

- chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Microchem J, 2010, 94: 130-138.
- [4] SALEM A A, MOSSA H A. Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. Talanta, 2012, 88: 104-114.
- [5] CHU Q C, TIAN X H, JIANG L M, et al. Determination of effective ingredients in compound sulfamethoxazole tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection [J]. Chin J Anal Chem, 2008, 36(3): 292-296.
- [6] GRANERO G, GARNERO C, LONGHI M. Second derivative spectrophotometric determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin(HP- β -CD) [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 29(1/2): 51-59.
- [7] SHEWIYOA D H, KAALE E, RISHA P G, et al. Development and validation of a normal-phase high-performance thin layer chromatographic method for the analysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(42): 7102-7107.
- [8] LIU X R, LI X, JIANG T. Application of electrochemical sensor technology in medicine studies [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(3): 211-215.

收稿日期: 2013-08-20

抗癌灵活性部位对不同肿瘤细胞的抑制作用

叶强¹, 睢凤英², 杨鑫骥², 王嘉^{3*} (1.浙江省人民医院, 杭州 310014; 2.嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314000; 3.浙江医学高等专科学校, 杭州 310053)

摘要:目的 研究抗癌灵正丁醇提取部位(以下简称 KAL)对多种肿瘤细胞的抑制率以及时效和量效关系。方法 采用 MTT 法考察 KAL 对肿瘤细胞 B-16、SGC-7901、Colo320、PC-3、HL60 的抑制率以及 IC₅₀; 通过观察 KAL 对肿瘤细胞 SGC-7901 和 PC-3 生长的影响, 考察其时效和量效关系。结果 KAL 对肿瘤细胞 B-16、SGC-7901、Colo320、PC-3、HL60 的 IC₅₀ 分别为: (21.05±4.31), (13.43±4.78), (15.17±3.82), (26.39±5.76), (25.78±4.40) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 且在抑制肿瘤细胞过程中呈现明显的时效关系和量效关系。结论 KAL 对肿瘤细胞 B-16、SGC-7901、Colo320、PC-3、HL60 具有显著抑制作用。

关键词: 抗癌灵; 正丁醇提取部位; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)05-0534-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.004

Anti-tumor Effect of Kang Ai Ling's Active Site on Different Cancer Cells

YE Qiang¹, SUI Fengying², YANG Xingji², WANG Jia^{3*} (1.Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2.Jiaxing University, College of Medicine, Jiaxing 314000, China; 3.Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the growth inhibitory effect of tumor cells by Kang Ai Ling's 1-butanol extract(KAL). **METHODS** The anti-proliferative activities of 1-butanol extract of KAL against B-16, SGC-7901, Colo320, PC-3 and HL60 cells were evaluated by MTT colorimetric assay *in vitro*, then the result showed by inhibitory rate and IC₅₀. Investigation on KAL's dose-effect dependent manner and time-effect dependent manner through growth inhibitory curve on SGC-7901 and PC-3. **RESULTS** The IC₅₀ of KAL on B-16, SGC-7901, Colo320, PC-3 and HL60 were (21.05±4.31), (13.43±4.78), (15.17±3.82), (26.39±5.76), (25.78±4.40) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The anti-tumor effect of KAL has obvious time-effect and dose-effect dependence. **CONCLUSION** KAL has significant growth inhibitory effect on B-16, SGC-7901, Colo320, PC-3 and HL60 cells.

KEY WORDS: Kang Ai Ling; 1-butanol extract; anti-tumor

抗癌灵是抗肿瘤经验方, 临床抗胃癌效果较好。前期实验表明, 抗癌灵的正丁醇提取部位(以下简称 KAL)对 U14 宫颈癌、S-180 小鼠肉瘤均有显著抑制作用, 且通过急性毒性实验发现该部位

在常规剂量下不良反应较小^[1-2]。为了进一步明确抗癌灵的抗肿瘤作用, 本研究通过 MTT 法观察 KAL 对肿瘤细胞生长的影响, 评价其对不同瘤株的抑制能力, 考察其时效和量效关系, 为进一步

基金项目: 浙江医学高等专科学校科研基金项目(2006XZ11)

作者简介: 叶强, 男, 主管药师 Tel: (0571)85893128
(0571)87692651 E-mail: jxwangjia2@163.com

E-mail: yht20020517@qq.com

*通信作者: 王嘉, 男, 教授 Tel:

研究 KAL 抑制细胞增殖及其临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 受试药物

取抗癌灵(本课题组自制)^[1-2]500 g, 用 50% 的乙醇水浴加热回流提取 3 次, 合并提取液, 减压回收乙醇至无醇味, 用正丁醇 50 mL 提取 4~5 次, 合并提取液, 减压浓缩至浸膏, 取适量浸膏, 加入 DMSO 溶解, 配成浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。临用前加入不含血清和抗菌药物的 RPMI 1640 培养基对倍稀释至所需浓度, DMSO 终浓度为 $0.3125\sim 5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 细胞株

