

骆驼蓬碱、氟尿嘧啶对视网膜母细胞瘤 细胞系 SO-Rb50 生物学效应*

金捷 易玉珍 郑健梁

(中山眼科中心)

潘启超

(肿瘤研究所)

提 要 在体外检测了骆驼蓬总碱, 氟尿嘧啶 (fluorouracilum, 5-Fu) 对人视网膜母细胞瘤细胞系 SO-Rb50 的生物学效应。两种药物对该细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别是 $1.437\mu\text{g/ml}$ 与 $5.321\mu\text{g/ml}$, 提示 Rb 细胞在体外对化疗敏感。临床 Rb 化疗效果欠佳可能与血-视网膜屏障有关。

关键词 骆驼蓬碱 氟尿嘧啶 视网膜母细胞瘤细胞系 生长抑制率 半数抑制浓度

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 是婴幼儿中最常见的眼内恶性肿瘤。多年来 Rb 的治疗以摘除患眼为主。婴幼儿时期摘除眼球, 造成残废、毁容, 对身心健康影响较大。利用体外培养 Rb 细胞选各种对 Rb 产生生物学效应的药物, 同时争取早期诊断、早期治疗, 以保留视力, 是改进 Rb 临床治疗所急待解决的问题。我们利用在本中心研究所病理室建成的人视网膜母细胞瘤细胞系 SO-Rb50, 在体外检测了骆驼蓬总碱、氟尿嘧啶对该细胞系的生物学效应。

材 料 与 方 法

1. 骆驼蓬总碱 新疆医学院附属第二医院提供, 先加少量 90% 酒精将药物溶解, 再用 RPMI 1640 完全培养液配制成浓度为 $200\mu\text{g/ml}$ 的骆驼蓬总碱溶液, 溶液中酒精浓度为 0.36%。

2. 氟尿嘧啶 (5-Fu) 注射剂 25mg/ml^1 (江苏南通制药厂), 以生理盐水稀释 100 倍, 稀释后溶液浓度为 0.25mg/ml 。

3. 视网膜母细胞瘤细胞系 SO-Rb 50 取第 20~51 代细胞, 参考许招懂所用方法^[1], 经

多次实验摸索出合适的药物浓度及药物作用时间。每次实验取从同一大瓶细胞传出的小瓶细胞, 于传代后 24 小时加入不同量的骆驼蓬总碱溶液或 5-Fu 溶液, 使其终浓度达到各剂量组的要求。每剂量组 3 瓶细胞, 并设 3 瓶对照。在骆驼蓬碱试验中, 酒精最终浓度 $<0.05\%$, 对照组的培养液中亦加入酒精, 其最终浓度与骆驼蓬碱最高剂量组者相同。在 5-Fu 试验, 对照组加入与药物最高剂量组所加药液等量的生理盐水。加药后孵育 72 小时, 取样, 加 0.1% 伊文斯蓝或 0.2% 锥蓝染色, 在细胞计数板上作拒染活细胞计数。每小瓶细胞取样 3 次, 每板计算 4 大格内活细胞数, 取平均每格内活细胞数乘 1 万, 即为每毫升活细胞数。生长抑制率计算公式如下:

细胞生长抑制率 % =

$$\left(1 - \frac{\text{实验组每毫升活细胞数}}{\text{对照组每毫升活细胞数}}\right) \times 100\%$$

所得各瓶中抑制率数据输入计算机内, 以随机区组方差分析检验差异性, 并用 Bliss 法进行曲线回归, 求出半数抑制浓度 (IC_{50})。

结 果

1. 骆驼蓬总碱对 SO-Rb50 细胞的生长

* 硕士研究生论文

表1 骆驼蓬总碱对SO-Rb₅₀细胞生长抑制实验结果(用药72小时)

剂量组 ($\mu\text{g/ml}$)*	活细胞数($\times 10^4/\text{ml}$)			抑制率(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	瓶1(抑制率%)	瓶2(抑制率%)	瓶3(抑制率%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	
对照	86.5	81.8	68.3		
12	1.2(98.6)	5.0(93.9)	1.8(97.3)	96.6 $\pm$ 1.98	
6	23.5(72.8)	21.2(74.1)	20.3(70.3)	72.4 $\pm$ 1.58	
3	29.1(66.4)	23.7(71.0)	24.5(64.1)	67.2 $\pm$ 2.87	1.4370
1.5	28.2(67.4)	48.7(40.5)	37.2(45.5)	51.1 $\pm$ 11.68	(1.173~1.795)
0.75	46.5(46.2)	54.0(34.0)	36.3(46.9)	42.2 $\pm$ 5.92	
0.375	51.7(40.2)	95.5(-16.7)	53.1(22.3)	15.3 $\pm$ 23.76	

随机区组方差分析: $F = 20.54$, $P < 0.0001$ * 为3次取样的均数

抑制实验(结果见表1)

