

小切口术式。此外,术前 1 天需详细告知家长禁食时间及注意事项,为手术做好准备。结合笔者医院 2004 年 7 月 ~ 2010 年 2 月 1035 例门诊鞘膜积液手术结果来看,门诊手术还是一种安全、方便的手术方式,我们认为这与规范的门诊手术模式及专业的小儿外科医师及小儿麻醉医师是分不开的。

总之,门诊手术模式是一种安全、方便、费用低的模式,腹股沟顺皮纹小切口径外环口行小儿鞘状突高位结扎术也在门诊手术中充分体现其微创手术的优势性,具有方法简便、损伤小、并发症少、安全可靠、复发率低的特点。此种手术模式值得推广普及。

参考文献

1 徐坚,连庆泉,陈小玲,等.七氟醚用于小儿非住院手术麻醉的可行性[J].中华麻醉学杂志,2000,20(4):248-249
2 黄澄如.实用小儿泌尿外科学[M].北京:人民卫生出版社,2006:

396

3 Jay LG, James AO. Eric WF, *et al.* 小儿外科学[M].北京:北京大学医学出版社,2009:1196-1209
4 林涛,龚以榜,李旭良,等.鞘膜腔内注射药物对睾丸发育的影响[J].中华小儿外科杂志,1997,18(1):47
5 张金哲,陈晋杰.小儿门诊外科学[M].北京:人民卫生出版社,2008:231-233
6 查元坤,戴永贵.现代美容外科学[M].北京:人民军医出版社,1995:13
7 Maddox MM, Smith DP. A long-term prospective analysis of pediatric unilateral inguinal hernias: should laparoscopy or anything eles influence the management of the contralateral side? [J]. Pediatr Urol, 2008,4(2):141-145
8 曹押宏.小切口手术治疗小儿斜疝的体会[J].临床和实验医学杂志,2009,8(11):80-81 (收稿:2011-02-28)
(修回:2011-03-30)

蜂房提取物体外抗人肝癌细胞株 HepG₂ 细胞作用的实验研究

戴关海 杨 锋 童晔玲

摘 要 **目的** 观察不同蜂房提取物体外抗 HepG₂ 细胞的作用。**方法** 用不同溶剂从蜂房中提取有效成分(A~G 样品),通过³H-TdR 渗入法观察各提取物体外对 HepG₂ 细胞的抑制作用,确定抑瘤效果最好的蜂房提取物。**结果** 各蜂房提取物对 HepG₂ 细胞均有很好的抑制作用,其中蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)与蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)的抑制作用最明显,抑制率分别为 38.6%~99.6%、21.4%~98.7%,并且具有较好的量效关系。**结论** 蜂房提取物体外具有较强的抗肿瘤作用。

关键词 蜂房提取物 HepG₂ 细胞 抗肿瘤

Effect of Extracts from Nidus Vespae on Resisting Human Hepatocarcinoma Cell Line HepG₂ in vitro. Dai Guanhai, Yang Feng, Tong Yeling. Institute of Basic Medicine, Zhejiang Academy of TCM, Zhejiang 310007, China

Abstract Objective To observe the effect of extracts from nidus vespae on resisting human hepatocarcinoma cell line HepG₂ in vitro. **Methods** Activity composition (A~G sample) was extracted from nidus vespae with different solvent. Sensitivity test of ³H-TdR incorporation assay was also used to detect the effect of inhibiting HepG₂ cell by extracts from nidus vespae in vitro. **Results** Extracts from nidus vespae had good inhibition to HepG₂ cell, especially ethanol petroleumether layer (F sample) and ethanol ethylacetate layer (G sample). The proliferation inhibition rates were 38.6%~99.6%, 21.4%~98.7%, and also had a dose-dependent manner. **Conclusion** Extracts from nidus vespae had good effect on resisting tumor.

