胞株 Bel-7402、人结肠癌细胞株 HCT-8、人白血病细胞株 HL-60、人鼻咽癌细胞株 KB 和人胃癌细胞株 BGC-823 均由北京大学医学部天然药物与仿生药物国家重点实验室细胞室提供。

1.1.3 小鼠移植瘤株 小鼠肉瘤 S₁₈₀ 由同济医科大学药学院药物研究室提供。

1.1.4 受试样品及试剂 金丝桃采自湖北省恩施自治州鹤峰县并经鹤峰县药检所洪家祥先生鉴定, 提取物 F003、F004、F005、F006、F007、F008 及化合物 I、II、III、IV、V、VI 均由本课题组提取分离得到, 经结构鉴定, 化合物 I、II、III、IV 分别为 β-谷甾醇、槲皮素、槲皮苷、金丝桃内酯丙。5-氟尿嘧啶 (5-Fu, 上海第十二药厂); RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B, SRB, Sigma 公司, 用 1% 醋酸配成 0.4% 的溶液); 溴化四唑蓝 (Tetrazoliumbromide, MTT, Sigma 公司, 用无血清 RPMI 1640 培养液配成 1mg/ml 的溶液); 小牛血清 (上海伯奥生物技术公司); 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 体外 SRB 比色法^[4,5] 取对数生长期人肝癌细胞 Bel-7402、人结肠癌细胞 HCT-8、人鼻咽癌细胞 KB 和人胃癌细胞 BGC-823 分别接种于 96 孔培养板中, 每孔 100μl。设阴、阳性对照及不同浓度的受试药物组, 各组设 4 个平行孔, 于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养。培养 48~96h 后, 向培养板每孔中加入预冷的三氯乙酸液固定, 4℃ 放置 1h, 使悬浮细胞固定在培养孔的底部。倒掉固定液, 小孔用二次蒸馏水洗 5 遍, 甩干, 空气干燥。每孔加入 100μl SRB 液, 室温放置 10min。未与蛋白结合的 SRB 用 1% 醋酸液冲洗。结合的 SRB 用 150μl 10mmol/L 的 Tris 液溶解。用酶标定量仪 Mode 400 测定 540nm 处光密度值。计算肿瘤细胞抑制率, 并求出半数抑制浓度 (IC₅₀) 进行评价。

1.2.2 体外 MTT 比色法^[5,6] 取对数生长的人白血病细胞 HL-60 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100μl。设阴、阳性对照及不同浓度的受试药物组, 各组设 4 个平行孔, 于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养, 培养 72h 后, 每孔加入 MTT 50μl, 37℃ 温育 4h, 使 MTT 还原为 Formazan。吸出上清液, 加入 100μl 酸化异丙醇, 振荡 5min, 使 Formazan 溶解。最后用酶标定量仪 Mode 400 测定 570nm 处光密度值。计算肿瘤细胞抑制率, 并求出半数抑制浓度 (IC₅₀) 进行评

价。

1.2.3 金丝桃体内抑制小鼠 S₁₈₀ 肉瘤生长实验^[7,8]

取接种 6~8d 的 S₁₈₀ 瘤源小鼠, 颈椎脱臼致死。消毒后剪开并剥去皮肤, 用无菌注射器从腹腔抽出腹水, 放入无菌小瓶, 按 1:3 加入灭菌生理盐水将腹水稀释, 作为接种液。将小鼠右前肢腋下消毒后, 于皮下注入接种液 0.4ml, 约 2 × 10⁶ 细胞。将动物随机分组, 每组 10 只小鼠。于接种 24h 后, 腹腔内给药, 连续 10d。停药 24h 后处死动物, 称体重, 解剖剥离瘤块, 称瘤重。计算肿瘤抑制率, 并进行统计分析。

2 结果

2.1 金丝桃对肿瘤细胞生长的抑制作用

我们考察了金丝桃 6 种提取物和 7 种化合物在浓度分别为 1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml 条件下对五种体外培养癌细胞生长的抑制作用。表 1 列出了在 100μg/ml 时抑制率超过 50% 的受试物结果。

表 1 金丝桃对肿瘤细胞生长的抑制率% (浓度为 100μg/ml)

受试物	细胞株	方法	抑制率	IC ₅₀ (μg/ml)
F003	KB	SRB	58.42	81
F004	KB	SRB	95.43	71
	HL-60	MTT	88.47	68
F006	Bel-7402	SRB	53.87	92
	HL-60	MTT	72.25	75
IV	KB	SRB	98.77	2.6
II	HCT-8	SRB	59.68	83
	BGC-823	SRB	59.06	82
	KB	SRB	55.52	92
	HL-60	MTT	50.00	100
III	Bel-7402	SRB	67.81	65

结果如表 1 所示, 这些提取物和化合物对不同的癌细胞株显示有不同的敏感性, 并呈现一定的剂量-效应依赖关系。如 F003、F004、金丝桃内酯丙、槲皮素在 1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml 对 KB 癌细胞生长的抑制率分别为 0.68%、2.90%、58.42%; 8.03%、12.26%、95.43%; 10.03%、95.76%、96.77%; 1.90%、5.46%、55.52%。F004、F006、槲皮素在 1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml 对 HL-60 癌细胞生长的抑制率分别为 -23.06%、-19.08%、88.47%; -0.47%、-3.20%、72.25%; -26.94%、16.63%、50.00%。F006、槲皮苷在 1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml 对 Bel-7402 细胞癌生长的抑制率分别为 5.52%、15.82%、53.87%; 18.99%、18.99%、67.81%。槲皮素在 1μg/ml、10μg/ml、100μg/ml 对 HCT-8、BGC-823 癌生长细胞的抑制率分别为 -2.70%、2.51%、59.68%; 5.71%、8.56%、59.06%。上述结果显示,