药物终浓度为 $12\mu\text{g/ml}$ 时,抑制率达 $96.6 \pm 1.98\%$;终浓度为 $0.375\mu\text{g/ml}$ 时,抑制率为 $15.3 \pm 23.76\%$;在 $12\mu\text{g}$ - $0.375\mu\text{g}$ 之间,各剂量组的抑制率随药物浓度递减而下降,量效呈线性关系。随机区组方差分析显示不同剂量组间差异明显大于组内不同细胞瓶间差异, $F = 20.54$, $P < 0.0001$ 。图1显示 Bliss 法曲线回归后的量效关系。骆驼蓬总碱对SO-RB50细胞的半数抑制浓度为 $1.437\mu\text{g/ml}$, (95%可信区间为 $1.173 \sim 1.795\mu\text{g/ml}$)。重复试验一次,结果相似, IC₅₀ 为 $1.665\mu\text{g/ml}$ ($1.248 \sim 2.222\mu\text{g/ml}$)。

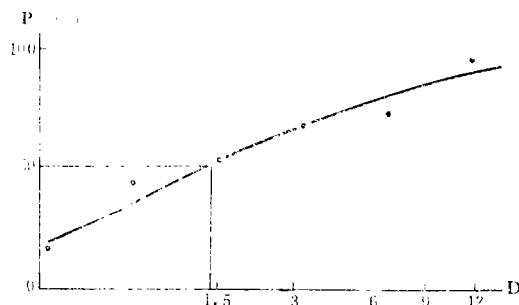


图1 骆驼蓬总碱对SO-Rb50细胞生长抑制率与药物剂量曲线

2. 5-Fu对SO-Rb50细胞的生长抑制实验(结果见表2)

表2 5-Fu对SO-Rb₅₀细胞生长抑制实验结果(用药72小时)

剂量组 ($\mu\text{g/ml}$)*	活细胞数($\times 10^4/\text{ml}$)			抑制率(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	瓶1(抑制率%)	瓶2(抑制率%)	瓶3(抑制率%)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	
对照	76.5	61.8	53.0		
12	4.0(94.8)	4.3(93.0)	3.8(92.8)	93.5 $\pm$ 0.90	
6	5.5(92.8)	5.2(91.6)	6.0(88.7)	91.0 $\pm$ 1.72	
3	9.8(87.2)	9.7(84.3)	9.5(82.1)	84.5 $\pm$ 2.09	
1.5	10.8(85.9)	10.7(82.7)	9.8(81.5)	83.4 $\pm$ 1.86	0.321
0.75	15.3(80.0)	24.2(60.8)	19.2(63.8)	68.2 $\pm$ 8.43	(0.238~0.432)
0.375	38.5(49.8)	34.7(43.9)	26.0(50.9)	48.2 $\pm$ 3.07	
0.1875	48.3(36.9)	36.5(40.9)	32.3(39.1)	39.0 $\pm$ 1.64	
0.09375	50.8(33.6)	41.5(32.8)	46.7(11.9)	26.1 $\pm$ 10.05	

随机区组方差分析 $F = 49.26$, $P < 0.0001$ * 为3次取样的均数

药物终浓度为 $12\mu\text{g/ml}$ 时,抑制率为 $93.5 \pm 0.90\%$;终浓度为 $0.09375\mu\text{g/ml}$ 时,抑制率为 $26.1 \pm 10.05\%$ 。在 $12\mu\text{g} \sim 0.09375\mu\text{g}$ 之间各剂量组药物对SO-Rb50细胞的抑制率随药物浓度递减而下降,量效呈线性关系。随机区组方差分析显示不同剂量组间差异明显大于组内不同细胞瓶间差异。 $F = 49.26$, $P < 0.0001$ 。图2显示经Bliss法曲线回归后的量效关系。5-Fu对SO-Rb50细胞的 IC_{50} 为 $0.321\mu\text{g/ml}$ ($0.238 \sim 0.432\mu\text{g/ml}$)。

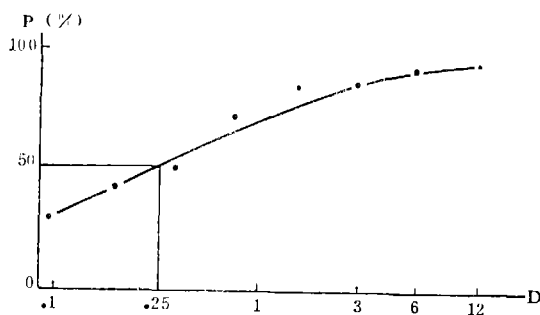


图2 5Fu对SO-Rb50细胞生长抑制率与药物剂量曲线图

讨 论

骆驼蓬总碱是从蒺藜科植物骆驼蓬种子提取的混合生物碱,主要成份为骆驼蓬碱 Harmaline 化学名 1-甲基-7-甲氧基-3,4-二氢- β -卡保啉(Carboline)。该药是单胺氧化酶抑制剂,对神经肌肉心血管系统均有药理作用。骆驼蓬碱的抗癌作用,首先由新疆同道们发现;郑特等将骆驼蓬粗制剂用于治疗消化道肿瘤^[3]。潘启超等与许招懂等先后分别检测了骆驼蓬所含混合生物碱(5L)、吲哚生物碱(5n)以及纯盐酸骆驼蓬碱的抗癌作用,结果提示上述

