

不同乙醇浓度半枝莲提取物抗肿瘤作用的相关性研究

周志愉¹ 王兆雷²

(1 江西中医学院 南昌 330006;2 江西中医学院附属医院 南昌 330006)

摘要:目的:研究不同乙醇浓度半枝莲提取物与抗肿瘤作用的关系。方法:采用高效液相色谱法测定半枝莲提取物中野黄芩苷含量,同时用 MTT 法测定其对入肝癌 SMMC-7721 细胞增殖抑制率,并统计乙醇浓度与抗肿瘤作用的相关性。结果:半枝莲提取物中野黄芩苷含量随着乙醇提取浓度的升高而增高,乙醇浓度及其野黄芩苷含量与其对肿瘤细胞的抑制作用成正相关。结论:半枝莲的抗肿瘤活性与其中所含野黄芩苷有一定的相关性。

关键词:半枝莲;乙醇浓度;野黄芩苷;抗肿瘤作用

中图分类号:R 284

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2007)06-0089-02

半枝莲辛苦性寒,具有良好的清热解毒、化痰利水、消肿定痛之功,如《江西草药》谓:“半枝莲,清热解毒,消肿止痛。”现代药理研究表明,半枝莲对小鼠 S₁₈₀、脑瘤 B₂₂ 等均有一定抑制作用。本文研究半枝莲的不同乙醇浓度提取物野黄芩苷的含量及其抗肿瘤作用,现将有关研究结果报道如下:

1 材料

1.1 药物 半枝莲提取物,由江西省中医药研究院中药所提供。取半枝莲 100g 五份,分别用 10%、30%、50%、70%及 90%的乙醇 500mL 提取 2 次,每次 30min,合并提取液,浓缩至 1g 生药/mL 浓缩液,过滤除菌,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基稀释成不同浓度的药液(根据预试验结果而定,浓度均以相当的生药量表示),4℃ 冰箱保存备用。野黄芩苷对照品(含测用),含量以 97.12% 计算,中国药品生物制品检定所提供,批号:110842-200403。

1.2 瘤株 人肝癌 SMMC-7721 细胞株,由江西省中医药研究院中心实验室保存。

1.3 试剂仪器 MTT 试剂(美国 Sigma),RPMI1640 细胞培养液(日本日水制药株式会社)。倒置显微镜(Nikon 808434),CO₂ 培养箱(日本 Forma),酶标仪(Lab systems Dragon well scan MK3),Waters 1525 高效液相色谱仪,Waters 2487 紫外检测器,Waters Empower 工作站,Agilent ZorBax 300SB-C₁₈ (5 μm,4.6 mm × 250mm) 色谱柱,超声波清洗器(250W,33kHz),中船重工七院七二六所(上海),SimplicityTM 个人型超纯水系统(Millipore 公司),AG-135 电子天平(梅特勒-托利多),甲醇(色谱纯),四氢呋喃(分析纯),磷酸(分析纯),纯化水。

2 方法

2.1 野黄芩苷含量测定方法 精密称取野黄芩苷对照品适量,用甲醇稀释成每 1mL 含野黄芩苷 0.15mg 的溶液,作为对照品溶液。另分别精密量取半枝莲提取物 1mL,置 25mL 容量瓶中,加 70%乙醇至刻度,密塞,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45μm 微膜,即得。分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 20μL,注入高效液相色谱仪,测定,计算野黄芩苷含量。

2.2 抗肿瘤作用研究方法 MTT 法测细胞增殖抑制率^[1]:取对数生长长期的人肝癌 SMMC-7721 肿瘤细胞,用胰蛋白酶消化后,用含 10%小牛血清的培养液配成浓度为 1×10⁴ 个/mL

的细胞悬液,接种在 96 孔培养板中,每孔 200μL,置含 5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱中,培养 24h 后,吸出培养液,按实验设计分别加入 2mg/mL 含不同药物的培养液,空白对照组加入等体积的培养液,培养 72 h 后,弃去上清液,用培养液洗 3 次,以去除药液,每孔加入 200μL MTT (1g/L),37℃ 培养 4h,小心弃去上清液,加入 200μL DMSO 溶解,平板振荡仪振荡 10min,在酶标仪上用波长 490nm、参比波 K 为 570nm 的条件下测定各孔吸光度(OD)值,计算抑制率[抑瘤率(%)=(1- 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值)× 100%]。

