



32种中草药提取物体外抗骨肉瘤作用的筛选

骨肉瘤是一种主要发生于青少年的恶性肿瘤，新辅助化疗方案使骨肉瘤患者5年生存率在国外已达60%，在国内约40%~50%。由于现有化疗药物剂量大、毒副作用大，且仍有约40%~50%的骨肉瘤患者对现行的治疗及化疗方案不敏感。目前国际上认为现行的化疗方案对骨肉瘤患者5年生存率的提高很难再有突破性进展[1][2]，而且由于化疗明显的毒副作用，大大限制了化疗的广泛应用和疗效的发挥。从治疗肿瘤的角度看，毒副作用小、疗效显著的中药备受关注。不管是中西医结合治疗，还是单用中药治疗，都越来越受到人们的欢迎[3][4]。由于部分骨肉瘤对化疗药物不敏感及中草药在抗肿瘤方面的独特作用，提示中草药可成为一种很有前途的骨肉瘤治疗手段。目前在抗骨肉瘤中药筛选方面国内外鲜有报道，因此研究中草药及其提取物对骨肉瘤的作用可能为骨肉瘤的治疗开辟一条新的途径。笔者首次对32味中药进行体外抗骨肉瘤筛选，以期寻找到有效药物，为中药治疗骨肉瘤提供标准化研究。

1 材料和方法

1.1 材料

32味中草药(蟾酥,牛胆粉,黄芩,王不留行,蒲公英,地龙,没药,冬虫夏草,龙葵,灵芝,半支莲,红花,仙鹤草,蜈蚣,地鳖虫,黄柏,威灵仙,香附,黄芪,忍冬藤,麝香,三棱,白花蛇舌草,肿节风,莪术,赤芍,水蛭,鳖甲,羚羊角,露蜂房,全蝎,乌药)购于中国药品生物制品检定所,由中山大学中药质量研究开发中心提取配制。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人成骨肉瘤细胞株U₂OS培养于含体积分数10%胎牛血清(购于杭州四季清)的DMEM(Gibicol)培养液中常规培养(37℃培养箱,体积分数5%的CO₂)。

1.2.2 细胞增殖活力检测(MTT法) 对数生长期细胞以每孔 0.7×10^4 接种于96孔板,分别加入不同浓度中药水提物,用酶联仪以570/630双波长测定,Bliss法计算抑制率及生长达50%时的药物浓度,以IC₅₀值表示。

1.2.3 细胞形态学观察 分别用普通光学显微镜、荧光显微镜(Hoechst 33258染色法)观察细胞生长情况并摄片。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)分析 收集不同药物作用的U₂OS细胞,每集约 1×10^5 个,用流式细胞仪分析不同浓度药物作用下的凋亡率,重复3次。

1.2.5 Annexin V和PI染色检测细胞的凋亡 200 μg/ml蟾酥水提物处理U₂OS细胞后,收集细胞,PBS洗涤两次后弃上清液;加入100 μl Annexin V工作液,室温孵育15 min;加入反应(结合)缓冲液500 μl,摇匀后在流式细胞仪上检测10 000个细胞作分析。重复3次。

1.2.6 统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件包进行数据处理分析,数据以均数±标准差表示,不同药物之间及相同药物不同浓度之间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 32种中草药提取物对骨肉瘤细胞株增殖的影响

在对32种抗骨肉瘤中草药的筛选中,蟾酥、牛胆粉对 U_{2+} OS细胞株的抑制作用最强。以下的实验研究中,针对对 U_{2+} OS细胞株的抑制作用最强的蟾酥、牛胆粉两种药物进行研究。通过对蟾酥、牛胆粉的MTT检测,其活细胞率随着浓度的增加而降低,呈明显的剂量依赖关系(图1)。蟾酥、牛胆粉的 IC_{50} 值($\mu\text{g/ml}$)分别为 97.96 ± 8.23 和 69.38 ± 8.48 。

