

## 卷首语

近年来,绿茶提取物和茶多酚的抗癌作用引起国内外学者的重视。本刊也陆续发表了一些绿茶提取物抗癌作用的研究报告,包括对肿瘤细胞的DNA拓扑异构酶、DNA多聚酶、的抑制作用。本期又发表了朱孝峰等绿茶提取物对肿瘤细胞DNA引物酶—多聚酶复合体以及DNA引物酶的影响的研究报道。

抗癌药物诱导肿瘤细胞凋亡为近几年来抗癌药物研究的另一个热点。本期也报道了顺铂和全反式维甲酸分别诱导人卵巢癌细胞系HO-8910细胞和人低分化鼻咽癌上皮细胞系CNE2Z凋亡的研究报告。

此外,桂皮酸和丁酸钠诱导高转移人肺癌细胞恶性表型逆转和抗侵袭作用;植物生长调节剂衍生物对DNA多聚酶及肿瘤生长的抑制作用;青蒿素的抗癌作用等均有新的内容,值得进一步深入研究。

临床方面,本期发表了国内一些单位对乳腺癌、食管癌、肺癌、恶性滋养叶肿瘤等癌症的临床治疗经验,可供参考。

基因治疗是肿瘤治疗中的一项新进展,目前仍在摸索研究阶段,还未能成为一种可广泛应用的常规治疗方法。杜楠医师等的综述,简明扼要地介绍了基因治疗的研究方向,可帮助临床医师初步了解基因治疗的原理及研究概况。

末梢血干细胞支持下大剂量化疗或所谓骨髓剥夺性治疗(Myeloablative therapy),对恶性淋巴瘤等化疗较敏感的肿瘤,可能有提高治愈率的作用,近10多年来国外临床研究十分活跃,国内也已有许多医院正在开展。对此种疗法的病例选择、干细胞的动员方案和收集时机、预处理方案、不良反应的预防和处理等许多方面,都很需要讨论和研究。本期刊出黄慧强医师等的报告,希望能引起更多的经验交流。

执行编委 管忠震

## ·基础研究·

## 绿茶提取物对肿瘤细胞DNA引物酶—多聚酶复合体活性的影响\*

朱孝峰 刘宗潮 潘启超 谢冰芬 冯公侃

**摘要** 目的:研究绿茶提取物的抗癌作用机理。方法:以小鼠艾氏腹水癌细胞破碎液为材料,用DE-52和P-11柱纯化DNA引物酶—多聚酶复合体,用液闪法和放射自显影法研究绿茶提取物对其活性的影响。结果:龙井茶提取物和毛叶茶提取物对DNA引物酶—多聚酶复合体活性抑制的IC<sub>50</sub>值分别为27.60±1.32 μg/ml和12.58±1.53 μg/ml,其K<sub>i</sub>值分别为15.35±2.36 μg/ml和9.41±1.42 μg/ml,且均为非竞争性抑制。龙井茶提取物和毛叶茶提取物在10、25、50、100、200 μg/ml浓度下,对引物合成的促进率分别为141.58%、233.5%、295.5%、354.9%、435.5%和138.8%、151.3%、170.5%、187.2%、229.5%。放射自显影可见两种绿茶提取物对引物合成也呈促进作用,且随着药物浓度的增加,药物越浓引物显影带越宽。以Pol<sub>γ</sub>dT·rA10为模板—引物,此两种绿茶提取物对引物延长抑制的IC<sub>50</sub>值分别为15.27±1.40 μg/ml和13.61±0.77 μg/ml。结论:对DNA引物酶—多聚酶复合体活性的抑制是绿茶提取物的抗癌作用机制之一,而且只是对引物的延长有抑制作用。

**关键词** 龙井茶提取物 毛叶茶提取物 DNA引物酶—多聚酶复合体

中图分类号 R979.1 R345

DNA引物酶—多聚酶是以复合体的形式存在于细胞核中,两种酶组分难以分开,无论是用离子交换、层析,甚至用抗DNA多聚酶单克隆抗体免疫吸附层析,所得的仍然是DNA引物酶—多聚酶复合体<sup>[1]</sup>。其功能是完成引物的合成及其延长,该酶复合体在DNA复制中起着十分重要的作用<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞的DNA复制活跃,此酶复合体的活性明显高于

