

110 种藏药抗肿瘤体外筛选实验研究

宗玉英¹, 党合群¹, 骆桂法¹, 张幸福¹, 车镇涛² (1. 青海省药品检验所, 西宁 810000; 2. 香港中文大学中医学院, 新界沙田)

摘要:目的: 对 110 种植物藏药进行抗肿瘤筛选。方法: 干燥植物样品粉碎后分别以石油醚及 90% 乙醇提取。用 90% 乙醇提取物对体外培养的 5 种人体肿瘤细胞: 乳腺癌、肺癌、直肠癌、口腔上皮癌(耐药性及非耐药性两种)、前列腺癌及一种大鼠神经胶质肿瘤细胞进行筛选实验。结果: 有五种藏药: 桃儿七果实、藏木香、裸茎金腰、祁连圆柏、苍耳草具有较好的抗肿瘤作用。结论: 本研究对进一步研究、开发藏药提供科学的理论依据。

关键词: 抗癌筛选; 藏药

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2000)05-0290-02

Antitumor Screening Research from 110 Tibetan Medicines

ZONG Yuying, DANG Hequn, LUO Guifa, ZHANG Xingfu, CHE Zhen-tao (Qinghai Institute for Drug Control, Xining 810000; The Chinese University of Hong Kong, School of Chinese Medicine, Shatin, New Territories, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To screen antitumor medicine from 110 Tibetan medicines. **METHODS:** Dried plant materials were ground and were extracted by petroleum ether and 90% ethanol separately. The 90% ethanol extracts were used to test cultured five human tumor cells: BC1, Lu1, C12, KB and LNCaP and one rat tumor cell ASK. **RESULTS:** Five Tibetan medicines were found to display cytotoxic effects in cultured tumor cells. **CONCLUSION:** The result would be used as reference for further Tibetan medicine research.

KEY WORDS: antitumor screening; tibetan medicines

藏药是我国尚待开发的民族药物, 在我国传统医药中占有重要地位。发掘、整理、研究藏药对进一步开发利用藏药具有深远意义。本研究对 110 种植物藏药进行体外筛选实验, 有五种藏药显示具有抗肿瘤作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 藏药 110 种藏药植物样品采自青海省海北州、海西州、果洛州、玉树州、黄南州、大通县、湟中县、海东地区、西宁地区。采集时间为 6、7、8、9 月, 部分药材购自黄南州藏医院、青海省藏医院。所有样品经过学名鉴定。鉴定人: 青海省药品检验所骆桂法。

1.1.2 肿瘤细胞 人体乳腺癌(BC1)、人肺癌(Lu1)、人结肠癌(C12)、人口腔上皮癌(KB)、对长春花碱具耐药性的 KB(KB-V)、KB-V 加长春花碱 KB-V(+VLB)、KB-V 未加长春花碱 KB-V(-VLB)、前列腺癌(LNCaP) 及大鼠神经胶质细胞(ASK) 由美国伊犁诺大学药学院 J. M. Pezzut 教授提供。

1.1.3 试剂 试剂均为分析纯, 各类培养基及对照品秋水仙碱、长春花碱、鬼臼毒素、美登木素购自美国 Fisher 公司。

2 方 法

2.1 肿瘤细胞培养方 法^[1]

BC1 及 C12 细胞: Eagle MEME 培养基加牛胚胎血清

(15%), Penicillin G(100U/ml), Streptomycin(100mg/ml), Amphotericin B(0.25 μ g/ml) 和氨基酸(1%)。

Lu1 细胞: Eagle MEME 培养基加牛胚胎血清(10%), Amphotericin B(0.25 μ g/ml) 和氨基酸(1%)。

KB 及 KB-V(-VLB) 细胞: Dulbecco's MEM 培养基加牛胚胎血清(10%) 和 Amphotericin B(0.25 μ g/ml)。

KB-V(+VLB) 细胞: Dulbecco's MEM 培养基加牛胚胎血清(10%), Amphotericin B(0.25 μ g/ml) 和 Vinblastine(1 μ g/ml)。

LNCaP 细胞: RPMI-1640 培养基加牛胚胎血清(10%, 不含激素), Amphotericin B(0.25 μ g/ml) 和睾酮(0.1nM)。

ASK 细胞: Eagle MEME 培养基加牛胚胎血清(10%)^[2-3]

所有细胞均在温度 37 $^{\circ}$ C、湿度 100%、含 5% 二氧化碳空气中培养。

2.2 药材提取方 法

取干燥药材粗粉 100g, 以石油醚(30-60 $^{\circ}$ C) 浸提至无色, 药渣再以 90% 乙醇浸提至无色。90% 乙醇回收溶剂, 浸膏室温真空干燥, 制得供试样品。

