

菱灵颗粒有效成分的抗肿瘤作用研究

牛凤兰¹, 李晨旭¹, 王学东², 程 舸¹, 梁 睿¹, 董 卿¹, 王天行³

(1. 吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021;

2. 长春市朝阳区疾病预防控制中心, 吉林 长春 130021

3. 长春市朝阳区卫生局, 吉林 长春 130021)

摘 要:目的: 研究菱灵颗粒有效成分—化合物 I 在体外对 HeLa 细胞的作用及其作用机制。方法: 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)还原法检测化合物 I 对肿瘤生长抑制作用, 应用光学显微镜、透射电子显微镜观察细胞形态, 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡情况。结果: 化合物 I 对人宫颈癌细胞生长具有明显的抑制作用及诱导细胞凋亡作用, 且这种作用有剂量依赖关系, 化合物 I 25、12.5、6.25mg/L 剂量组 30h 抑瘤率为 52.04%、34.44%、23.72%, 100、50、25、12.5、6.25、3.125mg/L 剂量组 30h 抑瘤率显著正相关, 相关系数 $r=0.9860$ ($p < 0.01$), IC_{50} 值为 10.9mg/L。透射电子显微镜对化合物 I 25、12.5、6.25mg/L 剂量组受试细胞观察, 均出现不同程度细胞凋亡现象, 细胞核明显皱缩、染色质趋边凝聚、线粒体空化等特征。流式细胞仪检测发现凋亡峰。结论: 化合物 I 对 HeLa 细胞增殖抑制作用明显并且有诱导细胞凋亡作用。

关键词: 菱灵颗粒; HeLa 细胞; 细胞凋亡

Anti-cancer Effects of Ling Ling Pellet

NIU Feng-lan¹, LI Chen-xu¹, WANG Xue-dong², CHENG Ge¹, LIANG Rui¹,

DONG Qing¹, WANG Tian-xing³

(1. School of Public Health of Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Changchun Center of Disease Prevention and Control, Changchun 130021, China;

3. Bureau of Health of Chaoyang District of Changchun, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of Compound I abstracted from Ling Ling pellet on human HeLa cell so as to explore its mechanism. Methods: Growth inhibition was assayed with MTT. The morphological changes of HeLa cells induced by compound I were observed with transmission electron microscope and phase contrast microscope. Cell division cycle distribution and apoptosis affected by compound I was determined with flow cytometry. Results: The growth of human HeLa cells is significantly inhibited which display strong in a dose and time-dependant manners against and induced apoptosis of HeLa cells. HeLa cell with estimated IC_{50} values of 10.9mg/L, concentration of 25, 12.5, 6.25mg/L inhibiting rate is 52.04%, 34.44%, 23.72% after 30h of treatment with compound I. Concentration of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125mg/L inhibiting rate is good correlation ($r=0.9860$, $p < 0.01$). Expose of HeLa cells to 25, 12.5, 6.25mg/L of compound I induced nuclear shrinkage, chromatin condensation and margination against nuclear envelope as seen in apoptotic cells. The flow cytometry profile revealed that treatment with different concentrations compound I induced apoptosis. Conclusion: Growth of human HeLa cells was significantly inhibitory and apoptosis may play an important role in the anti-tumor effect of active compound I.

Key words: ling ling pellet; HeLa cell; cell apoptosis

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)09-0253-04

菱角 (*Trapa bispinosa* Roxb) 为菱科菱属植物菱的果实, 具有消暑解热、除湿去风、益气健脾、解酒毒

等功效, 含多种微量元素及氨基酸, 有较高的食用价值和医用价值^[1~3]。近年来研究表明, 菱角有明显的抗

收稿日期: 2005-08-18

基金项目: 吉林省发改委基金项目(吉发改高技联字[2004]987号)

作者简介: 牛凤兰(1951-), 女, 教授, 主要从事药食同用植物与健康的研究。

肿瘤作用,可用于肿瘤的辅助治疗,但其作用的有效成分一直未明确。本课题组对菱角中的有效成分进行了分离,并以菱角中的有效成分为主,研制了治疗肝腹水及对肝癌有辅助疗效的药物—菱灵颗粒。本文研究了菱灵颗粒有效成分—化合物^[4]对HeLa细胞的抑制作用,探讨其抗肿瘤作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 菱灵颗粒有效成分—化合物的制备和纯化