3 结果

3.1 不同乙醇浓度半枝莲提取物中野黄芩苷含量 结果如表 1。其中 90% 乙醇提取物中野黄芩苷含量最高,为 2.97mg/mL。从结果可见,乙醇浓度从 10%~90%,提取物中野黄芩苷含量随乙醇浓度的升高而升高。

表 1 不同提取物中野黄芩苷的含量 mg/mL					
乙醇浓度	10%	30%	50%	70%	90%
野黄芩苷含量	0.87	1.45	2.01	2.93	2.97

3.2 不同浓度乙醇提取物抗肿瘤作用 结果见表 2。结果表明,半枝莲提取物随提取乙醇浓度的升高,其抗肿瘤活性即抑瘤率也随之增强。

表 2 半枝莲提取物对 SMMC-7721 细胞降解 MTT 的影响(n=4)		
组别	吸光度(OD)	抑瘤率(%)
对照组	0.75± 0.21	—
10%乙醇提取物	0.54± 0.19	28.0
30%乙醇提取物	0.49± 0.20	34.7
50%乙醇提取物	0.33± 0.14	56.0
70%乙醇提取物	0.29± 0.11	61.3
90%乙醇提取物	0.24± 0.10	68.0

3.3 乙醇浓度及野黄芩苷含量与抗肿瘤作用的相关性 结果见表 3。从表中结果可见,乙醇浓度及野黄芩苷含量均成正相关关系,说明半枝莲的抗肿瘤活性与其中所含野黄芩苷有一定的相关性。

表 3 乙醇浓度及野黄芩苷含量与抗肿瘤作用的相关性			
乙醇浓度(%)	野黄芩苷含量(mg/mL)	抑瘤率(%)	相关系数
10	0.87	28.0	R=0.66
30	1.45	34.7	
50	2.01	56.0	
70	2.93	61.3	
90	2.97	68.0	

4 讨论

中医学认为,肿瘤形成的病机十分复杂,诸如毒热内蕴,瘀血阻滞,痰凝湿滞等,为最常见之因。同时,肿瘤患者常有失常的离子作用靶点^[2]。药学学报,2004,39(5):328-332

(收稿日期:2007-03-28)

[5]龚冬梅,单宏丽,周宇宏,等.哇巴因和乌头碱诱发豚鼠和大鼠心律

水蛭提取物对大鼠大脑皮层神经细胞毒性的实验研究

刘丹 林明宝 张进
(江西省中医药研究院 南昌 330077)

关键词:水蛭提取物;神经细胞;细胞毒性

中图分类号:R 965.3

文献标识码:B

文献编号: 1671-4040(2007)06-0090-01

水蛭为我国传统中药,始载于《神农本草经》,其味咸、苦,性平,有毒,归肝经,具有破血逐瘀、通经消癥之功效^[1]。作者采用水蛭提取物对体外培养大鼠大脑皮层神经细胞的细胞毒性进行了研究,现将结果报道如下:

1 实验材料

1.1 实验动物及试剂 出生 24h 内的 SD 大鼠,清洁级,购自江西省动物中心。DMEM 培养基:GIBCOBRL 产品(批号:1024265,货号:12100-038)。B₂₇ Supplement: GIBCOBRL 产品(批号:1153623)。Neurobasal Medium: Gibcobrl 产品(批号1027887,货号:21103-049)。小牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司(批号:060209)。胰蛋白酶:Sigma 产品(批号:4977,效价为 1:250)。Hoechst 33342 荧光染料:Sigma 产品(批号:021206,货号:A9918)。

1.2 实验仪器 超净台:SW-CJ-IF 型,苏州净化设备厂;二氧化碳培养箱:3164 型,美国 Forma scientic 公司;倒置显微镜:808434 型,日本 Nikon 公司。

1.3 实验药物 水蛭提取物:取水蛭药材 50 g,10 倍量水煎煮提取 2 次,1h/ 次,合并提取液,滤过,浓缩至约 100mL,加入乙醇配制成含乙醇终浓度为 50%的药液,常温静置 24h 后,取上清液浓缩至 500 mg/mL,用饱和 NaOH 调节 pH 值至 7.2~7.4,离心,上清液过 0.45μm 微孔滤膜除菌,滤液作为贮备液,置冰箱保存备用(所用药物浓度均以生药量计算)。