Key words Extracts from nidus vespae; HepG₂ cell; Anti-tumor

蜂房(nidus vespae)又称露蜂房、野蜂房、马蜂窝,为胡蜂科昆虫果马蜂(polistes olivaceous egeer)、

日本长脚胡蜂(polistes japonicus saussure)或异腹胡蜂(parapolybia varia fabricius)的巢。是我国传统的动物中药,主要功能为祛风攻毒、散肿止痛。两千年前,《神农本草经》已有记载,主要有祛风解毒、散肿

止痛等功效,用于治疗疽疮肿毒、乳腺炎、风湿等症^[1,2]。近几年,一些老中医治疗恶性肿瘤的药方中常见用露蜂房,药理实验也证明露蜂房制剂对某些恶性肿瘤(肺癌、胃癌、子宫癌等)具有治疗作用而引起医药界重视^[3,4]。根据蜂房临床效用,我们在进行抗肿瘤药物筛选时,发现蜂房提取物在体外均具有较高的抗 HepG₂ 肿瘤细胞作用,现将结果报道如下。

材料与方

1. 实验药物:蜂房由浙江省中医药研究院中药房提供。
2. 实验试剂:DMEM 高糖培养液、0.25% Trypsin;均由吉诺生物医药技术有限公司生产,批号分别为 09081505、09081506;超级新生牛血清:杭州四季青生物工程材料有限公司产,批号 090430;氟-胸腺嘧啶核苷:中国科学院上海应用物理研究所生产,浓度 1μCi/ml,比度 30Ci/(mmol·L),批号 08-11-2,使用前用 Hank's 液配成 20μCi/ml;HepG₂ 细胞株:中国科学院上海药物研究所引进,本实验室液氮保存;无水乙醇、石油醚(60~90℃、30~60℃)、乙酸乙酯、二甲基亚砜:均为分析纯,由杭州高品精细化工有限公司生产。

3. 实验仪器:CO₂ 水套培养箱:型号 3111 型,美国热电公司产;液闪仪:型号 2050 型,PACKARD 公司产;HR40-II-A2 医用净化工作台:青岛海尔特种电器有限公司;RE2000A 型旋转式减压蒸发仪:成都市蜀华西部科技中心有限公司生产;GS-6R 离心机:Beckman 公司生产。

4. 蜂房水提物的制备:取清洁旧蜂房 400g,加 6 倍的冷水浸泡 2h,煮沸后文火煮 1h,共煎煮 3 次,合并 3 次滤液,4℃ 冰箱冷却过夜,除去上层蜂蜡,弃沉渣,滤液浓缩至 400ml(A 样品);取蜂房水提物 A 样品 300ml 加入无水乙醇 1200ml,使终醇度为 80%,4℃ 冰箱冷却过夜,弃沉渣,滤液挥发乙醇,得 150ml 蜂房水煎醇提取物(B 样品);取 100ml B 样品加入 200ml 石油醚(60~90℃)抽提,共 3 次,合并 3 次抽提液,挥发石油醚得蜂房水煎石油醚提取物(C 样品);取石油醚(60~90℃)抽提后滤液,再加入 200ml 乙酸乙酯抽提,共 3 次,合并 3 次抽提液,挥发乙酸乙酯得蜂房水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)。

5. 蜂房醇浸提取物的制备:取清洁旧蜂房 200g,加 10 倍的 95% 乙醇,60℃ 水浴提取 2 次,每次 3h,合并 2 次滤液,4℃ 冰箱冷却过夜,弃沉渣,滤液挥发乙醇,得到蜂房醇浸提取物(E 样品);取蜂房醇浸提取物,加入 100ml 水溶解,再加入 200ml 石油醚(30~60℃)抽提,共 3 次,合并 3 次抽提液,挥发石油醚得蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品);取石油醚(60~90℃)抽提后滤液,再加入 200ml 乙酸乙酯抽提,共 3 次,合并 3 次抽提液,挥发乙酸乙酯得蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)。

6. 蜂房不同提取物体外抗 HepG₂ 作用实验:取蜂房提取物 A~G 样品分别用含 10% FCS 的 DMEM 培养液配成 1000、500、250、125、62.5、31.25μg/ml 6 个浓度。取生长良好的 HepG₂ 细胞株用 0.25% Trypsin 消化成单细胞悬液,用 10% FCS 的 DMEM 培养液配成 1×10⁵/ml 浓度,取 100μl 细胞悬

