

水菖蒲抗癌活性研究

—— α -细辛醚对人癌细胞株的抗癌活性

南京市儿童医院 胡伯渊 纪耀沅

内容提要 本文报告水菖蒲挥发油提取物 α -细辛醚对 SGC-7901、Detroit-6、Hela 等人癌细胞株的抗癌活性。观察人癌细胞形态学改变，还应用活细胞染色计数及测定细胞生长率等方法，进行了动态的定量研究。结果均表明 α -细辛醚能选择性的抑制及杀伤人癌细胞。

我们对水菖蒲挥发油中提取物 α -细辛醚(α -Asarone)进行肿瘤细胞形态学及动态活细胞染色计数比较，表明它对人癌细胞株有一定的抗癌活性。

材 料

细胞株：人胃癌 SGC-7901，人肺转移癌 Detroit-6，均由上海市肿瘤研究所提供。人宫颈癌 Hela 由首都儿科研究所提供。

药品： α -细辛醚为我院制剂室生产的静脉注射针剂(批号 800221)，为 0.5% 浓度的灭菌水溶液(配方为 α -细辛醚 0.5g，95%乙醇 5ml，吐温-80 3g，注射用水加至 100ml)，pH 6.5~7.0。环磷酰胺，注射用(批号 800924)，粉剂，上海第十二制药厂生产。

方法和结果

一、 α -细辛醚作用下的肿瘤细胞形态学改变：待 SGC、D₆、Hela 细胞株长成单层后，制成细胞悬液，分别接种于一批培养管中，每管 1 ml，37℃ 培养。

1. 生长 48 或 72 小时后，分组加 α -细辛醚 25 μ g/ml，并设正常、环磷酰胺 200 μ g/ml 及含相应稀释含量的溶剂对照组。观察 48 或 72 小时各组细胞形态学改变及生长情况。结果：正常对照组细胞伸展好，境界清楚，胞质均匀，核大，核仁清晰，生长良好，基本形成致密单层。在 α -细辛醚作用下，细胞伸展不良，胞质混浊，颗粒增多，细胞出现干枯圆缩，或呈肿胀，胞质内出现大小不规则的泡性结构，细胞质膜局部似发生破裂，细胞可出现拉网状变化，最终导致细胞脱落、破坏、溶解。且可以看出细胞生长稀疏，繁殖受抑制。环磷酰胺对照组的作用则远较 α -细辛醚为弱。相应的溶剂对照未见明显影响。

2. SGC、D₆细胞生长 48 小时后，分组加入不同剂量 α -细辛醚，其细胞圆缩、脱落时间随剂量增大而缩短，与不同剂量环磷酰胺对照组比有明显差别。见表 1。

表 1 α -细辛醚作用下肿瘤细胞圆缩、脱落时间对比

	剂 量 (μ g/ml)	圆缩、脱落时间(天)	
		SGC 细胞	D ₆ 细胞
α -细辛醚	100.00	1	2
	50.00	2	4
	25.00	4	6
	12.50	5	7
	6.25	6	9
	3.13	6	轻度抑制
	1.60	9	无影响
环磷酰胺	200.00	9	9
对 照 组	100.00	10	9
	50.00	10	10
	25.00	无明显变化	无明显变化

二、 α -细辛醚对 SGC 细胞株有效抑制浓度(ED₅₀)的测定：待 SGC 细胞长成单层后，制成 10 万/ml 的细胞悬液，分别接种于培养管，每管 1 ml，37℃ 培养。48 小时后，换成含不同浓度的 α -细辛醚的培养液，对照组则换不含药物的培养液。再过 48 小时后，机械方法吹打分散细胞，用曙红(或台盼兰)排除法计数活细胞数，每管测 3 次，以 3 管活细胞数的平均数绘制其生长抑制效应的表格及图(表 2，图 1)，以及细胞生长的抑制曲线(图 2)，测出 ED₅₀。

$$\text{生长率} = \frac{\text{各实验组的细胞数}}{\text{对照组的细胞数}} \times 100\%$$

表 2 α -细辛醚对 SGC 细胞株的生长抑制效应
(万/ml M $\pm$ SD)