小鼠黑色素瘤 B-16 细胞, 人胃腺癌 SGC-7901 细胞, 人结肠腺癌 Colo320 细胞, 人前列腺癌 PC-3 细胞, 由浙江省医学科学院药物研究所提供; 人急性髓性白血病 HL60 细胞, 由浙江大学药学院提供。

1.3 试剂

RPMI1640 培养基(Invitrogen 公司); DMEM 培养基(Invitrogen 公司); 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所); 二甲基亚砷(无锡海硕生物有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, 杭州昊天生物技术有限公司)。

1.4 仪器

Forma3111 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fwisher Scientific 公司); Air Tech 超净工作台(苏州安泰空气技术公司); Model 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司); 80-2B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 MTT 法测定 KAL 对肿瘤细胞的抑制率

取对数生长期的 B-16、SGC-7901、Colo320、PC-3、HL60 细胞, 按 $1\ 500\sim 2\ 000$ 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$ 细胞数接种于 96 孔板上, $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 。培养 24 h 后给药, 给药组剂量为 50, 25, 12.5, 6.25, $3.125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时设对照组和空白组。每组设 4 复孔, 培养 72 h 后, 每孔加入 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $20\text{ }\mu\text{L}$, 培养 4 h 后倾去培养液, 分别加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 溶解, 振摇均匀。用酶标仪在 570 nm 处测定 OD 值^[3]。并算不同浓度 KAL 对肿瘤细胞的抑制率, 根据抑制率计算药物对肿瘤细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。抑制率计算公式:

$$IR = \frac{OD_{\text{正常对照孔}} - OD_{\text{给药孔}}}{OD_{\text{正常对照孔}} - OD_{\text{空白对照孔}}} \times 100\%$$

2.2 KAL 对 SGC-7901 和 PC-3 细胞生长的影响

取对数生长期的 SGC-7901 和 PC-3 细胞, 分别以 $1\ 500$ 和 $2\ 000$ 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$ 细胞数接种于 96 孔板, $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 培养 24 h 后加入 KAL, 设 3 个浓度梯度($100, 50, 25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每个浓度平行设 6 组, 另设正常对照组, 亦设 6 组, 每组设 4 复孔。各加药组分别培养 0, 24, 48, 72, 96 和 120 h 后加入 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT, $20\text{ mL}\cdot\text{孔}^{-1}$ 。继续培养 4 h 后吸去正常对照组和各浓度给药组的孔内上清液, 再加入 $150\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ DMSO 溶解, 振摇均匀。用酶标仪在 570 nm 处测 OD 值, 计算各个时间点 KAL 对 2 种肿瘤细胞的抑制率, 从而考察 KAL 的时效关系和量效关系。

2.3 统计学分析

数据用 SPSS 12.0 进行分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验方法进行检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异; $P < 0.01$ 认为有极其显著性差异。

3 结果

3.1 KAL 对肿瘤细胞的抑制作用

不同浓度 KAL 与多种肿瘤细胞共培养 72 h 后, 用 MTT 法测定 OD 值, 计算 IR 值和 IC_{50} , 结果见表 1。

表 1 KAL 对肿瘤细胞的抑制作用($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Inhibition effect of KAL on different tumor cells($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

瘤株	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%	$\text{IC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
B-16	3.125	3.26 ± 3.76	21.05 ± 4.31
	6.25	17.51 ± 4.51	
	12.5	26.76 ± 4.79	
	25	54.32 ± 3.64	
	50	81.32 ± 2.68	
Colo320	3.125	7.46 ± 3.50	15.17 ± 3.82
	6.25	27.17 ± 3.17	
	12.5	36.28 ± 2.89	
	25	62.52 ± 2.86	
	50	88.74 ± 2.92	
SGC-7901	3.125	15.94 ± 3.32	13.43 ± 4.78
	6.25	33.79 ± 3.12	
	12.5	51.43 ± 2.78	
	25	70.15 ± 2.54	
	50	74.29 ± 2.21	
PC-3	3.125	4.55 ± 4.16	26.39 ± 5.76
	6.25	21.54 ± 3.75	
	12.5	30.35 ± 3.45	
	25	48.68 ± 2.97	
	50	64.83 ± 3.13	
HL60	3.125	5.67 ± 3.45	25.78 ± 4.40
	6.25	17.85 ± 2.86	
	12.5	30.08 ± 2.26	
	25	47.94 ± 2.57	
	50	68.35 ± 2.31	

实验结果显示, KAL 对 B-16、SGC-7901、COLO320、PC-3、HL60 肿瘤细胞均有较好抑制作用, IC_{50} 为 $13.43\sim 26.39\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 但药物对各种细胞的敏感性有些差异, 其中对 SGC-7901 敏感度最高为 $13.43\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 PC-3 敏感性最差为 $26.39\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 KAL 对 SGC-7901 和 PC-3 细胞生长的影响
不同浓度 KAL 与 SGC-7901 和 PC-3 共培养不同时间后, 用 MTT 法测定 OD 值, 计算 IR 值, 结果见表 2~3。

