

升麻总苷抗肿瘤活性及其对肿瘤细胞周期的影响*

郑永仁¹, 吴德松², 王 礪¹, 周铭涛², 杨和金^{2△}

(1. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 2. 云南省药物研究所, 云南昆明 650111)

摘要: 目的 研究升麻总苷提取物(Total Glycoside of *Cimicifuga foetida*, TGC)的体内、外抗肿瘤活性及其对肿瘤细胞周期分布的影响。方法 MTT 法检测 TGC 对人肿瘤细胞株的增殖抑制活性; 体内实验观察 TGC 对小鼠肝癌 H22 移植瘤和人肝癌裸小鼠异种移植瘤 Bel-7402 的抑制作用; 荧光染色法和流式细胞仪检测其对肿瘤细胞周期的影响。结果 TGC 可明显抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖, 其 IC_{50} 值为 $(76.16 \pm 2.94) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; TGC $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量可明显抑制小鼠肝癌 H22 和人肝癌 Bel-7402 裸小鼠移植瘤的生长; TGC $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可明显诱导人肝癌 HepG2 细胞阻滞于 G2/M 期, 呈现出一定的时-效关系。结论 TGC 具有明显的体内、外抗肿瘤作用, 其活性可能与阻滞肿瘤细胞周期有关。

关键词: 升麻总苷; 抗肿瘤活性; 细胞周期

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2013)04-0017-04

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的重大疾病, 其临床治疗一般采用手术、放疗、化疗三大疗法, 有一定的治疗效果。目前临床上常用的化疗药物有 40 余种, 在肿瘤治疗中起着重要作用, 但也面临着严重挑战, 如许多实体瘤尚无有效的药物, 肿瘤的抗药性及抗癌药物严重的毒副作用等问题。因此, 寻找和开发新的高效、低毒的抗肿瘤药物是医学界重要的研究课题。

升麻 *Cimicifuga foetida* L. 属毛茛科 *Ranunculaceae* 金莲花亚科 *Helleboroideae* 升麻属植物, 其根茎为常用中药, 有发表透疹、清热解毒、升举阳气等功能^[1]。在北美洲, 对其也有悠久的用药历史, 用于治疗腹泻、咽喉痛和风湿症^[2]。近年来, 学者们对升麻进行了大量体外抗肿瘤活性筛选研究, 结果表明升麻总提物及其苷类对多种人肿瘤细胞株有较强的增殖抑制作用^[3]。但是目前对于升麻药理学活性的研究大都还处于细胞水平的初筛阶段, 缺乏对其机制的探讨及动物体内试验的佐证, 并且丰富的植物资源为其药理活性的研究提供了得天独厚的条件。因此, 在活性筛选的基础上对这类提取物进行深入的抗肿瘤药理学活性研究, 可以更好的开发利用

本植物。本研究采用肿瘤细胞株模型、动物移植瘤模型、人癌裸小鼠移植瘤模型和流式细胞术观察 TGC 的体内、外抗肿瘤活性和对肿瘤周期分布的影响, 初步探讨其抗肿瘤活性及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与瘤株

SPF 级 KM 小鼠, BALB/c 裸小鼠, 全雌性, 体重 18~22g, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2008-0002。人肝癌细胞株 HepG2、小鼠肝癌 H22 瘤株、人肝癌 Bel-7402 瘤株, 均购自中国科学院上海药物研究所。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

CKX31 型倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; JJ2000 型精密电子天平, 常熟双杰测试仪器厂; Multiskan Go 连续波长酶标仪、Forma 3111 CO₂ 恒温培养箱, 美国热电公司; L600 低速台式离心机, 湘仪离心机仪器有限公司。

1.2.2 试剂

升麻总苷提取物由云南省药物研究所提供。RPMI 1640 培养液、胎牛血清, Hyclone 生物化学制

* 基金项目: 云南省科技厅省院省校合作项目(NO:00YT06)