			10.42 $\pm$ 0.88 Δ	1 $\pm$ 0.09 (测算值)	SGC 生 长率(%)
2 天 后	正常对照组		37.80 $\pm$ 2.56	3.63 $\pm$ 0.25	100
	加 α -细 辛醚组	100*	0.40 $\pm$ 0.40	0.04 $\pm$ 0.04	1.06
		50	6.97 $\pm$ 1.24	0.67 $\pm$ 0.12	18.44
		25	15.63 $\pm$ 1.87	1.50 $\pm$ 0.18	41.35
		12.5	22.30 $\pm$ 3.81	2.14 $\pm$ 0.37	58.99
		6.25	29.60 $\pm$ 4.74	2.84 $\pm$ 0.46	78.31

* 剂量(μ g/ml) Δ 指 SGC 细胞接种在培养液中的数量

以正常对照组的生长率为 100%，造成 50% 生长抑制的药物浓度作为 ED_{50} 。结果表明， α -细辛醚的 ED_{50} 接近于 $25\mu\text{g/ml}$ 。

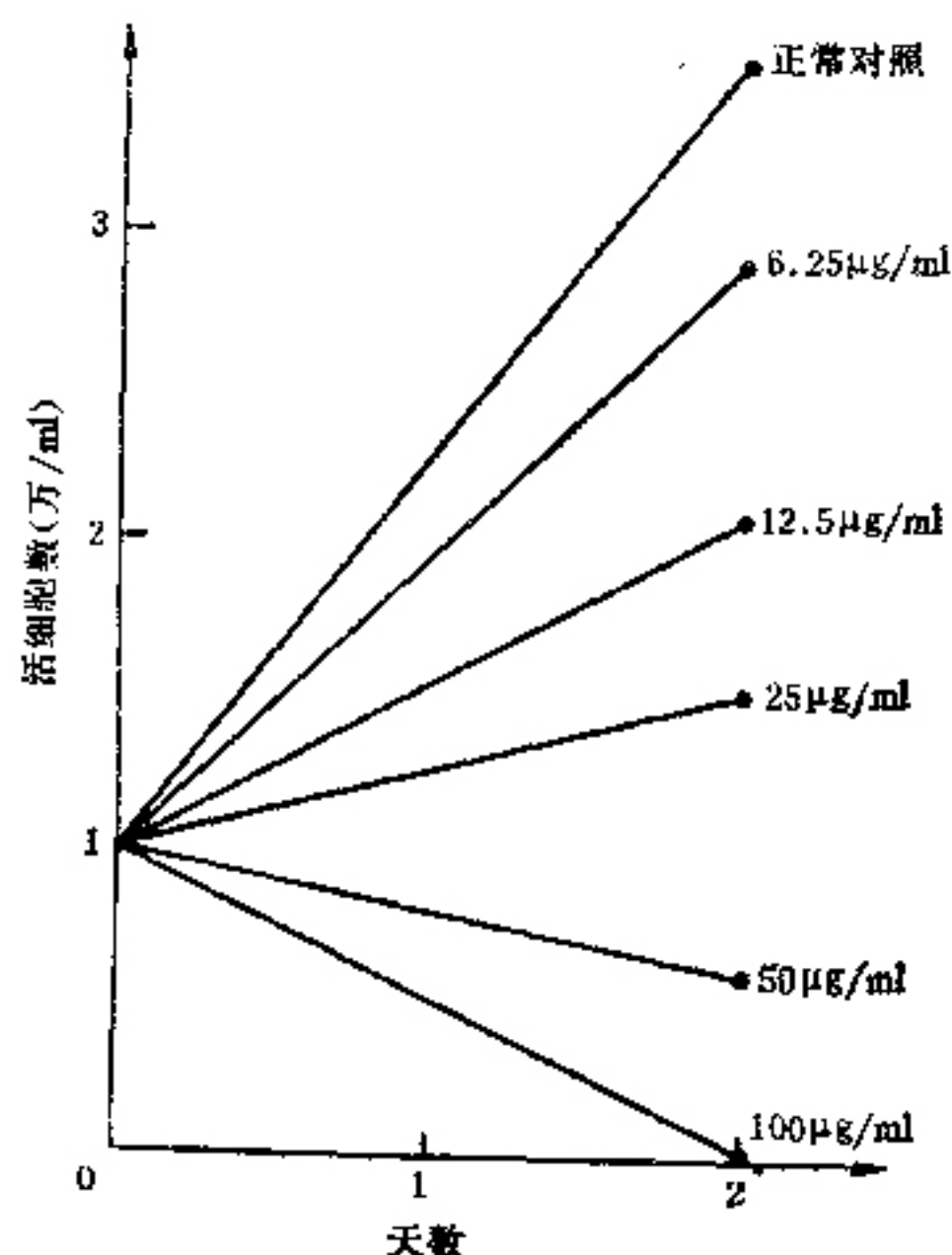


图 1 α -细辛醚对SGC细胞株的生长抑制效应

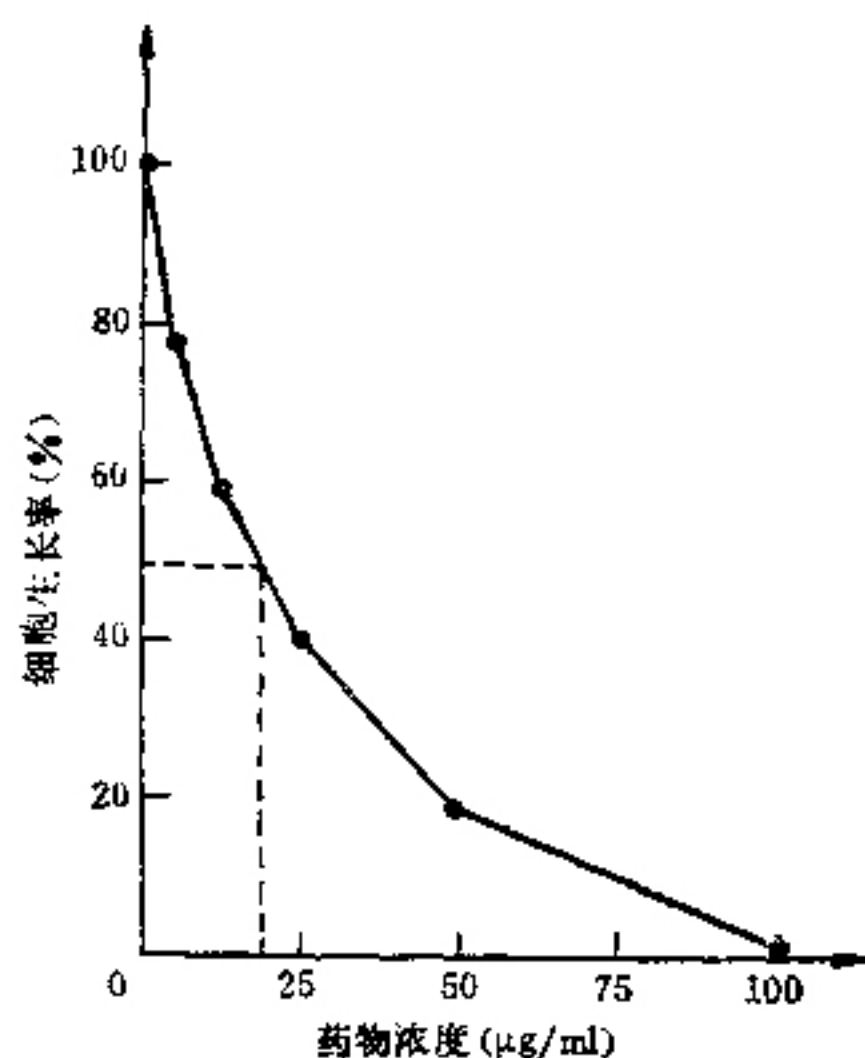


图 2 α -细辛醚对SGC细胞株生长的抑制曲线

ml，或环磷酰胺 $100\mu\text{g/ml}$ 。药物乙组是细胞接种 48 小时后，才分别换成含上述药物的生长液。正常对照组，换新鲜生长液。在加药后的 1~6 或 7 天，每天从各组中取出 3 支培养管，每管测 3 次活细胞数。以平均数制表并绘制生长曲线(见表 3，图 3、4)，并测定生长率(表 4)。结果表明 α -细辛醚对 SGC 细胞株有较强的生长抑制作用，且与环磷酰胺对照组的作用相比，经统计学方差分析及多组比较 q 检验结果表明：差异显著。