正常细胞<sup>[3]</sup>。抑制DNA引物酶—多聚酶复合体的活性,即抑制了引物的合成或延长,DNA的合成就受到抑制,肿瘤细胞不能繁殖,从而达到抗癌作用<sup>[4]</sup>。本实验室研究证明,龙井茶和毛叶茶提取物对人低分化鼻咽癌CNE<sub>2</sub>、宫颈癌HeLa细胞、胃癌MGC-803细胞、人肝癌细胞(BEL-7402)和人红白血病细胞(K562)在体外有杀伤作用<sup>[5]</sup>。绿茶提取物在体内对小鼠艾氏腹水癌(EAC实体型)和网织细胞肉瘤L<sub>2</sub>有抑制生长的作用。绿茶提取物分别与阿糖胞苷、环磷酰胺和阿霉素合用对网织细胞肉瘤L<sub>2</sub>的抗癌作用有增效作用<sup>[6]</sup>。研究发现可能对多聚酶有抑

\* 国家自然科学基金资助(编号:39370800)

作者单位:中山医科大学肿瘤研究所治疗基础室(广州·510060)

第一作者:男,1970年9月出生,助教,硕士

制作用<sup>[7]</sup>,为了进一步探讨绿茶提取物的抗癌作用机理,我们研究绿茶提取物对 DNA 引物酶—多聚酶复合体活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

昆明种小白鼠购自第一军医大学实验动物场(合格证号:95A02号),小鼠艾氏腹水癌瘤株由本实验室提供。P<sub>6</sub>ly(dT)为 Sigma 公司产品,DDT 为 Promerger 公司产品,焦碳酸二乙酯(DEPC),SERVA 公司产品,磷酸纤维素柱(Phosphocellulose, P-11)为 Whatman 公司产品。DEAE-cellulose (DE-52),SERVA 公司产品。寡聚腺苷酸引物(rA<sub>10</sub>)由加拿大 Sangon 公司合成。X 光片 Kodak 产品。丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、尿素、<sup>3</sup>H-dATP、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP、苯甲磺胺氟(PMSF)、碳酸氢氨、乙酸纤维素薄膜等均为国内购买。龙井茶提取物(ECS)和毛叶茶提取物(ECPC),由中山大学生命科学学院植物研究室提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DNA 引物酶—多聚酶复合体的纯化:取接种 7~9 天 EAC 癌细胞的小鼠腹水,离心后再用 PBS 洗涤后离心。以下步骤在 4℃ 下进行,取细胞 5 g + 30 ml 缓冲液 A(50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF),混匀后超声破碎癌细胞(超声作用 30 秒,停 1 分钟,共 5 次,功率为 145 W),镜检罕见完整细胞为准。匀浆离心(27,000 g × 30 min),收集上清液加到预先用 buffer B(50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 20 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 20% 甘油)平衡过的 DEAE-cellulose (DE-52)柱(35 ml)用 70 ml buffer B 洗之。再用 25 ml buffer B 和 25 ml buffer C(50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 20% 甘油)线性梯度洗脱,检测引物酶—多聚酶复合体的活性,收集酶活性部分,加入预先用 buffer D(50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 30% 甘油)平衡过的 Phosphocellulose-11 柱(25 ml)中,用 50 ml buffer D 洗之,再用 10 ml buffer D 和 10 ml buffer E(50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 400 mM KCl, 1 mM DTT, 30% 甘油)作线性梯度洗脱,检测酶活性,把有酶活性的部分收集起来,-70℃ 保存备用。

1.2.2 酶活性的测定:反应液(30  $\mu$ l)含有 50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 0.1% PEG<sub>6000</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 3 mM DTT, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 33  $\mu$ g/ml poly(dT), 2 mM ATP, 0.25  $\mu$ M <sup>3</sup>H-dATP, 10% 甘油, 3  $\mu$ l 酶液, 37

保温 30 min 后,加入 EDTA 至 10 mM 终止反应,移至乙酸纤维薄膜上,晾干后,除 1 管不漂洗用于测定总 CPM 数外,其它均用 5% 三氯醋酸漂洗 3 min × 2, 95% 乙醇漂洗 2 min × 2 次,晾干后,放入含有 4 ml 闪烁液的测定瓶中,在 LKB 液体闪烁计数器中检测 CPM。以每聚合 1 pmol dATP 为一个酶活性单位。