液加入 96 孔平底培养板中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24h。待细胞贴壁后,再分别加入上述不同浓度的药液,每一浓度做 3 个复孔,继续培养 48h,培养结束前 8h,加入 50μl ³H-TdR(20μCi/ml),继续培养。培养结束后消化贴壁细胞,用 XS-24 细胞收集仪收集细胞,用 2050 型液闪仪测定各孔的 cpm 值,计算各提取物对 HepG₂ 细胞的抑制作用。

结 果

1. 各蜂房提取物的提取得率:由表 1 可见,蜂房水提取物(A 样品)的提取得率最高,为 13.51%。蜂房水煎醇提取物(B 样品)与醇浸提取物(E 样品)的提取得率也较高,分别为 5.06% 与 5.89%,两者在得率上无明显差异。蜂房水煎石油醚提取物(C 样品)提取得率仅为 0.05%,而蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)的提取得率为 3.09%,说明溶解于石油醚的有效成分在水煎中不易提取。而蜂房水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)与醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)的提取得率无明显差异,分别为 0.57% 与 0.55%。

表 1 蜂房提取物提取得率

蜂房提取物名称	200g 蜂房中 提取物量(g)	提取得率 (%)
水提取物(A 样品)	27.024	13.51
水煎醇提取物(B 样品)	10.126	5.06
水煎石油醚提取物(C 样品)	0.093	0.05
水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)	1.131	0.57
醇浸提取物(E 样品)	11.780	5.89
醇浸石油醚提取物(F 样品)	6.180	3.09
醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)	1.100	0.55

2. 不同蜂房提取物对 HepG₂ 细胞抑制作用的影响:由表 2~表 3 可见,不同蜂房提取物对 HepG₂ 细胞³H-TdR 掺入均有明显的抑制作用,说明其对 HepG₂ 细胞生长均有明显的抑制作用。其中蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)与蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)的抑制作用最明显,抑制率分别为 38.6%~99.6%、21.4%~98.7%,并且具有较好的量效关系。而相同剂量的蜂房水提取物(A 样品)、蜂房水煎醇提取物(B 样品)、蜂房水煎石油醚提取物(C 样品)及蜂房水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)抑制作用相对较弱,其抑制率分别为 25.7%~83.2%、-13.2%~82.1%、10.5%~99.6% 及 1.9%~92.8%,蜂房醇浸提取物(E 样品)由于 TLC 分离中含有较高的蜂胶成分,故不进行体外抗肿瘤实验。综合蜂房提取物的提取得率及本实验对 HepG₂ 细胞抑制作用的效果,F 样品与 G 样品抗肿瘤药开发的可行性最大,故有待对这 2 个样品进行进一步成分分析及抗肿瘤实验研究。

表 2 蜂房提取物对 HepG₂ 细胞抑制作用的影响

药物浓度 (μg/ml)	蜂房水提取物(A 样品)		蜂房水煎醇提取物(B 样品)		蜂房水煎石油醚提取物(C 样品)	
	cpm 值	SI(%)	cpm 值	SI(%)	cpm 值	SI(%)
1000	702.0 ± 42.4	83.2	747.5 ± 6.4	82.1	16.5 ± 13.4	99.6
500	1183.5 ± 116.7	71.6	2175.0 ± 48.1	47.9	94.0 ± 33.9	97.7
250	1878.0 ± 404.5	55.0	2602.0 ± 605.3	37.6	107.5 ± 70.0	97.4
125	2956.0 ± 1008.3	29.1	2767.0 ± 469.5	33.7	2238.0 ± 565.7	46.3
62.5	2985.0 ± 50.9	28.4	4272.5 ± 603.2	-2.4	3687.5 ± 64.3	11.6
31.25	3098.5 ± 297.7	25.7	4719.5 ± 1349.9	-13.2	3731.5 ± 450.4	10.5

DMEM 培养液对照 cpm 值为 4170.8

表 3 蜂房提取物对 HepG₂ 细胞抑制作用的影响

药物浓度 (μg/ml)	蜂房水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)		蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)		蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)	
	cpm 值	SI(%)	cpm 值	SI(%)	cpm 值	SI(%)
1000	298.5 ± 119.5	92.8	17.5 ± 19.1	99.6	70.5 ± 37.5	98.3
500	766.5 ± 24.7	81.6	48.0 ± 35.4	98.8	56.0 ± 21.2	98.7
250	1489.5 ± 183.1	64.3	67.5 ± 77.1	98.4	69.0 ± 5.7	98.3
125	3675.5 ± 3080.9	11.9	78.5 ± 23.3	98.1	459.0 ± 231.9	89.0
62.5	3925.0 ± 1278.4	5.9	1523.5 ± 457.5	63.5	1708.5 ± 600.3	59.0
31.25	4090.0 ± 833.0	1.9	2559.5 ± 634.3	38.6	3279.5 ± 1395.1	21.4

