

三叶青有效部位抑制肿瘤增殖和迁移的作用研究

蒋维尔, 徐军烈

浙江中医药大学附属广兴医院, 浙江 杭州 310000

[摘要] 目的: 观察三叶青有效部位对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和迁移的抑制作用及相关机制研究。方法: 制备三叶青有效部位, 将接种于培养板的 MCF-7 细胞分为阴性对照组, 三叶青有效部位给药组和阳性对照组, 观察细胞增殖抑制率、IC₅₀ 值、乳酸脱氢酶 (LDH) 活力、迁移距离、细胞周期分布和凋亡率。结果: 与阴性对照组相比, 三叶青有效部位 5~160 g/L 各剂量组和阳性对照组对 MCF-7 细胞增殖有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 且随着浓度的增大, 三叶青有效部位对 MCF-7 细胞的抑制率呈剂量依赖性关系。三叶青对 MCF-7 细胞增殖的 IC₅₀ 值为 (22.35±1.02) g/L。与阴性对照组相比, 当给药浓度为 160 g/L 时, LDH 活力明显增加 ($P < 0.05$)。与阴性对照组相比, 经药物处理 48 h 后, 随着剂量的增大, MCF-7 细胞的迁移能力被明显抑制 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈明显的剂量依赖性。与阴性对照组相比, 三叶青有效部位作用后, 随着给药浓度的增大, G₀/G₁ 期细胞比例降低, S 期和 G₂/M 期细胞比例增大, 凋亡率升高 ($P < 0.01$)。结论: 三叶青有效部位可有效地抑制 MCF-7 细胞的增殖和迁移, 其作用机制可能与阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 肿瘤; 三叶青; 乳腺癌细胞; MCF-7

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0204-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.090

肿瘤细胞的增殖和凋亡是肿瘤细胞发展的重要因素, 当机体正常调控机制发生紊乱时, 肿瘤细胞的增殖能力将快速增强, 而肿瘤细胞的转移作为恶性肿瘤的特征之一, 其中细胞的迁移是促进肿瘤细胞浸润和转移的重要因素。化疗药物在临床中广泛应用, 但不良反应严重, 中药在肿瘤的治疗中正发挥其独特的优势。三叶青, 又名蛇附子, 属葡萄科植物, 《中药大辞典》^[1]记载其具有清热解毒、祛风止痛等功效, 临床常用来治疗高热惊厥、肺炎、支气管炎、咽喉炎等疾病。有学者研究指出, 三叶青提取物对人黑色素瘤细胞、人宫颈癌细胞、胃癌细胞和膀胱癌细胞具有抑制作用^[2]。本研究提取分离三叶青的有效部位, 研究其对 MCF-7 细胞增殖和迁移的抑制作用, 并进一步探讨其作用机理, 为其成药性提供理论基础。

1 材料

1.1 受试药物 三叶青块根饮片购自杭州市三叶青科技有限公司, 经鉴定为 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et. Gilg。取三叶青块根 4 kg, 粉碎后经 70% 乙醇加热回流 2 次, 每次 2.5 h, 减压回收乙醇旋干后, 用少量去离子水复溶, 再经乙醚萃取 3 次, 经冷冻干燥, 等到冻干粉后备用, 约为 18.6 g。注射用环磷酰胺 (CTX, 江苏恒瑞医药股份有限公司)。

1.2 细胞株 人乳腺癌细胞 MCF-7, 购自上海中国科学院生物化学与细胞所。

1.3 实验仪器与试剂 RPMI1640 培养基和胎牛血清, 美国 GIBCO 公司; 磺酰罗丹明 B (SRB), Sigma 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 南京建成科技有限公司; 细胞周期检测试剂盒, 凯基生物。CO₂ 培养箱: 上海喆图科学仪器有限公司; 流式细胞仪 FM500, 美国贝克曼库尔特有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7 在 RPMI1640 培养基 (含有 10% 胎牛血清), 37℃, 5% CO₂ 的恒温细胞培养箱内进行培养。

2.2 体外检测细胞增殖实验 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 按每孔 200 μL (10000 个细胞) 加入 96 孔细胞板中, 培养 24 h 后, 分别加入不同浓度的三叶青有效部位 200 μL, 阴性对照组只加入 200 μL 培养基, 阳性对照组加入等体积 CTX。培养 48 h 后, 除去上清, 每孔加入 200 μL 三氯乙酸 (TCA), 于 4℃ 冰箱固定 40 min 后, 弃去固定液, 并用去离子水轻轻冲洗 3 遍后每孔加入 100 μL SRB, 于 37℃ 恒温培养箱 30 min 后, 弃去 SRB, 冲洗后每孔加入 150 μL 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 选择酶标仪 540 nm 波长测得每孔光吸收值。肿瘤细胞生长抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 给药组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

