

茵陈抗肿瘤活性成分的研究

蒋洁云 徐强 王蓉 李佩珍

(中药药理教研室)

摘要 从茵陈(*Herba Artemisiae capillaris*)乙醇提取物中分离到结晶 I (黄酮素)、II (茵陈色原酮)及组分 A、B、F。它们在体外能抑制 HeLa 细胞的增殖,其 IC₅₀分别为 3.2×10^{-6} 、 3.4×10^{-6} 、 2.2×10^{-6} 、 4×10^{-6} 和 1.6×10^{-6} g/ml。I 与 II 体外抑制 Ehrlich 腹水癌细胞增殖的 IC₅₀分别为 5.4×10^{-7} 和 3×10^{-6} g/ml。

关键词 茵陈; 茵陈色原酮; 黄酮素; 肿瘤细胞毒作用

茵陈为菊科艾属植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥幼苗,具清热利湿、利胆退黄之功效,用于黄疸、肝炎、尿少色黄等^[1]。本品主要含 6,7-二甲基香豆素、绿原酸、咖啡酸、茵陈色原酮(capillarisin)、甲基茵陈色原酮等化合物,为利胆有效成分^[2-5]。本文作者之一对茵陈的抗肿瘤作用进行了深入的探讨,发现其抗肿瘤作用机制主要是通过直接杀伤肿瘤细胞^[6],其中有效成分之一是茵陈色原酮^[7]。为了进一步探讨茵陈的抗肿瘤作用,我们对其乙醇提取物进行了分离,并观察了各组分对培养癌细胞的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

茵陈购自南京市药材公司,经本校生药教研室余伯阳博士鉴定为 *Artemisia capillaris* Thunb.。将茵陈用 93% 工业酒精浸泡 24 h 后,热回流提取 2 h,重复进行三次,得到的醇提液经浓缩后得干浸膏,收率约为 10%。细胞培养液为含 100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素和 10% 小牛血清(南京军区军事医学研究所)的 RPMI-1640(Gibco)的重蒸馏水溶液,经 0.22 μm 的 millipore 过滤器过滤灭菌, -20 °C 保存。胰蛋白酶(trypsin, 1 : 250,

Difco)配成 0.4%,过滤灭菌,4 °C 保存,用时用 Tris 缓冲液稀释成 0.2% 的浓度。

1.2 肿瘤细胞

HeLa 细胞(上海实生细胞生物技术公司)于 RPMI-1640 培养液中在 37 °C, 5% CO₂ 下每周传代培养。Ehrlich 腹水癌细胞(江苏省肿瘤防治研究所)在昆明种小鼠腹腔内每周传代一次维持。

1.3 细胞培养

将各化合物或组分溶于二甲亚砜(DMSO)中,用有机溶媒用过滤器(0.45 μm, FHLP, millipore)进行过滤灭菌。DMSO 的最终浓度控制在不影响细胞增殖的 0.5% 以下。用时将其稀释至 RPMI-1640 培养液中作为待试药物溶液。

取培养 7 天的 HeLa 细胞,用 RPMI-1640 培养液洗涤两次后,悬浮于该培养液中(存活率为 100%),置 24 穴细胞培养板(黄岩拱东化学塑料实验厂)内(5×10^3 /well)在 37 °C, 5% CO₂ 下培养 24 h 后,弃去上清,加入用该培养液稀释的不同浓度的药物溶液,继续培养 4 天。培养毕,用 1 ml EDTA 的 Tris 缓冲液洗涤一次,再用 0.2 ml 的 0.2% 胰蛋白酶溶液使细胞离壁,然后加上述培养液停止反应,并按常规方法进行细胞计数。

另外给小鼠接种 Ehrlich 腹水癌,第 7 天时取腹水,用 Hanks 溶液洗涤两次后,悬浮于 RPMI-1640 培养液中,将该细胞悬液(存活率为 96.8%)于 96 穴细胞培养板(Corning)内(2×10^4 /well)与不同浓度的药物一起,在 37°C , 5% CO_2 下培养 3 天。然后用 Hanks 液洗涤两次,进行细胞计数。

