

中草药光敏剂的筛选及对人胃癌细胞系 光动力学杀伤效应的研究*

廖 静¹ 李萍萍² 武纯静² 鄂 征² 王淑珍³ 李淑莲³

内容提要 目的:筛选中草药抗癌光敏剂,寻求中药用于肿瘤光动力学疗法新途径的可能性。方法:检测了 13 种中草药提取液的荧光激发波长、发射波长;它们被 BGC-823 人胃癌细胞(简称 823 细胞)摄取后的细胞荧光强度;提取液在固定细胞和活细胞染色中荧光物质的分布、亲和部位,以及 pH 值对提取液染色细胞荧光强度的影响。在此基础上,进一步选择性进行了光敏抗癌实验。结果:13 种中草药中,黄柏、黄连为最理想的荧光剂。与加药不照光的对照组比较,黄连在照光实验组,使 823 细胞代谢活力、增殖能力明显降低,并使癌细胞死亡率明显增高。结论:中药具有成为新的抗癌光敏剂的潜力和将来用于肿瘤光动力学疗法的可能性。

关键词 光敏抗癌 中草药光敏剂 人胃癌细胞 筛选

Screening New Photosensitizers from Chinese Medicinal Herbs and Searching for Herbal Photodynamic Killing Effects on Human Stomach Cancer Cells LIAO Jing, LI Ping-ping, WU Chun-jing, et al Capital University of Medical Sciences, Beijing(100054)

Objective: To find new photosensitizers from Chinese medicinal herbs for cancer photodynamic therapy. **Methods:** The extracts of thirteen herbs were examined: (1) Their fluorescence excitation wave lengths and emission wave lengths; (2) Their fluorescence intensity in living cells and (3) Their distribution and localization in the living cells and the fixed cells both stained in each extract, and responses of cell fluorescence intensity to pH value change. Furthermore, the herb's anticancer photosensitive efficiencies were studied by using BCG-823 human stomach cancer cells. **Results:** Cortex phellodendri and Rhizoma Coptidis, were found with optimal fluorescence properties as photosensitizers in this test. The latter could remarkably reduce the cell metabolic viability, proliferative ability and increased the cell mortality when the cells exposed to both drugs and luminance but not only to drug. **Conclusions:** The potential of Chinese medicine as new kind of photosensitizer and its possibility for use in anticancer photodynamic therapy are existed.

Key words photosensitive anticancer, Chinese medicinal herbs of new photosensitizers, human stomach cancer cells, screening

光动力学疗法(PDT)是 80 年代初兴起的肿瘤临床综合治疗手段之一。10 多年来广泛用于头颈部和上消化道等多处恶性肿瘤的治疗⁽¹⁾。PDT 的关键因素是光敏剂血卟啉衍生物(HPD),而 HPD 的毒性较大⁽²⁾,这使发现和研制更理想的新光敏剂成为必要。鉴于我国有丰富的中草药资源,我们设想从毒性小或无毒的中草药中筛选新的光敏剂。这种新的光敏剂在对肿瘤细胞进行光敏杀伤的同时,可以发挥中草药本

身抗癌或扶正效果。故此,我们选择了 13 种中草药,对中草药所含荧光物质的荧光性质进行研究,并进一步证实了所筛选出的理想中草药对人胃癌细胞具有光动力学抑制效应,从而证实了从中草药中寻找新光敏剂的可能性。

材料和方法

1 中草药提取液的制备 选用中草药黄柏、苦参、黄芩、黄连、补骨脂、秦皮、紫草、前胡、白芷、泽兰、羌活、独活、山豆根共 13 种(北京医科大学第一附属医院中药房提供),分别取生药 50g,加蒸馏水 500ml,浸泡 24h,煎至 50ml,冷却后加 95% 乙醇 100ml,静置后

* 国家“七五”攻关课题

1. 首都医科大学病理教研室(北京 100054);2. 北京市肿瘤防治研究所;3. 白求恩医科大学

取上清浓缩至 10ml, 浓度 5g 药/ml。调 pH 值后过滤除菌, 4℃ 保存待用。

2 中草药荧光确定

2.1 流束细胞仪(FACS440 型, 美国 DI 公司)检测在蓝光激发下, 13 种提取液(10 μ l/ml)分别孵育的 BGC823 人胃癌细胞⁽⁴⁾(简称 823 细胞)悬浮液的细胞荧光强度。细胞的培养和消化采用鄂征的方法⁽³⁾。培养液用 15% 小牛血清的 RPMI1640。