称取4.0kg菱皮于提取器内,以三倍体积的蒸馏水浸泡8d,加热煮沸4h,过滤再以三倍体积的水重复提取两次,合并水提液过滤,蒸发水分至干,得黑色浸膏。将浸膏分别以石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取。取玻璃层析柱(30cm×3cm),按柱填料高度与柱内径比为10:1,湿法装柱,采用乙酸乙酯萃取部位上样,以石油醚:乙酸乙酯:甲酸(5:4:0.1)为流动相,每50ml为一个流分,共收集20组流分,经TLC检测,合并5~20号流分,将5~20号流分再次通过硅胶柱分离,以石油醚:乙酸乙酯(5:4)分离,分步收集,TLC检验,将其中15~20号流分合并,浓缩至干,用乙醇/水重结晶,得白色粉末。测定化合物熔点为235~238。实验前定量称取、紫外线照射灭菌。10%小牛血清RPMI-1640培养液溶解,-20℃冰箱保存备用。

1.1.2 试剂

RPMI-1640培养基 美国Sigma公司;胰酶 美国Sigma公司;新生小牛血清 美国Sigma公司;四甲基偶氮唑蓝 美国Sigma公司;96孔培养板 Denmark、氟尿嘧啶/Fluorouracil 天津。

1.1.3 仪器及设备

酶联免疫检测仪(Dragon Labsystems Multiscan MK) Finland;CO₂孵箱(SHEL-LAB 1815TC) USA;倒置显微镜(Olympus) Japan;光学显微镜(Olympus) Japan;超净台苏州;离心机(Sokual RC5B) USA;流式细胞仪(Becton Dickinson) USA;电子显微镜(JEM-1200EX) Japan。

1.1.4 细胞培养

人宫颈癌HeLa细胞株由吉林省肿瘤研究所提供,RPMI-1640基础培养液中加入10%的新生小牛血清,置37℃、5%的CO₂孵箱中培养,饱和湿度,3~4d传代一次。

1.2 方法

1.2.1 MTT法^[5,6]检测化合物对HeLa细胞生长的影响

将对数生长期人宫颈癌HeLa细胞,以4×10⁴/ml细胞悬液,加入96孔培养板中,每孔100μl,置37℃、

5% CO₂饱和湿度孵箱中培养过夜。然后加入不同浓度的化合物、25mg/L的氟尿嘧啶、等体积的培养液分别作为受试组、阳性对照组、空白对照组,每个浓度设3个孔,培养30h,用MTT法测定细胞存活率,按下式计算不同浓度化合物对HeLa细胞生长抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = \frac{\text{对照组平均A值} - \text{实验组平均A值}}{\text{对照组平均A值}} \times 100\%$$

1.2.2 细胞形态观察

按4×10⁴/ml/孔将呈对数生长期的HeLa细胞接种到96孔板上,培养24h后,加入100、50、25、12.5、6.25、3.125mg/L化合物继续培养,4、8、16、32h后,在倒置显微镜下观察受药细胞形态变化并摄影。

将呈对数生长期HeLa细胞按2×10⁵/瓶接种到100ml培养瓶后,加入25、12.5、6.25mg/L含药培养液继续培养30h,然后离心收集细胞,立即用4%预冷的戊二醛固定细胞2h以上,再用1%锇酸双重固定。经乙醇梯度脱水,Epon812环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后,用JEM-1200EX透射电镜观察并摄影。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞周期变化

HeLa细胞经Compound (25、12.5、6.25mg/L)处理30h后收集细胞,用0.1%磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,将细胞重悬于0.3ml PBS,迅速注入预冷的75%乙醇(4℃)固定,测定时用PBS洗涤去掉乙醇,将细胞重悬于0.3ml PBS中,调整细胞密度,加入0.6ml碘化丙啶溶液(含10mg/L RNASE、0.1% Triton-100、50ml/L碘化丙啶),4℃避光染色15min以上,经尼龙网过滤后,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,分析细胞周期。