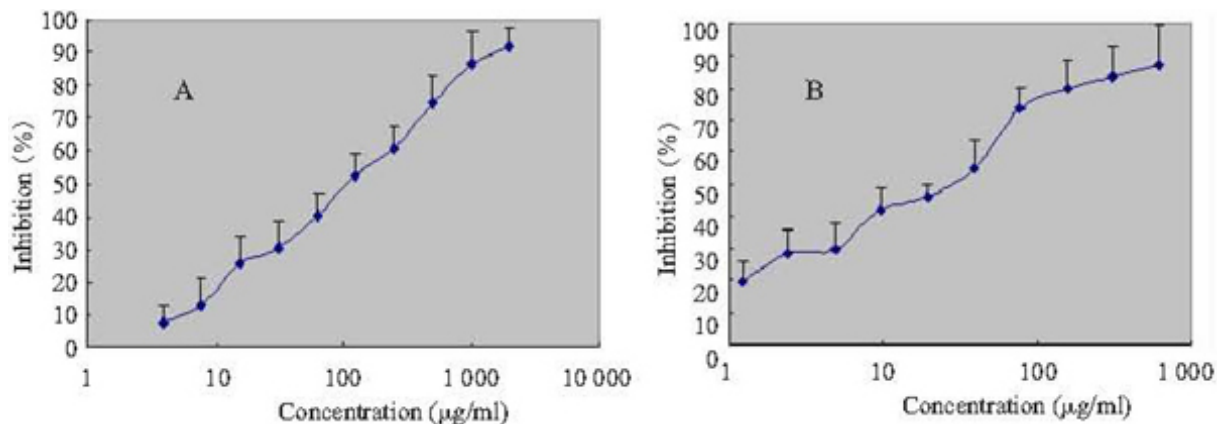


图 1 不同浓度蟾酥(A)和牛胆粉(B)水提取物对 U_{2+} OS细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Growth inhibition of U_{2+} OS cell line by aqueous extracts of Venenum Bufonis (A) and oxgall powder (B)

2.2 细胞形态学观察

普通光镜下, U_{2+} OS细胞株经蟾酥(200 $\mu\text{g/ml}$)、牛胆粉(100 $\mu\text{g/ml}$)处理后,可见部分细胞变圆,体积缩小,折光性增强,出现皱缩、脱落(图2)。荧光显微镜下, U_{2+} OS细胞株经200 $\mu\text{g/ml}$ 蟾酥处理48 h后,Hoechst 33258 染色可见染色质出现浓缩状态,凝集成块的凋亡改变,染色有核裂解、固缩、深染的凋亡细胞出现。细胞凋亡晚期可见凋亡小体;牛胆粉虽在MTT法检测中显示出良好的抑制细胞生长作用,但在实际观察中,在100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下并没有明显凋亡形态改变,其促进骨肉瘤细胞凋亡作用并不十分明显(图3)。

2.3 流式细胞仪检测蟾酥与牛胆粉提取物对 U_{2+} OS凋亡率的影响

200 $\mu\text{g/ml}$ 蟾酥水提取物分别作用0、16、24、48 h, U_{2+} OS 细胞株的凋亡率(%)分别为 1.73 ± 0.55 、 14.4 ± 3.8 、 21.5 ± 3.01 和 34.7 ± 5.54 ,具有显著差异性($P < 0.01$)。FCM显示低浓度牛胆粉(100~200 $\mu\text{g/ml}$)对细胞凋亡没有明显的影响,与阴性对照组相比没有统计学差异($P > 0.05$)。对牛胆粉进行不同浓度分析(0、150、300、500 $\mu\text{g/ml}$),显示48 h后 U_{2+} OS细胞株凋亡率(%)分别为 1.73 ± 0.55 、 8.93 ± 2.45 、 14.56 ± 2.15 和 26.53 ± 4.15 ,差异有显著性($P < 0.05$)。