收稿日期: 2013-04-17 修回日期: 2013-04-26

作者简介: 郑永仁(1965~), 男, 云南楚雄人, 实验师, 主要从事实验动物和动物实验工作。

△通信作者: 杨和金, E-mail: 404713576@qq.com

品(北京)有限公司生产;胰蛋白酶、二甲基四氮唑蓝(MTT),Amresco 公司生产;核糖核酸酶 A(RNase A)、碘化丙啶(PI),Sigma 公司生产;注射用环磷酰胺、依托泊苷,江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

1.3 体外细胞毒性实验

MTT 法^[4]检测 TGC 对人肝癌 HepG2 细胞的体外细胞毒性。将对数生长期细胞 90 μL /孔接种于 96 孔板,浓度为 $5 \times 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$,培养 24 h 后加入不同浓度的 TGC ($10, 20, 40, 80, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液 10 μL ,每个浓度设 3 个复孔,并设溶媒对照孔及无细胞调零孔。药物与细胞共孵育 48 h 后加入 MTT,继续培养 4 h,加入三联液(10% SDS-5%异丁醇-0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl)50 μL /孔,于 CO_2 培养箱中孵育过夜,用酶标仪于 570 nm 处测定吸光度(OD_{570})。按照下列公式计算肿瘤生长抑制率,并采用 LOGIT 法计算半数抑制浓度 IC_{50} 。

$$\text{肿瘤生长抑制率} = \frac{\text{对照组 OD} - \text{治疗组 OD}}{\text{对照组 OD}} \times 100\%$$

1.4 小鼠肝癌 H22 移植瘤模型的建立及药物疗效评价

将处于对数生长期的小鼠肝癌 H22 肿瘤细胞计数后,用无菌生理盐水调细胞浓度为 $1 \times 10^{10} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度,接种于小鼠右侧腋部皮下,每只 0.2 mL,即 2×10^6 个细胞。接种 24 h 后随机分为溶媒对照组(纯水)、阳性对照组(环磷酰胺,CTX)和 TGC 低剂量组($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),CTX 以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射给药,其余各组均灌胃给药,每天 1 次,连续 10 d。第 11 天脱颈椎处死小鼠,取瘤称重,按下列公式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{受试组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

1.5 人肝癌 Bel-7402 裸小鼠移植瘤模型的建立及药物疗效评价

参照文献[4]方法,选择肿瘤生长旺盛且无破溃的荷瘤裸小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下剥离肿瘤。用剪刀剪去肿瘤组织表面包膜和血管,将组织剪切成 1.5 mm^3 左右组织小块。无菌条件下用套管针接种于裸小鼠右侧腋窝皮下,用游标卡尺测量瘤径,每周 2~3 次,待肿瘤生长至 $100 \sim 300 \text{ mm}^3$ 后,剔除移植瘤未生长的裸小鼠,动物随机分为 4 组。即溶媒对照组(纯水)、阳性对照组(依托泊苷,VP-16 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 TGC 低剂量组($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),

各组均以 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重灌胃给药,连续 3 周。采用游标卡尺测量瘤径,以计算肿瘤的大小,每周测量 3 次。末次给药 24 h 后,颈椎脱臼处死动物,取完整的肿瘤组织,按下列公式计算肿瘤体积 TV、相对肿瘤体积 RTV 和相对肿瘤增殖率 T/C(%)。

$\text{TV} = 1/2 \times a \times b^2$,其中 a、b 分别表示肿瘤组织的长、短径

$\text{RTV} = V_t/V_0$,其中 V_0 为开始给药(d_0)时测量所得肿瘤体积, V_t 为每次测量时的肿瘤体积

$$\text{T/C}(\%) = \frac{\text{T}_{\text{RTV}}}{\text{C}_{\text{RTV}}} \times 100\%, \text{T}_{\text{RTV}} \text{ 为治疗组 RTV, C}_{\text{RTV}}$$