2 结果

2.1 茵陈的乙醇提取物中有效成分的分离

取前述干浸膏,按图 1 所示流程进行分离,得组分 A、B、C 和 D,其中 C 为黄色板状

结果晶(I)。将组分 D 再进行一次柱层析,用二氯甲烷-丙酮梯度洗脱,得组分 E 和 F, E 为白色棱柱状结晶(II)。

2.2 化合物 I 与 II 的结构鉴定

化合物 I:黄色板状结晶;mp $252 \sim 253^\circ\text{C}$;EIMS $m/z(\%)$: $314(\text{M}^+, 54.8)$, $313(\text{M}-\text{H}, 16.9)$, $299(\text{M}-\text{CH}_3, 50)$,推断其分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$;与 FeCl_3 反应呈污绿色; $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: $3132(\text{OH})$, $1614(\text{C}=\text{O})$, 1596 , $1559(\text{arom})$,与标准谱相同^[8]。由以上结果鉴定 I 为萹黄素(cirsimaritin)。

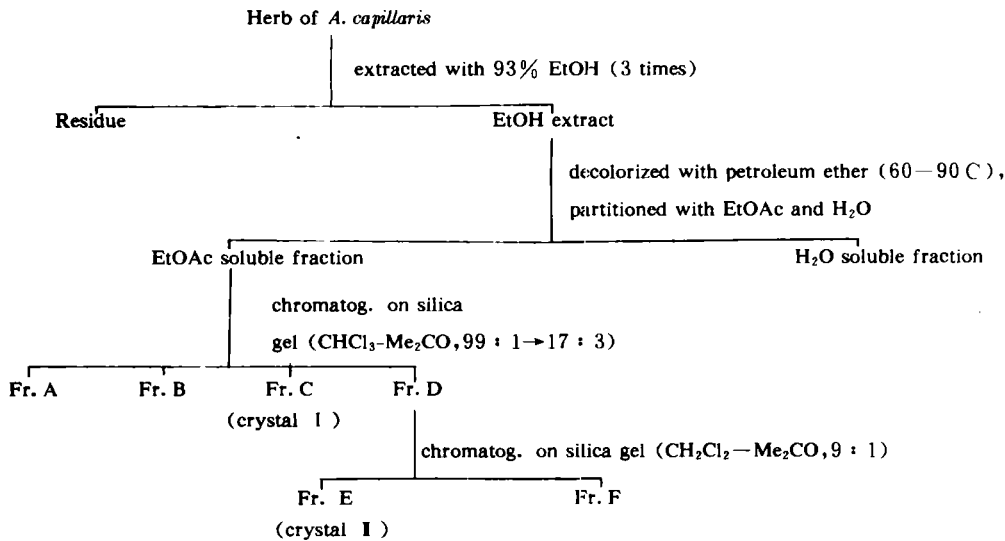


Fig 1. Protocol for fractionating cytotoxic substance from Herba Artemisiae capillaris

化合物 II:白色棱柱状结晶;mp $218 \sim 219^\circ\text{C}$; FeCl_3 反应呈赤紫色;EIMS $m/z(\%)$: $316(\text{M}^+, 74.6)$, $317(\text{M}+1, 14)$, $301(\text{M}-\text{CH}_3, 22.6)$, $299(\text{M}-\text{OH}, 14.7)$, $298(\text{M}-\text{H}_2\text{O}, 74)$,推断分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$; $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: $3271(\text{OH})$, $1658(\text{C}=\text{O})$, 1616 , $1564(\text{arom})$,与茵陈色原酮红外光谱相同^[5],薄层行为与标准品对照相同,由此鉴定 II 为茵陈色原酮(capillarisin)。

2.3 萹黄素、茵陈色原酮及组分 A、B 和 F

对培养 HeLa 细胞增殖的影响

如图 2 所示,经 5 天培养,HeLa 细胞由 5×10^3 个增殖至 3.6×10^4 个。与此相比,各化合物和组分均明显地抑制了细胞的增殖,其抑制作用随药物浓度增大而增大,其中萹黄素和茵陈色原酮的 50% 细胞增殖抑制浓度 (IC_{50}) 为 3.2×10^{-6} 和 3.4×10^{-5} g/ml,组分 A、B 和 F 的 IC_{50} 分别为 2.2×10^{-5} 、 4×10^{-6} 和 1.6×10^{-5} g/ml。