2.3 细胞毒活性试验

样品 90% 乙醇提取物先以少量 DMSO 溶解, 然后用双重蒸馏水稀释 10 倍, 再以 10% DMSO 水溶液重复稀

释,于 96 孔细胞培养板的每一孔内加入 10 μ l 不同浓度的样品,每一浓度设三个复孔,测定五个不同浓度,估算 IC50,调整浓度重复试验,求得 IC50。

对照组不含样品,以 10 μ l 10% DMSO 水溶液代替样品,空白组为不含细胞的培养基。加入样品以后,自培养瓶吸取细胞,以 trypsin 消化,再以新鲜培养基稀释,每孔加入 190 μ l 含细胞的培养基,细胞浓度为:

BC1	10 \times 10 ⁴
C 12	6.5 \times 10 ⁴
Lu1	5 \times 10 ⁴
KB	5 \times 10 ⁴
KB- V	6 \times 10 ⁴
LNCaP	6.5 \times 10 ⁴

细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C 含 5% 二氧化碳及饱和湿度的培养箱内,培养 72 小时后,加入 50 μ l 冷 triplaxalid 溶液将细胞固定于板上,4 $^{\circ}$ C 培养 1 小时,用水冲洗四次,吹干,细胞以 0.4% sulfoxamine B (W/V) 染色 30 分钟,经 1% 醋酸冲洗四次,吹干,以 200 μ l 10mM Tris base (pH10) 溶解附于塑料板上的色素,轻微振荡 5 分钟,在 ELISA 板量读仪上,515nm 处测定吸收值。

每组试验设零天对照,细胞培养时间为 10 分钟。

计算方法:求出三个相同浓度的平均吸收值,减去零天对照组的吸收值,以不含试验样品的对照组的吸收值为基数,计算试验组的百分比,以线性回归计算 IC50。

2.4 ASK 细胞有丝分裂试验

ASK 细胞(1 \times 10⁵) 放在 35- mm Petri dish 培养 48 小时,加入 Dbutyryl y li - AMP(1mM) 诱导细胞变形(由纺锤形变成星形),1 小时后加入 100 μ g/ml 样品,阳性对照组分别为秋水仙碱、长春花碱、鬼臼毒素、美登木素,空白对照组加培养液。继续培养 1 小时后,将 Petri dish 置显微镜下,观察细胞数目及形态。

3 结果

样品筛选结果的判断标准为: BC1、C 12、Lu1、KB、KB- V、LNCaP 肿瘤细胞半数致死量的浓度小于 20 μ g/ml 为有效。ASK 细胞由星形逆转变为纺锤形达 50% 以上(与空白对照组比较),活细胞数目不少于空白对照组 50% 为阳性。筛选结果见表 1 及表 2。

110 种藏药除表 1 中所列样品,其余样品 90% 提取物均为 > 20 μ g/ml。

表 1 藏药抗癌筛选结果 IC50(μ g/ml)

细胞样品(90% 乙醇提)	BC1	Lu1	C 12	KB	KB- V(+ VLB)	KB- V(- VLB)	LNCaP	ASK
桃儿七果实 <i>Sinopodophyllum hexandrum</i> (R yle) Ying	> 20	> 20	> 20	0.22	1.1	4.1	2.1	+
藏木香 <i>Inula racemosa</i> H k.f.	3.7	3.1	4.8	3.7	4.0	4.3	4.6	-
祁连圆柏 <i>Sabina przewalskii</i> K w	> 20	> 20	7.3	2.2	4.1	5.1	2.0	-
裸茎金腰 <i>Chrysosplenium nudicaule</i> Bge.	> 20	> 20	13.4	17.2	> 20	> 20	14.6	-
苍耳草 <i>Xanthium sibiricum</i> Patr in	6.6	> 20	5.4	13.2	> 20	> 20	15.5	-

表 2 不同样品对 ASK 抑制作用

样品浓度(μ g/ml)	100.0	20.0	4.0	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128
秋水仙碱	100%	100%	100%	70%	0%	0%	0%	0%
长春花碱	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%
鬼臼毒素 100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
美登木素 100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
桃儿七果实 90%	100%	100%	75%	25%	0%	0%	0%	0%
乙醇提取物								

结果表明,桃儿七果实,藏木香,祁连圆柏,裸茎金腰及苍耳草具有程度不同的抑制肿瘤细胞活性。桃儿七果实 90% 提取物与已知抗癌药物在相同条件下试验,结果表明,对肿瘤细胞抑制率为 75%。

4 讨论

采用本试验条件对 110 种藏药 90% 乙醇提取物进行抗癌筛选,以五种人体肿瘤细胞及一种大鼠神经胶质细胞为筛选模型,结果表明,有五种藏药具有程度不同的抗

肿瘤活性。其中药物桃儿七果实、苍耳草、祁连圆柏为本次实验首次发现具有抗癌活性^[4-5]。

本文为 1997- 1999 年度青海省自然科学基金项目,由青海省自然科学基金管理委员会资助。

致谢: 本文部分样品学名鉴定由青海高原生物研究所刘尚武研究员协助完成。

参考文献(略)

收稿日期: 2000- 08- 28