2.2 荧光检测仪(HITACHI MPF-4 型, 日本产)测定每种提取液(1:10 稀释)自身的荧光发射波长和激发波长。前者进一步确定荧光强弱特性, 后者提供光敏实验光源照光波长的选择依据。

2.3 荧光显微镜(AO 2071 型, 美国产)观察不同 pH 值提取液对生长在盖玻片上的 823 细胞的活细胞和固定细胞染色⁽⁴⁾10min 结果, 确定荧光物质在细胞的摄取、分布或亲和部位。

3 中草药对癌细胞的光敏杀伤实验

3.1 细胞和光源 细胞: 823 细胞, 培养方法同上。光源: 本所仪器室自制的照光仪。光波长: 原则上选择提取液荧光激发波长, 另设 650nm 波长为对照, 照光距离为 28cm。

3.2 分组和处理 实验组: 加药并照光。贴壁 24h 细胞加黄连提取液, 37℃ 孵育 30min, PBS 洗 3 遍, 照光 30min 后, 补充等量培养液, 37℃ 避光培养。对照组: 加药不照光或不加药不照光。

3.3 观察指标

3.3.1 噻唑蓝代谢比色法 823 细胞接种于 96 孔板, 1 $\times$ 10⁴个/孔, 0.1ml 培养液/孔, 37℃ 培养 24h 后加药, 终浓度每毫升培养液含提取液分别为 1、2、4、10、50、80 和 100 μ l, 每种浓度的实验组对照组各 6 孔。光敏实验处理(见分组和处理)后 24 和 48h, 分别行噻唑蓝代谢比色法⁽⁹⁾。

3.3.2 癌细胞生长和死亡率的检测 823 细胞接种于小方瓶, 8 $\times$ 10⁴个/瓶, 2ml 培养液/瓶, 37℃ 24h 后加药, 终浓度每毫升培养液含提取液分别为 2 μ l 和 8 μ l, 光敏实验处理后 24h, 按常规做 1 周内细胞生长曲线和死亡率曲线图⁽³⁾。

结 果

1 流束细胞仪分析结果 13 种中草药均有细胞荧光显示。据多数细胞显示荧光强度看, 黄柏、黄连最强, 其次是苦参、独活、紫草、羌活、前胡、山豆根、补骨脂, 而秦皮和白芷较弱。黄芩、泽兰荧光图象略呈平顶状、较宽, 说明同一种药呈现不同荧光强度的细胞数接

近, 显不出多数细胞荧光的趋势。

2 荧光检测仪测定结果 见表 1。除黄芩、秦皮、泽兰外, 其他 10 种中草药均能检测出荧光的激发波长和发射波长。黄连、黄柏的发射波长最长, 提示其光敏效应可能最明显, 其次是补骨脂、紫草和苦参等。

3 荧光显微镜观察 中草药提取液的细胞染色结果 见表 2。

表 1 13 种中草药荧光波长的测定 (nm)

药 名	激发波长	发射波长	药 名	激发波长	发射波长
黄芩	—	—	苦参	415	505
黄柏	482	540	泽兰	—	—
黄连	530	600	羌活	420	500
秦皮	—	—	前胡	410	490
独活	410	490	紫草	420	520
山豆根	415	465	补骨脂	490	538
白芷	400	478	1640 培养液*	—	—

注: * 测定前, 用于 10 倍稀释中草药提取液

表 2 13 种中草药提取液细胞染色结果比较

药名	pH	固定细胞观察		活细胞观察	
		荧光分布	荧光强度	荧光分布	荧光强度
黄柏	5.5	核、胞浆	++++	核、胞浆、胞膜	+++
	7.5	核、胞浆	++++	核、胞浆	+++
黄连	4.5	核、胞浆	++++	核、胞浆	+++
	7.5	核、核仁、胞浆	++++	核、胞浆、胞膜	+++
黄芩	5.5	胞浆	++++	均染	+
	7.5	均染	++++	浅染	+
苦参	5.5	核仁、胞浆	++++	均染	+
	7.5	核仁、胞浆	++++	—	—
补骨脂	5.0	核仁、胞浆	+++	浅染	+
	7.5	均染	+	—	—
秦皮	4.0	核、胞浆	+++	浅染	+
	7.0	—	—	—	—
紫草	5.5	胞浆	+++	浅染	+
	7.5	均染	++	浅染	+
前胡	4.5	核仁、胞浆	+++	均染	++
	7.0	浅染	+	浅染	+
白芷	5.0	核仁、胞浆	+++	均染	++
	7.0	浅染	+	均染	++
泽兰	4.5	核、胞浆	+++	浅染	++
	7.0	浅染	+	浅染	++
羌活	5.0	核、胞浆	++	—	—
	7.0	均染	++	浅染	++
独活	5.0	胞膜	+++	—	—
	7.5	均染	+++	均染	++
山豆根	5.5	胞膜	+++	浅染	+
	7.5	均染	+++	—	—