F004、F006 和槲皮素在低剂量(1 μ g/ml、10 μ g/ml)时刺激 HL-60 细胞的生长,而在高剂量(100 μ g/ml)时则能有效抑制癌细胞的生长。结果同时表明槲皮素对 4 种癌细胞都有一定抑制作用,而金丝桃内酯丙对 KB 细胞则有很强的抑制作用,其 IC_{50} 仅为 2.6 μ g/ml。因此,体外研究结果表明,金丝桃提取物 F003、F004、F006 以及化合物金丝桃内酯丙、槲皮素、槲皮苷在体外对癌细胞生长有不同程度的抑制作用。

2.2 金丝桃对小鼠 S₁₈₀肉瘤生长的抑制作用

我们研究了金丝桃 3 种提取物对小鼠 S₁₈₀肉瘤生长的抑制作用,结果如表 2 所示:

表 2 金丝桃提取物对小鼠 S₁₈₀肉瘤生长的抑制作用

药物	剂量 mg/kg	给药途径× 疗程(d)	体重变化率 (%)	瘤重 (g)	抑制率(%)
对照			35.7	1.21	
5-Fu	20.0	SC×10	24.0	0.52	57.0
F003	20.0	SC×10	32.7	0.96	20.7*
	5.0	SC×10	40.2	1.03	14.6*
	2.5	SC×10	44.6	1.24	-2.7
F004	20.0	SC×10	43.5	1.06	12.4*
	5.0	SC×10	43.7	1.00	9.1*
	2.5	SC×10	20.8	1.02	15.7*
F005	20.0	SC×10	36.3	0.83	31.4*
	5.0	SC×10	44.1	0.94	22.3*
	2.5	SC×10	45.6	1.05	13.2*

与对照组比较: * $P < 0.01$

给药过程中,给药组动物的一般情况和进食量与对照组动物没有明显差异,而且也无毒副作用出现。从对肿瘤生长抑制结果看,金丝桃提取物对小鼠肉瘤 S₁₈₀生长有一定的抑制作用,并以 F005 组抑制率为最高。

3 讨论

作者此前的研究表明,金丝桃能有效防止自由基对 DNA 的损伤^[3]。通过本文研究发现金丝桃具有一定的体外细胞毒作用和体内抗肿瘤活性。其中槲皮素对所研究的四种肿瘤细胞均有一定的抑制作用。这一结果与近年来国外对槲皮素的研究结果一致,槲皮素的抗肿瘤活性在动物实验中已得到确证,并已有将槲皮素用于癌症治疗的专利报道。而金丝桃内酯丙对鼻咽癌细胞则有强烈的抑制作用。金丝桃内酯丙结构中含有内酯结构,这一结构是许多抗癌药的活性基团,其对 KB 细胞的抑制作用可能与此结构有关。因此,作者认为这两种化合物有进一步研究开发的价值。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院.《中药大辞典》缩印本(上册)[M].上海:上海科学技术出版社,1986:1388
- [2] Couldwell WT, Gopalakrishna R, Hinton DR, et al. Hypericin: a potential antiangioma therapy[J]. Neurosurgery, 1994, 35(5): 993.
- [3] 项光亚,周宜开.化学发光法检测金丝桃对 DNA 损伤的保护作用[J].同济医科大学学报,2000,29(3):209
- [4] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. Natl. Cancer Inst, 1990, 82: 1107.
- [5] 韩锐.抗癌药物研究与实验技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学出版社,1997:271~321.
- [6] Camichael J, DwGriff WC, Gazdar AF, et al. Evaluation of a tetrazolium based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity[J]. Cancer Res. 1987, 47:936.
- [7] 张绣珍,沈方兰,王建华,等.牛黄酸对 S₁₈₀肉瘤小鼠的抑瘤作用[J].青岛医学院学报,1996,32(2):106.
- [8] 钟进义,张丰运,张艳滨. A-CM 海洋生物制剂对小鼠 S₁₈₀肉瘤抑制作用研究[J].畸变.突变,1998,10(6):365

收稿日期:2000-06-27

(上接第 64 页)

本刊文献格式规定如下,投稿请以下列格式为准:

[期刊]作者.题(篇)名[J].刊名,年,卷号(期号):起始页.

例 1:高峰,孔宪涛,刘焱,等.血清层粘连蛋白 ELISA 检测及其在肝病中的临床意义[J].解放军医学杂志,1994,19(2):83.

[专著(书)]作者.书名[M].版本(第 1 版可省略).出版地:出版者,出版年.起止页(所在页)或析出责任者.析出题(篇)名.见(In):原文献的责任者.原文献的题(篇)名 A.版本.出版地:出版者,出版年.起止页(所在页).

例 2:曹雪涛.白细胞介素 2 的临床与基础[M].北京:北京科学技术出版社,1990:55~60.

例 3:陈英勇.气胸[A].见:戴自英主编.实用内科学[M].第 9 版.北京:人民卫生出版社,1993,924~926.

[会议论文集]作者.题(篇)名[A].见(In):文集的编者.文集名[C],会议名,会址,开会年.出版地:出版者,出版年.页次.

[专利]专利申请者.专利题名[P].专利国别,专利号,出版日期.

[报纸]作者.题(篇)名(N).报纸名,年月日(版次).