

也不增加小鼠骨髓微核率,综合这些结果表明 ST-1435 不是诱变剂,可望成为一个很好的抗生育药.

REFERENCES

- 1 Coutinho EM, da Silva AR, Kraft H-G. Fertility control with sub-dermal silastic capsules containing a new progestin (ST-1435). *Int J Fertil* 1976; 21 : 103-8.
- 2 Manson JM, Zenick H, Costlow RD. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press, 1982; 141-84.
- 3 Tu ZH, Wang MY, Xiao WQ, Qi XD, Tang WD. Effects of 10-hydroxycamptothecin on m-

duced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells and micronuclei in mouse bone marrow and fetal liver. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 378-81.

- 4 Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48 : 337-354.
- 5 Tu ZH, Wang MY. Mutagenicity and comutagenicity of three nootropils: huperzin A, amiracetam and piracetam. *N Drugs Clin Remedy* 1990; 9 : 65-8.
- 6 Chu ZW, Wang WC, Wang YE, You GD, Gu ZP. Antifertility effect of the implant containing 16-methylene-17 $\alpha$ -acetoxy-19-norprogesterone (ST-1435). *Acta Pharmacol Sin* 1991; 12 : 285-8.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Mar; 13 (2) : 186-188

86-188

桑素素的光敏作用对腹水型肝癌细胞 DNA 合成的抑制

周秀芳, 郑荣梁, 黄明 (兰州大学生物系, 兰州 730000, 中国)

Inhibition of photosensitization of morin on DNA synthesis of ascites hepatoma cells

ZHOU Xiu-Fang, ZHENG Rong-Liang, HUANG Ming (Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT Morin (0.012, 0.12, 1.2, 12.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) significantly inhibited the DNA synthesis of ascitic hepatoma (AH) cells. The inhibition of DNA synthesis and cell mortality was dependent on its concentrations as well as the illumination time. Photosensitization of morin was not due to  $^1\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^-$ , but closely related to OH and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The mechanism of the inhibition may be attributed to the damage of DNA replication template.

KEY WORDS morin; phototherapy; free radical scavengers; neoplasm DNA; experimental liver neoplasms

提要 桑素素(morin)对腹水型肝癌细胞(AH)具有光敏杀伤作用,对AH细胞的DNA合成具有很明显的抑制作用,抑制作用随着桑素素浓度的增加,照光时间的延长而加强.在避光条件下,桑素素也具有杀伤癌细胞的能力,但远比照光组杀伤力低,桑素素对AH细胞的杀伤具有永久性,光敏作用的产生与 $^1\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^-$ 无关,而与OH和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 密切相关.

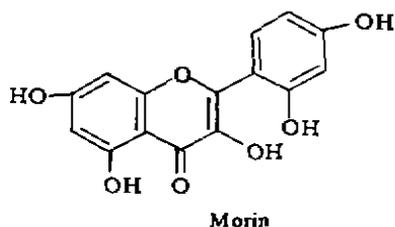
关键词 桑素素; 光疗法; 自由基清除剂; 肿瘤脱氧核糖核酸; 实验的肝肿瘤 DNA

桑素素(morin)是从桑科植物的树皮和茎中提出的一种黄酮类物质(2',3,4',5,7-五羟基黄酮),它是一种光敏剂,有较强的抗金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、痢疾菌株、斑疹伤寒芽孢杆菌的作用<sup>(1)</sup>,能抑制体外培养的小鼠NK/Ly淋巴瘤腹水细胞的生长<sup>(2)</sup>,对TPA(佛波酯)诱导的皮肤癌也有显著的抑制作用<sup>(3)</sup>.近年来,利用光敏反应来诊断和治疗癌症已成为热门,本文就桑素素的光敏反应及其

Received 1990 Feb 1

Accepted 1991 Sep 3

机制进行探讨。



**MATERIALS AND METHODS**

桑色素(morin): AR, Merck 产品, 用 1,2-丙二醇配成 1, 0.1, 0.01 和 0.001 mol · L<sup>-1</sup> 溶液. β-胡萝卜素(β-carotene): AR, Sigma 产品, 用 1,2-丙二醇配成 1 mmol · L<sup>-1</sup>. 组氨酸(L-histidine): AR, 中国科学院上海生物化学研究所产品, 用灭菌无离子水配成 0.01 mol · L<sup>-1</sup>. 甘露醇(mannitol): AR, 成都化学试剂厂产品, 用灭菌无离子水配成 0.01 mol · L<sup>-1</sup>. 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD): AR, 军事医学科学院放射所产品, 用灭菌无离子水配成 2 mg · ml<sup>-1</sup>. 过氧化氢酶(catalase, CAT): AR, Sigma 产品, 用灭菌无离子水配成 1 mg · ml<sup>-1</sup>.

