

灯盏乙素、灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素苷元联合 三氧化二砷对乳腺癌细胞的增殖抑制作用研究^{*}

倪广惠^{1,2}, 何越峰^{3△}

(1. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省民族特色养生理理论与健康产品工程实验室, 云南 昆明 650500;
3. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨灯盏乙素及其衍生物和三氧化二砷单独及联合用药对乳腺癌细胞的作用。**方法** 将体外培养的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分成对照组和用药组, 每组设 6 个复孔。用药组为灯盏乙素及其衍生物(灯盏乙素苷元与四乙酰灯盏乙素苷元)单独用药, 以及 5 μM 三氧化二砷一起联合用药。用 MTT 法测试它们对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用。**结果** 灯盏乙素单独用药时, 剂量为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对 MDA-MB-231 细胞的抑制率分别为 (0.01 $\pm$ 5.56)%、(18.18 $\pm$ 3.46)%、(35.72 $\pm$ 5.27)%; 灯盏乙素与 5 μM As_2O_3 联合用药时, 抑制率分别为 (13.55 $\pm$ 3.54)%、(32.6 $\pm$ 5.09)%、(35.29 $\pm$ 6.96)%。灯盏乙素苷元单独用药时, 剂量为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对 MDA-MB-231 细胞的抑制率分别为 (1.13 $\pm$ 5.46)%、(1.68 $\pm$ 6.55)%、(3.86 $\pm$ 5.51)%; 与 5 μM As_2O_3 联合用药时, 抑制率分别为 (17.90 $\pm$ 2.41)%、(28.13 $\pm$ 4.63)%、(34.94 $\pm$ 2.41)%。四乙酰灯盏乙素苷元单独用药时, 剂量为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对 MDA-MB-231 细胞的抑制率分别为 (0.76 $\pm$ 5.07)%、(1.34 $\pm$ 4.07)%、(-0.40 $\pm$ 7.59)%; 与 5 μM As_2O_3 联合用药时, 抑制率分别为 (16.52 $\pm$ 5.91)%、(17.25 $\pm$ 3.89)%、(13.62 $\pm$ 7.24)%。**结论** 单独用药时, 灯盏乙素对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用大于灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素, 糖基的去除和乙酰化使其作用减弱; 与三氧化二砷联用时, 灯盏乙素及灯盏乙素苷元对细胞有显著的抑制作用。其中, 灯盏乙素苷元单独使用无抑制活性, 却能显著增强三氧化二砷对细胞的抑制作用。灯盏乙素苷元与三氧化二砷联合用药具有治疗乳腺癌的应用前景。

关键词: 灯盏乙素; 灯盏乙素苷元; 四乙酰灯盏乙素苷元; 三氧化二砷; 乳腺癌

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)06-0017-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.005

灯盏乙素(Scutellarin, 图 1)是灯盏细辛[*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz]的主要成分^[1], 在体内被迅速代谢为灯盏乙素苷元(Scutellarein, 图 1)。研究发现, 灯盏乙素和灯盏乙素苷元都具有抗氧化等

作用^[2-3], 脂溶性比较低^[4], 药代动力学性质差^[5]。笔者合成了四乙酰灯盏乙素苷元(tetraacetylscutellarein, 图 1), 以期改进其脂溶性。越来越多研究发现, 灯盏乙素及其衍生物在抗肿瘤领域中展现出较好的应

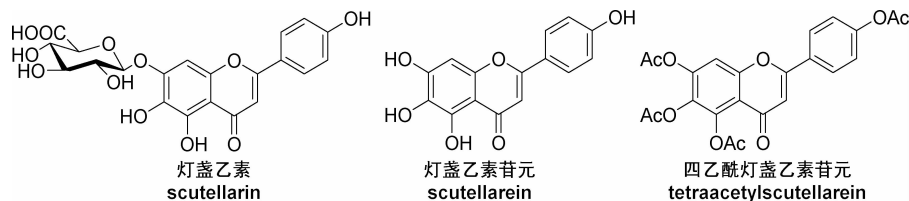


图 1 灯盏乙素、灯盏乙素苷元、四乙酰灯盏乙素苷元的化学结构式

^{*} 基金项目: 云南省应用基础研究-中医联合专项(2015FB205-029); 云南公共卫生与疾病防控协同创新中心项目(2016YNPHXT15)

