

• 实验研究 •

紫草萘醌单体分离物的
抗癌生物效应测试

北京市肿瘤研究所(北京 100034)

路桂荣 廖 静 李延钧 刘伟莉 武纯净 李 赤 郭 征

内容提要 紫草萘醌单体分离物-LⅢ(简称紫草素),是从中草药紫草中提纯的一种新的有效成份。本实验应用多项指标,检测了紫草素对人胃癌和人食管癌来源的两种细胞系的抗癌生物效应。实验显示:在紫草素剂量为 $3\sim 5\mu\text{g/ml}$ 的条件下,癌细胞的生长曲线、分裂指数均受抑制,而人来源的正常细胞未见明显影响;在剂量为 $5\sim 10\mu\text{g/ml}$ 情况下,癌细胞的集落形成率受到抑制。紫草素的抗癌生物学效应可能与它降低癌细胞RNA含量以及对癌细胞超微结构的影响有关。

关键词 紫草萘醌单体-LⅢ 癌细胞系 抗癌生物效应

在抗癌药研究中,化疗药的研究和临床应用已取得很大的进展^①。但是如何制备疗效高而副作用小的抗癌药,仍是亟待解决的问题。近几年来,从中草药中寻找新的抗癌药,日益证明是个很有前途的方向^{②,③}。国内曾有报道,以中国新疆紫草为原料分离出若干抗癌活性成份,对小鼠腹水型肉瘤₁₈₀抑制率达90%以上^④。郭征等也曾报到了紫草对Hela肿瘤细胞的抑制作用^⑤。最近,长春中医学院利用植化的方法,提纯出紫草有效成份——紫草萘醌单体分离物,我们利用培养细胞对其进行了检测,为这种紫草提纯物早日作为抗癌药应用于临床治疗提供部分实验依据。

材料与方 法

一、细胞与细胞培养

1. 细胞:(1)BGC823细胞:人胃癌细胞(以下简称823细胞)。(2)ECa 109细胞:人食管鳞癌细胞以(以下简称109细胞)。(3)羊膜细胞:正常人胚的羊膜来源。(4)小儿包皮成纤维细胞:正常人细胞来源。

2. 细胞来源:除109细胞由中国医学科学院提供,823细胞由北京人民医院提供,其它细胞均由本室提供。

细胞培养于含20%小牛血清的1640培养液中,其它同常规细胞培养法。

二、测试物以及剂量的确定

1. 测试物:紫草萘醌单体分离物LⅢ(以下简称紫草素或LⅢ)。pH值:6.9。生产日期:1988年2月2日。

来源:由长春中医学院中医研究所马赤主任药师提供。

2. 药物剂量确定:分别检测LⅢ $0.1\mu\text{g/ml}$ 、 $1.0\mu\text{g/ml}$ 、 $3\mu\text{g/ml}$ 、 $5\mu\text{g/ml}$,以及 $10\mu\text{g/ml}$ 浓度下823细胞的生长曲线。结果显示剂量 $3\sim 5\mu\text{g/ml}$ 时,对823细胞生长有抑制作用,而对正常细胞生长无明显影响; $10\mu\text{g/ml}$ 以上对正常细胞和肿瘤细胞有细胞毒性作用。低于 $3\mu\text{g/ml}$ 的浓度对癌细胞无明显影响,故选 $5\mu\text{g/ml}$ 作为实验主要剂量。

三、实验分组:每种细胞各分加药组和对照组。

四、观察指标

1. 细胞生长曲线:823细胞和羊膜细胞每瓶接种量为 $5\times 10^4/3\text{ml}$,小儿包皮成纤维细胞 $8\times 10^4/2\text{ml}$,接种细胞后第24h给药,每天每组计数3瓶,共计6天,绘出生长曲线图。

2. 细胞核分裂指数:小皿直径3.5cm,铺有盖玻片,接种823细胞和羊膜细胞2万/2ml,小儿包皮成纤维细胞 $7\times 10^4/2\text{ml}$ 细胞接种后第24h加药,观察细胞时,取出盖玻片行Giemsa染色,数2000个细胞中的核分裂相,算出千分率。

3. 细胞集落形成率:培养皿直径5cm,每皿接种分散的823细胞 $2\times 10^2/3.5\text{ml}$,加药组接种同时给药,观察不同浓度紫草素对细胞集落形成率的影响并绘图。

4. 细胞微核形成率:细胞接种与染色方法同指标2,观察加药后2000个细胞中的微核百分率,微核确

认标准按参考文献⁽⁶⁾。微核是主核旁独立的小核，能反映细胞核特别是染色体是否受影响。

5. 吖啶橙染色观察：取长有细胞的盖玻片行吖啶橙染色⁽⁶⁾。荧光显微镜下，细胞核呈绿色显示DNA，胞浆桔黄色显示RNA。

6. 细胞超微结构的观察：细胞加药的第4天，与对照组同时取材。先将细胞刮下，离心后用2.5%戊二醛先固定1h，2%锇酸后固定1.5h，系列脱水后，618环氧树脂包埋，行透射电镜观察。