DMEM 培养液对照 cpm 值为 4170.8

讨 论

露蜂房为胡蜂科昆虫大黄蜂及同属近缘昆虫的巢。蜂房用药历史悠久,所含低分子化合物主要是蜂蜡、蜂胶、蜂房油^[5];徐伟等^[6]用层析等方法首次从蜂房抗炎活性有效成分纯化得到一酸性蛋白 NV-PP-4。王伟等^[7]利用各种色谱技术进行分离,再根据理化性质和光谱分析鉴定结构。从蜂房中分离得到 6 个化合物,分别鉴定为:8-羟基喹啉-4-酮、对苯二酚、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、胸腺嘧啶脱氧核苷。近年来人们对其抗恶性肿瘤研究颇多,有文献记载蜂房对癌细胞有抑制作用^[8,9]。

我们通过对蜂房提取物 TLC 分离,蜂房水提取物(A 样品)在分离后区带不明显,说明 A 样品中有较多的成分。而蜂房水煎醇提物(B 样品)与蜂房醇浸提取物(E 样品)在颜色上与蜂胶相近,并且在分离后区带上与蜂胶对照药材出现相同的区带,因此估计 B 样品与 E 样品含有较高的蜂胶含量。蜂房水煎石油醚提取物(C 样品)与蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)在分离后区带上基本一致,与蜂胶对照药材出现的区带不相同,估计其他的有效成分。蜂房水煎乙酸乙酯提取物(D 样品)与蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)在分离后区带也基本一致,且与蜂胶对照药材出现的区带不相同,因此也为其他的有效成分。根据蜂房水提物与蜂房醇浸提取物的 TLC 分离结果以及提取物的得率高低为以后的药效实验提供参考。

另外通过³H-TdR 渗入法药敏试验对蜂房提取

物体外抗 HepG₂ 肿瘤细胞的实验研究,结果显示各蜂房提取物对 HepG₂ 细胞均有很好的抑制作用,其中蜂房醇浸石油醚提取物(F 样品)与蜂房醇浸乙酸乙酯提取物(G 样品)的抑制作用最明显,抑制率分别为 38.6%~99.6%、21.4%~98.7%,并且具有较好的量效关系,有待对这两个样品进行进一步成分分析及抗肿瘤实验研究,为开发成抗肿瘤新药提供实验依据。

参考文献

1 邓沂.土茯苓合千年健、露蜂房可治类风湿性关节炎[J]. 中医杂志,2002,43(1):11

2 高士贤.中国动物药志[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1996:319

3 时彦,张圣明,张雪莉,等.露蜂房纯化蛋白对急性髓系白血病患者骨髓细胞的影响[J]. 中国药理学通报,2007,23(5):685-687

4 荆旭波,辛先贵.中药露蜂房蛋白对人红白血病细胞株 K562 细胞影响的实验研究[J]. 实用临床医学,2005,6(12):6-9

5 武鸿翔.露蜂房中化学成分的研究与临床应用概况[J]. 云南中医中药杂志,2001,22(3):29-30

6 徐伟,肖宣,刘雪枚,等.中药露蜂房水溶性蛋白 NV-PP-4 的分离纯化及部分理化性质鉴定[J]. 药实践杂志,2000,18(5):284-285

7 王伟,赵庆春,安晔,等.中药蜂房的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志,2008,18(1):54-56

8 李彦,贾恩礼,栾琳,等.蜂房药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2004,21(5):21-22

9 时彦,张圣明,张雪莉,等.露蜂房纯化蛋白对人早幼粒白血病 HL-60 细胞的生长抑制作用[J]. 潍坊医学院学报,2007,29(2):111-114

(收稿:2011-01-18)

(修回:2011-02-16)