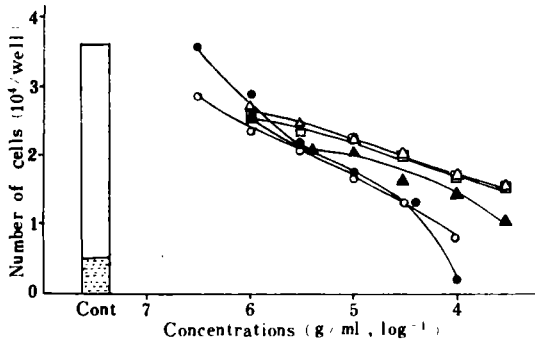


Fig 2. Effect of I (○), II (●), A (△), B (▲) and F (□) on proliferation of HeLa cells *in vitro*. Each point indicates the mean of duplicate sets. Dotted part means the number of seeded cells.

2.4 茵黄素和茵陈色原酮对培养 Ehrlich 腹水癌细胞增殖的影响

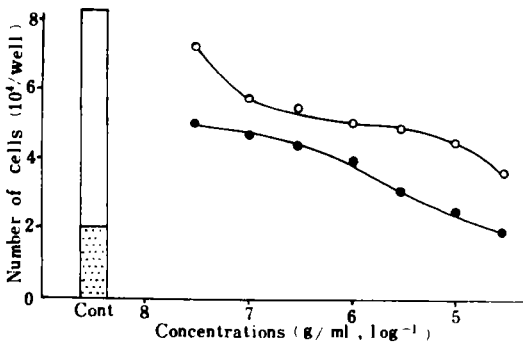


Fig 3. Effect of I (○) and II (●) on proliferation of Ehrlich cells *in vitro*. Each point indicates the mean of duplicate sets. Dotted part means the number of seeded cells.

如图 3 所示, Ehrlich 腹水癌细胞培养 3 天后, 由原来的 2×10^4 个增殖至 8.25×10^4 个, 与此相比, 茵黄素和茵陈色原酮均呈显著地抑制了 Ehrlich 细胞的增殖, 其 IC_{50} 分别为 5.4×10^{-7} 和 3×10^{-8} g/ml。

3 讨论

现代药理研究表明, 茵陈有解热、降压、得胆、利尿、抗微生物等多种生物活性。作者之一对其抗肿瘤作用进行了较深入的研究, 发现其能明显地抑制移植在 BALB/c 小鼠上 Meth A 肿瘤的生长, 其作用机制主要是通过

直接杀伤肿瘤细胞^[6], 并有部分促进肿瘤免疫的活性^[9]。本研究为了进一步探讨茵陈的抗肿瘤活性成分, 对茵陈的乙醇提取物进行了分离, 并以培养 HeLa 细胞和 Ehrlich 腹水癌细胞的增殖为指标, 观察各组分的生物活性。结果发现, 得到的 A、B、F 三组分和茵黄素、茵陈色原酮二化合物对上述培养癌细胞均有不同程度的细胞毒活性, 其中以茵陈色原酮和茵黄素为较强, 组分 B 也有较强的细胞毒作用。

关于茵陈色原酮, 已有报道指出其有利胆^[5]和保肝作用^[10]。我们的前报^[7]还发现其对培养的 L-929 和 KB 细胞的增殖有较强的抑制作用, 在体内能明显抑制 Meth A 肿瘤的生长。本文在此基础上发现其对培养的 HeLa 细胞和 Ehrlich 腹水癌细胞有很强的杀伤作用, 证明该化合物对多种癌细胞均有作用。必须指出的是, 茵陈色原酮的副作用较小, 因为进一步的研究发现, 茵陈色原酮不仅没有象肿瘤化疗药 5-氟脲嘧啶 (5-FU), 环磷酰胺 (CY) 样的降白血球作用, 而且有升高小鼠白血球的趋势 (未发表数据), 提示其作用机制有别于 5-FU、CY 等化疗药物。因此其作为抗肿瘤药用于临床的可能性值得进一步探讨。茵黄素具有保肝作用^[10], 但有关其抗肿瘤作用尚未见报道。此外, 组分 A、B 和 F 均为混合物, 进一步分离这些组分, 可望得到新的具有抗肿瘤活性的化合物。