结 果

一、细胞生长曲线

823细胞加药后第2~6天，与对照组相比，生长曲线明显下降，细胞生长抑制率达64%。109细胞加药组的细胞计数下降更明显，细胞生长抑制率高达37%。羊膜细胞和小儿包皮成纤维细胞的加药组和对照组细胞无明显区别(图1~4)。

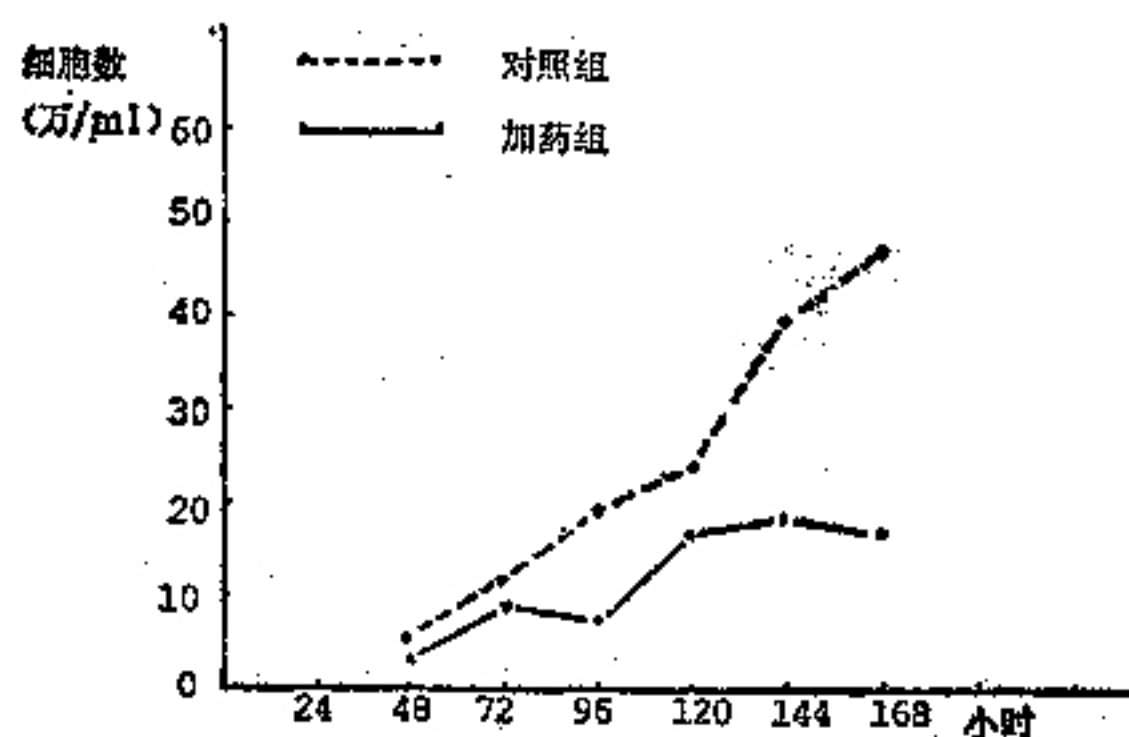


图1 823细胞生长曲线

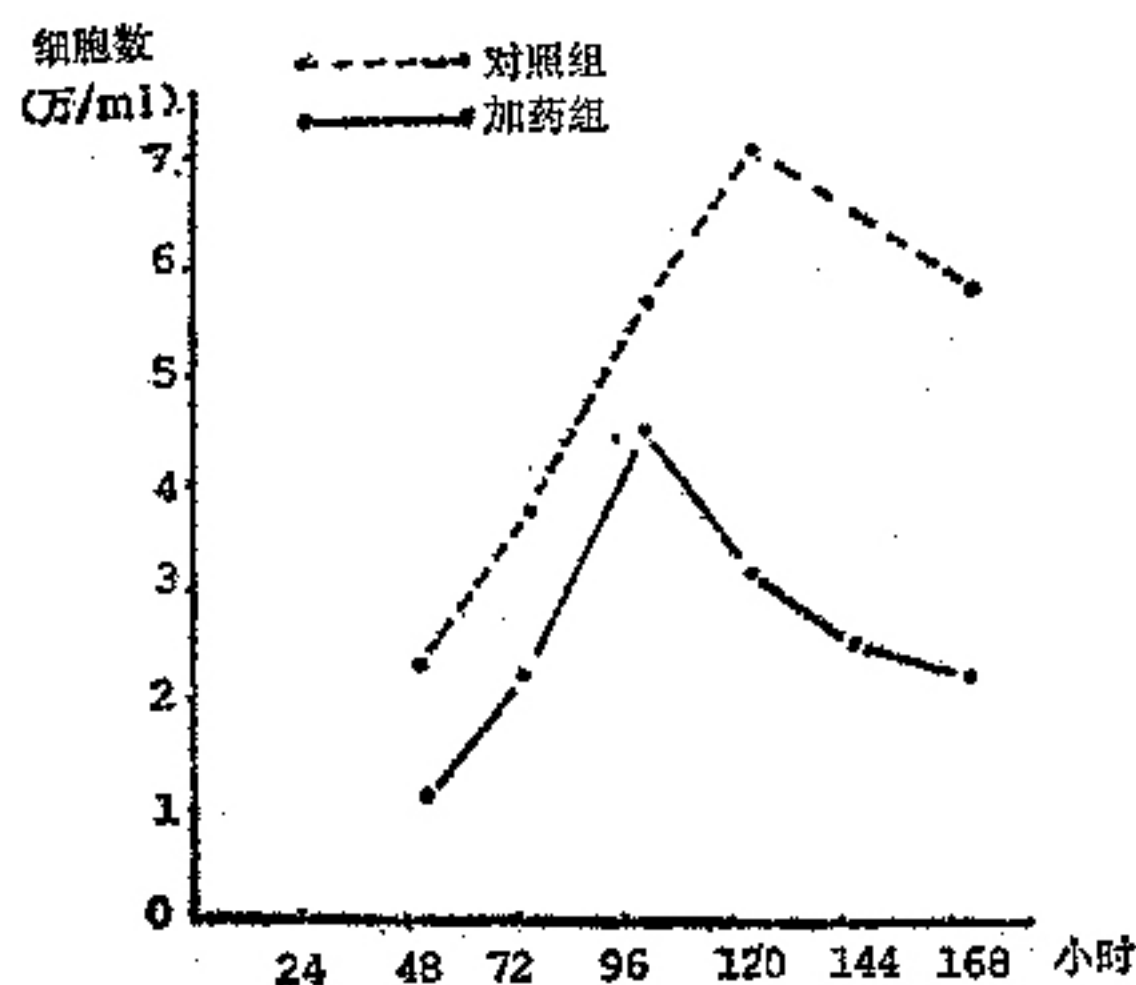