注: +++++ 很强, +++ 强, ++ 较强, — 未见荧光

4 黄连对癌细胞的光敏效应 见表 3。在 520nm(蓝光)光照下, 823 细胞经光敏实验处理后 24h, 黄连 1~4 μ l/ml 浓度能使 823 细胞噻唑蓝代谢的 OD 值下降 40~60%, 10~100 μ l/ml 的浓度导致死亡细胞增多, 使噻唑蓝 OD 值减少 90% 左右, 然而加药未照光组的 OD 值也受到一定影响, 但始终明显高于加

药照光组; 48h 黄连的这一光敏抑制效应更明显。650nm 波长(红光)光照下, 光敏处理后 24h, 黄连 10 μ l/ml 以上浓度, 均能明显降低癌细胞噻唑蓝 OD 值。48h 黄连 1~100 μ l/ml 均显示了这种光敏抑制效应。

黄连对 823 细胞生长也有明显光敏抑制作用,

表 3 黄连对胃癌细胞噻唑蓝代谢光敏抑制效应 ($\bar{x} \pm s$)

药量 (μ l/ml)	24h 噻唑蓝比色 OD 值			48h 噻唑蓝比色 OD 值		
	对照	蓝光	红光	对照	蓝光	红光
1	1.44 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.06	1.18 $\pm$ 0.13	1.10 $\pm$ 0.14	0.63 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.05
2	1.22 $\pm$ 0.26	0.83 $\pm$ 0.08	1.24 $\pm$ 0.07	1.03 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.23	0.76 $\pm$ 0.11
4	1.08 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.18	1.21 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.18	0.18 $\pm$ 0.12
10	0.57 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.01	1.10 $\pm$ 0.09	0.97 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.13
50	0.39 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.004	0.12 $\pm$ 0.003
80	0.32 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.01	0.77 $\pm$ 0.18	0.34 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.13	0.10 $\pm$ 0.01
100	0.35 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.002	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01

2 μ l/ml 和 8 μ l/ml 的浓度对细胞生长抑制率在第 5 天分别高达 56.6% 和 57.6% (见图 1)。随着药物浓度增高, 细胞死亡率明显上升 (见图 2)。