1.2.4 统计分析

实验数据用F检验进行统计分析,剂量效应关系采用直线回归和相关分析方法进行处理,对数机率单位法求IC₅₀。

2 结果与分析

2.1 对HeLa细胞生长的抑制作用

化合物100、50、25、12.5、6.25、3.125mg/L作用30h,HeLa细胞生长明显受抑制,抑制作用呈浓度依赖关系,其剂量效应直线回归为Y=21.3112X-2.3884(r=0.98596447),IC₅₀为10.9mg/L(图1)。

2.2 化合物I对HeLa细胞形态变化及诱导细胞凋亡影响

2.2.1 光学显微镜观察

倒置显微镜400倍下(物镜40×目镜10)可见随着药物浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100mg/L)增加,

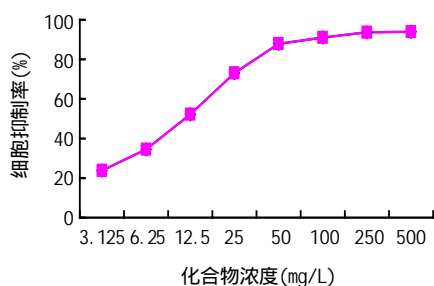


图1 化合物 I 对Hela 细胞生长抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of Compound I on HeLa cell growth

细胞数明显减少,且有明显的剂量依赖性。细胞形状出现不规则、膜皱缩、漂浮等征象。其中,25 mg/L 化合物 I 处理 HeLa 细胞 4h,细胞逐渐变圆、分裂相明显减少并出现不规则分裂(图 2B);处理 8h,细胞肿胀明显、不规则分裂(图 2C);16h 后,细胞膜皱缩、细胞漂浮、细胞核碎裂(图 2D),32h 后,细胞漂浮、大小不一、部分细胞死亡(图 2E),阴性对照组无明显增殖抑制和其它形态学改变(图 2A)。

2.2.2 透射电子显微镜观察

HeLa 细胞经化合物 I 处理 30h,三个剂量组均出现不同程度核染色质趋边凝聚、核固缩、核碎裂现象,高剂量组以细胞空化为主要表现(图 3B),中低剂量组均以凋亡为主要表现(图 3C、3D),并且在低剂量组可见到典型的凋亡小体出现(图 3D),阴性对照组无明显改变(图 3A)。

2.2.3 化合物 I 使细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡

经 6.25、12.5、25mg/L 化合物 I 作用 30h 的 HeLa 细胞均出现亚二倍体峰,随药物剂量增加,峰面积增加,而细胞周期变化不明显,三个剂量组间 G_0/G_1 、S 期细胞变化不大, G_2/M 期在三个剂量间变化不规律,提示化合物 I 有诱导细胞凋亡的作用但对细胞周期的阻滞不明显(图 4)。

3 讨论

本文所得结果提示菱灵颗粒有效成分——化合物 I 对 HeLa 细胞生长有明显抑制作用和诱导细胞凋亡作用。

目前认为,肿瘤的发生与细胞的增殖与凋亡平衡失调有关^[7]。细胞凋亡在维持机体状态方面有着重要的生物学意义^[8]。人们在肿瘤治疗的长期实践中逐渐认识到可以通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到治疗肿瘤的目的。近年来,大量研究表明,大部分药物导致细胞死亡的机理是细胞凋亡而不是坏死^[9],大多数抗肿瘤药物抗肿瘤作用强弱与它们诱导肿瘤细胞凋亡的活性呈正比。诱导肿瘤细胞凋亡与引发肿瘤细胞坏死相比,诱导肿瘤细胞凋亡的药物要求剂量较小,作用时间较短,产生不良反应较轻,因此,抗肿瘤药物诱导细胞凋亡可作为药物疗效判定一项新指标。