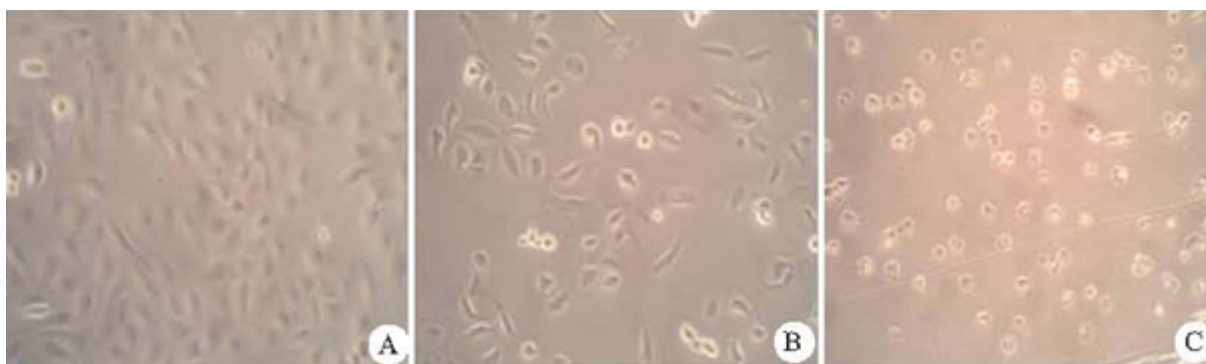


图2 普通光学显微镜观察蟾酥与牛胆粉水提物对U₂₊OS细胞株的影响

Fig.2 Effect of aqueous extracts of Venenum Bufonis and oxgall powder on U₂₊OS cell line observed microscopically (Original magnification: ×200)
A: Control; B: Venenum Bufonis; C: Oxgall powder

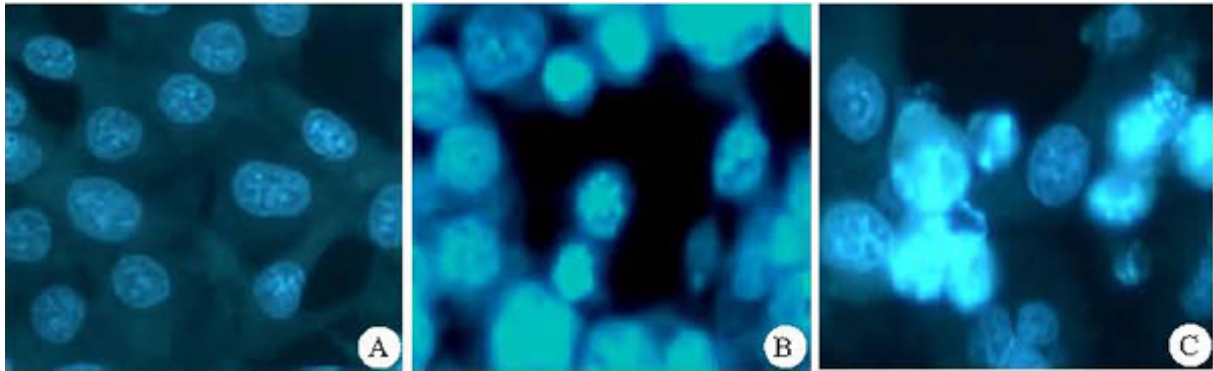


图3荧光显微镜观察蟾酥与牛胆粉水提物对U₂₊OS细胞株的影响

Fig.3 Effect of aqueous extracts of Venenum Bufonis and oxgall powder on U₂₊OS cell line under fluorescence microscope (Hoechst 33258 staining, original magnification: ×400)
A: Control; B: Venenum Bufonis; C: Oxgall powder

2.4 Annexin V 和PI双染检测细胞的凋亡结果

由于牛胆粉对细胞株的凋亡作用不十分明显，故仅对U₂₊OS细胞株进行蟾酥水提物的Annexin V 染色分析，进行细胞早期凋亡的检测。结果显示在200 μg/ml蟾酥水提物对U₂₊OS 细胞株的Annexin V 的检测中发现，随着作用时间延长，第四象限即早期凋亡细胞所占的比例增多。在作用0、16、24、48 h后早期凋亡细胞比例(%)分别为0.7±0.2、7.7±0.9、10.2±2.1和15.6±2.3。

