

光合细菌转化槲寄生制剂抗肿瘤活性初步研究*

杨官娥^{1,2} 张肇铭^{1**}

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)¹ (山西医科大学药学院 太原 030001)²

摘要: 通过急性毒性实验比较各制剂组的毒性, MTT 法考查各制剂组对人体外癌细胞的生长抑制率, 体内实验考查各制剂组对移植性肿瘤的抗肿瘤作用。结果表明, 光合细菌 (PSB) 制剂组、光合细菌转化槲寄生 (PSBT) 制剂组无毒, PSBT 降低了槲寄生的毒性; PSBT 制剂组对人体外癌细胞 BGC-803、A2780、KB 和小鼠体内 S₁₈₀ 肉瘤、H₂₂ 肝癌、Lewis 肺癌均具有明显抑制作用, 且抗肿瘤活性高于其他制剂组。

关键词: 光合细菌, 槲寄生, 急性毒性, 抗肿瘤活性, 生物转化

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0040-04

Study on Antitumor Activity of Photosynthetic Bacteria Transforming Mistletoe Preparation*

YANG Guan-E^{1,2} ZHANG Zhao-Ming^{1**}

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)¹

(School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)²

Abstract: The acute toxicity experiments were used to compare the toxicity of these preparation groups. MTT method was used to examine the proliferation inhibition assay of these preparation groups on human cancer cells in vitro and experiments in vivo were used to evaluate the anti-tumor activity of these preparations on implanted tumors. It was proved Photosynthetic Bacteria (PSB) preparation and Photosynthetic Bacteria Transforming Mistletoe (PSBT) preparation were innocuity. PSBT reduced the toxicity of Mistletoe. PSBT on human cancer cells BGC-803, MCF7, A2780, KB in vitro and on implanted tumors S₁₈₀ sarcoma, H₂₂ liver carcinoma, Lewis lung carcinoma had effectively inhibit effect. Antitumor activity was higher than the other preparation groups.

Key words: PSB, Mistletoe, Acute toxicity, Antitumor activity, Biotransformation

槲寄生 (MIS) 为桑寄生科槲寄生属植物, 已有文献报道, MIS 粗提物、MIS 总生物碱具有抗肿瘤活性, 但因其中含有对人体有害的毒肽和小分子蛋白质, 限制了其应用^[1-3]。光合细菌为一种有益菌, 可以转化中药中的一部分成分。本课题组通过一定工艺制得 PSBT 制剂, 通过 TLC 分析, PSBT 制剂中成分与 PSB 制剂、MIS 制剂中成分相比, 发生了一定变化, 且有 2 个以上主斑点。本文对其毒性及抗肿瘤活性进行了考查。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材: 槲寄生饮片, 定州医药公司东亭批发部。

* 国家科技攻关项目 (No. 2001BA540C)

** 通讯作者 Tel: 0351-7011409, E-mail: zhangzhm@sxu.edu.cn

收稿日期: 2005-05-30, 修回日期: 2005-07-18

1.1.2 试剂与药品: 环磷酰胺 (CP) 制剂: 上海华联制药有限公司产品。光合细菌 (PSB) 制剂: 紫色非硫菌群红细菌属的球形红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*), 由山西大学光合细菌研究室分离鉴定保藏^[4], 菌液含菌数 8.0×10^8 个/mL。MIS 制剂: 槲寄生 75% 乙醇提取物制成, 浓度以 MIS 原药材计为 0.25g/mL。光合细菌 + 槲寄生 (PSB + MIS) 制剂: PSB 制剂和槲寄生 75% 乙醇提取物的简单复配, 制剂浓度以槲寄生原药材计为 0.25g/mL, 菌液含菌数 8.0×10^8 个/mL。光合细菌转化槲寄生 (PSBT) 制剂: 由 75% 乙醇提取槲寄生, 导入光合细菌后培养 5d。制剂浓度以槲寄生原药材计为 0.25g/mL, 菌液含菌数 8.0×10^8 个/mL。

1.1.3 细胞株: 人胃癌细胞 BGC-803, 人卵巢癌细胞 A2780, 人口腔癌细胞 KB, 由中国辐射防护研究院传代保种。Lewis 肺癌实体瘤、H₂₂ 肝癌腹水瘤、S₁₈₀ 肉瘤由山西大学光合细菌研究室传代保种。

1.1.4 动物: 昆明种小鼠、C₅₇/BL 小鼠由山西医科大学动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性试验: 根据预试验结果, 选出实验组, 50 只重约 20g 的健康昆明种小鼠, 雌雄各半随机分成 5 组, 每组 10 只, 每只灌胃含不同浓度的各制剂 0.5mL。一次性给药后即刻观察中毒症状并记录死亡动物数^[5]。