1.2.3 ECS 和 ECPC 对 DNA 引物酶—多聚酶复合体活性的抑制作用:抑制率和 IC<sub>50</sub> 的测定:设 ECS 和 ECPC 实验浓度分别为 10、25、50、75、100  $\mu$ g/ml 和 5、10、25、50、100  $\mu$ g/ml,还设一个无药对照组,每个均设 2 个平行管,其他实验步骤基本与酶活性测定相同,分别计算抑制率,再采用中效原理的方法计算 IC<sub>50</sub> 值。抑制作用方式的分析判断及 K<sub>i</sub> 值的计算:实验以龙井茶提取物和毛叶茶提取物浓度分别为 0、10、15  $\mu$ g/ml 和 0、5、10  $\mu$ g/ml 组,每组均测定 poly(dT)为 67、100、133、167、200  $\mu$ g/ml 时对应的速度,每个浓度设 3 个平行管,依实验结果进行双倒数作图,判断抑制方式,再根据米氏方程计算出其 K<sub>i</sub> 值。

1.2.4 ECS 和 ECPC 对引物合成的影响:液闪计数法:反应液(30  $\mu$ l)含有 50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 0.1% PEG<sub>6000</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 3 mM DTT, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% 甘油, 33  $\mu$ g/ml poly(dT), 0.3  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 药物和对照管, 37℃ 保温 30 min 后,加入终止反应液(10 mM EDTA),移至乙酸纤维薄膜上,晾干后,除 1 管不漂洗用于测定部管 CPM 数外,其它均用 0.4 M 碳酸氢铵漂洗 3 min × 2, 95% 乙醇漂洗 2 min × 2 次,晾干后,放入含 4 ml 闪烁液的测定瓶中,在 LKB 液体闪烁计数器中计数 CPM。计算对引物合成的促进率。放射自显影法:反应液 20  $\mu$ l,所含组份同液闪计数法反应液,终止反应后加入上样缓冲液(50% 甘油, 2% 的溴酚兰, 50 mM EDTA),再加热 95℃ × 5 min,在 20% 聚丙烯酰胺(含有 8 M 尿素)变性凝胶中电泳。作放射自显影,了解药物对引物合成的影响。执行此操作应注意 RNase 的污染,反应液用 DEPC 处理的三蒸水配制,器皿等均用 0.1% DEPC 溶液浸泡处理 RNase。

1.2.5 ECS 和 ECPC 对引物延长的影响:poly(dT)与 rA<sub>(10)</sub>以 20:1 的碱基比混合,同时加入 NaCl 和 Tris-HCl, pH 7.2 使之浓度分别为 50 mM 和 15 mM,在 2~3 小时内使其从 55℃ 冷却至室温退火以形成 PolydT · rA<sub>10</sub>。以 PolydT · rA<sub>10</sub>为模板—引物,ATP, <sup>3</sup>H-dATP 为底物,反应液(30  $\mu$ l)中含有 50 mM Tris-HCl, pH=7.2, 0.1% PEG<sub>6000</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 3

mM DTT, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% 甘油, 加入纯化的 DNA 引物酶—多聚酶 复合体, 然后分别加入不同浓度的药物以及水对照, 37 °C 保温 30 分钟, 加入 EDTA 至 10 mM 终止反应, 再移至乙酸纤维滤纸上, 凉干后, 除总管外, 其它均用 5% 三氯醋酸漂洗 3 min × 2, 95% 乙醇漂洗 2 min × 2, 凉干后放入含有 4 ml 闪烁液中, 在 LKB 上检测, 计算药物对引物的延长抑制率及其 IC<sub>50</sub> 值。

## 2 实验结果

### 2.1 DNA 引物酶—多聚酶 复合体的纯化、活性

通过 DE52 柱和 P-11 柱后, DNA 引物酶—多聚酶 复合体得到纯化, 酶的总活性获得率为 22.8%, 酶液蛋白量从粗酶的 5 mg/ml 到纯酶的 0.05 mg/ml, 酶的比活性从粗酶液的 26.4 u/mg 蛋白到纯酶的 6013.3 u/mg 蛋白。见表 1

表 1 DNA 引物酶—多聚酶 复合体的纯化

	体积(ml)	蛋白(mg)	总活性(u)	比活性(u/mg 蛋白)	收得率(%)
粗酶	30	150	3960	26.4	100
DE52	8	1.6	1655	1034.4	41.8
P11	3	0.15	902	6013.3	22.8