细胞凋亡本身是一个复杂的事件,细胞凋亡也是多途径的,效应也是多途径共同作用的结果,本文所得结果提示化合物 I 对 HeLa 细胞生长有明显抑制作用和诱

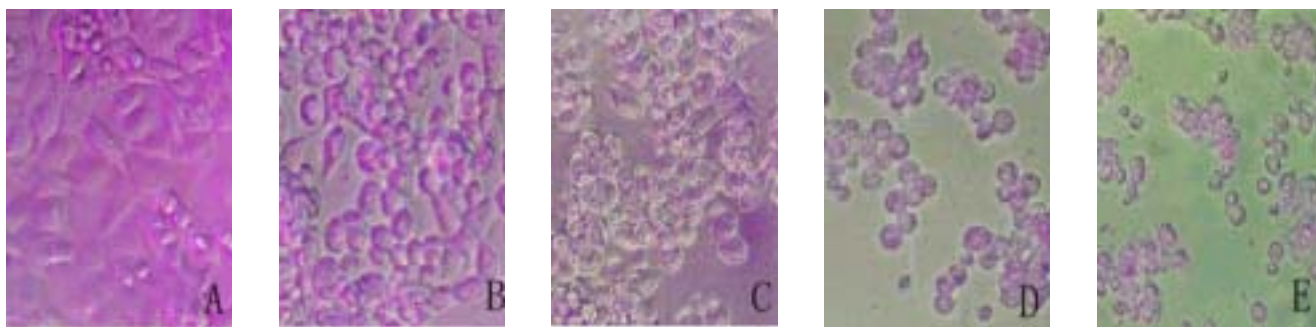


图2 化合物 I 对Hela 细胞形态的影响

Fig.2 Compound I induced morphological changes of HeLa cells under light microscope

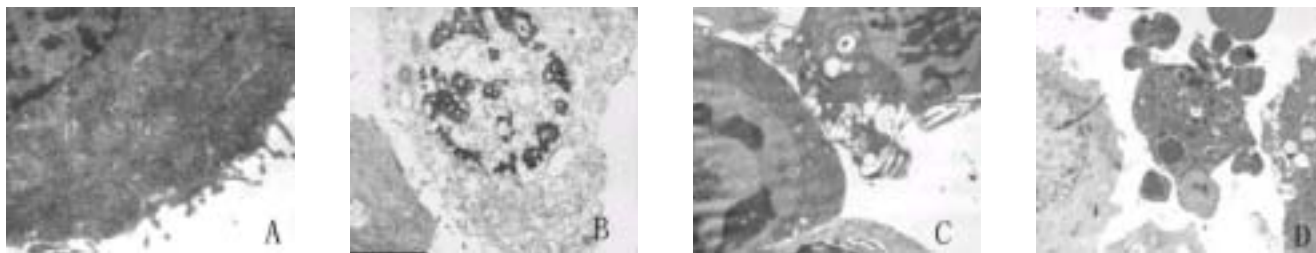


图3 化合物 I 诱导Hela 细胞超微结构的变化

Fig.3 Compound I induced morphological changes of HeLa cells under electron microscope