1.2.2 MTT 法测定对人体外肿瘤细胞生长抑制率: 对数生长期的 BGC-803、A2780、KB 癌细胞株, 配成细胞悬液, 浓度为 1×10^5 cell/L, 分装于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 置于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 4h 后, 加入 100 μ L 含不同浓度 PSB、MIS、PSB + MIS、PSB 制剂的 RPMI1640 培养液, 使 PSB 制剂组终浓度分别为 480、240、120、60、24 mL/L, 其它制剂组终浓度按槲寄生药材计分别为 120、60、30、15、6 g/L, 对照组加入等体积的 RPMI1640 培养液, 各组 3 个平行孔。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72h 后弃去培养液, 每孔加入 200 μ L 0.2% MTT 溶液 (RPMI1640 配制)。37℃ 保温 4h, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解 Formazan, 轻度振荡后, 用酶标仪在 540nm 处测定 OD 值, 按“生长抑制率 IR (%) = (1 - 用药组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%”公式计算生长抑制率。

1.2.3 体内抗肿瘤实验: S₁₈₀ 肉瘤小鼠和 H₂₂ 肝腹水瘤模型来自昆明种小鼠, 在无菌条件下, 取带瘤小鼠的腹水用无菌生理盐水 1:10 稀释, 于昆明种小鼠右前腋下以每鼠 0.2mL 瘤液接种; Lewis 肺癌模型来自于 C₅₇/BL 小鼠, 取新鲜无坏死的 Lewis 肺癌瘤组织, 无菌条件下匀浆, 以生理盐水 1:10 稀释, 小鼠每鼠右侧腋窝皮下接种 0.2 mL。每组实验 24h 后将小鼠按雌雄对半随机分成 15 组, 每组 10 只, 设生理盐水对照组、培养基组、CP 组、PSB 制剂组、MIS 制剂组、PSB + MIS 制剂组、PSBT 制剂组。CP 组为腹腔注射环磷酰胺, 100mg/kg, 1 次; 其余各组每天给小鼠灌胃给药 1 次。S₁₈₀ 肉瘤小鼠和 H₂₂ 小鼠连续给药 10d, Lewis 肺癌小鼠连续给药 15d。停药后次日断颈处死, 剥取瘤块称重, 按“抑瘤率 = (1 - 试验组瘤重/生理盐水对照组瘤重) \times 100%”公式计算抑瘤率^[6]。

1.2.4 统计学方法: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t-test 比较组间差异。

2 结果

2.1 急性毒性试验

预实验灌胃 PSB 制剂, 最高给药剂量达到 200mL/kg (浓缩后灌胃); PSBT 制剂,

以槲寄生原药材计达到 100 g/kg, 结果无小鼠死亡, 表明 PSB、PSBT 制剂毒性很小, 无法通过急性毒性实验确定混合液对小鼠的半致死剂量。MIS 醇提物、PSB + MIS 醇提物据预试验结果决定剂量范围以槲寄生原药材计为 60、51、43.35、36.85、31.32g/kg, 剂距为 1: 0.85, 小鼠灌胃后, 均出现 4 肢伏地, 蜷缩, 高剂量出现跳跃, 死亡。结果见表 1。用 Bliss 法计算 MIS 醇提物按槲寄生原药材计 LD₅₀ 为 42.735 g/kg; PSB + MIS 醇提物按槲寄生原药材计 LD₅₀ 为 43.351 g/kg。存活小鼠约 2h 后恢复, 但活动减少, 4h 后开始进食, 7d 后解剖观察内脏器官无异常。

表 1 急性毒性实验结果

		剂量 (g/kg)				
		60.00	51.00	43.35	36.85	31.32
MIS 醇提物	7min 死亡		20 min 死亡, 存活 1 只	60 min 后, 6 只死亡	1 只死亡	无死亡
PSB + MIS 醇提物	10min 死亡		30min 死亡, 存活 1 只	60 min 后, 5 只死亡	1 只死亡	无死亡

2.2 MTT 法测定对人体外肿瘤细胞生长抑制率

不同制剂不同浓度对 3 种肿瘤细胞的抑制作用结果见表 2。其它组均未达 IC₅₀, PSBT 制剂对 3 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 按原药材计分别为 11.027, 21.796, 37.357 g/L。

表 2 对体外肿瘤细胞抑制作用实验结果

药物	浓度* (g/L)	生长抑制率 (%)		
		BGC-803	A2780	KB
对照组	0	0	0	0
PSB 制剂组	480 mL	5.07	31.30	20.30
	240 mL	4.29	10.25	11.46
	120 mL	2.58	2.97	10.20
	60 mL	1.32	0.64	5.37
	24 mL	0.36	0	0.29
MIS 制剂组	120 g	38.90	35.96	25.69
	60 g	29.40	30.86	22.54
	30 g	19.80	22.40	23.60
	15 g	10.30	10.69	19.80
	6 g	3.21	3.59	17.20
MIS + PSB 制剂组	120 g	38.6	40.69	38.31
	60 g	29.9	40.20	34.21
	30 g	27.9	35.89	28.60
	15 g	15.9	30.25	24.32
	6 g	16.4	10.32	19.20
PSBT 制剂组	120 g	89.5	78.21	81.43
	60 g	87.2	76.56	77.65
	30 g	74.2	60.42	60.20
	15 g	44.8	30.27	3.59
	6 g	42.4	29.80	0

