

离,可除去大部分饱和脂肪酸,使 γ -亚麻酸得到初步富集,是利用饱和脂肪酸钠盐在乙醇中溶解度小,而不饱和脂肪酸钠盐在乙醇中溶解度大的原理。与脂肪酸经低温冷冻(-30°C 以下),分离相比,本法操作简便,不需特殊设备;与尿素包合法相比,还具有得率多纯度高的优点。

2. 溴化、脱溴法的提取过程,简便易行,快速。

3. 脱溴后 γ -亚麻酸,经红外检测在 $970(\text{Cm}^{-1})$ 处有少量反式双键,是本法不足之处,但其数量极少,不影响产品质量。

4. 溴化时必需无水操作。如有水份,

将减少产品收率,

参 考 文 献

1. 吉林省中医中药研究所编:长白山植物志第一版 长春:吉林人民出版社,1980:772
2. Riley J P. J Chemsoc 1949:2728
3. 傅方浩等:白求恩医科大学学报1987;13(1):1
4. 王建中:医药工业 1988,19(3):109
5. 张恒弼等:药学情报通讯 1988,6(3):47
6. R. Daniel, et al: Handbook of Analytical Derivatization 164
7. 张恒弼等:中国药学杂志 1989,24(6):350

蓝萼甲素在体外对DNA, RNA和蛋白质生物合成的影响

解放军202医院 张淑香 俞惠然 杨淑云 刘淑琴 杨晶华* 邵泽生* 隋全正*

本实验采用 ^3H -TdR、 ^2H -udR、 ^3H -Leucine在体外掺入 S_{180} 腹水癌细胞放射性同位素示踪法,探讨蓝萼甲素对DNA、RNA和蛋白质合成的抑制作用,抑制程度呈剂量相关性。对DNA、RNA的抑制发生较早,恢复较快,对蛋白质作用持久、且均为可逆性抑制。

蓝萼甲素(glaucoclyxinA)为唇形科,香茶菜属植物蓝萼香茶菜(*Isodom glaucocalyx kudo*)的一种二萜类成份,经药理实验证明:蓝萼甲素具有细胞毒作用⁽²⁾,对艾氏腹水癌有一定抑制作用⁽³⁾,体内对 S_{180} 实体瘤实验抑制率达30.4%(10mg/kg \times 7d),但抗癌作用机理尚未见报道。本文探讨蓝萼甲素对 S_{180} 腹水癌细胞的DNA、RNA和蛋白质生物合成的影响,并以冬凌草甲素为阳性对照,研究其抗癌作用机理。

实验材料

蓝萼甲素由中国科学院林土所提供,冬凌草甲素由郑州化学制药厂提供, ^3H -TdR比放射性为18ci/mM, ^3H -udR比放射性为20ci/mM, ^3H -leucine比放射性为1.33ci/mM,均为中国原子能研究所产品,FJ-353型双道液体闪烁计数仪为西安262厂生品。

方法与结果

一、对体外培养的 S_{180} 腹水癌细胞生

* 沈阳药学院、天津二医大、上海二军大药学院实习生

长的影响

取含药的RPMR $_{1640}$ 培养液1ml(含药量分别为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)于试管内,然后加入含 S_{180} 腹水癌细胞悬液0.2ml(含 1×10^6 个细胞)于 37°C 恒温箱内孵育1hr,取出一滴加台氏蓝液,在镜下统计蓝染率。

结果表明,在药物浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时蓝染率分别为93%、76%、53%,具有较强的细胞毒作用。

