

• 论著 •

中药北豆根抗肿瘤活性的体外实验

单保恩¹, 梁文杰¹, 任凤芝², 朱京童²

(1. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北 石家庄 050011; 2. 华北制药集团新药研究开发中心, 河北 石家庄 050011)

【摘要】背景与目的: 探讨中药北豆根 (*Rhizoma menispermii*) 提取物的抗肿瘤作用并分离其活性物质。材料与方法: 采用 MTT 法测定了北豆根提取物对肿瘤细胞增殖反应的影响; 用三步法初步分离、纯化了北豆根提取物的抗肿瘤有效部位。结果: 北豆根提取物对多种组织来源的肿瘤细胞增殖有较强的抑制作用, 量效关系良好, 并且对原代培养肿瘤组织细胞增殖反应有抑制作用, IC₅₀ 多在 9 μg/ml 以下, 最低可达 0.7 μg/ml。并找到了其有效部位。结论: 北豆根水提物和北豆根醇提物体外均有很强的抗肿瘤作用; 醇提物的作用高于水提物; PE2 是北豆根醇提物抗肿瘤的有效部位; PE2 不仅对各肿瘤细胞株有广泛的杀伤作用, 而且对原代培养肿瘤细胞也有杀伤作用; 北豆根作为抗肿瘤药物有待进一步开发。

【关键词】北豆根; 抗肿瘤作用

中图分类号: R730.52

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)05-0293-03

Study about Anti-tumor Effect of *Rhizoma Menispermii* Extracts *in Vitro*

SHAN Bao-en¹, LIANG Wen-jie¹, REN Feng-zhi², et al

(Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. NCPC New Drug R & D co. Ltd, Shijiazhuang 050015, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study the antitumor effect of *Rhizoma Menispermii* extracts and purify its' active component. **MATRAIAL AND METHODS:** The effect of *Rhizoma Menispermii* extracts on the proliferation of 12 kinds of tumor cell lines and 9 cases of tumor cell coming from patients were assayed *in vitro* using MTT colorimetric method. The antitumor active part of *Rhizoma Menispermii* extracts was separated and purified using three steps method. **RESULTS:** *Rhizoma Menispermii* extracts markedly inhibits the proliferation of 12 kinds of tumor cell lines, and with a dose-dependent relationship ($P < 0.01$). *Rhizoma Menispermii* extracts also inhibits the proliferation of 9 cases of tumor cell coming from patients by primary culture. The antitumor active part was found. **CONCLUSION:** Both *Rhizoma Menispermii* extracts by water (RMW) and *Rhizoma Menispermii* extracts by ethanol (RME) have very strong antitumor effent *in vitro*; The effect of RME is stronger than RMW; PE2 is the antitumor active part of RME; PE2 not only has very strong and extensive inhibitive effect on the tumor cell lines but also has inhibitive effect on the tumor cell coming from patients by primary culture. It need the further development as antitumor drug.

【KEY WORDS】 *Rhizoma menispermii*; anti-tumor effect

中药北豆根即蝙蝠葛根, 为防己科植物蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum* DC) 的干燥根茎, 为北方习用。北豆根始载于《中国药植志》^[1]。其性味苦寒, 有清热解毒, 祛风止痛之功效, 具有抑菌、降压、抗心率失常等作用。中国药典 1977 年版始见北豆根^[2], 由于北豆根与山豆根长期混用 (尤其在北方), 中国药典

1985 年版将北豆根与山豆根正式分列。本文就北豆根提取物的体外抗肿瘤活性及其有效成分的初步分离进行报道。

1 材料与方法

1.1 用于原代培养肿瘤组织标本悬液制备 肿瘤

组织标本来自河北省肿瘤医院, 经过病理确诊且未经过放、化疗癌症患者手术切除的新鲜标本。其中小细胞肺癌 6 例, 乳腺癌 2 例, 食管癌 1 例。取新鲜无菌的肿瘤组织约 0.5 cm³, 放置 RPMI1640 培养液中, 3 h 内用机械分离的方法制成细胞悬液, 用 200 目铜网过滤, 台盼蓝染色活细胞 > 90 %, 以 RPMI1640 培养液洗涤后调成 5 × 10⁵/ml 细胞悬液备用。