表 2 KAL 不同作用时间对 SGC-7901 生长的抑制作用 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Inhibition of KAL on SGC-7901 in different time ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

时间/h	抑制率/%		
	KAL $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	KAL $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
24	$52.12\pm 1.31^{2)}$	28.34 ± 1.08	21.38 ± 1.07
48	$77.14\pm 1.71^{2)3)}$	$53.23\pm 1.77^{1)4)}$	38.77 ± 1.52
72	$86.86\pm 1.57^{2)4)}$	$71.87\pm 1.69^{4)}$	$63.32\pm 2.41^{3)}$
96	$91.75\pm 1.80^{2)4)}$	$77.62\pm 1.36^{4)}$	$68.43\pm 1.84^{3)}$
120	$95.42\pm 1.41^{1)4)}$	$86.74\pm 2.13^{4)}$	$72.51\pm 2.13^{4)}$

注: 与 KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; 与作用 24 h 比较, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

Note: Compared with KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with 24 h, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

表 3 KAL 不同作用时间对 PC-3 生长的抑制作用 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Inhibition of KAL on PC-3 in different time ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

时间/h	抑制率/%		
	KAL $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	KAL $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
24	$41.58\pm 1.84^{2)}$	$12.49\pm 0.8^{1)}$	6.33 ± 1.13
48	$63.78\pm 1.70^{2)3)}$	$36.1\pm 0.51^{1)4)}$	$25.31\pm 0.72^{4)}$
72	$70.91\pm 2.13^{2)4)}$	$58.0\pm 0.41^{1)4)}$	$42.92\pm 0.49^{4)}$
96	$79.50\pm 1.62^{2)4)}$	$63.5\pm 0.84^{1)4)}$	$49.12\pm 0.78^{4)}$
120	$85.66\pm 1.91^{2)4)}$	$72.8\pm 0.32^{1)4)}$	$55.34\pm 0.71^{4)}$

注: 与 KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; 与作用 24 h 比较, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

Note: Compared with KAL $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with 24 h, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$

实验结果表明, 不同浓度 KAL 在不同时间对 SGC-7901 及 PC-3 的抑制率均有变化。在同一浓度上, 随着时间的增加, KAL 对 2 种肿瘤细胞的抑制作用均不断增强, 呈明显的时间-效应关系;

在同一时间点上, 随着浓度的增加 KAL 对 2 种肿瘤细胞的抑制作用也不断增强, 呈明显的剂量-效应关系。

4 讨论

本实验是在课题组对 KAL 通过体内筛选, 证实正丁醇提取部位对 U14 宫颈癌、S-180 肉瘤的抑制作用较其他提取部位更强的基础上^[1-2], 对活性部位所做的进一步研究, 考察了 KAL 正丁醇提取部位对多种肿瘤细胞的抑制率以及时效和量效关系。

研究采用 MTT 法测定 KAL 对多种肿瘤细胞的抑制作用。活细胞内线粒体中的琥珀酸酶能使 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物, 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能^[4]。故可利用此原理测定药物处理后的肿瘤细胞 OD 值的变化, 计算肿瘤细胞的存活率, 从而预测肿瘤细胞对药物的敏感程度。

国家新药研究指导原则规定, 当植物提取物对肿瘤细胞增殖的 $IC_{50}<30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 即确定其体外具有抗肿瘤活性。本实验选择 B-16、SGC-7901、Colo320、PC-3、HL60 作为靶向细胞, 结果显示 KAL 均能较好地抑制细胞繁殖, 但药物对各种细胞的敏感性不同, IC_{50} 为 $13.43\sim 26.39\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。表明 KAL 有一定的体外抗肿瘤活性, 抗癌谱较广。

在研究 KAL 对肿瘤细胞生长的影响中, 选用了药物敏感性最强和最小的 SGC-7901 和 PC-3 肿瘤细胞。通过不同时间、不同浓度 KAL 对肿瘤细胞生长的影响试验, 发现 KAL 对 2 种细胞生长的抑制作用具有时间、浓度依赖性的特点。而 KAL 的作用机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] WANG J, HUANG Y Y, YAN R L, et al. An experimental study on acute toxicity of the drug anti-tumor agent [J]. Zhejiang Prev Med(浙江预防医学), 2006, 18(2): 5-7.
- [2] YI H, YAN R L, YANG X J, et al. Experimental study on the action of "Anti-cancer Agent" with different extraction techniques [J]. Zhejiang Med Edu(浙江医学教育), 2005, 4(2): 50-52.
- [3] XU S Y, BIAN R L, CHEN X, et al. Test Methods of Pharmacology(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2002: 1785-1786.
- [4] MOAMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55-58.

收稿日期: 2013-10-19