收稿日期: 2016-11-02

作者简介: 倪广惠(1983-), 女, 博士, 讲师, 主要从事天然产物的有机合成及活性研究。

△通信作者: 何越峰, E-mail: heyuefeng@kmmu.edu.cn

用前景^[6-14],但是活性不够强。三氧化二砷(As_2O_3)是抗癌药物的热点之一,但是其全身毒性是一个严重问题。本研究将灯盏乙素、灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素苷元与 As_2O_3 联合使用,研究其对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂、仪器

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院昆明动物研究所。灯盏乙素购自云南红河千山生物工程有限公司(批号:20150216);灯盏乙素苷元、四乙酰灯盏乙素苷元由本实验室合成;三氧化二砷由昆明医科大学提供(云南文山金驰砷霜有限公司)。RPMI1640 培养液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(兰州百灵生物技术有限公司);MTS 一步法细胞活力检测试剂盒(美国 Promega 公司)。CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板,每孔 3×10^3 个细胞。置 CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 24 小时后加入样品。灯盏乙素的实验分为对照组、单独用灯盏乙素组、单独用砷组与联合用药组。其中对照组加入 10 μL PBS 溶液;单独用灯盏乙素组分别加入 10 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 灯盏乙素溶液;单独用砷组加入 5 μL PBS 溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液;联合用药组加入 5 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 灯盏乙素溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液。灯盏乙素苷元的实验分为对照组、单独用灯盏乙素苷元组、单独用砷组与联合用药组。其中对照组加入 10 μL PBS 溶液;单独用灯盏乙素苷元组分别加入 10 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 灯盏乙素苷元溶液;单独用砷组加入 5 μL PBS 溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液;联合用药组加入 5 μL 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 灯盏乙素苷元溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液。四乙酰灯盏乙素苷元的溶解性较差,所以将其配为浓度为 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液;实验分为对照组、单独用四乙酰灯盏乙素苷元组、单独用砷组与联合用药组。其中对照组加入 10 μL PBS 溶液;单独用四乙酰灯盏乙素苷元组分别加入 10 μL 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四乙酰灯盏乙素苷元溶液;单独用砷组加入 5 μL PBS

溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液;联合用药组加入 5 μL 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四乙酰灯盏乙素苷元溶液与 5 μL 三氧化二砷溶液。每组设 6 复孔,每个实验分别重复 3 次。放入 37℃ CO₂ 培养箱中。48 小时后加入 20 μL MTS 溶液,37℃ CO₂ 培养箱中继续孵育 2 小时,用全自动酶标仪在 490nm 测定吸光度(A)^[15]。

1.3 统计学方法

使用统计学软件 SPSS12.0 版,多组比较采用方差分析,两组比较采用 *t* 检验,当 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 灯盏乙素对乳腺癌细胞的增殖抑制作用

灯盏乙素单独用药时,随着剂量的增加,对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用呈现增加作用;与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 联合用药时,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用呈现增强作用,见表 1。

表 1 灯盏乙素单独及联合用药对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

灯盏乙素 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	单独用药 抑制率/%	与 5 μM As_2O_3 联合用药 抑制率/%
0	0.00 $\pm$ 7.42	12.36 $\pm$ 3.84 ^a
10	0.01 $\pm$ 5.56	13.55 $\pm$ 3.54 ^a
50	18.18 $\pm$ 3.46 ^c	32.6 $\pm$ 5.09 ^{ab}
100	35.72 $\pm$ 5.27 ^c	35.29 $\pm$ 6.96 ^{ab}

注:与单独用药组比较,^a $P < 0.05$;与 5 μM As_2O_3 组比较,^b $P < 0.05$;与单独用药 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较,^c $P < 0.05$

2.2 灯盏乙素苷元对乳腺癌细胞的增殖抑制作用

灯盏乙素苷元单独用药时,对 MDA-MB-231 细胞几乎无抑制作用;与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As_2O_3 联合用药时,对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用增强,并且呈现出剂量-效应关系;见表 2。

表 2 灯盏乙素苷元单独及联合用药对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

灯盏乙素苷元 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	单独用药 抑制率/%	与 5 μM As_2O_3 联合用药 抑制率/%
0	0.00 $\pm$ 3.72	12.15 $\pm$ 3.91 ^a
10	1.13 $\pm$ 5.46	17.90 $\pm$ 2.41 ^{ab}
50	1.68 $\pm$ 6.55	28.13 $\pm$ 4.63 ^{ab}
100	3.86 $\pm$ 5.51	34.94 $\pm$ 2.41 ^{ab}