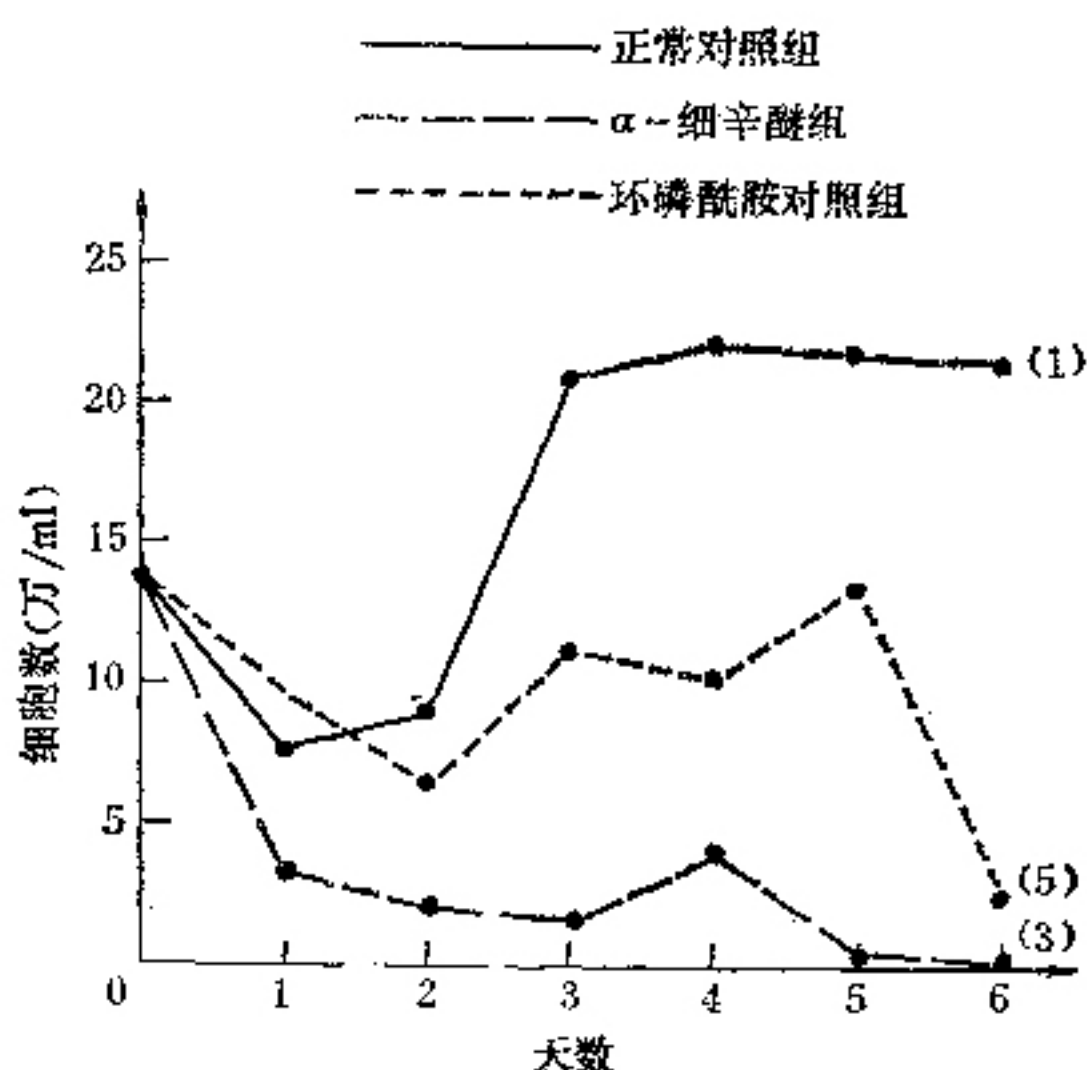


图 3 α -细辛醚作用下甲组活细胞染色计数

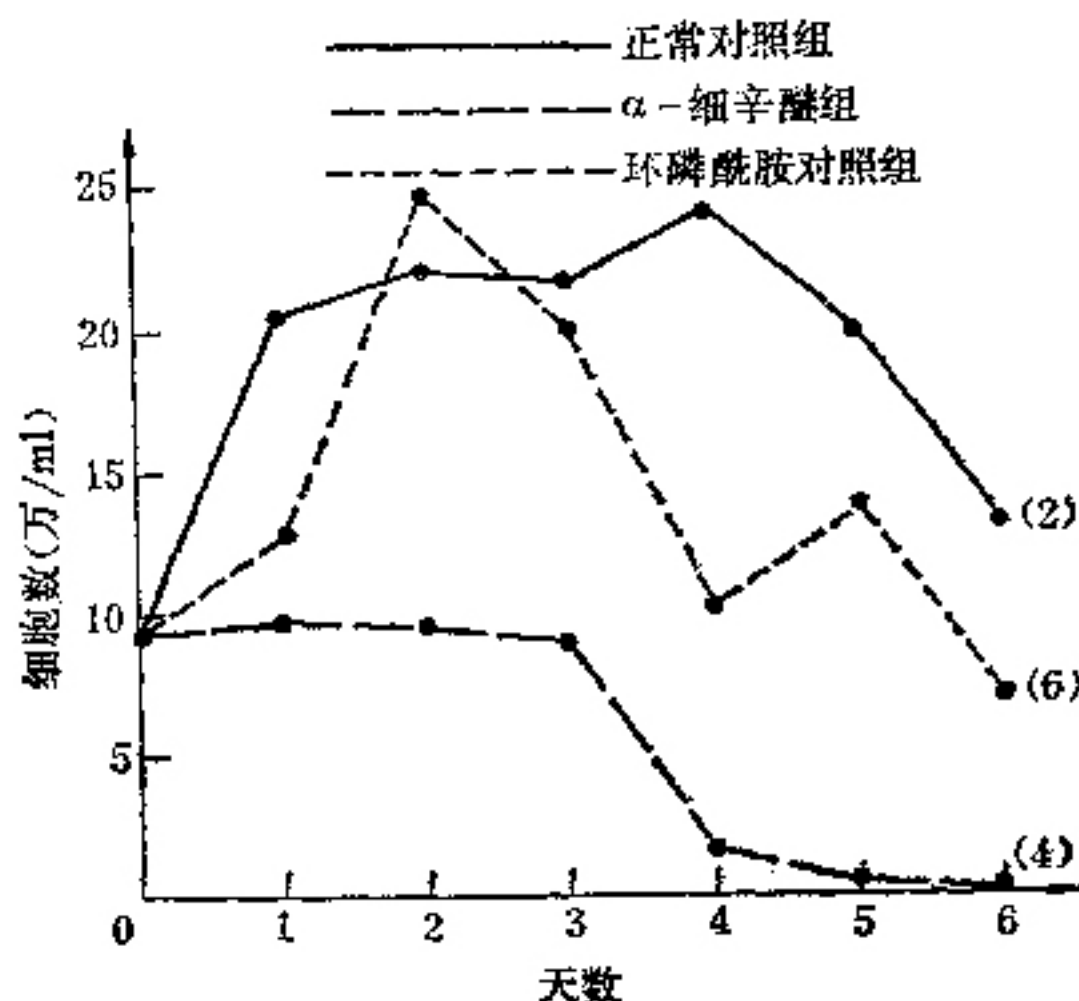


图 4 α -细辛醚作用下乙组活细胞染色计数

三、 α -细辛醚对 SGC 细胞株的生长抑制试验。按上述方法将 SGC 细胞株消化，计数，接种。药物甲组是细胞接种同时，生长液内分别加 α -细辛醚 $25\mu\text{g/}$

表 3 在 α -细辛醚作用下各组活细胞染色计数 (万/ml $M \pm SD$)