1.2 肿瘤细胞株 人红白血病细胞株 K562、人单核细胞白血病细胞株 U937、人胃癌细胞株 BGC823、HGC27、KATO-Ⅲ, 人食管癌细胞株 TE13、TE1, 人卵巢癌细胞株 SK-OV3, 人胰腺癌细胞株 ASPC-1、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人肺癌细胞株 QG-56、人肝癌细胞株 SMMC-7721 等, 由河北医科大学第四医院科研中心提供和日本产业医科大学山下优毅教授惠赠。

1.3 肿瘤细胞株悬液制备 常规方法培养, 待细胞进入对数生长期后, 收集细胞, 用 RPMI1640 培养液调浓度为 1 × 10⁵ 个/ml 的细胞悬液备用。

1.4 北豆根水提液 (Rhizoma Menispermis extract by water, RMW) 制备 北豆根购自河北安国, 产地辽宁, 经河北医科大学药学院鉴定。取干品 5 g, 加蒸馏水 100 ml 浸泡过夜, 100 °C 水浴 1 h, 滤纸过滤除去不溶物质, 无菌滤器除菌, 旋转蒸发仪测定溶质含量, 调浓度为 10 mg/ml, 作为 RMW, 4 °C 保存。

1.5 北豆根醇提液 (Rhizoma Menispermis extract by ethanol, RME) 制备 北豆根干品经 95 % 乙醇浸泡过夜, 而后回流提取, 将提取液过滤、浓缩, 得 RME1; 药渣再经 50 % 乙醇回流提取, 将提取液过滤、浓缩, 得 RME2; 所剩药渣再用水提取, 得 RME3。各提取物用适宜溶媒 (水或 50 % 乙醇) 溶解, 一次性滤器过滤, 调浓度为 10 mg/ml, 4 °C 保存备用。

1.6 RME 的初步纯化 根据初步抑瘤实验结果, 将 RME1 和 RME2 合并, 用 3 % HCl 溶解后, 用有机溶剂萃取, 再将有机相浓缩, 得纯化提取物 1 (Purified extract 1, PE1); 水相调节 pH 值为 9, 再用有机溶剂萃取, 有机相反复水洗、脱水、浓缩, 得纯化提取物 2 (PE2); 所剩水相浓缩, 得纯化提取物 3 (PE3)。各提取物用适宜溶媒 (水或 50 % 乙醇) 溶解, 一次性滤器过滤, 调节浓度为 10 mg/ml, 4 °C 保存备用。

1.7 体外抑瘤实验 将原代培养的肿瘤标本悬液或肿瘤细胞株悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL (含 1 × 10⁴ 个细胞), 分别加入阴性对照磷酸盐缓冲液 (PBS)、阳性对照顺铂 (DDP) 和羟基喜树碱 (HCPT) 以及不同浓度提取液各 10 μL, 3 复孔。置于饱和湿度、37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养 72 h, 结束前 4 h, 各培养孔加入 5 mg/ml MTT 10 μL, 培养结束后, 离

心, 弃去上清, 每孔加入 15 % SDS 100 μL, 过夜。次日用酶联免疫检测仪检测各孔吸光度 (OD) 值, 测定波长 λ = 570 nm, 参考波长 λ = 630 nm。重复 3 次并计算抑制率。抑制率 (CI) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100 %。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据用 *t* 检验, 多组间数据用单因素方差分析。应用 The SAS system 6.12 统计软件计算。

1.9 药物敏感实验判断标准 CI ≥ 50 % 为敏感, 30 % ≤ CI < 50 % 为中度敏感, CI < 30 % 为不敏感。如果出现负值^[6], 表示药物刺激细胞生长。

2 结果

表 1 结果显示, 与阴性对照比较, RMW 对血液细胞源性细胞株 K562、腺细胞源性细胞株 BGC823 及上皮细胞源性细胞株 TE13 均有抑制作用, 并有良好的量效关系及时效关系, IC₅₀ 分别为 49.3、75.2 和 29.3 μg/ml。

与阴性对照组比较, RME1 和 RME2 对 K562、BGC-823 及 TE13 均有抑制作用, 并有良好的量效关系。对 RME1, IC₅₀ 分别为 26.0、44.9 和 8.1 μg/ml。对 RME2 敏感的最低药物浓度分别为: 31.3、31.3 和 15.6 μg/ml。IC₅₀ 分别为 28.9、46.1 和 23.0 μg/ml。高浓度的 RME3 (≥ 250 μg/ml) 对两个细胞株有抑制作用, 但随浓度的降低, 其抑制作用迅速消失。IC₅₀ 分别为 206.2、400.1 和 170.1 μg/ml。见表 2。