注:与单独用药组比较,^a $P < 0.05$;与 5 μM As_2O_3 组比较,^b $P < 0.05$

2.3 四乙酰灯盏乙素苷元对乳腺癌细胞的增殖抑制作用

四乙酰灯盏乙素苷元灯盏乙素苷元单独用药时,对MDA-MB-231细胞几乎无抑制作用;与 $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 联合用药时,对MDA-MB-231细胞的抑制作用也未见增强;见表3。

表3 四乙酰灯盏乙素苷元单独及联合用药对MDA-MB-231细胞的抑制作用($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

四乙酰灯盏乙素苷元/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	单独用药抑制率/%	与 $5\mu\text{M}$ As_2O_3 联合用药抑制率/%
0	0.00 ± 6.94	11.88 ± 5.47^a
1	0.76 ± 5.07	16.52 ± 5.91^a
5	1.34 ± 4.07	17.25 ± 3.89^a
10	-0.40 ± 7.59	13.62 ± 7.24^a

注:与单独用药组比较, $^aP<0.05$,

3 讨论

灯盏乙素对乳腺癌MDA-MB-231细胞有着抑制作用,而灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素苷元对其几乎无抑制作用。与灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素苷元相比,灯盏乙素多着一个葡萄糖醛酸基团,这意味着糖基对其抑制MDA-MB-231细胞增殖有着重要意义。

前期大量研究证实, As_2O_3 对乳腺癌有抑制作用^[6],但是由于毒性问题,其应用受到限制。在本研究中,灯盏乙素、灯盏乙素苷元均能提高 As_2O_3 对乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制作用,而四乙酰灯盏乙素苷元未显示出相应的效果。灯盏乙素在剂量为 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 As_2O_3 的抑制作用有所增强;而剂量增大到 $50\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其联合增强作用更加明显;而在 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其联合作用与单独用药的抑制作用相当。灯盏乙素苷元本身对MDA-MB-231细胞增殖并无抑制作用,但是能增强 As_2O_3 对乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制作用,并且随着剂量的增大呈现效应增强的趋势。

单独用药时,灯盏乙素对MDA-MB-231细胞的抑制作用大于灯盏乙素苷元及四乙酰灯盏乙素,糖基的去除和乙酰化使其作用减弱;与三氧化二砷联用时,灯盏乙素及灯盏乙素苷元对细胞有显著的抑制作用。其中,灯盏乙素苷元单独使用无抑制活性,却能显著增强三氧化二砷对细胞的抑制作用。综上所述,本研究为灯盏乙素抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的构效关系研究提供了思路。本研究

表明,灯盏乙素苷元与 As_2O_3 联合使用具有治疗乳腺癌的应用前景。

参考文献:

- [1] 蔡丽珠,冯春,罗珊珊,等. HPLC法测定无糖型灯盏细辛合剂中野黄芩苷含量[J]. 云南中医学院学报,2014,37(6):5-8.
- [2] 石美娜,杨为民,刘璇. 灯盏花乙素药理作用研究进展[J]. 昆明医科大学学报,2013,34(9):151-154.
- [3] 王银辉,耿玲,李辉. 灯盏乙素抗大鼠肝纤维化作用的研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(10):1999-2003.
- [4] 石森林,徐莲英,毛展凯,等. 灯盏花素的理化性质及其稳定性影响因素研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(7):843-847.
- [5] 刘建明,熊玉卿. 灯盏乙素及其苷元药代动力学特征的研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):3165-3168.
- [6] Wu YX, Sato E, Kimura W, et al. Baicalin and scutellarin are proteasome inhibitors that specifically target chymotrypsin-like catalytic activity[J]. Phytother Res, 2013, 27(9):1362-1367.
- [7] Cheng CY, Hu CC, Yang HJ, et al. Inhibitory effects of scutellarein on proliferation of human lung cancer A549 cells through ERK and NF κ B mediated by the EGFR pathway[J]. Chin J Physiol, 2014, 57(4):182-187.
- [8] Feng YZ, Zhang SS, Tu J, et al. Novel function of scutellarin in inhibiting cell proliferation and inducing cell apoptosis of human Burkitt lymphoma Namalwa cells [J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(12):2456-2464.
- [9] Hsiao WL, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy - from TCM theory to mechanistic insights[J]. Planta Med, 2010, 76(11):1118-1131.
- [10] Li H, Huang D, Gao Z, et al. Scutellarin inhibits cell migration by regulating production of α 5 β 1 integrin and E-cadherin in human tongue cancer cells [J]. Oncol Rep, 2010, 24(5):1153-1160.
- [11] Chan JY, Tan BK, Lee SC. Scutellarin sensitizes drug-evoked colon cancer cell apoptosis through enhanced caspase-6 activation[J]. Anticancer Res, 2009, 29(8):3043-3047.
- [12] Xu H, Zhang S. Scutellarin-induced apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells via a STAT3 pathway [J]. Phytother Res, 2013, 27(10):1524-1528.
- [13] Li J, Wang Y, Lei JC, et al. Sensitisation of ovarian cancer cells to cisplatin by flavonoids from scutellaria barbata[J]. Nat Prod Res, 2014, 28(10):683-689.
- [14] 张颖, 李俊玫, 秦博文, 等. 野黄芩苷对人舌鳞癌Tca8113细胞凋亡及caspase-8表达的影响 [J]. 天津医