		接 种	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
甲 组	正常对照组(1)		7.84 $\pm$ 2.00	9.40 $\pm$ 0.94	20.58 $\pm$ 5.37	22.18 $\pm$ 3.62	21.73 $\pm$ 3.21	21.80 $\pm$ 7.01
	α -细辛醚 (3)	13.9 $\pm$ 1.31	3.40 $\pm$ 0.94	2.13 $\pm$ 0.39	1.64 $\pm$ 0.33	4.27 $\pm$ 1.02	0.16 $\pm$ 0.11	0
	环磷酰胺对照组(5)		9.53 $\pm$ 1.49	6.80 $\pm$ 1.84	11.29 $\pm$ 1.78	9.96 $\pm$ 2.37	13.18 $\pm$ 3.31	2.47 $\pm$ 0.73
	P 值	三组比较 α 与环比较	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
乙 组	正常对照组(2)		20.58 $\pm$ 5.37	22.18 $\pm$ 3.62	21.73 $\pm$ 3.21	24.38 $\pm$ 5.61	20.07 $\pm$ 4.68	13.38 $\pm$ 4.21
	α -细辛醚 (4)	9.40 $\pm$ 0.94	9.58 $\pm$ 1.29	9.49 $\pm$ 2.37	8.93 $\pm$ 2.0	1.73 $\pm$ 0.84	0.33 $\pm$ 0.31	0.07 $\pm$ 0.01
	环磷酰胺对照组(6)		12.58 $\pm$ 1.14	24.53 $\pm$ 2.43	20.0 $\pm$ 4.93	10.31 $\pm$ 2.53	13.62 $\pm$ 3.57	7.00 $\pm$ 2.63
	P 值	三组比较 α 与环比较	—	<0.01 >0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 4 α -细辛醚作用下的 SGC 细胞株生长率的测定 (生长率%)

		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
α -细辛醚	甲组(3)	43.37	22.66	7.97	19.25	0.74	0
	乙组(4)	46.55	42.79	41.10	7.10	1.64	0.52
环磷酰胺对照	甲组(5)	121.56	72.34	54.86	44.91	60.65	11.33
	乙组(6)	61.13	110.66	92.04	42.29	67.82	52.32

四、 α -细辛醚对 SGC 细胞株抑制及杀伤作用的可逆性问题: (1)取 6 管生长 48 小时的 SGC 细胞。其中 2 管作正常对照。另 4 管换含有 α -细辛醚 25 μ g/ml 的培养液, 48 小时后观察细胞形态变化。结果发现细胞较正常为稀, 且胞质中颗粒增多, 细胞境界较清。然后再换成不含 α -细辛醚的培养液, 逐日观察细胞情况。结果细胞生长虽较正常缓慢, 但仍能继续生长成片。

(2)取 8 管生长 48 小时的 SGC 细胞。其中 2 管作正常对照。4 管换含有 α -细辛醚 50 μ g/ml 的培养液, 作用 48 小时、96 小时, 分别换成不含 α -细辛醚的培养液。前者 SGC 细胞仍能继续生长成片, 后者细胞圆化增多, 换液后 SGC 细胞未能继续生长。另 2 管换含有 α -细辛醚 100 μ g/ml 的培养液, 作用 48 小时后, 则细胞大部圆化, 少许呈拉网状, 虽又换成不含 α -细辛醚的培养液, 但仍脱落死亡。这表明, 当 α -细辛醚浓度低或作用时间不足时, 抑制或杀伤作用可表现一定的可逆性。

五、 α -细辛醚对正常人胚肾(HK)细胞株的生长抑制试验: 制备人胚肾细胞, 待生长 5 天后, 按上述方法消化, 计数, 接种。实验组培养液含 α -细辛醚 25

表 5 α -细辛醚作用于 HK 细胞的活细胞染色计数 (万/ml $M \pm SD$)

	接 种	2 日	5 日
正常对照组		25.60 $\pm$ 7.10	28.16 $\pm$ 1.59
α -细辛醚组	15.18 $\pm$ 1.98	20.13 $\pm$ 2.17	9.16 $\pm$ 2.16
P 值	—	t=1.45 P>0.05	t=13.91 P<0.01

μ g/ml, 设正常对照组。2 天、5 天时, 分别计数活细胞数(表 5)。

根据下列公式计算药物对细胞生长的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组活细胞数} - \text{实验组活细胞数}}{\text{对照组活细胞数}} \times 100\% \quad (\text{IR})$$

表 6 α -细辛醚对 HK 细胞及 SGC 细胞的 IR (%)

	2 天	P 值	5 天	P 值
甲组 SGC 细胞	77.34	} t=3.5 P<0.01 t=2.7 P<0.01	99.26	} t=3.5 P<0.01 t=3.3 P<0.01
HK 细胞	21.37		67.47	
乙组 SGC 细胞	57.21		98.36	