3 讨论

骨肉瘤在中医古籍中属“骨瘤”、“骨癆”、“骨疽”等范畴，在《灵枢·刺节真邪篇》、《外科正宗》以及《千金翼方》中均有详细的记载，治疗中多应用清热解毒、活血化瘀、扶正培本之中药。我国学者近几年来已开始进行中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究，至目前为止发现了许多种中药提取物有诱导肿瘤细胞凋亡的作用[5][6][7][8]。但中药抗骨肉瘤作用的研究较少报道，且多为增殖和分化方面的研究[9][10]，故我们首次对中医辨证施治的抗骨肉瘤药物方剂进行筛选，以期筛选出对骨肉瘤细胞株有作用的中药。

在通过32种传统抗骨肉瘤中药及其他抗肿瘤药物中，筛选出了以蟾酥，牛胆粉为首的对人骨肉瘤细胞株U₂₊OS有效的中草药。深入研究表明蟾酥、牛胆粉对骨肉瘤细胞株U₂₊OS有生长抑制及促进凋亡作用，其作用有时间剂量依赖性。蟾酥为攻毒散节药，主治消化系统、肺、乳腺、骨骼等部位恶性肿瘤，是中成药“六神丸”、“痧药丸”等的组成之一。化学成分复杂，主要成分有蟾蜍甾二烯类、强心甾烯蟾毒类、吲哚碱类、甾醇类及肾上腺素、多糖、蛋白质、氨基酸、有机酸等，每类又含有多种活性成分。在抗肿瘤方面已知其对小鼠肉瘤S180、兔BP瘤、子宫颈癌、腹水型肝癌等均有抑制作用。蟾酥能不同程度地防治化疗和放疗引起的白细胞下降，对下降者用蟾酥可回升[11][12]。临床应用方面：(1)肝癌。范健等[13]用乳化聚合法制备的华蟾酥精明胶微球选择性地栓塞肝窦前动脉，显示了较好的抗肝癌作用。(2)胃癌。蟾酥蟾毒配基、蟾毒灵作用低分化胃癌细胞系MGC-803 48 h，即可显著抑制细胞生长，IC₅₀约为0.1 μmol/L[14]。(3)其他如膀胱癌、白血病等[15]。本实验运用现代药物筛选方法，对蟾酥进行了研究，发现其具有较强的抑制骨肉瘤细胞株生长的作用，有着良好的开发前景。今后可进一步筛选蟾酥中有效单体成分，纯化出对骨肉瘤细胞株有特效的药物，

为抗骨肉瘤药物的研究提供新方法。

牛胆粉为镇痉、镇静、清热、解毒之中药。牛胆粉中主要含有胆红素、胆汁酸、胆固醇、无机元素、蛋白及氨基酸等成分[16]，其中胆汁酸的量占绝大多数，有一定数量的无机元素，但蛋白、肽类成分较微。胆汁酸在医疗上具有广泛用途，例如从猪胆汁中提取的 α -猪去氧胆酸，用来降低血液胆固醇，治疗高血压及血管粥样硬化症；从鹅、鸡、鸭胆汁中提取的鹅去氧胆酸，用来治疗以胆固醇为主要成分的胆结石症；从牛、羊等动物的胆汁中配制人工牛黄。但其抗肿瘤作用尤其是抗骨肉瘤作用还未有相关报道。本实验通过MTT、FCM及形态学观察，初步证明了其具有一定的抗骨肉瘤细胞增殖的作用，但进一步分析发现只有在高浓度下才具有一定的促进肿瘤细胞凋亡作用。众所周知，由于中药的成分复杂，作用机制众多，除了促使肿瘤细胞凋亡之外可能还有其他抑制机制，如直接的细胞毒作用、抗突变作用、免疫增强作用、诱导其分化等。鉴于其已知成分主要为胆汁酸，故今后可行成分分析，深入进行药理机制的研究，提取分离胆汁酸等有效成分，进一步研究。