- 药, 2015, 43(3): 237-240.
- [15] Du J, Zhou N, Liu H, et al. Arsenic induces functional re-expression of estrogen receptor α by demethylation of DNA in estrogen receptor-negative human breast cancer[J]. Plos One, 2012, 7(4): e35957.
- [16] 石莹, 胡博, 郭侯, 等. 三氧化二砷抑制小鼠乳腺癌细胞 MA-891 生长作用及其对端粒酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 637-642.
- (编辑: 徐建平)

Study of Scutellarin, Scutellarein and Tetraacetyl Scutellarein Combined with Arsenic Trioxide on Breast Cancer Cell Proliferation Inhibition

NI Guanghui^{1,2}, HE Yuefeng³

- (1. College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
2. Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products of Yunnan Province, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
3. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of scutellarin and its derivatives on breast cancer cells and the synergistic anti-tumor effects of scutellarin and its derivatives combined with arsenic trioxide. **Methods** Human breast cancer MDA-MB-23 cells were cultured in vitro and divided into control and test groups. Every group was set 6 wells. Test groups were treated with scutellarin and its derivatives alone and combined with 5 μ M arsenic trioxide. One of the derivatives of scutellarin is scutellarein, which is the glycone of scutellarin. Scutellarein is also the main metabolism product of scutellarin in vivo. The other derivatives of scutellarin is tetraacetyl scutellarein, which we synthesized to improve the low bioavailability of scutellarin. Inhibition of MDA-MB-23 cells proliferation was tested by MTS assays. **Results** Scutellarin alone inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner, when scutellarein and tetraacetylscutellarein showed slight inhibition effect. It indicated that the glucuronic acid moiety of scutellarin played an important part in cell proliferation inhibition. Both scutellarin and scutellarein combined with arsenic trioxide exerted synergistic effects on proliferation inhibition in MDA-MB-231 cells in dose-dependent manners. Particularly, scutellarein did not inhibit cell proliferation alone but significantly enhance the proliferation inhibition of arsenic trioxide on MDA-MB-231 cells. **Conclusion** The combination of scutellarein and arsenic trioxide inhibits breast cancer development more effectively than each drug alone.

KEY WORDS: scutellarin; scutellarein; tetraacetyl scutellarein; arsenic trioxide; breast cancer

(原文见第 10 页)

Effect of Kanglixin Capsules on Cell Cycle and Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line

LIU Xuefang¹, DONG Haoran¹, ZHANG Na², FENG Suxiang¹

- (1. The Key Laboratory of Internal Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
2. Department of Human Anatomy and Embryology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of the antitumor medicine-Kanglixin capsule on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of the SGC-7901 cell. **Methods** After inoculated for 12, 24, 36, and 48 hours respectively, the action of Kanglixin capsule on growth inhibiting rate was detected by MTT, the DNA content of cell cycle in each phase was detected with flow cytometry and the morphologic change of cell apoptosis was observed through fluorescence microscope. **Results** The result of MTT method reveals that the inhibition rate of Kang Lixin capsule has a close time-dose-effect relationship; the flow cytometry result indicates that Kanglixin capsule can block cell cycle in G1 phase, meanwhile it decreases the percentage of cells in S phase and G2 phase; the fluorescence microscope observes that Kanglixin capsule could induce early apoptosis and late apoptosis of SGC-7901 cells. **Conclusion** The inhibition of Kanglixin capsule on SGC-7901 cell can be realized by means of blocking cell cycle and inducing the cell apoptosis.

KEY WORDS: Kanglixin capsule; gastric cancer cell line; inhibition in vitro; cell cycle; cell apoptosis.