成份对人宫颈癌细胞系Hela细胞、小鼠S-180肉瘤、网细胞肉瘤或肝癌在体内及体外试验有不同程度的抑制作用^[1-3]。孔样彬等实验提示骆驼蓬碱对鼠及人白血病细胞系LI210与HL-60细胞系的细胞毒效应主要通过抑制蛋白合成而实现,且该效应在药物中止后是可逆的。本实验提示人视网膜母细胞瘤细胞系SO-Rb50对骆驼蓬碱极为敏感。骆驼蓬总碱对该细胞的 IC_{50} 为 $1.437\mu\text{g/ml}$,与纯盐酸骆驼蓬碱对Hela细胞(IC_{50} 为 $37.84\mu\text{g/ml}$)以及对鼠S-180肉瘤(IC_{50} 为 $34.7\mu\text{g/ml}$)效应比较,要强25倍左右。

5-Fu是广泛应用于临床的抗癌药物,在体外抑制人癌细胞的 IC_{50} 为 $1 \sim 3\mu\text{m}$ ($0.13 \sim 0.39\mu\text{g/ml}$)^[4]。本实验结果,5-Fu对SO-Rb50细胞的 IC_{50} 为 $0.321\mu\text{g/ml}$,与上述以5-Fu对人癌细胞系实验结果相似。

用骆驼蓬碱及5-Fu对人视网膜母细胞瘤细胞系实验及生物学效应测定,国内外文献未见有报道。至于Rb临床化疗效果欠佳,我们初步推测可能与血-视网膜屏障阻碍药物在眼内达到有效抑制浓度有关。

参 考 文 献

- [1] 许招懂,潘启超. 骆驼蓬碱抗癌作用研究. 癌症 1989; 8(2):94.
- [2] 潘启超,等. 骆驼蓬种子混合生物碱5L抗肿瘤作用. 广东医学 1985; 6(5):40.
- [3] 潘启超,等. 骆驼蓬种子-吲哚生物碱的抗肿瘤作用. 癌症 1985; 4(4):192.
- [4] 孙曾一. 恶性肿瘤的化疗原则. 见:孙燕、韩锐主编. 肿瘤化学治疗新进展. 济南:山东科学技术出版社,1987:20.

EFFECTS OF HARMALINE AND FLUOROURACILUM ON HUMAN RETINOBLASTOMA CELL LINE SO-RB50

Jin Jie Yi Yuzhen Zheng Jianliang

(Zhongshan Ophthalmic Centre)

Pan Qichao

(Cancer Institute)

Harmaline and Fluorouracilum(5-Fu) were incubated in vitro together with human retinoblastoma(Rb) cell line SO-Rb50 for 72 hours, then subjected to sampling, viable cell counting and inhibition rate(IR) calculating. When concentration in 12 μ g/ml, the IR of Harmaline to SO-Rb50 cells was $96.6 \pm 1.98\%$ and 5-Fu to SO-Rb50 cells was $93.5 \pm 0.9\%$, the 50% inhibition concentration(IC₅₀) was 1.437 μ g/ml in Harmaline test and 0.32 μ g/ml in 5-Fu test. Rb cells were sensitive to chemical therapy in vitro, but not in the clinical therapy, the blood-retina barrier might be the responsible factor.

Key words Harmaline Fluorouracilum Retinoblastoma cell line Growth inhibition rate 50% Inhibition concentration

+++++			
(上接第20页)		阴茎癌	(3):79
血浆性激素	(1):79	隐血试验	(1):82
血清	(1):11	荧光染料 fura-2 法	(2):14
血清铁蛋白	(3):76	幽门弯曲菌	(3):5
血栓素B ₂	(3):43		(4):68
血栓形成	(1):66		
血型	(2):33		
血药浓度	(4):59	再生障碍性贫血	(2):48
	Y		(2):封4
氩激光	(2):13		(3):65
牙体光弹性实验	(2):53	自动比色显微分析法	(3):9
要素膳	(4):38	自动分析仪	(2):封2
乙二醛酶 I	(4):31	植物性神经	(1):62
乙肝疫苗	(1):54	智能发育	(4):53
乙酰胆碱	(2):8	肿瘤	(3):76
遗传	(2):64	传略	(2):1
胰肾联合移植	(1):66	组胺	(4):8