图2 109细胞生长曲线

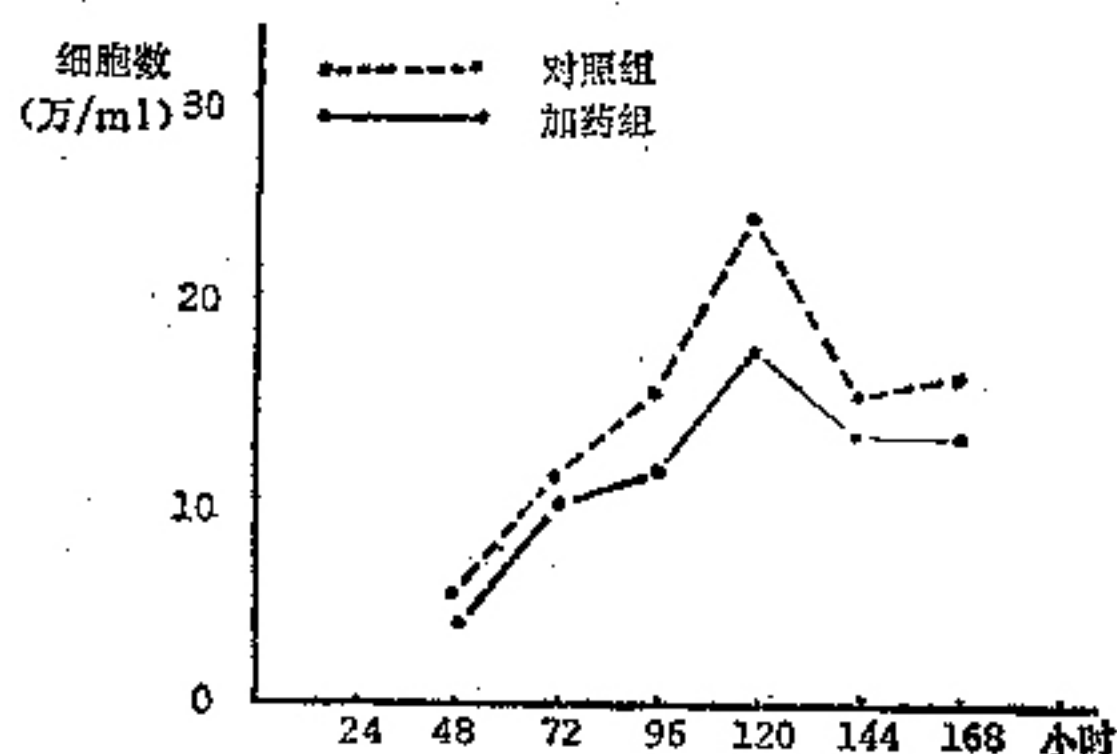


图3 人羊膜细胞生长曲线

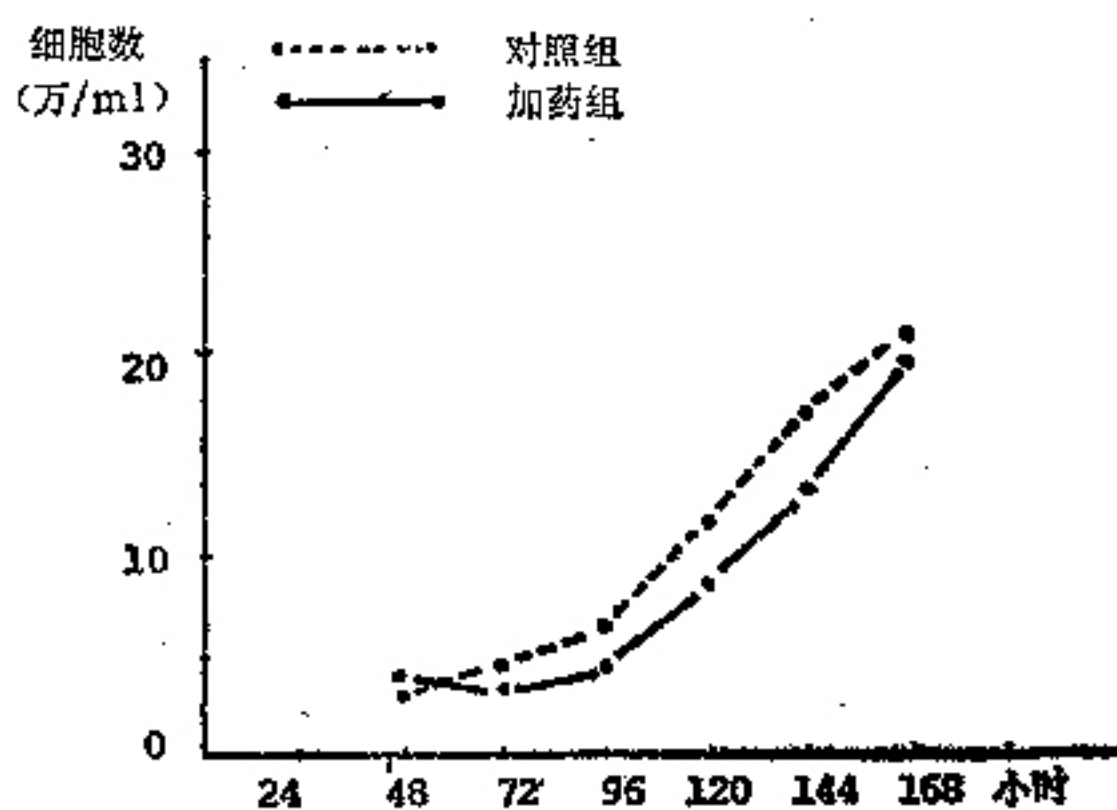


图4 小儿包皮成纤维细胞生长曲线

二、细胞核分裂指数

加药第3~6天，823细胞对照组核分裂指数迅速增高，而加药组无明显上升，羊膜细胞和小儿包皮成纤维细胞的加药组与对照组无明显差异(图5)。

三、细胞集落形成率

紫草素浓度1 $\mu\text{g/ml}$ 和2 $\mu\text{g/ml}$ 对823细胞集落形成率未见有抑制作用，5 $\mu\text{g/ml}$ 时才产生明显抑制效应(表1)($P < 0.05$)。抑制率在38~95%。而浓度在1 $\mu\text{g/ml}$ ~7 $\mu\text{g/ml}$ 时，均能抑制109细胞集落形成率(表1)($P < 0.01$)。抑制率为54~100%，说明紫草素对109细胞作用更敏感。