* PSB 制剂组浓度以 PSB 制剂浓度计, MIS、PSB + MIS、PSBT 制剂组以原药材槲寄生浓度计

2.3 体内抗肿瘤实验

实验过程中只有 PSB、PSBT 制剂几乎不影响小鼠的正常活动与生长。PSBT 制剂对 3 种肿瘤瘤体生长的抑制率均明显高于其它制剂组。各制剂对 3 种肿瘤的抑制率见表 3。

表 3 对小鼠实体瘤生长的影响

组别	剂量 (kg × d)	S180 肉瘤		H22 肝癌		Lewis 肺癌	
		瘤体重 (g)	抑瘤率 (%)	瘤体重 (g)	抑瘤率 (%)	瘤体重 (g)	抑瘤率 (%)
对照组		2.55 ± 0.89		2.99 ± 0.76		2.23 ± 0.31	
培养基组	20 mL	2.59 ± 0.91	-1.57	3.11 ± 0.67	-4.71	2.25 ± 0.29	-0.09
CP	100mg × 1	0.50 ± 0.07 **	80.39	0.56 ± 0.08 **	81.27	0.42 ± 0.04 **	81.17
PSB	20mL × 15	2.34 ± 0.84	8.24	2.88 ± 0.79	3.68	2.18 ± 0.32	2.24
	40mL × 15	2.10 ± 0.63	17.65	2.64 ± 0.65	11.71	1.97 ± 0.36	11.66
	60mL × 15	1.95 ± 0.65	23.53	1.98 ± 0.70	33.78	1.86 ± 0.33	16.59
MIS	5g × 15	2.46 ± 0.74	3.53	2.54 ± 0.81	15.05	2.15 ± 0.41	3.59
	10g × 15	2.01 ± 0.67	21.18	2.07 ± 0.55	30.77	1.87 ± 0.25	16.14
	15g × 15	1.97 ± 0.59	22.75	1.59 ± 0.45 *	46.82	1.56 ± 0.32	30.04
PSB + MIS	5g × 15 + 20mL × 15	2.37 ± 0.82	7.06	2.49 ± 0.65	16.72	2.17 ± 0.29	2.69
	10g × 15 + 40 mL × 15	2.09 ± 0.62	18.04	1.69 ± 0.51	43.48	2.01 ± 0.35	9.87
	15g × 15 + 60 mL × 15	1.94 ± 0.59	23.92	1.52 ± 0.36 *	49.16	1.82 ± 0.30	18.39
PSBT	5g × 15 + 20mL × 15	1.87 ± 0.69	26.67	1.59 ± 0.42	46.82	1.97 ± 0.35	11.66
	10g × 15 + 40 mL × 15	1.25 ± 0.54	50.98	0.90 ± 0.36 *	69.90	1.12 ± 0.40 *	49.78
	15g × 15 + 60 mL × 15	0.99 ± 0.36 *	61.18	0.69 ± 0.31 **	76.92	0.48 ± 0.25 * *	78.48

与荷瘤对照组比较 * P < 0.05 ** P < 0.01, 制剂均制成浓缩液, 小鼠灌胃剂量为 0.4 mL/次/d

3 讨论

由实验结果可知, PSB 和槲寄生提取物的简单复配并不能降低槲寄生的毒性, 也不能增加槲寄生的抗肿瘤作用, 而通过 PSB 对槲寄生中部分成分的转化作用, 不仅降低了槲寄生的毒性, 而且明显提高了其体内外抗肿瘤活性, 并呈强烈的剂量效应关系; 实验后剥离瘤组织时发现, PSBT 制剂组的荷瘤小鼠的皮下实体瘤并不与内皮粘连, 而其他组小鼠的实体瘤不同程度地与内皮粘连, 说明 PSBT 制剂组很好地抑制了实体瘤的浸润, 这对于恶性肿瘤的治疗有一定的意义。

光合细菌确实能够转化中药中的一部分成分, PSBT 抗肿瘤的有效单体化学成分及作用的分子机理, 有待于进一步深入研究。本课题的研究对于利用有益菌研究毒性中药及发现高活性的药物有着重要的意义。

参 考 文 献

[1] Schumacher U, Valentiner U. Drug Discovery Today, 2003, 8 (1): 17 ~ 18.
[2] Bauer C, Oppe T, Przybilla B, et al. Journal of Allerg and Clinical Immunology, 2003, 113 (Suppl. 1): 309.
[3] Khwaja T A, Dias C B, Pentecost S. Oncology, 1986, 43 (Suppl. 1): 42 ~ 50.
[4] 张肇铭. 山西大学学报, 1984, 7 (4): 201 ~ 204.
[5] 黄志新, 岳京丽, 赵凤生, 等. 天然产物研究与开发, 2003, 15 (3): 245 ~ 248.
[6] 彭海燕, 章永红, 韩 英, 等. 吉林中医药, 2003, 23 (9): 50 ~ 51.