PE1 和 PE2 对 3 种细胞株的增殖反应均有明显的抑制作用, PE3 基本无抑制作用。PE2 的抑制作用高于 PE1, 且比 RME2 的抑制作用高了近 10 倍, 1 μg/ml 的 PE2 对 3 个细胞株的抑制率分别为 36.4 %, 28.2 % 和 57.5 %。见表 3。

PE2 对 U937、HGC-27、KATO-Ⅲ、TE1、SK-OV3、ASPC-1、MCF-7、QG-56 和 SMMC-7721 等 9 个细胞株的 IC₅₀ 分别为 8.7、4.9、1.7、5.6、3.7、17.6、7.4、3.9 和 3.6 μg/ml。各细胞株对 PE2 敏感的最低药物浓度多小于 3.9 μg/ml。

在 11 例癌组织细胞原代培养中, 有 2 例因生长不良未能进行药敏评价, 其余的 9 例均不同程度地敏感于 PE2, 但其敏感程度低于肿瘤细胞株。提示不同个体对药物的敏感程度存在差异。见表 4。

3 讨论

山豆根是豆科植物柔枝槐的根, 而北豆根是防己科植物蝙蝠葛的根, 二者迥然不同, 山豆根是传统抗癌中药, 而北豆根的抗癌作用尚未开发。有关北豆

表 1 RMW对K562、BGC823及TE13肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 1 The effect of RMW on the proliferation of K562、BGC823 and TE13 tumor cell lines(CI₁ × 10⁻², $\bar{x} \pm s$)

Drug (g · ml ⁻¹)	K562	BGC823	TE13
(-)	0.804 ± 0.023 (0)	0.586 ± 0.007 (0)	0.960 ± 0.043 (0)
DDP	0.029 ± 0.002 (96.4)	0.019 ± 0.001 (96.9)	0.024 ± 0.002 (98.0)
HCPT	0.145 ± 0.017 (82.0)	0.121 ± 0.012 (80.2)	0.103 ± 0.008 (91.3)
RMW 500	0.017 ± 0.000 * (97.9)	0.017 ± 0.001 * (97.1)	0.046 ± 0.009 * (95.2)
250	0.085 ± 0.005 * (89.4)	0.032 ± 0.006 * (94.6)	0.084 ± 0.002 * (91.3)
125	0.151 ± 0.002 * (81.2)	0.235 ± 0.003 * (56.8)	0.112 ± 0.009 * (88.3)
62.5	0.202 ± 0.008 * (74.8)	0.408 ± 0.009 * (30.4)	0.331 ± 0.110 * (65.5)
31.3	0.548 ± 0.012 * (31.8)	0.519 ± 0.023 * (11.4)	0.579 ± 0.011 * (39.7)
15.6	0.732 ± 0.035 * * (9.0)	0.496 ± 0.018 * (15.4)	0.631 ± 0.023 * (34.3)
7.8	0.793 ± 0.025 (1.4)	0.568 ± 0.006 * * (3.1)	0.709 ± 0.015 * (26.1)
3.9	0.861 ± 0.011 (-7.1)	0.612 ± 0.011 (-4.4)	0.779 ± 0.028 * (18.8)

Compared with (-), * P < 0.01; ** P < 0.05.

表 2 RME对K562、BGC823及TE13肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 2 The effect of RME on the proliferation of K562、BGC823 and TE13 tumor cell lines(CI₁ × 10⁻²)

Drug g · ml ⁻¹	K562		BGC823		TE13	
	RME1	RME2	RME1	RME2	RME1	RME2
(-)	0		0		0	
DDP	96.4		96.9		98.0	
HCPT		82.0		80.2		91.3
RME 500	96.5 *	96.6 *	96.5 *	96.7 *	98.8 *	97.5 *
250	97.1 *	95.9 *	97.3 *	97.1 *	98.7 *	97.6 *
125	87.3 *	84.9 *	90.0 *	75.8 *	96.8 *	93.8 *
62.5	83.0 *	82.1 *	54.1 *	41.3 *	93.3 *	90.4 *
31.3	79.3 *	72.6 *	26.7 *	31.3 *	88.3 *	66.7 *
15.6	29.9 * *	27.4 * *	16.2 *	25.6 *	62.2 *	32.8 *
7.8	4.6	6.2	18.6 * *	22.7 * *	40.3 *	17.3 *
3.9	2.2	7.6	-2.5	2.6	34.6 *	24.7 *

Compared with (-), * P < 0.01; ** P < 0.05.