2.3 细胞迁移实验 用划线灼伤法研究三叶青有效部位对

[收稿日期] 2015-06-20

[作者简介] 蒋维尔 (1984-), 女, 主管药师, 主要从事中药学研究工作。

MCF-7 细胞的迁移作用。将已消化悬浮的 MCF-7 细胞按每孔 10×10^4 个接种到 24 孔板中, 培养 24 h, 用移液枪头在每孔的中央划一条灼伤带, 宽约 0.5 mm, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去脱落细胞, 加入含不同浓度的三叶青有效部位和阳性对照组的细胞培养基。在显微镜下 (100 \times) 进行拍照, 用 IPP 图像软件进行分析, 计算灼伤带距离。

2.4 LDH 活力检测 取给药组和对照组的上清液, 根据 LDH 测定试剂盒进行酶活力的检测。

2.5 细胞周期的检测 将 MCF-7 细胞培养于 6 孔板中, 加入三叶青有效部位处理 48 h 后, 消化悬浮细胞, 离心收集后, 严格按细胞周期检测试剂进行操作。

2.6 统计学方法 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间均数的比较采用单因素方差分析, 组间均数两两比较, 方差齐时采用 SNK 法, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。由 SPSS22.0 软件完成。

3 实验结果

3.1 各组对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 见表 1。与阴性对照组相比, 三叶青有效部位 5~160 g/L 各剂量组和阳性对照组对 MCF-7 细胞增殖有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 且随着浓度的增大, 三叶青有效部位对 MCF-7 细胞的抑制率呈剂量依赖性关系。三叶青对 MCF-7 细胞增殖的 IC_{50} 值为 (22.35 ± 1.02) g/L。

表 1 各组对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 $(\bar{x} \pm s, n=3)$

组别	剂量(g/L)	抑制率(%)	IC_{50} (g/L)
阴性对照组	-	0	
三叶青有效部位组	5	28.68 ± 3.14	22.35 ± 1.02
	10	39.92 ± 4.61	
	20	49.13 ± 5.01	
	40	56.58 ± 6.89	
	80	65.36 ± 7.01	
	160	78.54 ± 9.01	
阳性对照组	0.1	80.82 ± 6.05	

与阴性对照组比较, ① $P < 0.01$

3.2 各组 LDH 活力检测结果 见表 2。与阴性对照组相比, 当给药浓度为 160 g/L 时, LDH 活力明显增加 ($P < 0.05$)。

表 2 各组 LDH 活力检测结果 $(\bar{x} \pm s, n=3)$

组别	剂量(g/L)	LDH(U/L)
阴性对照组	-	548.18 ± 61.68
三叶青有效部位组	80	588.15 ± 82.12
	160	812.24 ± 123.42 ①

与阴性对照组比较, ① $P < 0.05$

3.3 各组对 MCF-7 细胞迁移距离的作用 见表 3。与阴性对照组相比, 经药物处理 48 h 后, 随着剂量的增大, MCF-7

细胞的迁移能力被明显抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$), 呈明显的剂量依赖性。

表 3 各组对 MCF-7 细胞迁移距离的作用 $(\bar{x} \pm s, n=3)$ μm

组别	剂量(g/L)	0 h	48 h
阴性对照组	-	492.6 ± 24.2	171.5 ± 22.7
三叶青有效部位组	5	482.5 ± 20.8	194.5 ± 21.7
	10	485.2 ± 19.2	124.6 ± 20.3 ①
	20	490.6 ± 23.8	94.2 ± 23.2
阳性对照组	0.15	489.6 ± 21.2	83.1 ± 19.5

与阴性对照组比较, ① $P < 0.05, ② P < 0.01$

3.4 各组对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响 见表 4。与阴性对照组相比, 三叶青有效部位作用后, 随着给药浓度的增大, G_0/G_1 期细胞比例降低, S 期和 G_2/M 期细胞比例增大, 凋亡率升高 ($P < 0.01$)。

表 4 各组对 MCF-7 细胞周期和凋亡的影响 $(\bar{x} \pm s, n=3)$ %

组别	给药浓度(g/L)	凋亡率	G_0/G_1	S	G_2/M
阴性对照组	-	1.34 ± 0.12	45.09 ± 3.75	39.35 ± 2.98	15.56 ± 1.06
三叶青有效部位组	5	9.24 ± 0.51	31.20 ± 3.45	52.06 ± 2.81	16.74 ± 1.55
	10	16.86 ± 1.34	18.10 ± 1.94	60.31 ± 3.82	21.59 ± 1.65
	20	20.12 ± 1.84	8.09 ± 2.08	63.18 ± 4.36	28.73 ± 1.70
阳性对照组	0.15	14.85 ± 1.21	15.24 ± 1.73	59.49 ± 0.79	25.27 ± 2.06

与阴性对照组比较, ① $P < 0.01$

4 讨论

我国的肿瘤发病率一直处于高发水平, 目前对于肿瘤的临床治疗以化学药品为主要手段, 但其日益凸显的副作用不断增加, 例如有费用昂贵、不良反应严重、静脉损伤等一系列问题。随着天然中药的不断开发, 从中提取和分离得到的有效部位不仅可以有效地抑制肿瘤细胞的生长, 且价格实惠, 大大减轻了患者的经济负担。同时, 中药还具有调节人体免疫力、减少药物耐受性等优点。