四、微核形成率

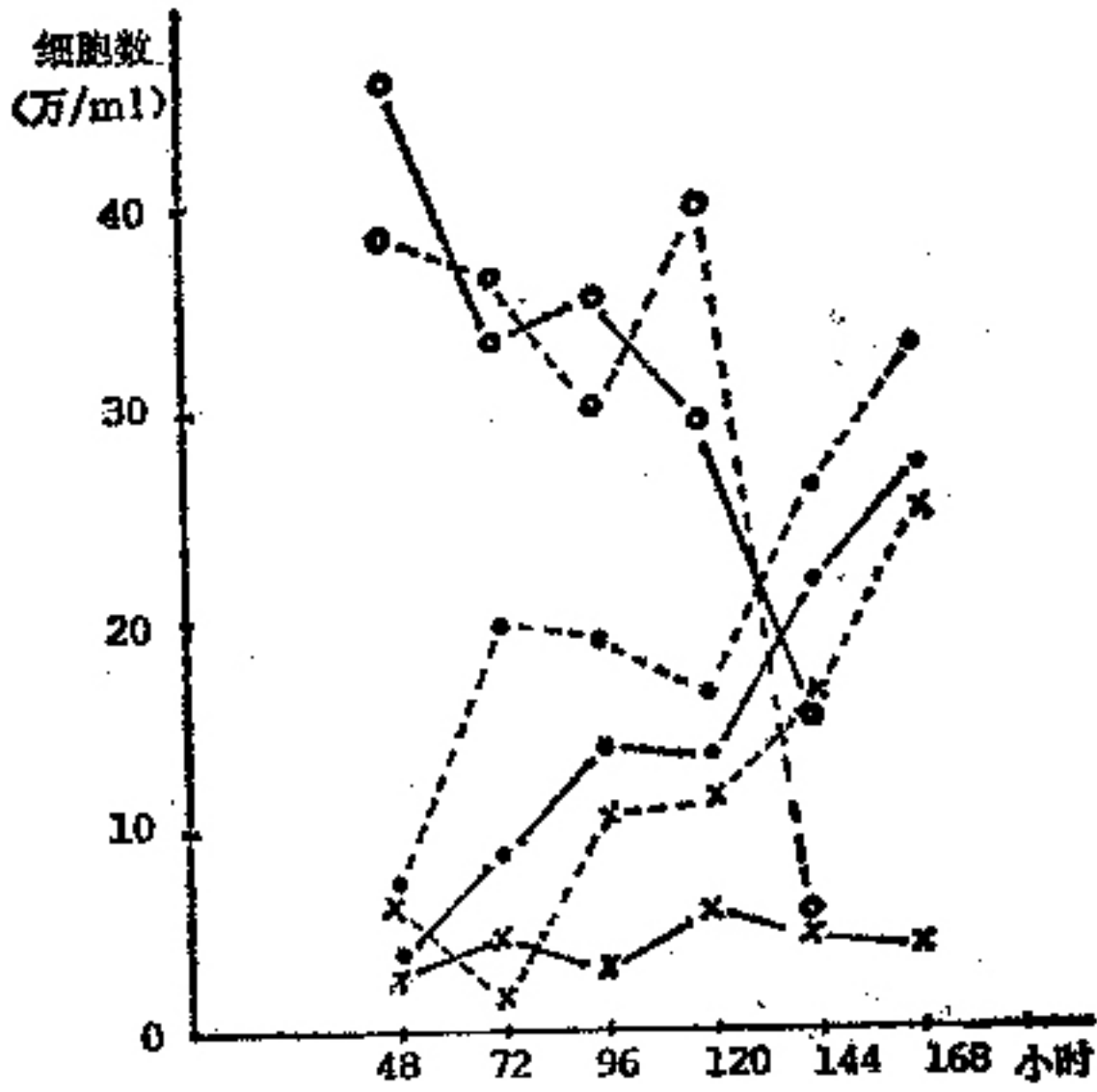
观察三种不同细胞的微核形成率，其对照组与加药组之间未见明显差异。

五、吖啶橙染色荧光显微镜观察，见表2。

823细胞加药组胞质呈橘黄色，提示RNA合成可能受一定影响。

六、细胞超微结构的观察

与相应的对照组比较，两种癌细胞的超微结构均有变化。加药组823细胞胞浆内的内质网明显减少，而



× 823 细胞对照组
 × —— 823 细胞加药组
 • 羊膜细胞对照组
 • —— 羊膜细胞加药组
 • 小儿包皮成纤维细胞对照组
 • —— 小儿包皮成纤维细胞加药组

图 5 不同细胞分裂指数

表 1 紫草素对癌细胞集落形成率的影响 ($\bar{x} \pm S$)

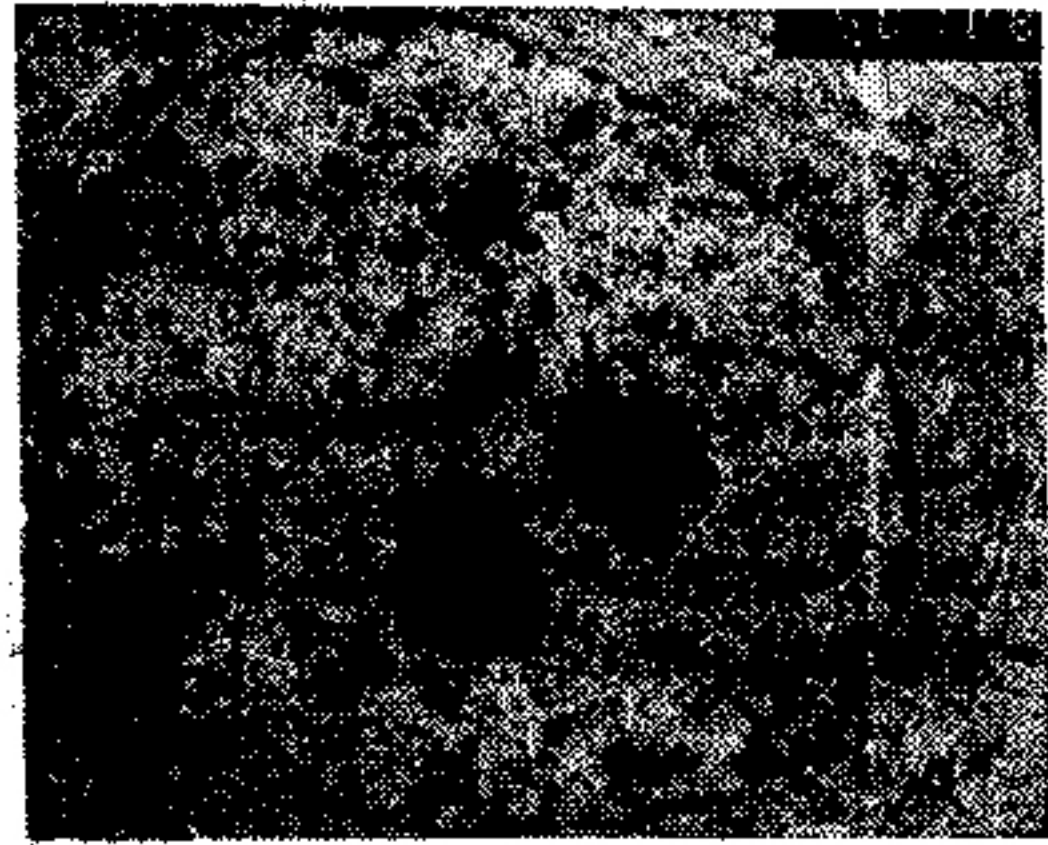
编组	823 细 胞		109 细 胞	
	药浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	集落形成率 (%)	药浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	集落形成率 (%)
(1)		30.8 ± 6.04		24.00 ± 2.92
(2)	1	$43.8 \pm 1.36^*$	1	$8.88 \pm 3.18\Delta$
(3)	2	36.5 ± 3.98	3	$1.63 \pm 0.86\Delta^*$
(4)	5	$18.8 \pm 4.07^*$	5	$0.25 \pm 0.17\Delta$
(5)	10	$0.2 \pm 0.2\Delta\Delta$	7	$0\Delta^*$