表 3 PE2对K562、BGC823及TE13肿瘤细胞增殖作用的影响

Table 3 The effect of PE2 on the proliferation of K562、BGC823 and TE13 tumor cell lines($\bar{x} \pm s$, CI₁ × 10⁻²)

Drug (g · ml ⁻¹)	K562	BGC823	TE13
(-)	0.559 ± 0.017 (0)	0.877 ± 0.044 (0)	0.589 ± 0.014 (0)
DDP	0.034 ± 0.001 (94.0)	0.027 ± 0.002 (97.0)	0.027 ± 0.002 (95.5)
HCPT	0.162 ± 0.014 (71.1)	0.169 ± 0.017 (80.7)	0.105 ± 0.004 (82.1)
PE2 31.3	0.017 ± 0.002 * (96.9)	0.037 ± 0.005 * (95.7)	0.018 ± 0.001 * (96.9)
15.6	0.021 ± 0.001 * (96.2)	0.166 ± 0.005 * (81.1)	0.045 ± 0.020 * (92.3)
7.8	0.066 ± 0.007 * (88.3)	0.294 ± 0.005 * (66.5)	0.079 ± 0.005 * (86.5)
3.9	0.123 ± 0.010 * (78.1)	0.339 ± 0.024 * (61.4)	0.099 ± 0.005 * (83.3)
2.0	0.157 ± 0.024 * (71.9)	0.518 ± 0.012 * (41.0)	0.099 ± 0.002 * (83.1)
1.0	0.355 ± 0.069 * (36.4)	0.630 ± 0.037 * (28.2)	0.250 ± 0.051 * (57.5)
0.5	0.559 ± 0.009 (0.0)	0.664 ± 0.012 * (24.4)	0.402 ± 0.018 * (31.6)
0.2	0.556 ± 0.013 (0.5)	0.832 ± 0.004 (5.1)	0.429 ± 0.029 * (27.1)

Compared with (-), * P < 0.01.

表 4 PE2对原代培养肿瘤细胞的作用

Table 3 The effect of PE2 on the proliferation of tumor cells by primary culture(CI₁ × 10⁻²)

Drug(μg · ml ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DDP	65.1	62.1	61.6	65.9	58.0	63.3	63.1	54.5	56.5
HCPT	51.9	56.7	41.8	57.4	42.8	49.9	52.7	43.5	47.8
PE2 250	68.9 *	70.0 *	60.8 *	70.2 *	60.1 *	55.6 *	59.5 *	53.2 *	59.9 *
125	63.7 *	67.4 *	58.7 *	66.5 *	53.8 *	53.8 *	52.9 *	48.8 *	59.1 *
62.5	41.9 *	65.1 *	52.3 *	61.3 *	48.2 *	48.9 *	47.3 *	42.6 *	58.3 *
31.3	41.9 *	68.2 *	43.8 *	56.9 *	40.8 *	45.4 *	43.2 *	37.2 *	53.2 *
15.6	38.2 *	62.6 *	38.6 *	56.7 *	31.7 *	40.1 *	38.6 *	29.6 *	49.3 *
7.8	36.1 *	44.6 *	32.3 *	42.9 *	27.0 *	35.0 *	33.5 *	27.6 *	48.3 *
3.9	22.8 * *	31.3 *	30.1 *	24.1 * *	25.7 *	20.2 *	27.6 *	22.2 *	44.6 *
2.0	22.5 * *	13.9 *	21.9 *	9.2	21.2 *	13.2 *	18.1 *	22.8 *	31.1 *

Compared with (-), * P < 0.01; ** P < 0.05.

根的抗肿瘤作用罕有报道, 仅有北豆根的有效成分之一蝙蝠葛碱的逆转肿瘤多药耐药等^[3,4]相关报道。田代华著《实用中药辞典》中, 谓北豆根可用于治疗

消化道癌症^[5]。

本文使用人肿瘤细胞株 K562、BGC823 及 TE13

(下转 304 页)

表 6 超微生物钙颗粒剂对大鼠脏器重量及系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 The results of visceral organ weight and coefficient on mice with Minuteness granule Calcium of biology($\bar{x} \pm s$)