光源 1000W 碘钨灯, 光距 37 cm, 用水隔热, 水层厚 16 cm, 九五料玻璃厚 5 mm, 室温 20℃ 左右, 光照度 4.2 × 10<sup>-4</sup> lx, 桑色素最大吸收波长为 680 nm.

DNA 合成的测定 将昆明种小白鼠腹水肝癌细胞(AH) 1 × 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> 培养于含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, pH 7.3, 加青霉素 100 IU · ml<sup>-1</sup> 及链霉素 100 μg · ml<sup>-1</sup>, 置 37℃, CO<sub>2</sub> 培养箱内 15-20 h, 加桑色素温育 1 h 后照光 10 min, 避光组在细胞瓶外包一层黑纸, 照光后立即加入 [<sup>3</sup>H]deoxythymidine, [<sup>3</sup>H]TdR (上海原子核研究所产品, 放射活度 37 MBq), 终浓度为 37 kBq · ml<sup>-1</sup>, 2 或 24 h 后收获细胞, 用生理盐水洗 2 次, 除去桑色素, 干燥后加 HClO<sub>4</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 各一滴, 在 80℃ 烘箱消化 40 min, 加

闪烁液置 FJ-2100 液体闪烁仪, 测定放射性.

DNA 合成抑制机制的判定 -AH 细胞与桑色素温育 1 h 后照光 10 min, 再用生理盐水洗 2 次除去桑色素, 加新鲜培养液继续温育 0, 2, 4 和 6 h 再分别加入 [<sup>3</sup>H]TdR, 使终浓度为 74 kBq · ml<sup>-1</sup>, 60 min 后测其放射性, 如果清洗掉桑色素后一段时间内, DNA 合成速率迅速恢复, 则属于代谢型抑制, 如果清洗掉桑色素后合成速率继续下降, 则属于 DNA 模板损伤型<sup>(4)</sup>.

**RESULTS AND DISCUSSION**

桑色素的光敏作用 桑色素作用 1 h, 照光 10 min, 无论照光或避光, AH 细胞均有死亡, 但照光组在观察的 2-24 h 内, 死亡率始终高于避光组 30% 左右, 照光组 DNA 合成的抑制程度也较避光组严重, 且有浓度依赖性 (Fig 1). 溶剂(1,2-丙二醇)对细胞的毒害作用与对照组相近, 其死亡率均在 0.3% 以下.

照光时间对 DNA 合成的影响 当桑色素浓度和作用时间固定后, DNA 合成的抑制及细胞死亡率平均随着照光时间 1, 5, 10 和 20 min 的延长而加重 (Tab 1).

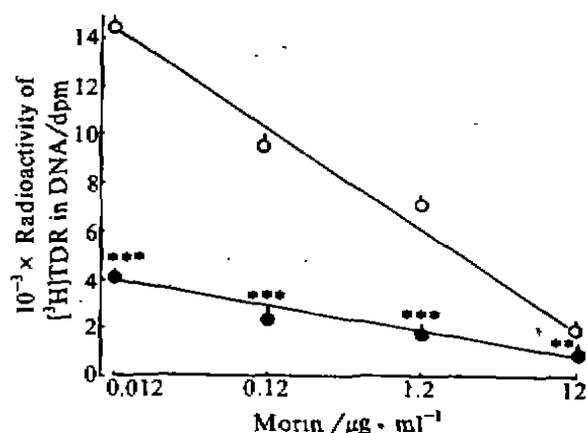


Fig 1. Inhibition of [<sup>3</sup>H]TdR incorporation into DNA of ascitic hepatoma cells by morin and photosensitization. (○) dark (●) light. n=5,  $\bar{x} \pm s$  \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs dark.

Tab 1. Effects of morin and illumination on ascitic hepatoma cells mortality and inhibition of DNA synthesis.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs dark.