注: 与对照组比* $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, 与前一组比 $\Delta P < 0.01$, $^*P < 0.05$

表 2 吖啶橙荧光染色观察

分组	823 细胞		羊膜细胞		小儿包皮成纤维细胞	
	核	胞质	核	胞质	核	胞质
对照	亮绿	橘红	亮绿	橘红	亮绿	橘红
加药	亮绿	橘黄	亮绿	橘红	亮绿	橘红

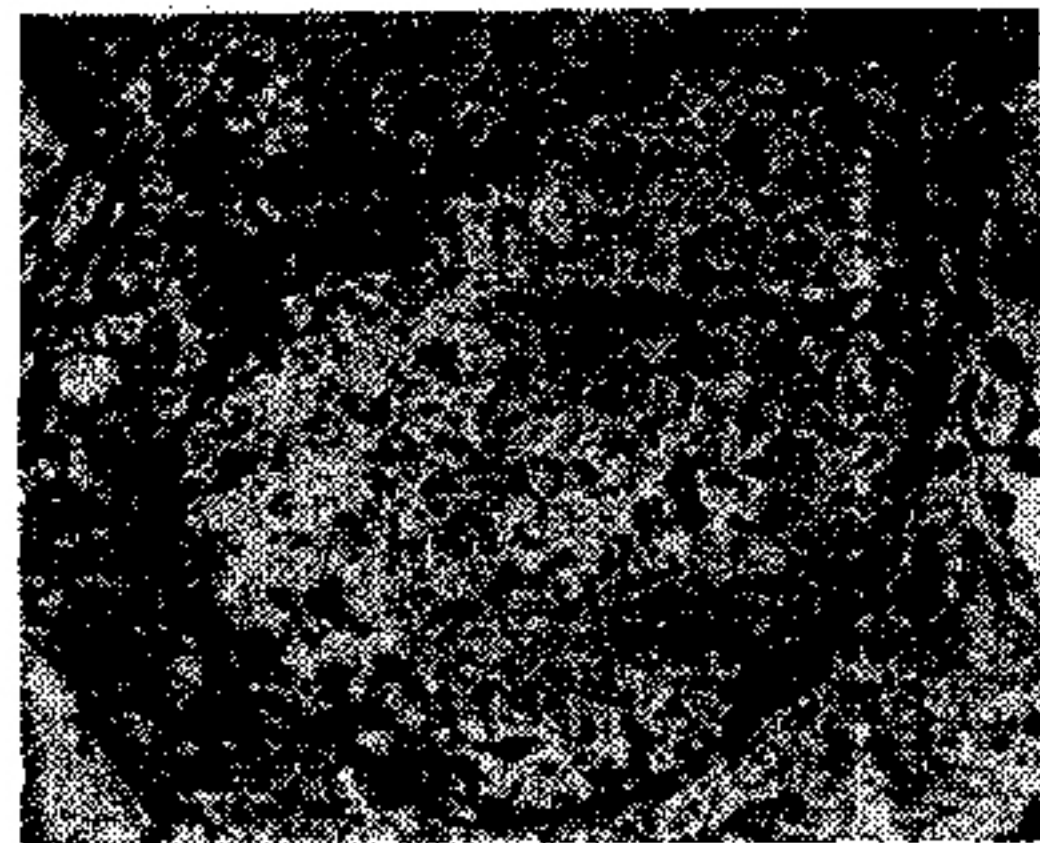
分泌小泡、溶酶体和线粒体增多, 核无明显变化。加药组的 109 细胞, 其粗面内质网与核糖体显著减少, 胞质内角质颗粒和张力微丝增多。细胞核也有明显改变。对照组 109 细胞核多见两个, 核染色质常呈块状堆积, 核膜多扭曲, 并凹陷形成囊状。而加药组细胞