其他如王不留行、黄芩、仙鹤草、红花、半支莲、灵芝等中草药，在我们进行筛选工作中发现也具有一定的抑制肿瘤细胞增殖作用，也有相关文献报道其抗肿瘤作用[17][18][19]。在今后的工作中也将继续进行上述药物的抗骨肉瘤研究，以期寻找到对骨肉瘤有作用的特异性有效部位及特异性单体。

本实验通过对32种中草药的筛选，并对其中的最有效药物蟾酥、牛胆粉进行了深入分析，证实蟾酥、牛胆粉对骨肉瘤细胞株U₂₊OS有生长抑制及促进凋亡作用，其作用呈时间剂量依赖性。本实验结果为今后进一步筛选、寻找蟾酥、牛胆粉等中药的抗骨肉瘤有效部位以及进一步提取特异性抗肿瘤成分提供了实验依据，并为今后继续开展抗骨肉瘤中药标准化的研究提供了方法学方面的有益探索。

参考文献:

- [1] Marina N, Gebhardt M, Teot L, et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma[J]. *Oncologist*, 2004, 9(4): 422-41.
- [2] Delepine N, Alkallaf S, Cornille H, et al. Progress and stagnation in chemotherapy protocols for primary osteosarcoma[J]. *Ann Med Int (Paris)*, 2003, 154(1): 12-24.
- [3] Cragg GM, Newman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources[J]. *Cancer Invest*, 1999, 17(2): 153-63.
- [4] Abelson PH. Medicine from plants[J]. *Science*, 1990, 247(4942): 513.
- [5] 谢沛珊, 李爱媛, 周芳, 等. 中草药抗肿瘤筛选的实验研究[J]. *时珍国药研究*, 1996, 7(1): 19-20.
- [6] 李笑弓, 南勋义, 党建功, 等. 中药土贝母对人肾细胞癌影响的实验研究[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 1998, 4(2): 100-3.
- [7] 马晓华, 沃兴德, 梁海曼. 姜黄素抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡的研究概况[J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 1999, 26(1): 21-3.
- [8] 杨骅, 王仙平, 郁琳琳, 等. 榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡[J]. *中华肿瘤杂志*, 1996, 18(3): 169-72.
- [9] 张有为, 窦德强, 窦德强, 等. 人参皂苷对人体骨肉瘤细胞U₂₊OS增殖的影响[J]. *中草药*, 2001, 32(3): 232-6.
- [10] 李万根. 染料木素对成骨肉瘤细胞株SaOS2增殖和分化功能的影响[J]. *广州医学院学报*, 2000, 28(3): 7-9.
- [11] 高艳荣, 张莉, 张磊. 蟾酥及其有效成分的药理作用及机制研究进展[J]. *武警医学院学报*, 2003, 12(5): 406-8.
- [12] 张丽皎, 王学英, 石红梅, 等. 蟾蜍配合化疗治疗消化道恶性肿瘤的临床观察[J]. *肿瘤研究与临床*, 2000, 12(3): 185-6.
- [13] 范健, 黄懋魁, 伍福乐, 等. 华蟾酥精微球肝动脉栓塞的实验研究[J]. *癌症*, 1995, 14(6):

- [14] 陈小义, 徐瑞成, 陈莉, 等. 蟾蜍灵对人胃癌细胞系MGc-803的细胞毒作用[J]. 中草药, 2000, 31(12): 920-2.
- [15] 江成亮, 竺叶青. 蟾蜍抗肿瘤作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(1): 67-72.
- [16] 张启明. 牛胆粉的化学研究[J]. 药物生物技术, 1997, 4(1): 58-60.
- [17] 候华新, 黎丹戎, 秦箐, 等. 黄芩黄酮A对人肝癌细胞7402的抑制能力及体外增效作用[J]. 中国临床药学杂志, 2000, 9(3): 166-8.
- [18] 王思功, 李予蓉, 王瑞宁, 等. 仙鹤草对人癌细胞裸鼠移植瘤的影响[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(6): 702-4.
- [19] 张红, 左云飞, 张耀铮. 灵芝水煎剂对肝癌腹水瘤细胞系Hca- F25/CL-16A3的抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1994, 5(1): 40-2.

[回结果列表](#)