Illumination time, min	Morin, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	
	0.59	0.12
	Mortality, %	$10^{-2} \times$ Radioactivity of [ $^3\text{H}$ ]TdR in DNA, dpm
Control	$0.54 \pm 0.04$	$496 \pm 88$
1	$49.5 \pm 8.1^{**}$	$62.4 \pm 2.6^{**}$
5	$51.3 \pm 9.3^{**}$	$37.8 \pm 7.8^{**}$
10	$63.2 \pm 10.7^{**}$	$27.3 \pm 7.0^{**}$
20	$75.4 \pm 8.8^{***}$	$17.4 \pm 4.4^{***}$
Dark	$35.5 \pm 9.1$	$96.8 \pm 2.0$

**DNA 合成抑制机制的判定** 在清洗掉桑色素后 0, 2, 4 和 6 h, DNA 合成的抑制随着时间的延长而加深, 抑制率由 0 h 的 6% 增加到 6 h 的 35.9%, 估计桑色素在光照下, 破坏了 DNA 复制的模板。

**光敏作用机制**  $\beta$ -胡萝卜素、甘露醇、组氨酸、SOD 和 CAT 分别是  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除剂<sup>(5,6)</sup>, 将  $\beta$ -胡萝卜素和 SOD 分别与已加入桑色素的 AH 细胞温育 1 h 后照光 10 min, 照光后 24 h 未看到对细胞有任何保护作用 (Tab 2), 说明桑色素的光敏作用与  $^1\text{O}_2$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  无关, 而加入组氨酸、甘露醇和 CAT 后, 则对细胞有明显的保护作用

(Tab 2), 可见桑色素的光敏作用与  $\text{OH}^\cdot$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  有着密切的关系。本结果与四溴荧光素杀伤癌细胞的光敏作用机制<sup>(7)</sup>有相同之处。

#### REFERENCES

- 1 Ramaswamy AS, Jayaraman S, Sirsi M, Rao KH. Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids. *Indian J Exp Biol* 1972; **10**: 72-3.
- 2 Molnár J, Béládi I, Domonkos K, Földes S, Boda K, Veckenstedt A. Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells. *Neoplasma* 1981; **28**: 11-8.
- 3 Nakadate T, Yamamoto S, Aizu E, Koto R. Effect of flavonoids and antioxidants on 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate caused epidermal ornithine decarboxylase induction and tumor promotion in relation to lipoxygenase inhibition by these compounds. *Gann* 1984; **75**: 214-22.
- 4 Painter RB. Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 1977; **265**: 650-1.
- 5 Weitzman SA, Stossel TP. Effect of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis. *J Immunol* 1982; **128**: 2270-2.
- 6 Li YX, Fang YZ, Huang SM. Studies on the NAD(P)H photooxidation sensitized by hematoporphyrin derivative. *Acta Biophys Sin* 1985; **1**: 257-63.
- 7 Zhou XF, Wang YH, Zheng RL, Wang LF. Mechanism of active oxygen in cytotoxic activity of tetrabromofluorescein. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 374-6.

Tab 2. Effects of free radical scavengers and photosensitization of morin on DNA synthesis in mouse ascitic hepatoma cells.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \* $P > 0.05$ , \*\* $P > 0.05$  vs control.

Scavengers / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	$10^{-2} \times$ Radioactivity of [ $^3\text{H}$ ] TdR in DNA / dpm			
	Morin $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$		$0.012 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	
	Light	Dark	Light	Dark
Control	$120 \pm 14$	$236 \pm 10$	$152 \pm 18$	$226 \pm 50$
$\beta$ -Carotene (20.6)	$134 \pm 22^*$	$222 \pm 24^*$	$142 \pm 86^*$	$250 \pm 81^*$
Histidine (60)	$220 \pm 50^{**}$	$246 \pm 92^*$	$258 \pm 98^{**}$	$276 \pm 46^*$
Mannitol (20)	$224 \pm 68^{**}$	$258 \pm 30^*$	$248 \pm 76^{**}$	$262 \pm 42^*$
SOD (76.5)	$132 \pm 84^*$	$256 \pm 20^*$	$154 \pm 40^*$	$246 \pm 18^*$
Inactive SOD (76.5)	$112 \pm 4^*$	$222 \pm 22^*$	$142 \pm 44^*$	$242 \pm 16^*$
Catalase (38.4)	$206 \pm 2^*$	$236 \pm 10^*$	$204 \pm 10^*$	$252 \pm 22^*$
Inactive catalase (38.4)	$116 \pm 64^*$	$216 \pm 26^*$	$150 \pm 18^*$	$236 \pm 28^*$