二、在体外掺入 S_{180} 腹水癌的放射性同位素示踪法

取常规接种 S_{180} 腹水癌后9天的小白鼠一只,在无菌条件下取出腹水、将癌细胞离心沉降(1000rpm,3min),用生理盐水洗涤一次悬浮液于RPMI $_{1640}$ 培养液(含2.5%小牛血清)以供实验用。实验分给药组(蓝萼甲素)、阳性对照组(冬凌草甲素)及阴性对照组,每组设三个平行管。操作步骤如下:给药组每管加入含药的RPMI $_{1640}$ 培养液1ml、0.2ml细胞悬液(含 1×10^6 个癌细胞),于 37°C 恒温箱中培养1hr后,离心弃去上清液,加入3mlssc溶液(0.15MNaCl、0.015M柠檬酸钠),离心(1000rpm、3min)弃去上清液,然后每管加入1ml新鲜的RPMI $_{1640}$ 培养液、2 μCi ^3H -TdR、 ^3H -UdR、或 ^3H -leucine,继续于 37°C 恒温箱内依次培养0.5、1、2、4、8hr,立即放入冰水浴中停止其作用,用

附表 蓝萆甲素对 $^3\text{H-TdR}^3\text{H-UdR}$ 和 $^3\text{H-Leucine}$ 掺入 S180 腹水癌细胞

DNA.RNA 和蛋白质合成的影响

药物	浓度 $\mu\text{g/ml}$	时间 h	$^3\text{H-TDR}$ 掺入量 $\text{cpm}\bar{x} \pm \text{SD}$	抑制率 (%)	$^3\text{H-TDR}$ 掺入量 $\text{cpm}\bar{x} \pm \text{SD}$	抑制率 (%)	$^3\text{H-L\ddot{E}U}$ 掺入量 $\text{cpm}\bar{x} \pm \text{SD}$	抑制率 (%)
对照		0.5	37206 + 2488	—	14634 + 1770	—	272 + 48	—
		1	40329 + 3348	—	22002 + 1822	—	1096 + 69	—
		2	63974 + 8795	—	47934 + 305	—	975 + 41	—
		4	107048 + 16409	—	42180 + 2256	—	1150 + 157	—
		8	94912 + 10052	—	51768 + 966	—	1974 + 169	—
蓝		0.5	14260 + 2745	62.3	11754 + 305	19.9	216 + 16	4.8
		1	35028 + 2065	13.3	15804 + 1143	28.3	444 + 87	69.4
		2	68501 + 1306	-7.0	41816 + 585	12.8	726 + 84	30.5
	5	4	105920 + 7598	1.05	37068 + 1131	12.2	1084 + 24	6.6
		8	91323 + 6977	3.8	44491 + 1138	14.1	1791 + 16	10.0
甲		0.5	1518 + 93	96.9	2371 + 72	84.6	232 + 6	35.1
		1	11595 + 1272	71.9	5783 + 574	74.2	320 + 29	82.8
		2	31428 + 1474	51.2	15837 + 78	67.1	360 + 96	75.3
	20	4	77275 + 3325	27.9	28628 + 6	40.0	446 + 60	70.9
		8	48030 + 198	11.5	31619 + 1376	39.0	1079 + 185	49.3
素		0.5	5106 + 160	71.6	6672 + 501	54.9	268 + 6	3.5
		1	39905 + 908	1.1	14109 + 2575	36.1	429 + 62	71.1
		2	65460 + 2635	-2.3	21500 + 1136	52.7	738 + 52	27.4
	5	4	89564 + 7080	16.4	34544 + 1979	18.2	1023 + 159	12.8
		8	84298 + 10332	11.2	48941 + 9211	5.5	1881 + 73	5.1
冬		0.5	584 + 269	99.4	397 + 166	99.5	234 + 4	25.4
		1	2089 + 123	95.7	783 + 155	97.1	390 + 43	81.2
		2	16728 + 1268	74.3	1304 + 275	97.3	390 + 85	71.5
	20	4	35285 + 2324	67.3	2164 + 384	95.2	398 + 79	65.8
		8	58561 + 3756	38.4	14592 + 1649	72.0	1350 + 370	34.8