为溶媒对照组 RTV

1.6 流式细胞术分析细胞周期

人肝癌 HepG2 细胞经 TGC $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别处理 24 h 和 48 h 后,胰酶消化收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定在预冷的 70%乙醇中。检测前离心弃去固定液,用 PBS 洗 2 次后,将细胞重悬在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 的 PBS 中,调整细胞数为 $1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$,于室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪检测,采用 WinMDI 2.9 和 FCS Express V3 软件进行细胞周期分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经正态性检验和方差齐性检验满足正态分布和方差齐同后作单因素方差分析,组间差异用 SNK 法比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TGC 对人肝癌细胞株生长的抑制作用

不同浓度 TGC 处理人肝癌 HepG2 细胞 48 h 后,MTT 法检测发现 TGC 对其增殖具有明显的抑制作用,结果呈现一定的剂量-效应关系,其 IC_{50} 值为 $76.16 \pm 2.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,结果见图 1,实验重复 3 次。

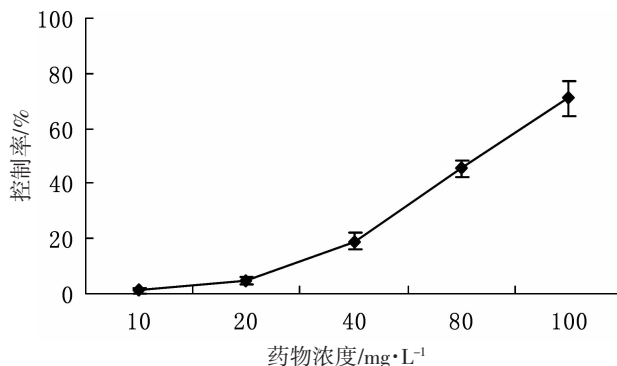


图 1 TGC 作用 48h 对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

2.2 TGC 对小鼠肝癌移植瘤生长的抑制作用

结果显示,与溶媒对照组比较,TGC $0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量可明显抑制小鼠肝癌 H22 的生长 ($P<0.05$),

其抑瘤率为 39.38% ;TGC $0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量对小鼠肝癌有一定的抑制作用,但活性不明显 ($P>0.05$),结果见表 1。

表 1 TGC 对小鼠肝癌 H22 生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数	体重/g		瘤重/g	抑瘤率/%
			给药前	给药后		
溶媒对照	--	10	20.56 $\pm$ 1.27	33.41 $\pm$ 1.44	1.60 $\pm$ 0.79	--
CTX	0.02	10	20.66 $\pm$ 1.02	31.28 $\pm$ 1.70	0.98 $\pm$ 0.33*	38.75
TGC	0.40	10	21.21 $\pm$ 1.22	33.47 $\pm$ 2.43	1.18 $\pm$ 0.77	26.25
	0.80	10	20.59 $\pm$ 0.92	31.00 $\pm$ 1.67	0.97 $\pm$ 0.61*	39.38

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 TGC 对人肝癌裸小鼠移植瘤生长的抑制作用

结果显示,TGC $0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组给药 14 d,肿瘤相对增殖率 (T/C%)为 49% ,与溶媒对照组比较,

差异有统计学意义 ($P<0.05$)。TGC $0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组肿瘤相对增殖率 (T/C%)为 65% ,与溶媒对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),结果见表 2、图 2。

表 2 TGC 给药第 14 天对人肝癌 bel-7402 裸小鼠移植瘤生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数	体重/g		TV/ mm^3		RTV	T/C/%
			d_0	d_{14}	d_0	d_{14}		
溶媒对照	--	12	21.72	24.69	137.44 $\pm$ 76.54	1284.63 $\pm$ 345.66	11.55 $\pm$ 7.02	
VP-16	0.025	6	21.38	22.10	205.27 $\pm$ 88.10	784.49 $\pm$ 356.13	4.68 $\pm$ 3.20**	41
TGC	0.40	6	23.84	25.57	110.59 $\pm$ 77.53	683.01 $\pm$ 404.75	7.56 $\pm$ 5.26	65
	0.80	6	22.54	24.32	147.57 $\pm$ 78.11	782.90 $\pm$ 375.85	5.68 $\pm$ 1.53*	49

注:与溶媒对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$; d_0 :开始分组给药时间; d_{14} :最佳疗效时间