### 2.2 ECS 和 ECPC 对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体活性的抑制作用

2.2.1 ECS 在 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 75 μg/ml, 100 μg/ml 浓度下对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体活性的抑制率是 18.5%, 31.9%, 59.0%, 74.1%, 92.7%。ECPC 在 5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml 对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体活性的抑制率分别为 20.4%, 31.7%, 61.3%, 79.6%, 94.6%。采用中效原理方法计算得 ECS 和 ECPC 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 27.60 ± 1.32 μg/ml 和 15.35 ± 2.36 μg/ml。

2.2.2 ECS 和 ECPC 对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体活性抑制的 K<sub>i</sub> 值分别是 12.58 ± 1.53 μg/ml 和 9.41 μg/ml, 见表 2。根据双倒数作图(略), 呈现对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体活性抑制相对于模板 P<sub>6</sub>lydT 来说为非竞争性抑制。

表 2 ECS 和 ECPC 对 DNA 引物酶—多聚酶 复合体的抑制方式

P <sub>6</sub> lydT (mg/ml) - 1	ECS(μg/ml)			ECPC(μg/ml)		
	0	10	15	0	5	10
5.00	0.68	1.03	1.12	0.71	0.96	1.07
5.98	0.84	1.23	1.64	0.92	1.23	1.23
7.52	1.15	1.57	1.95	1.19	1.54	1.66
10.0	1.39	1.89	2.38	1.39	1.74	2.17
14.9	1.47	2.50	2.83	2.56	3.58	4.16

### 2.3 对引物合成的影响

2.3.1 放射自显影法: 以 <sup>32</sup>P-ATP 为底物, 引物合成后通过变性凝胶分离后, 用 X 光片进行自显影。结果无酶道(lane 7)未见有显影带即无引物合成, 有酶无药物道(lane 1)可见引物合成, 且通过变性凝胶电泳后显示梯形, 代表不同长度的引物, 大于 7 个寡聚核苷酸的引物合成量少。2 至 6 道分别含有 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml 药物, 可见引物合成增多, 有药道显影的条带清楚, 随药物浓度的增加显影条带越宽越浓, 尤其长引物的合成明显增加, 呈现对引物合成有促进作用, 且为剂量依赖性。还呈现 ECS 对引物合成的促进作用比 ECPC 强, 见图 1、2。

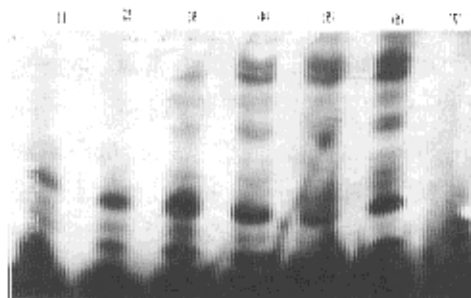


图 1 ECS 对引物合成的影响

放射自显影显示<sup>32</sup>P 标记的引物, 1-6 道含有酶复合体及浓度分别为 0, 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml of ECS, 7 道为无酶复合体道

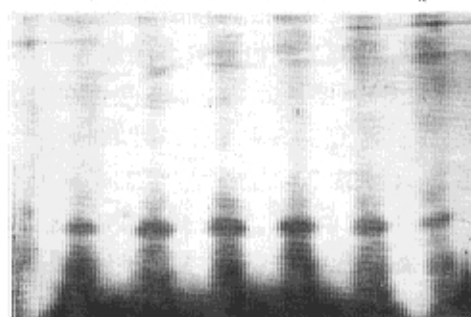


图 2 ECPC 对引物合成的影响

放射自显影显示<sup>32</sup>P 标记的引物, 1-6 道含有酶复合体及浓度分别为 0, 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml of ECPC, 7 道为无酶复合体道

2.3.2 液闪计数法: ECS 和 ECPC 在 10, 25, 50, 100, 200 μg/ml 下, 对引物合成促进率分别 141.58%, 223.5%, 295.5%, 354.9%, 435.5% 和 138.8%, 151.35, 170.5%, 187.2%, 229.5%。从结果可以看出 ECS 对引物合成的促进作用强, 高达 4 倍之多, 而 ECPC 对其引物合成的促进在 200 μg/ml 下仅 2 倍左右。它们对引物的合成均为剂量依赖性。