照片 1 对照组BGC823细胞培养第 5 天



照片 2 加药组BGC823细胞培养第 5 天



照片 3 加药组EC4109细胞培养第 5 天

胞核多为一个, 核染色质疏松, 分布均匀, 核膜比较规则, 核多呈椭圆形(见照片 1~3)。

照片 1 可见胞浆内许多平行排列的粗面内质网。

照片 2 可见, 细胞胞浆内线粒体、分泌小泡增多,

粗面内质网减少。细胞核不规则，染色质粗糙，核仁多个。

照片3可见，胞浆内可见许多角质颗粒，张力微丝清晰可见。粗面内质网和核糖体几乎消失。细胞为单核，核膜较光滑规则，染色质疏松，均匀分布。未见核仁。

讨 论

本实验选用4种不同的细胞系，对紫草素进行多项指标的检测。实验结果显示：在剂量 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 时对人胃癌来源的BGC823细胞和人食管癌来源的ECa109细胞的生长均有明显抑制作用。而在相同条件下，对人来源的正常羊膜细胞和小儿包皮成纤维细胞生长未见有影响。从而证明紫草素在一定剂量时对癌细胞生长具有一定选择性抑制效应。

从823细胞来看，加药组细胞生长曲线明显降低，细胞生长抑制率达64%；药物剂量为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，能显著抑制细胞集落形成率($P<0.05$)，其抑制率为38~95%。细胞分裂指数也明显降低。1975年鄂征等报道紫草能抑制Hela细胞分裂指数，但用同位素检测未见细胞DNA合成受影响^[6]。本实验与该报道相符，荧光染色未见胞核DNA含量变化，但胞质内RNA含量减少。另，实验证实微核无变化，电镜也未见细胞核明显改变，而胞质内粗面内质网减少，分泌小泡、溶酶体增多。分析这几项指标可以认为，紫草素对823细胞产生抑制效应主要在于对细胞质的作用。

与823细胞相比，109细胞对药物更敏感。加药组细胞生长抑制率高达67%。此外，紫草素在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的较低浓度，就能显著地抑制细胞集落形成率($P<0.01$)。电镜不仅显示109细胞胞浆内粗面内质网和核糖体减少，角质颗粒和张力微丝增多，而且显示核染色质变疏松、核膜较规则，这些超微结构的变化使细胞更接

近正常鳞状上皮的细胞特点^[7]，说明紫草素对109细胞胞质和胞核均有作用。然而对109细胞DNA和RNA合成是否有直接抑制作用，还有待于用核酸的定量分析来确定。

紫草素属于清热解毒药，这一类的药具有广谱抗菌和抗癌解毒功能。目前认为紫草对上皮来源的多种恶性肿瘤具有抑制作用，如对绒毛膜上皮癌、自发性乳癌等的抑制^[4]。本实验结果除了再次证明了紫草的抗癌作用，还注意到，对食管鳞癌的109细胞的抑制作用比对人胃腺癌823细胞作用更强，提示鳞癌细胞比腺癌细胞对紫草更敏感的可能性。其原因可能在于两种癌的细胞来源不同，细胞的结构和功能有区别，因而导致对紫草有效成份的吸收、代谢和效应等方面的差异，对这些差异的进一步研究也许有助于揭示紫草的作用机制。

参 考 文 献

1. Daniel, et al. New anticancer drugs, In: Cancer Chemotherapy. The Netherlands, HM Pinedo, 1980: 118—127.
2. 千原吴郎. 从生药药理角度试谈抗癌的现状与发展. 国外医学(中医中药分册) 1989; 2:57.
3. Yoshimichi Sakai, et al. 中草药中一些药用植物提取物对苯并芘的致突变作用的影响. 国外医学(中医中药分册) 1989; 4:22.
4. 蔡和生, 等. 常用抗肿瘤中草药. 第1版. 广东: 广东科技出版社, 1981:74—76.
5. 吉林医科大学组胚室. 中药紫草—II抗癌作用的细胞学研究. 吉林医科大学学报 1975; 2:53.
6. 鄂 征, 等. 组织培养技术. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1988:248.
7. 宁爱兰. 人食管癌细胞株与正常食管上皮细胞电镜观察的比较. 解剖学报 1980; 11(1):70.
8. 李景德. 日本研究活血化瘀的动态(之四). 国外医学·中医中药分册 1989; 11(1):4.
9. 用的比较. 国外医学·中医中药分册1988; 10(4):44.
10. 王惠康. 日本近年来中药研究中的一些动向. 国外医学·中医中药分册 1986; 8(4):10.
11. 唐荣华. 生半夏、生南星治疗冠心病50例临床观察. 中草药 1989; 4:10.
12. 陈如泉, 等. 血虚证及养血补血方剂的实验研究进展. 中国医药学报 1989; 4(1):57.
13. 小林悟朗. 吴茱萸中细胞外钙流入阻碍作用的成分研究. 国外医学·中医中药分册 1989; 11(1):64.
14. 刘俊田, 等. 钙拮抗剂对血小板功能的影响. 生理科学进展 1988年; 19(3):273.
15. 史以庆. 花生四烯酸及其代谢物的生理与药理. 生理科学进展 1985; 16(4):362.
16. 凌义和, 等. 膜的研究与新型抗肿瘤药物. 生理科学进展 1982; 13(4):345.