肿瘤有杀伤效应。故此我们选择并研究了 13 种含有荧光物质的中草药, 实验结果得出以下印象。

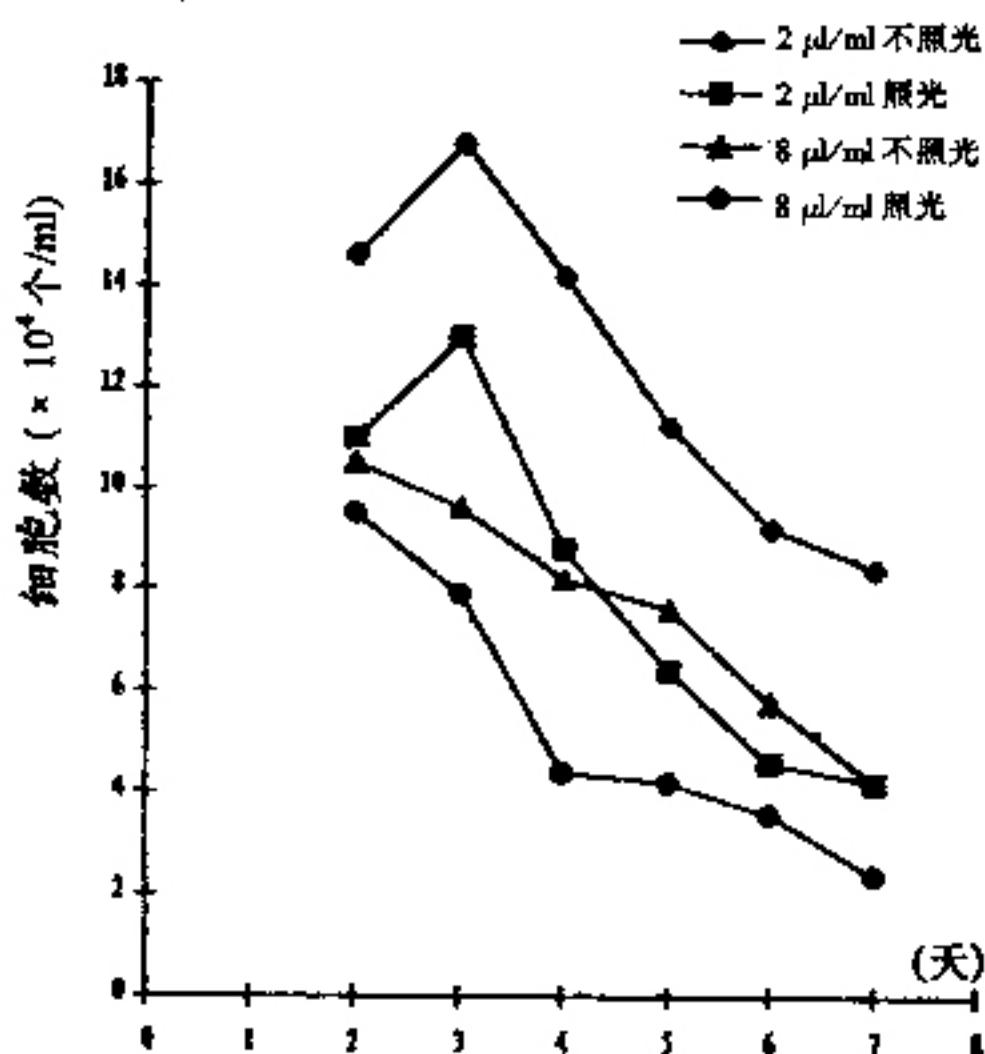


图 1 黄连对人胃癌细胞生长的光动力学抑制效应

讨 论

中药在抗癌治疗的研究中, 日益受到国内外重视, 例如中药对免疫系统的促进^[5]、抗致癌物的致突变能力^[6]以及对致癌启动因子的抑制^[7]等方面的研究, 不断拓深了对中药抗癌作用的认识。本实验首次从事筛选中药抗癌光敏剂, 探索中药光敏抗癌的新途径。Tomson SH^[8]等曾指出: 荧光剂吡啶橙通过光激活对

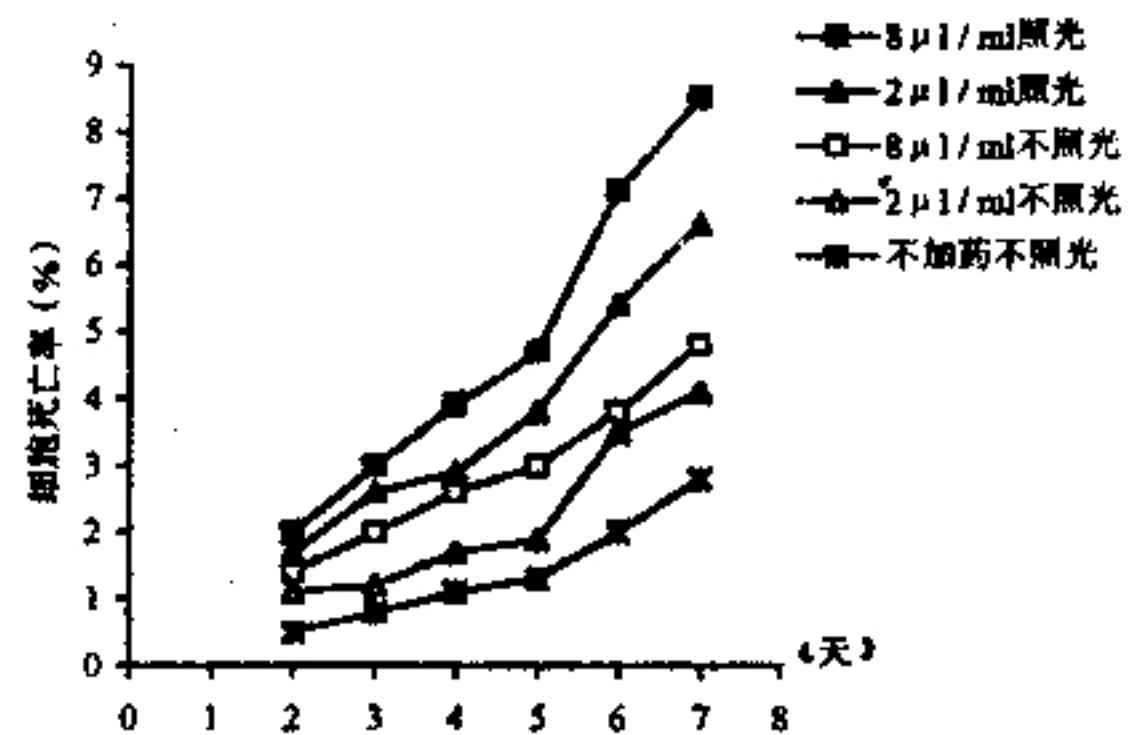


图 2 黄连对人胃癌细胞死亡率增高的光动力学效应

1 本筛选系统注意到部分所选中药没有成药, 统一制备了生药的提取液, 增强了中药之间的可比性。固定细胞染色体 13 种中药都显示了强荧光(++++~+++), 证明提取液有效地保存了荧光物质。