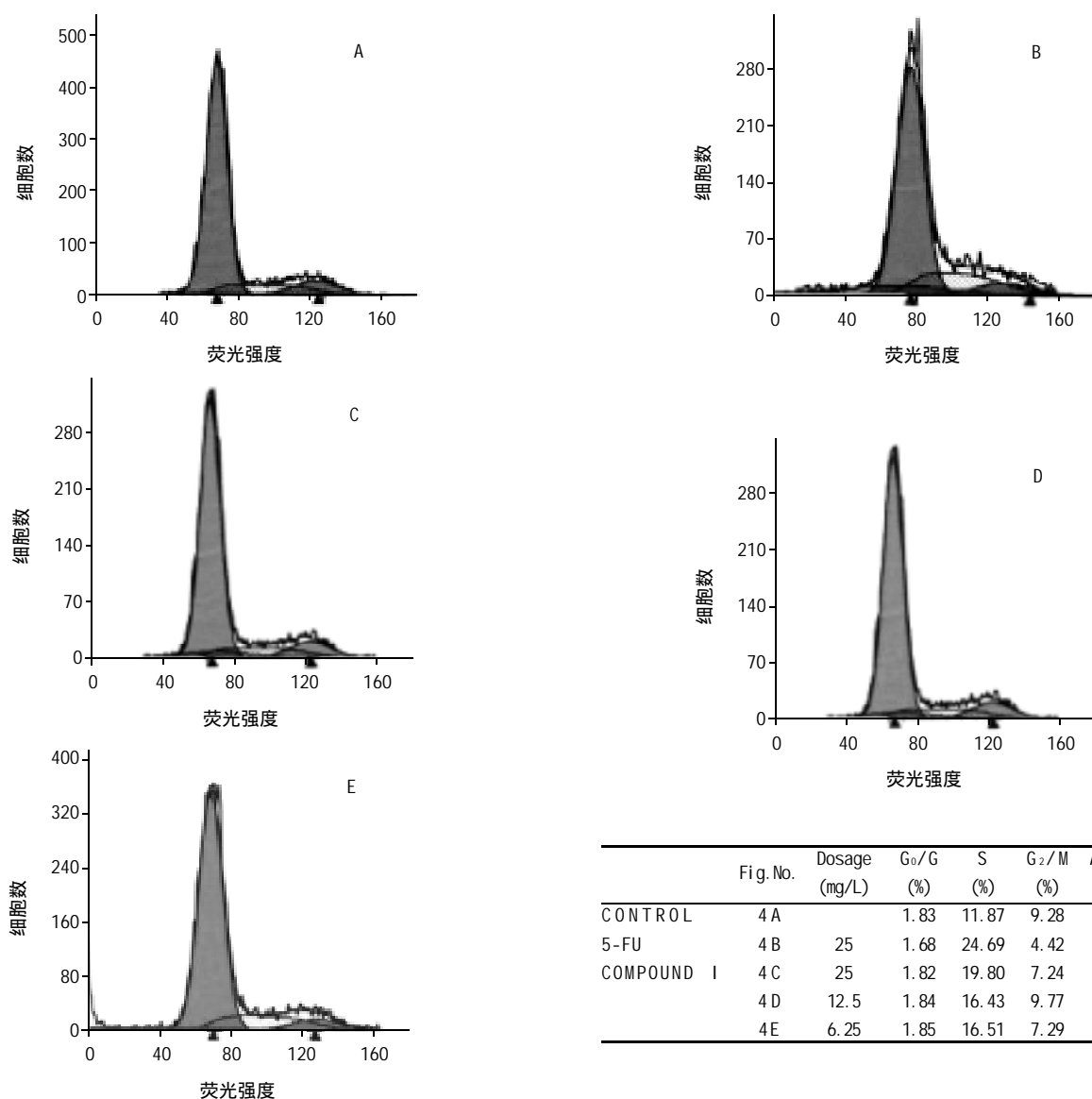


图4 流式细胞仪分析化合物处理后的Hela细胞凋亡情况

Fig.4 Flow cytometric analysis of the cell cycle distribution of the Hela cells with or without compound

导细胞凋亡作用，而对细胞周期阻滞不明显，推测其可能通过 caspase-8 和 caspase-3 或其它途径诱导细胞凋亡。目前，关于细胞周期阻滞和细胞凋亡的研究已经进入分子水平，我们在上述实验结果的基础上正在深入研究菱灵颗粒有效成分对肿瘤细胞周期相关蛋白激酶活性和细胞凋亡相关基因表达。

参考文献：

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 1992-1993.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 1901-1902.
- [3] 侯士良. 中药八百种详解[M]. 郑州: 河南科技出版社, 1999. 149-150.
- [4] 牛凤兰, 尹建元, 董威严, 等. 菱角中抗肿瘤活性成分的分离及结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(5): 852-855.
- [5] Alley MC, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using microculture tetrazolium assays[J]. Cancer Res, 1988, 48: 589.
- [6] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版西安公司, 1996, (4): 186-187.
- [7] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death[J]. Science, 1998, 281(5382): 1317-1322.
- [8] 钟晓松, 童善庆, 张希衡, 等. 细胞凋亡荧光染色法检测肿瘤化疗药物敏感性并与MTT法的比较[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(2): 125-129.
- [9] Criswell JE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death[J]. Fasebj, 1992, (6): 2450-2456.