(上接448页)

The Detection of Anti-Cancer Biological Effect of Naphthoquinone Pigment-LIII

Lu Guirong(路桂荣), Liao Jing(廖 静), et al

Beijing Institute for Cancer Research, Beijing (100034)

Naphthoquinone pigment-LIII, an extract from *Arnebia euchroma*, could apparently inhibit the proliferation of stomach cancer cell line and esophagus cancer cell line. At the effective concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$, the mitotic index and growth curve declined without showing any damage to human normal cells. At 5~10 $\mu\text{g/ml}$, the colony efficiency of cancer cells became significantly low. The anti-cancer effect of Naphthoquinone pigment-LIII might be related to its role of influencing the amount of RNA and ultrastructure of cancer cells which was discussed in this paper.

(Original article on page 422)

The Adjustable Action of Pi-Shen Recipe(脾肾方) on Immune Function of Mice with L₁₂₁₀ Ascites

Duan Shaojin(段绍瑾), et al

Dept. of Basic Medicine, Guang-An-Men Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100053)

Proliferation of Con A stimulated splenic lymphocyte was examined by incorporation of ³H-thymidine. Fluorescence polarization of DPH labelled splenic lymphocyte and bone marrow cells was measured. Proliferation of Con A stimulated splenic lymphocyte in DBA inbred healthy mice was higher than that of L₁₂₁₀ mice but fluorescence polarization of DPH labelled splenic lymphocyte in same healthy mice was lower than that of L₁₂₁₀ mice, ie. membranous lipid lymphocyte fluidity of lymphocyte in the healthy mice was smaller than that of L₁₂₁₀ mice. 9 days after administration of Pi-Shen recipe by tube stomach proliferation of Con A-lymphocyte in the healthy mice has been increased. The recipe-adjusted splenic lymphocyte membrane lipid fluidity of L₁₂₁₀ mice to level of those in healthy mice. Effects of Pi-Shen recipe on lipid fluidity of bone marrow cell membrane of L₁₂₁₀ mice were almost similar to that in splenic lymphocytes. These studies suggest that the mechanism on adjustable role of Pi-Shen recipe on T-lymphocyte function related to lymphocyte membrane lipid fluidity.

(Original article on page 426)

Study on Anti-Cancer Effects of Sanjie Pellet(散结片)

Liu Jinfang(刘今方), Tuo Chaowei(脱朝伟), et al

*Chinese PLA No. 202 Hospital, Shenyang (110003) **

In the present paper, the authors applied Sanjie pellet in the anti-cancer study on the animals. The results indicated that in the extracorporeal experiment, stomach perfusion with Sanjie pellet 12.5g/kg daily for 10 successive days, the inhibitory rate for the substantive liver cancer was 84%. For ascites liver carcinoma, it could raise the average rate of prolonging life span to 76%. Lethal dose (LD₅₀) was 25 g/kg. The pathological observations indicated that Sanjie pellet acted directly on the cell membrane and organelle of the liver cancer cells and causing lysis and clasis of the cell membrane, dilation of rough surface endoplasmic reticulum, the swelling of mitochondria and disintegration and clasis of the liver cancer cells body. The authors concluded that these were the main pharmacological efficacies of Sanjie pellet.

(Original article on page 429)

The Inhibitory Effect of Liuwei Dihuang Decoction(六味地黄汤)

on Induced Mutation and Spontaneous Tumor

Zhao Liangfu(赵良辅), Yan Shuchang(严述常), Jiang Tingliang(姜廷良), et al

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing (100700)

Anti-mutagenic activity was evaluated with micronuclear test. It appeared to be same between the result of mice treated with 10 g/kg Liuwei Dihuang decoction (LWDHd) for 3 days and that with 34.5 g/kg for 10 days. All the permillages of micronuclear appearance of treated groups were less than that of controls. The intercept (A) value of dose-effect curve were 12.7 and 9.4 as treated with cyclophosphamide (Cy) alone, but 1.2 and 3.2 as orally administered with LWDHd before injecting Cy. It showed that LWDHd could inhibit mutagenic activity of Cy. The affection of LWDHd on spontaneous tumorigenesis was observed in LACA mice. The tumor incidence rate was 9.0% in the control mice observed for 60 weeks, but 5.0% in the animal feeding LWDHd in food. The tumor incidence rate of big dose group was 1.0% and the difference was significant between it and that of the control ($P < 0.01$).

(Original article on page 433)