同样浓度的 α -细辛醚对甲、乙两组SGC细胞的IR可从表4得出,三组的结果见表6。

对比研究结果表明, α -细辛醚对HK和SGC两种细胞显然均有抑制作用,但对SGC细胞的抑制作用比对HK细胞为强,在统计学上均有显著性差异。

讨 论

一、水菖蒲(*Acorus calamus* L)能辟秽开窍,宣气逐痰,解毒杀虫。国内对国产水菖蒲的研究自1971年起日见增多,主要围绕在应用于慢性气管炎、小儿肺炎、癫痫等疾病的治疗方面^[1],并取得了一定效果。

α -细辛醚(α -Asarone)是从水菖蒲的挥发油中分离、提制、制备的活性成分,分子式 $C_{12}H_{16}O_3$ 。它显示了与菖蒲疗效相似的催眠、镇静、止痛、抗惊厥、平喘、镇咳、祛痰等药理活性,对溶血性金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、大肠杆菌均有不同程度的抑制作用^[1]。而本文报告了它抗人癌细胞株的研究。

二、我们除观察细胞形态变化外,应用活细胞染色计数及测定细胞生长率的方法,进行 α -细辛醚对肿瘤细胞抑制及杀伤的定量研究。除习用的人癌细胞Hela株、D₅株以外,SGC-7901细胞株系我国首次人胃癌细胞培养建株的人类胃癌细胞株^[2]。研究结果显示了 α -细辛醚对SGC、D₅、Hela等人癌细胞株有一定的抗癌活性,其抑制及杀伤作用,不仅有药物浓度的依赖性,也有作用时间的依赖性,药物浓度越大,作用时间越长,则抑制及杀伤作用越大。 α -细辛醚导致

肿瘤细胞发生一系列变化的作用方式、代谢环节等,还有待进一步研究。

三、实验表明,如果 α -细辛醚浓度低或作用时间短,虽对细胞的繁殖有一定的抑制或杀伤作用,但这种作用有一定的可逆性。要发挥较好的效果,应考虑剂量和作用时间两方面的因素,尤其是剂量,如试用于临床,要注意剂量和疗程。

四、我院从水菖蒲的干燥根茎切片中可提挥发油2.62%,其中含 α -细辛醚12.75%, β -细辛醚37.12%,然后再将 β -细辛醚转成为 α -细辛醚。

我院曾应用 α -细辛醚肌肉注射或静脉滴注治疗小儿肺炎,应用2~4mg/kg/日,分二次静滴,以一岁小儿为例,每次按2mg/kg计,则用20mg,血液稀释后浓度为25 μ g/ml,与本实验选用剂量相近。本实验环磷酰胺选用剂量较大,以利对照。在治疗肺炎的临床观察中,也系统观察了用药期间患儿的心电图、肝功能、肾功能、血压、白细胞、尿常规等检查,均无不良影响^[1]。由此可见,本药有毒性小,副作用少,使用安全方便,药源广,成本低等优点。本实验结果表明, α -细辛醚在对正常细胞损害较少的条件下,能对肿瘤细胞有一定的选择性抑制及杀伤作用。

参 考 文 献

- 1.南京市儿童医院, α -细辛醚注射液治疗小儿肺炎110例。江苏医药1979;5(5):39.
- 2.林超鸿,等。人体胃腺癌细胞株SGC-7901的建立。肿瘤1981;1(1):1.

慢心律对室性早搏的疗效与中医辨证关系的观察

天津市李七庄医院内科

庞华威

我们对1982~1984年我院门诊及住院患者中154例室性早搏病人进行了中医辨证分型,并观察了慢心律(Mexiletine)在各型中的疗效,简要报道如下。

临床资料 本文154例中男98例,女56例;年龄17~70岁;154例中冠心病94例,风心病4例,病毒性心肌炎6例,高血压性心脏病(部分合并冠心病)21例,肺心病11例,其他原因18例。154例中呈联律性者38例。中医辨证分型:心气虚41例,心阴虚30例,气阴两虚33例(偏气虚18例,偏阴虚15例),阴虚阳亢28例,气滞血瘀14例,痰湿阻络8例。本组病例均无明显心功能不全,近1个月内未用过毛地黄类药物。单纯使用慢心律治疗,剂量300mg/日,分3次口服;若3日无效,剂量增加至450mg/日,分3