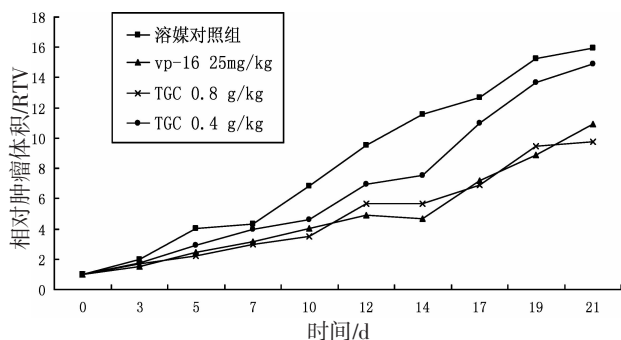


图 2 TGC 对人肝癌 bel-7402 裸小鼠移植瘤生长的抑制作用

2.4 TGC 对人肿瘤细胞周期的影响

TGC $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,TGC 组 G2/M 期细胞百分比为 (15.69 ± 2.5)%,溶媒对照组为 (6.52 ± 1.7)%,与溶媒对照组比较,TGC 组 G2/M 期细胞有所增多,G0/G1 期细胞数相对下降;TGC 作用 48 h 后,HepG2 细胞凋亡数明显增多,G2/M 期细胞百分比为 (29.68 ± 3.1)%,溶媒对照

组为 (10.69 ± 2.2)%,与溶媒对照组比较,TGC 组 G2/M 期细胞明显增多 ($P<0.05$),结果表明 TGC 能诱导人肝癌 HepG2 细胞阻滞于 G2/M 期,且呈现一定的时-效关系,结果见图 3。

3 讨论

升麻中富含多种活性成分,具有抑制核苷转运、抗病毒、抗肿瘤、调节神经内分泌功能、抗骨质疏松、消炎等多种药理学活性,其开发前景可观。为了进一步开发利用本植物,本研究采用体外细胞株模型、体内动物模型和流式细胞术对升麻总苷提取物的抗肿瘤活性及其可能的作用机制进行探讨。结果表明,升麻总苷提取物可明显抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖,其 IC_{50} 为 (76.16 ± 2.94) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,结果具有较好的量效关系;升麻总苷提取物 $0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量可明显抑制小鼠肝癌 H22 和人肝癌 Bel-7402 裸小鼠移植瘤的生长。在此剂量下对受试动物的毒性不大,动物体重下降不明显、动物无死亡,表明药物