### 2.4 对引物延长的影响

ECS 和 ECPC 对 P<sub>6</sub>lydT · rA10 模板—引物的延长有明显的抑制作用, 在 5, 10, 25, 50, 100 μg/ml 浓度下, 对其抑制率分别为 20.3%, 42.6%, 60.4%, 72.1%, 91.7% 和 27.4%, 45.7%, 63.2%, 77.5%, 93.1%。IC<sub>50</sub> 值分别是 15.27 ± 1.40 μg/ml 和 13.61 ±

0.77  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对延长的抑制也呈剂量依赖性。

### 3 讨论

茶叶是一种多酚类含量高的植物,长期以来被当作醒神、清热、解毒、利尿的传统草药。近几年来对其与肿瘤的关系作了大量的研究。无论是流行病学调查,多项实验研究都证明茶有抗癌、防癌作用<sup>[8]</sup>。抗癌机理研究不多,为了进一步探讨它们的作用机理,研究这两种绿茶提取物对 DNA 复制的起动的与延长的影响。

DNA 的复制是肿瘤细胞增殖的关键,DNA 复制首先是解旋,随后由 DNA 引物酶-多聚酶 复合体结合于 DNA 单链上,并在其上滑动,寻找复制起始点,合成一长 7~10 个核苷酸的 RNA 引物,随后 DNA 引物酶-多聚酶 发生转位,由多聚酶 聚合 dNTP 完成引物的延长<sup>[9]</sup>。我们研究绿茶提取物对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性有明显的抑制。DNA 引物酶-多聚酶 复合体是一个整体,用常规分离方法甚至抗多聚酶 的单克隆抗体免疫吸附层析未能把它们分开,即使把它们分开,两者活性均不稳定,而且再混合到一起又形成复合体。但是在功能上各不同,且其功能由不同的亚基负责,所以从功能上把其分为 DNA 引物酶和多聚酶<sup>[10]</sup>。本实验的绿茶提取物对肿瘤细胞的  $\text{IC}_{50}$  值在 200~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间<sup>[6]</sup>。我们研究 ECS 和 ECPC 对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 27.60  $\pm$  1.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 12.58  $\pm$  1.53  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。绿茶提取物抑制 DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性,从而抑制了 DNA 的复制,阻止肿瘤细胞的繁殖,可能是其抗癌作用机理之一。研究其对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体的抑制方式得到相对于模板 Poly(dT) 均为非竞争性抑制,这类可逆抑制反应中酶可以同时与底物及抑制剂结合,两者没有竞争性作用,也没有先后的次序,这类抑制剂的结构可能与底物无关系,而是在酶分子上可能另有一个抑制剂的结合部位,抑制剂就在这个部位和酶结合改变了酶的构象,减低酶的活性<sup>[10]</sup>。

为了进一步研究绿茶提取物分别对引物的合成及其延长的影响。用液闪计数法以及放射自显影法研究结果表明对引物合成有促进作用,绿茶提取物是一种混合物,含有多种化合物,至于是什么组分对引物合成起促进作用,值得进一步探讨。以 PolydT · rA(10) 为模板-引物,研究发现绿茶提取物对引物延长有抑制作用,所以绿茶提取物对 DNA 复制影响总的结果要看综合影响,这就是上面所谈到的对

DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性的抑制。对引物合成促进,但抑制了引物的延长后,DNA 仍然不能合成。ECS 和 ECPC 抑制引物的延长其  $\text{IC}_{50}$  分别为 15.27  $\pm$  1.40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 13.61  $\pm$  0.77  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。从  $\text{IC}_{50}$  值看,ECS 对引物延长抑制作用稍强于对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性的抑制作用( $P < 0.05$ )。可能是 ECS 对引物合成促进作用在其中起着一定的作用。ECPC 对引物合成促进作用弱,其对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体和引物延长的  $\text{IC}_{50}$  值无显著差别。绿茶提取物对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性实验时,对引物合成起促进,对引物延长起抑制,这种促进作用可能会抵消了一部分抑制作用。这也说明一个药物对 DNA 复制影响,以 PolydT 为模板反应对 DNA 引物酶-多聚酶 复合体活性的影响,比以激活的小牛胸腺 DNA 为模板单独研究其对多聚酶的抑制好,它更能反映对 DNA 复制的影响。本文只用不纯的提取物作实验,其中有效成分为何,尚未明了,具抑制作用与促进作用的是否是一物质亦不清楚,此作用与该混合物抗癌的关系等问题还需进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Kuchta RD, Rcid B, Chang LMS. DNA primase processivity and the primase to polymerase activity switch. *J. Bio. Chem.*, 1990, 265: 16158 ~ 16165
- 2 Catapano CV, Perrino FW, Fernandes DJ. Rimase RNA Chain termination Induced by 9 - - D - Brabinofuranosyladenosine triphosphate. *J. Bio. Chem.*, 1993, 268: 7179 ~ 7185
- 3 Kuchta RD, IisLey D, Kravig KD. Inhibition of DNA primase and polymerase by 9 - - D - Arabinofuranosyladenosine triphosphate. *Biochem.*, 1992, 31: 4720 ~ 4728
- 4 Nasheuer HP, Grosse F. DNA Polymerase - Primase from Calf Thymus. *J. Bio. Chem.*, 1988, 263: 8981 ~ 8983
- 5 谢冰芬,刘宗潮,潘启超,等. 毛叶茶提取物的抗癌作用以及对 DNA 拓扑异构酶 抑制作用. *癌症*, 1992, 11(6): 424 ~ 428
- 6 刘宗潮,谢冰芬,潘启超,等. 毛叶茶提取物对不同细胞生长的影响及协同抗癌作用. *癌症*, 1996, 15(3): 164 ~ 167
- 7 李汉西,潘启超,洗励坚,等. DNA 多聚酶在抗癌药物研究中的初步探讨. *癌症*, 1993, 12(6): 473 ~ 476
- 8 韩 锐. 肿瘤的化学预防及药物治疗. 第一版. 北京:中国协和医科大学,北京医科大学联合出版社,1990: 90 - 92
- 9 Sheaff RJ, Kuchta RD, IisLey D. Calf thymus DNA polymerase - primase: "Communication" and primer template movement between the Two activities. *Biochemistry.*, 1994, 33: 2247 - 2254
- 10 金长振. 酶学的理论与实际. 第一版. 北京:北京科学技术出版社香港雪谷出版社,1989: 113 - 114

(收稿:1996-04-22 修回:1996-09-16)

(英文摘要转第 167 页)

表5 体外 Sa、GE、P、Pu 和 Da 对 P<sub>388</sub> 白血病的细胞毒作用比较 (2)

浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD( $\bar{x} \pm s$ ) (抑制率%)				
	GE	P	Pu	Da	Sa
0	0.527 $\pm$ 0.09	0.527 $\pm$ 0.09	0.527 $\pm$ 0.09	0.527 $\pm$ 0.09	0.527 $\pm$ 0.09
0(1% DMSO)	0.549 $\pm$ 0.05	0.549 $\pm$ 0.05	0.549 $\pm$ 0.05	0.549 $\pm$ 0.05	0.549 $\pm$ 0.05
1.56	0.510(7.1) $\pm$ 0.02	0.557(- -) $\pm$ 0.04	0.693(- -) $\pm$ 0.10	0.486(11.5) $\pm$ 0.09	0.456(16.9) $\pm$ 0.04
6.25	0.449(18.2) $\pm$ 0.03	0.567(- -) $\pm$ 0.04	0.520(5.3) $\pm$ 0.07	0.522(4.9) $\pm$ 0.06	0.340(38.1) $\pm$ 0.06
25	0.360(33.3) $\pm$ 0.04	0.466(15.1) $\pm$ 0.02	0.639(- -) $\pm$ 0.12	0.518(5.6) $\pm$ 0.03	0.134(75.6) $\pm$ 0.04
100	0.092(83.2) $\pm$ 0.06	0.579(5.5) $\pm$ 0.07	0.677(- -) $\pm$ 0.04	0.557(- -) $\pm$ 0.06	0.005(99.1) $\pm$ 0.01
400	0.006(98.9) $\pm$ 0.01	0.552(- -) $\pm$ 0.04	0.592(- -) $\pm$ 0.05	0.603(- -) $\pm$ 0.02	0.001(100) $\pm$ 0.00
IG <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	39.8	/	/	/	8.5

\* P &lt; 0.05, \*\* P &lt; 0.01, \*\*\* P &lt; 0.001

用已知的成分有葛根素和大豆甾元(另有大豆甾,其性质不稳定,可水解产生大豆甾元),此两种成分除本实验室外未见有关抗癌作用的研究报道,近有报道大豆甾元对 HL-60 细胞株及 B<sub>16</sub> 细胞株有诱导