参考文献

- 1 王浴生主编. 中药药理与应用. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 757
- 2 真下启明. 利胆剂の研究-とくにカワラヨモギの利胆作用について. 最新医学, 1963, 18: 1430
- 3 小宫威弥, 津久井 诚, 大盐春治. 茵陈蒿の研究(第 1 报)-新利胆成分 Capillarisin. 药学杂志, 1976, 96(7): 841
- 4 小宫威弥, 成瀬义知, 大盐春治. 茵陈蒿の研究(第 2 报) Capillarisin 类縁化合物および Flavonoids の研究. 药学杂志, 1976, 96(7): 855
- 5 Komiya T, Tsukui M, Oshio H. Capillarisin, a constituent from *Artemisia Capillaris Herba*. Chem Pharm Bull 1975; 23(6): 1387

- 6 徐强, 手岛浩慈, 崔洙亨 他. 数种生药的抗肿瘤作用についての検討. 和汉医药学会志, 1986; 8: 31
- 7 徐强, 森裕志, 坂本修身 他. 茵陈蒿の抗肿瘤活性物质とその関連化合物. 和汉医药学会志, 1989; 8(1): 1
- 8 The Sadtler Standard Spectra; Prism Standard Infrared Spectra. 27109
- 9 Mori H, Xu Q, Sakamoto O, et al. Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of Chinese herbs; Meth A-induced delayed type hypersensitivity. *Japan J Pharmacol* 1988; 48: 37
- 10 Kiso Y, Ogasawara S, Hirota K, et al. Antihepatotoxic principles of *Artemisia capillaris* buds. *Planta Medica* 1984; 50(11): 81

Studies on the Antitumor Principles of *Herba Artemisiae capillaris*

Jiang Jieyun, Xu Qiang, Wang Rong and Li Peizhen

Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica

Two compounds, cirsimaritin (I) and capillarisin (II), and three fractions, A, B, and F, were isolated from *Herba Artemisiae capillaris*. The compounds and fractions showed a dose-dependent cytotoxic activity against Hela cells *in vitro*. The 50% inhibition concentration of cell proliferation (IC₅₀) was 3.2×10^{-6} , 3.4×10^{-6} , 2.2×10^{-5} , 4×10^{-6} and 1.6×10^{-5} g/ml, respectively. I and II also showed the cytotoxic activity against Ehrlich cells *in vitro* having 5.4×10^{-7} and 3×10^{-8} g/ml of IC₅₀, respectively.

Key words *Herba Artemisiae capillaris*, Capillarisin; Cirsimaritin; Tumoricidal action

【文摘 046】1-(α -萘甲基)2-甲基-6,7-二甲氧基-四氢异喹啉对大鼠 α -肾上腺素受体的阻断作用 刘国卿, 韩邦媛, 王思慧, 曹于平. 中国药理学通报, 1992; 8(3): 188-90

1-(α -萘甲基)2-甲基-6,7-二甲氧基-四氢异喹啉(简称 86040)是设计合成的新化合物, 已有研究表明它对实验动物有降压作用, 为探讨其降压作用机理, 作者应用离体大鼠肛尾肌和输精管实验研究了 86040 对 α -肾上腺素受体的作用。86040 能对抗可乐定抑制电刺激输精管前列腺端所引起的兴奋性收缩, pA₂ 值为 5.85。其竞争性拮抗新福林引起的大鼠肛尾肌收缩, pA₂ 值为 7.62。结果表明 86040 对 α_1 -及 α_2 -肾上腺素受体均有阻断作用, 但对 α_1 受体作用较

强且选择性高, 其阻断作用的选择性比率(α_1/α_2)约为 60。

【文摘 047】炮制何首乌对小鼠实验性肝损伤后肝脂代谢的影响 刘成基, 张清华, 林军. 中国中药杂志, 1992; 17(10): 595-6

实验用药系各取生首乌、黑豆汁制首乌、清蒸首乌粗粉, 加水煎煮 3 次, 合并水煎液浓缩而得, 相当于生药 0.5 g/ml。实验结果表明, 生何首乌对四氯化碳、醋酸强的松和硫代乙酰胺引起的肝损伤小鼠的肝脂蓄积有效; 黑豆汁制首乌水煎液和清蒸首乌水煎液对醋酸强的松所致的肝脂蓄积有效; 生首乌及炮制品都可降低四氯化碳中毒引起的肝肿大。作者对其作用机制进行了探讨。