次口服;若3日仍无效时改用其他药物治疗。

治疗结果 154例中有效者(早搏减少50%以上,由联律变为不联律)111例,占72.1%。心气虚型有效22例,占53.7%;心阴虚型有效27例,占90.0%;气阴两虚型有效23例,占69.7%;阴虚阳亢型有效26例,占92.9%;气滞血瘀型有效8例,占57.1%;痰湿阻络型有效5例,占62.5%。经统计学处理,本组病例经慢心律治疗效果阴虚阳亢型高于心气虚型、气滞血瘀型($P<0.01$)及气阴两虚型、痰湿阻络型($P<0.05$);心阴虚型亦高于心气虚型、气滞血瘀型($P<0.01$)及气阴两虚型($P<0.05$)。本文提示在使用慢心律治疗室性早搏时,若能结合中医辨证分型可能收到更好效果。

Effects of Alkaloids of *Corydalis Decumbens* on Cerebral and Peripheral Circulation in Dogs

Wang Dayuan (王大元), et al

Jiangxi Institute of Medical Sciences, Nanchang

Effects of the total alkaloids of *Corydalis decumbens* (TACD) and its principal alkaloid, protopine, on cerebral and peripheral circulation were studied in 75 anesthetized dogs.

TACD 1 mg/kg given intra-arterially induced a significant increase of cerebral blood flow, a striking reduction of its vascular resistance and a falling of the systemic blood pressure. When the cerebral vessels were in a hypertonic state induced by noradrenaline, intra-arterial injection of TACD could still show the same reactions, but could not affect the vasoconstricting response of serotonin on the cerebral vessels. TACD 5mg/kg given intravenously showed no significant influence on cerebral blood flow and its vascular resistance. For peripheral blood flow, 1 mg/kg of TACD administered intra-arterially induced a significant increase of femoral blood flow and a marked decrease of its vascular resistance; but such effects were not recorded in i.v. given TACD 5 mg/kg.

Protopine 0.2 mg/kg given intra-arterially produced similar effects both on cerebral and femoral circulation as TACD 1 mg/kg given intra-arterially. Intravenous injection of protopine 2 mg/kg caused an increase of both cerebral and femoral blood flow, a reduction of their vascular resistance and a falling of the systemic blood pressure. These results indicate that TACD and protopine possess the effect of vasodilation on cerebral and peripheral vessels.

(Original article on page 477)

A Research on Anticarcinogenic Activation of *Acorus Calamus*

—Anticarcinogenic Activation of α -Asarone on Human Carcinoma Cells

Hu Boyuan (胡伯渊), Ji Yaoyuan (纪耀沅)

Nanjing Children's Hospital, Nanjing

This paper reports that α -asarone, a substance refined from volatile oil of *Acorus calamus*, can kill human cancer cells, such as SGC-7901, Detroit-6 and Hela. Its anticarcinogenic activation is discussed in detail. The dosage for effective action of α -asarone on ED₅₀ of SGC cells was found to be about 25 μ g/ml. α -Asarone was observed to cause a series of morphological changes in human carcinoma cells and finally damage them, and make them drop out and resolve, in addition to inhibition of cell multiplication.

A quantitative study was made on the ability of α -asarone to kill cancer cells by counting the stained living cells and measuring cell growth rate. The effect was found to be closely associated with the concentration of the drug and reaction time. The result shows that the drug can selectively inhibit and kill human carcinoma cells with less damage to the normal HK cells.

(Original article on page 480)

A Study on Anti-Infection Effect of Chinese Traditional Ointment for External Application

—Effect on Activation of Peritoneal Macrophages of Mice and Their Phagocytosis

Li Xiulan (李秀兰), et al

Tianjin Institute of Orthopedics, Tianjin

In order to probe the anti-infection effect of Chinese traditional ointment for external application, the authors studied macrophage immunization activated by ointments of Jin Huang (金黄), Huang Lian (黄连) and Yu Hong (玉红) after the study of Sheng Ji (生肌) ointment. The experimental results indicated that these ointments had marked activation and phagocytosis as well as the ability to digest foreign body of peritoneal macrophages. It is higher than the control ($P < 0.001$). Thus these ointments had similar good anti-infection effect though their properties and cases for their clinical application are different. The results of the study suggest that anti-infection effect of the Chinese traditional ointment for external application is different from antibiotics and western medicine for external application, since their chief action is not direct bacteriostasis but modulation and enhancement of the body's immunization.

(Original article on page 486)