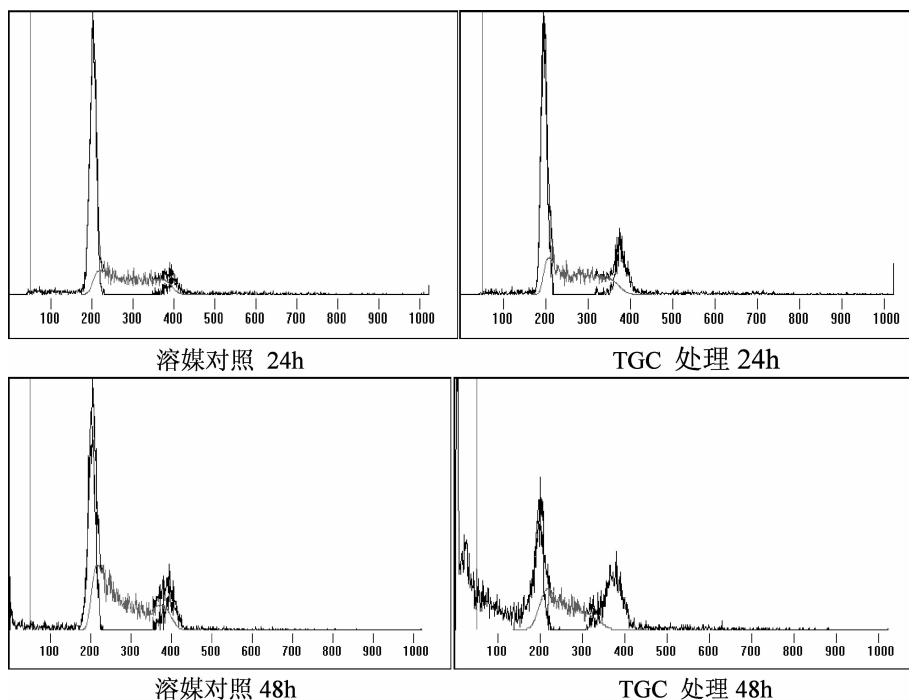


图 3 TGC 不同处理时间对人肝癌 HepG2 细胞周期分布的影响

安全性较好。

细胞周期进程是一种非常复杂和精细调节的过程,结果引起细胞的分化、生长或细胞程序死亡。恶性肿瘤的特征是细胞周期调节的失控,引起细胞分化的缺乏和细胞生长的失常,导致细胞无限增殖^[9]。细胞周期的阻滞可引发细胞凋亡,从而影响了其增殖。在细胞周期中存在 G_0/G_1 、S 及 G_2/M 3 个调控点,任何一个调控点改变都有可能影响肿瘤细胞的生长。本实验细胞周期分析结果表明,升麻总苷提取物 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理人肝癌 HepG2 细胞 48h 后,

能明显诱导人肝癌 HepG2 细胞阻滞于 G_2/M 期,且呈现一定的时-效关系。

综上,升麻总苷提取物在体外能显著抑制人肝癌细胞的增殖,在体内对小鼠肝癌移植瘤和人肝癌裸鼠移植瘤的生长也具有较强的抑制作用,而其抗肿瘤活性的发挥可能与阻滞肿瘤细胞周期有关。在今后的研究中,我们将扩大细胞株和瘤株的选择范围,并研究药物对细胞周期相关调控蛋白、基因表达水平的影响,进一步探讨其的作用机制。

参考文献

- [1] 潘瑞乐,陈迪华,斯建勇,等. 升麻地上部分皂苷类成分研究[J]. 药学学报,2002,37(2):117-120.
- [2] Hitoshi Y, Makiko N, Toshihiro N. Three New 15,16-Seco-cycloartane Glycosides from *Cimicifuga Rhizome* [J]. Chem. Pharm. Bull, 2007, 55(5):789-792.
- [3] 刘蓓蓓,陈胜璜,陈四保. 升麻化学成分及其抗肿瘤活性研究进展[J]. 中南药学,2012,10(1):53-58.
- [4] 甄永苏. 抗肿瘤药物研究与开发[M]. 北京:化学工业出版社,2004:721-729.
- [5] 詹启敏. 分子肿瘤学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2005:324-325.

(编辑:迟越)

Anti-tumor Activity of Total Glycoside of *Cimicifuga foetida* L. and Its Effect on Tumor Cell Cycle

ZHENG Yong-ren¹, WU De-song², WANG Bo¹, ZHOU Ming-tao², YANG He-jin²

(1. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500, China;

2. Yunnan Institute of Material Medica, Kunming Yunnan 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the anti-tumor activity of total glycoside of *Cimicifuga foetida* L. (TGC) and its mechanism. **Methods** The growth inhibitory effect of TGC on human hepatoma cell line HepG2 was observed by using assay (MTT); In vivo anti-tumor activity of TGC were evaluated in transplant hepatoma H22 model and human hepatocellular carcinoma Bel-7402 xenograft nude mice model; Cell cycle distribution was assayed by flow cytometry. **Results** TGC could markedly inhibit the growth of HepG2 ($IC_{50}=76.16 \pm 2.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Compared with the solvent group, TGC showed a significant inhibitory effect on H22 and Bel-7402 at a dose of $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Furthermore, TGC could arrest HepG2 at G_2/M phase at a concentration of $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in a time-dependent manner. **Conclusion** TGC had significant anti-tumor effects both in vivo and in vitro, which might be associated with the arresting of the tumor cell cycle at G_2/M phase.

KEY WORDS: total glycoside of *Cimicifuga foetida* L.; anti-tumor activity; cell cycle