分化作用,特别是对 B<sub>16</sub> 细胞的生长还有抑制作用<sup>[6]</sup>。我们还从葛根中分离出总皂甙及多糖,对这些成分或组分进行体外抗癌活性比较。其结果可见,葛根素及大豆甾元在醇液和水溶条件下表现的抗癌活性不同,但其活性均低于葛根提取物 2~7 倍,只有总皂甙在所用的任何溶剂及任何筛选方法中均表现了很强的细胞毒作用,但总皂甙中何种成分有效尚待研究,且待进一步进行抗肿瘤作用的研究,以证实其有无开发价值及研究前景。

### 参 考 文 献

- 1 杜德极,石小枫,冉长清,等. 葛根的抗肿瘤作用的研究. 中药药理与临床,1994,10(2):16
- 2 杜德极,石小枫,冉长清,等. 复方菝葜抗炎、抗肿瘤及毒性研究. 中成药,1989,11(12):29
- 3 Francois D, Rita L. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 1986,89:271
- 4 杜德极,山崎正利. 30 种中医方药对 TNF 生成的影响. 中药药理与临床,1990,6(5):27
- 5 景永奎,韩锐. 大豆甾元对小鼠 B<sub>16</sub> 黑色素瘤细胞的分化诱导作用. 中国药理学与毒理学杂志,1992,6(4):278  
(收稿:1995-11-07 修回:1996-08-27)

## Antitumor cytotoxicity of main components from puerariae (legeioeaoae)

Du Deji Yang Wei Ye Yulan Ran Changqing Shi Xiaofeng Zhao Suyun

Sichuan Institute of Chinese Materia Medica Chengdu 610041

**Abstract** Purpose: To discover the principle with antitumor activity from Puerariae. The cytotoxicity of various extracts from Pueraria spp were evaluated with <sup>3</sup>H-TdR incorporation assay and MTT assay. The result showed that these agents tested were different in their cytotoxicities on EAC cells and P<sub>388</sub> leukemia cells. The saponins were the most active among them, suggesting that the polysaccharides, puerarin and daidzein were not the cytotoxic components while the saponins was the principle for its cytotoxicity.

**Key words** Puerarin Daidzein Saponins Cytotoxicity

(接第 164 页)

## Effect of EGT on DNA primase - polymerase complex activity

Zhu Xiaofeng Liu Zongchao Pan Qichao Xie Binfen Feng Gongkan

Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guang Zhou, 510060

**Abstract** Purpose: To investigate the mechanism of antitumor of EGT. Method: DNA primase - polymerase complex was extracted from mouse EAC cells, then was purified with ED-52 and P-11 column sequentially and identified. The enzymatic activity was assayed. Using the enzyme complex as a target, effect of EGT (extract of green tea) on the complex activity, primer synthesis and primer extension was investigated. Results: IC<sub>50</sub> values of ECS (Camellia Sinesis) and ECPC (Camellia Pitlophylla Chang) on DNA primase - polymerase complex activity were 27.60  $\pm$  1.32  $\mu\text{g/ml}$  and 12.58  $\pm$  1.53  $\mu\text{g/ml}$ . Ki values were 15.35  $\pm$  2.36  $\mu\text{g/ml}$  and 9.41  $\pm$  1.42  $\mu\text{g/ml}$  respectively. Both modes of inhibition were noncompetitive. Under concentration of 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ , promote rates of primer synthesis by ECS and ECPC were 141.58%, 233.5%, 285.5%, 354.9%, 435.5% and 138.8%, 151.3%, 170.5%, 187.2%, 229.5% respectively. Primer synthesis was promoted by EGT and was dependent of concentration of EGT. IC<sub>50</sub> values of ECS and ECPC on primer extension were 15.27  $\pm$  1.40  $\mu\text{g/ml}$  and 13.61  $\pm$  0.77  $\mu\text{g/ml}$  respectively. Conclusion: Inhibition of DNA primase - polymerase complex activity is one of mechanisms of antitumor of EGT, and the inhibition only occurred in primer extension.

**Key words** Extract of Camellia Pitlophylla Chang (ECPC) Extract of Camellia Sinesis (ECS) DNA primase - polymerase complex