* P < 0.01 ** P < 0.001 Δ P > 0.05 无标记 P < 0.05

抽滤法收集细胞于玻璃纤维滤纸上,依次用3ml生理盐水,5%三氯醋酸、70%乙醇和无水乙醇洗涤,待滤纸凉干后放入盛有5ml闪烁液(0.5%ppo,0.03%popop、二甲苯)的测量瓶中,用液体闪烁计数仪测cpm值(每管测三次),对照组操作方法同上,阴性对照组不含药。计算百分抑制率。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{对照组cpm}\bar{x} - \text{给药组cpm}\bar{x}}{\text{对照组cpm}\bar{x}} \times 100\%$$

实验结果表明:蓝萼甲素在终止药物作用后8hr之内对三种前体物均有明显的抑制作用,且呈剂量相关性,抑制率随着浓度的增大而增加,随着时间的延长、抑制率逐渐下降,终止药物作用后4~8hr抑制率变化不明显,同浓度下抑制率低于冬凌草甲素。

附表表明蓝萼甲素明显抑制³H-TdR的渗入,在20μg/ml时,终止药物作用后0.5hr,抑制率为96.9%(P<0.001),其后随着恢复时间的增加抑制率逐渐下降,说明该药只抑制³H-TdR的渗入,并无损伤DNA模板的作用。在5μg/ml时,终止药物作用后0.5hr,抑制率62.3%(P<0.05),1hr抑制率为负值,与冬凌草甲素的作用相似。

对³H-udR掺入的抑制作用,低浓度(5μg/ml)作用不明显。高浓度(20μg/ml)作用十分明显,终止药物作用后0.5hr抑制率为84.6%(P<0.001)后逐渐下降。

对³H-leucine掺入的抑制,5μg/ml时抑制率为69.4%(P<0.01)随后逐渐下降,20μg/ml抑制率为82.8%(P<0.001),终止药物作用后4hr,抑制率为70.9(p<0.01),8hr为49.3%(P<0.05),表明药物作用强而持久。

讨 论

DNA、RNA蛋白质合成构成细胞周期中三大重要变化过程⁽¹⁾TdR,udR,leucine

分别为DNA、RNA和蛋白质的特异前体物。因此我们采用氚标记的三种特异前体物在体外掺入S₁₈₀腹水癌细胞的同位素示踪法研究蓝萼甲素对DNA、RNA和蛋白质合成的影响。

结果表明该药对三种前体物掺入S₁₈₀腹水癌细胞DNA、RNA和蛋白质合成均有明显抑制作用,作用强度呈明显的浓度相关性,对三种前体物掺入的抑制作用,基本同于冬凌草甲素,提示抗癌作用机理相同,但抑制作用强度略低于冬凌草甲素,可能在于冬凌草甲素6位上存在羟基,和15位上的羰基之间形成氢键增加了17位上碳的亲电性,增强抗肿瘤活性。

药物停止作用后随着时间的延长抑制率逐渐下降,说明该药对DNA、RNA和蛋白质合成的抑制作用均为可逆型。³H-TdR掺入抑制率逐渐下降,提示药物是通过干扰DNA的代谢而发挥抑制作用,因此蓝萼甲素抑制作用属于干扰代谢型。⁽⁵⁾

蓝萼甲素对³H-TdR掺入的抑制作用可看出,在低浓度时(5μg/ml)药物作用解除后1~2hr时,抑制率下降为负值(-1.0%)似乎激活了癌细胞对前体物的摄取,提示临床用抗癌药时必须达到治疗浓度,提供临床参考。

实验结果可以解释,蓝萼甲素的抗癌作用是通过抑制DNA、RNA和蛋白质合成而干扰细胞周期中的运行,延缓了细胞周期时间,起到抗癌作用⁽⁶⁾,关于该药是抑制了三种前体药物的摄取还是抑制了某一阶段关键酶而导致DNA、RNA和蛋白质合成的抑制有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. 《云南植物研究》 1981.3(3): 283-286
2. 《云南植物研究》 1988.10(4)
3. 《中药通报》 1987.12(5)
4. 《药学通报》 1981.16(9)
5. 《Nature》 1977.25
6. 《云南医学院学报》 1984; 20(1)