三叶青是我国独有的珍贵植物, 以块根或全叶入药, 含有黄酮、花青素类等成分, 具有抗肿瘤、抗炎, 治疗哮喘、风湿和免疫调节等多种功效。有学者指出, 三叶青对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用^[3-4]。程伟等^[5]发现三叶青提取物对肺癌 A549 细胞有良好的抑制作用, 可诱导细胞凋亡。丁丽等^[6]发现三叶青水提物对宫颈癌细胞 Hela229 和人恶性黑色素瘤细胞 A375 体外抑制作用确切。有医者在乳腺癌患者治疗过程中辅以三叶青, 其可清热解毒、消肿散瘀, 结果发现三叶青治疗乳腺癌有一定的疗效^[7]。但关于三叶青对乳腺癌细胞的实验室研究少见报道。

本研究提取和分离三叶青有效部位, 对其抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖和迁移作用进行研究, 结果发现, 三叶青有效部位对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用随浓度的增大而逐渐

增大, MCF-7 细胞的 IC_{50} 值为 (22.35 ± 1.02) g/L, 当给药浓度为 160 g/L 时, LDH 活力增大, 提示出现细胞毒作用, 且远远高于 IC_{50} 值, 提示该有效部位给药浓度有较大的安全范围。迁移实验结果显示, MCF-7 细胞的迁移距离随给药浓度的升高而减少, 提示三叶青有效部位可明显抑制 MCF-7 细胞的迁移能力。细胞周期可反映细胞的增殖状态, 分析流式细胞仪结果可知, 三叶青有效部位可将 MCF-7 细胞阻滞于 S 和 G_2/M 期, 并诱导细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤生长的作用。

综上所述, 三叶青有效部位对 MCF-7 细胞的增殖和迁移有抑制作用, 且用药安全范围广, 其作用机理可能与阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关, 但其详尽的作用机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2123.

- [2] 丁丽, 纪其雄. 三叶青抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 46-48.
- [3] 汪珍, 冯健, 王晓华, 等. 三叶青提取物对人结肠癌细胞系 RKO 细胞凋亡的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(3): 321-324.
- [4] 倪克锋, 丁志山, 黄挺, 等. 三叶青黄酮对 H-22 荷瘤小鼠瘤体的抑制作用及其机理研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(6): 732-734.
- [5] 程伟, 陆曙梅. 三叶青提取物对肺癌 A549 细胞的体外抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 53-56.
- [6] 丁丽, 纪其雄, 吕雯婷, 等. 三叶青水提物体内、体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1076-1078.
- [7] 石镇东, 张尊祥. 中医辨证论治乳腺癌经验总结[J]. 中医学报, 2013, 28(11): 1610-1611.

(责任编辑: 吴凌)

HPLC 法测定灯盏生脉胶囊中灯盏花乙素含量的研究

孙银芳

余姚市中医院, 浙江 余姚 315400

[摘要] 目的: 建立灯盏生脉胶囊中灯盏花乙素含量测定的高效液相色谱法 (HPLC)。方法: 选用 Water XTerra RP C_{18} 色谱柱 ($5 \mu m$, 4.6×150 mm), 以乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (含 0.1% 三乙胺) ($15:85, v/v$) 为流动相; 流速: 1.0 mL/min。检测波长为 334 nm。柱温及进样器温度: 室温。结果: 灯盏花乙素在 6-100 $\mu g/mL$ 的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, $r=0.9991$ 。灯盏花乙素的平均加样回收率为 100.14, $RSD=1.14$ 。结论: HPLC 法测定灯盏生脉胶囊中灯盏花乙素含量操作简便, 结果准确, 重现性好, 可用于控制灯盏生脉胶囊的质量。

[关键词] 灯盏生脉胶囊; 灯盏花乙素; 高效液相色谱法 (HPLC); 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 11-0206-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.11.091

灯盏生脉胶囊是由灯盏细辛、人参、五味子和麦冬制成的复方制剂^[1], 具有益气养阴、活血健脑之功效。主要用于气血两虚, 瘀阻络脉引起的胸痹心痛、中风后遗症、冠心病心绞痛、缺血性心脑血管疾病以及高脂血症的治疗^[2]。灯盏花乙素为灯盏生脉胶囊的主要活性成分之一, 具有清热解毒、扩张血管、降低血管阻力、抗血小板聚集、改善体内微循环等作

用^[3-4]。本实验运用高效液相色谱法 (HPLC) 建立了灯盏生脉胶囊中灯盏花乙素的含量测定方法, 该方法可靠, 简单可行, 专属性强, 重复性好, 结果报道如下。

1 实验材料与仪器

1.1 药品与试剂 灯盏花乙素对照品 (中国药品生物制品鉴定所提供, 批号 11084, 纯度 $\geq 92.1\%$); 灯盏生脉胶囊由云南

[收稿日期] 2015-06-05

[作者简介] 孙银芳 (1984-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药学。