2 方法

2.1 新生大鼠大脑皮层神经细胞原代培养 参照文献^[2],将出生 24h 内的 SD 大鼠用眼科剪取出全脑,并在放大镜下剪取出大脑皮质,将其剪成 1~2 mm³ 的小块,37℃消化 25min,然后用含 10%小牛血清 DMEM 终止反应,用培养基洗两次,然后加完全培养基轻轻吹打,并静置 5min 吸取上清的细胞悬液。吸取细胞悬液过 70 μm 尼龙网筛,用血球计数板计数细胞,以 5× 10⁵/mL 密度接种在涂布有多聚赖氨酸的 96 孔、24 孔培养板,每孔分别加入 0.1 或 0.3mL,培养板置 37℃,5%CO₂,饱和湿度的培养箱中培养 4 h 后,吸去 10%小牛血清培养基,加入 2%B₂₇ Neurobasal 培养液继续培养,3d 后半量换液。

2.2 Trypan blue 染色细胞直接计数法 Trypan blue(台盼

兰)是一种具有阳离子特性的染料,活细胞拒染,死细胞被染成蓝色。神经细胞培养 4d 后,每组(设 4 个复孔)加入水蛭提取物使终浓度分别为 50、35、25、20、15、10、5、2.5、1mg/mL,再继续培养 48h 后,以 1:9 的比例加入 0.4%台盼兰使其终浓度为 0.04%,染色 1min 后将长有神经细胞的盖玻片反盖在载玻片上,5min 之内在光学显微镜下计数死细胞及活细胞数。随机计数 200 个细胞,计算死亡率(%)=[1- 活细胞数 / (活细胞数 + 死细胞数)]× 100%。

3 结果

实验结果显示,水蛭提取物在 1~10mg/mL 浓度范围内与正常对照组相比 P>0.05,而当水蛭提取物浓度达到 15~50mg/mL 时毒性作用表现出来,与正常对照组比较 P<0.05 或 P<0.01。见表 1。

表 1 水蛭提取物对神经细胞的毒性作用(n=4) ($\bar{X}\pm S$) %	
组别	死亡率
正常对照组	7.81± 0.78
水蛭提取物(1mg/mL)	7.74± 0.97
水蛭提取物(2.5mg/mL)	8.09± 1.05
水蛭提取物(5mg/mL)	8.19± 1.08
水蛭提取物(10mg/mL)	8.71± 1.96
水蛭提取物(15mg/mL)	14.91± 1.87 [▲]
水蛭提取物(20mg/mL)	21.55± 3.00 ^{▲▲}
水蛭提取物(25mg/mL)	29.64± 5.22 ^{▲▲}
水蛭提取物(35mg/mL)	39.46± 4.78 ^{▲▲}
水蛭提取物(50mg/mL)	49.78± 5.92 ^{▲▲}

注:与正常对照组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01。

4 讨论

药物浓度过高本身对体外培养神经细胞也具有毒性作用,所以选择合适的体外实验浓度范围对实验的成败至关重要。我们对水蛭提取物的细胞毒进行了研究,实验研究结果显示,水蛭提取物在 1~10mg/mL 浓度范围内神经细胞坏死率与正常对照组相比 P>0.05,而当浓度达到 15~50mg/mL 时毒性作用表现出来,与正常对照组比较 P<0.05 或 P<0.01,故本研究所用保护浓度应在无毒性或低毒性的范围内。本试验为水蛭提取物的药效学研究提供剂量选择依据。

参考文献

[1]国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1998.2 352
[2]聂荣庆,李扣华,胡国柱,等.黄芪抗新生大鼠大脑皮层神经细胞缺血性凋亡研究[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(11):34~37

(收稿日期:2007-07-11)

关系。本研究结果提示半枝莲抗肿瘤活性与野黄芩苷有一定的相关性,为临床应用半枝莲抗肿瘤治疗及其应用方法提供依据。

参考文献

[1]刘建文.药理实验方法学新技术与新方法[M].北京:化学工业出版社,2003.25~27

(收稿日期:2007-06-26)

“内虚”,正气不足而后邪气踞之,加之已是一类全身消耗性疾病,常可因病致虚。故治宜清热解暑,益气扶正,而补虚扶正是治疗肿瘤患者的重要法则之一。半枝莲辛苦性寒,具有较强的清热解毒、散瘀止血之功,文中应用不同浓度的乙醇提取,测定提取物中野黄芩苷含量,结果显示其含量与乙醇浓度成正比关系。同时以不同提取物进行抗肿瘤活性试验,统计得其抗肿瘤活性与乙醇浓度及野黄芩苷含量成正相关