Sex	Dose g·kg ⁻¹	Numbers of mice	Hepar		Milt		Ren		Testicle	
			Weight(g)	coefficient($\times 10^{-2}$)	Weight(g)	coefficient($\times 10^{-2}$)	Weight(g)	coefficient($\times 10^{-2}$)	Weight(g)	coefficient($\times 10^{-2}$)
♀	1.71	10	5.50±0.47	3.41±0.25	0.47±0.07	0.29±0.03	1.15±0.09	0.71±0.05	-	-
	3.35	10	5.79±0.64	3.61±0.41	0.46±0.04	0.29±0.02	1.19±0.10	0.74±0.05	-	-
	6.82	10	5.59±0.50	3.49±0.14	0.48±0.06	0.30±0.03	1.17±0.10	0.73±0.05	-	-
	0.00	10	5.74±0.39	3.52±0.14	0.48±0.07	0.30±0.03	1.19±0.07	0.73±0.03	-	-
♂	1.82	10	6.48±0.81	3.42±0.20	0.54±0.07	0.29±0.03	1.42±0.18	0.75±0.05	2.19±0.32	0.15±0.08
	3.48	10	6.57±0.58	3.45±0.27	0.59±0.07	0.31±0.03	1.50±0.15	0.78±0.03	2.27±0.18	1.19±0.07
	6.99	10	6.56±0.57	3.55±0.22	0.54±0.08	0.29±0.03	1.44±0.11	0.78±0.07	2.23±0.27	1.21±0.14
	0.00	10	6.85±0.51	3.55±0.13	0.60±0.09	0.31±0.04	1.51±0.11	0.78±0.05	2.30±0.33	1.19±0.13

项致突变试验(小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)结果均为阴性。30 d 喂养试验结果表明:该受试物对雌性大鼠低、中、高剂量为 1.71、3.35、6.82 g/kg;对雄性大鼠低、中、高剂量为 1.82、3.48、6.99 g/kg 对 Wistar 大鼠的临床检查、血液学、生化学、脏器重量和系数以及病理组织学等指标无明显影响,未发现该受试物有明显的毒性作用。超微

生物钙颗粒剂作为保健食品是安全的。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部卫生法制与监督司, 保健食品检验与评价技术规范[S].
- [2] GB15193-1994. 食品安全性毒理小评价程序和方法[S].

(上接 295 页)

作为血源性、腺源性和上皮源性代表细胞株,对北豆根水提液及醇提液进行体外抑瘤实验,结果表明, RMW 和 RME1、RME2 有明显的抑制肿瘤细胞株增殖反应的作用。RME1、RME2 的作用大于 RMW, 而 RME3 的作用最小。提示其抗癌有效成分有的溶于水,但多溶于乙醇。为进一步找到其有效部位,我们将 RME1、RME2 合并进一步应用三步法纯化,纯化后得到 PE1、PE2、PE3。其中 PE2 作用最强,对 BGC823 的 IC₅₀ 达到 2.8 μg/ml,降低了大约 20 倍。说明 PE2 即其有效部位。

通过选用不同来源、不同生长特性的细胞株进行实验,发现 PE2 对各细胞株具有广泛的杀伤作用,其 IC₅₀ 多在 9 μg/ml 以下,最低达 0.7 μg/ml。文献表明,肿瘤药物敏感实验体外实验结果与体内化疗疗效总符合率高达 85%^[6]。采用 MTT 法体外研究 PE2 对源于实体瘤的原代培养肿瘤细胞的作用,发现各肿瘤细胞多敏感于 PE2,但敏感程度个体差异较大,可能是个体肿瘤细胞生物学特性的差异所致。

总之,北豆根水提物和北豆根醇提物体外均有

很强的抗肿瘤作用;醇提物的作用高于水提物;PE2 是北豆根醇提物抗肿瘤的有效部位;PE2 不仅对各种肿瘤细胞株有广泛的杀伤作用,而且原代培养肿瘤细胞也有杀伤作用;北豆根作为抗肿瘤药物有待进一步开发,其作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 532.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 56.
- [3] LI Jian-hua, QIN Feng-qi, YANG Pei-man. Reversal of multidrug resistance in human K562/ADM cell line by dauricine[J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2002, 24 (2): 94-96.
- [4] CUI Liao, PANG Yi-sheng. Inhibitory effects of tetrandrine and dauricine on growth of HL-60 and K562 cell lines[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1995, 11(6): 478-481.
- [5] 田代华. 实用中药辞典[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 493-495.
- [6] 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1991. 418.

一篇合格医学论文的统计学准则

设计科学, 方法适宜, 计算准确, 结论合理, 描述正确。

(陈彬)