2 13 种中草药均含一定量的荧光物质, 都能在一定程度上被活细胞吸收。然而部分(约 1/2)提取液的荧光强度在活细胞的摄取量和分布受到 pH 值影响, 这一发现对相应中草药的贮存条件和给药途径提供了一定参考。

3 荧光检测的多项指标均一致证实黄柏、黄连荧光强、细胞摄取好、荧光物质在细胞分布广、滞留部位明显, 并且不受 pH 值变化的明显影响。应首选为理想的荧光剂。进一步的光敏抗癌实验证明, 黄连对噻

唑蓝代谢有明显的光敏抑制作用。Mosmann⁽⁹⁾曾指出:噻唑蓝中四唑盐只有经活细胞脱氢酶作用,分子结构才能发生变化,产生显色的甲脒,从而在 ELISA READER 仪上读出 OD 值来。因此黄连使癌细胞噻唑蓝代谢 OD 值降低的光敏效应,准确反应了癌细胞活力程度和增殖状态受到抑制。癌细胞生长曲线降低和死亡率升高再次证明了黄连的光敏抗癌效应。

4 除黄柏以外,我们注意到苦参、山豆根和紫草等中草药也有抗肿瘤报道^(10,11),如能进一步提高活细胞对它们的吸收能力,光敏抗癌效果就能事半功倍。本实验也证明补骨脂、紫草、苦参、羌活的荧光发射波长与黄柏、黄连接近,都在 500nm 以上,如果这些中草药都能受到广泛重视和深入研究,从中草药中寻找毒性小、疗效高的新光敏剂是大有可能的。

参 考 文 献

1. Delaney TP, Glatstein EL. Photodynamic therapy of cancer. Comprehensive Therapy 1988; 14(5):43—55.
2. Goeig AFPMD, Ververgaert PHJT, Steveninck JV. Photodynamic effects of protoporphyrin on the architecture of erythrocyte membranes in protoporphyria and in normal red blood cells. Clinica Chimica Acta 1975; 62:287—292.
3. 鄂 征. 组织培养技术. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1988:56—153.
4. 路桂荣, 廖 静, 李延钧. 紫草萘醌单体分离物的抗癌生物学效应测试. 中西医结合杂志 1990; 10(7):422—425.
5. 小岳宣昭. 柴苓汤治疗老年上消化道癌. 国外医学中医中药分册 1987; 9:33.
6. Yoshimichi Sakai. 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.
7. 安川克. 食用植物及生药类对致癌启动因子的抑制效果. 国外医学中医中药分册 1990; 1:57.
8. Tomson SH. Tumor destruction due to acridine orange photoactivation by argon laser. Ann NY Acad Sci 1976; 267:191—198.
9. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J of Immunological Methods 1983; 65:55—63.
10. 胡月英, 宣明盛. 云南抗癌中草药. 昆明:云南人民出版社, 1982:56—57.
11. 上海市肿瘤防治研究办公室. 实用抗癌药物手册. 上海:上海市肿瘤防治研究办公室出版, 1997:6—24.

(收稿:1996-09-27 修回:1997-07-15)

1996 年《中国中西医结合杂志》优秀论文评选揭晓

为了促进我国中西医结合事业的发展,表彰和奖励中西医结合优秀成果,本刊自 1992 年起设立“中国中西医结合优秀论文 505 奖励基金”,每年进行一次优秀论文评选活动[详见本刊 1992;12(6):321]。本杂志社每年组织全国的数十位专家,对本刊全年所载论文进行认真评阅,选出该年度优秀论文一、二、三等奖。现将本刊 1996 年度优秀论文评选结果颁布如下。

一等奖:愈心痛胶囊治疗不稳定性心绞痛临床研究。1996;16(10):580;中国中医研究院西苑医院心血管病研究室,雷燕等,奖金 5000 元。

二等奖:补肾健脾活血类中药复方对老龄小鼠免疫功能作用的对比研究。1996;16(10):610;上海医科大学中西医结合研究所,张新民等,奖金 3000 元。

三等奖:扶正法缓解哮喘发作的作用探讨。1996;16(4):198;上海医科大学附属华山医院脏象研究室,许得盛等;奖金 1000 元。

(本刊讯)