

水茄提取物体外抗肿瘤活性成分的筛选及其作用机制研究^①

刘森¹, 彭丽雲¹, 朱名毅^{2②}, 高洁², 褚德雅¹, 刘津³, 卢露碧²

(1. 右江民族医学院 2012 级临床医学本科, 广西 百色 533000

E-mail: 278793730@qq.com;

2. 右江民族医学院病理生理学教研室, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 观察水茄提取物体外对 4 种肿瘤细胞株的抑制作用, 并初步研究其作用机制。 **方法** 采用噻唑蓝染色法(MTT法)检测水茄提取物对人鼻咽癌细胞株(CNE-1 细胞)、人肺腺癌细胞株(A-549 细胞)、人舌癌细胞株(Tca8113 细胞)和人肝癌细胞株(HepG-2 细胞)的抑制作用, 并计算半数生长抑制浓度(IC₅₀); 流式细胞仪检测最佳抗肿瘤活性成分对敏感细胞株凋亡及周期的影响; 进一步检测最佳抗肿瘤活性成分对敏感细胞株凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白表达量和 Caspase-3 活性的影响。 **结果** 7 种水茄提取物中, 10% 乙醇洗脱部位(Fr-2)对 4 种肿瘤细胞均有较强的抑制作用, 对 Tca8113 细胞的抑制作用最强, 其 IC₅₀ 为 (34.26 ± 6.84) mg/L; Fr-2 可使 G₁ 期 Tca8113 细胞的比例显著增加, 而使 S 期细胞的比例明显减少; Fr-2 可诱导 Tca8113 细胞凋亡, 且作用时间越长, 凋亡率越高; 经 Fr-2 作用后, Bcl-2 蛋白在 Tca8113 细胞的表达明显下降, 而 Caspase-3 酶的活性明显增加。 **结论** 水茄提取物 Fr-2 体外有较强的抗肿瘤活性, Fr-2 可能通过抑制 Bcl-2 的表达和增加 Caspase-3 的活性, 从而抑制 Tca8113 细胞的增殖和诱导其凋亡。

关键词: 水茄提取物; 抗肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R73-36

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)02-0157-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.009

水茄(*Solanum torvum swarta*), 又名山颠茄、金衫扣、野茄子、刺茄等, 属于茄科茄属植物, 分布于我国广西、广东、云南、贵州、海南等省市。《本草拾遗》记载水茄主破老血、产后血结、淋漓不尽等。水茄提取物中主要含有皂甙元、澳洲茄碱、澳洲茄-3,5-二烯、谷甾醇等化学成分。有文献报道水茄中的甾体皂苷类化合物有一定的抗肿瘤活性^[1-2]。而我们早期实验发现水茄果实提取物中含有一定量的澳洲茄碱^[3]。因此本实验主要筛选水茄提取物的体外抗肿瘤活性成分, 及探讨其促进肿瘤细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人鼻咽癌 CNE-1 细胞、人肺腺癌 A-549 细胞、人舌癌 Tca8113 细胞株和人肝癌 HepG-2 细胞, 购自于上海细胞库, 保存在右江民族医学院科学实验中心。

1.1.2 药物与试剂 水茄提取物由高洁老师提供^[3], 包括 Fr-2(10% 乙醇洗脱部位样品)、Fr-3(30% 乙醇洗脱部位样品)、Fr-4(50% 乙醇洗脱部位样品)、Fr-6(95% 乙醇洗脱部位样品)、Fr-8(乙酸乙酯萃取部位样品)、Fr-9(正丁醇萃取部位样品)和总提取物等 7 种提取物均能溶于二甲亚砜(DMSO), 用于后续细

胞实验。RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物公司); 细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 检测试剂盒(南京凯基生物科技发展技术有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国 Sigma 公司); 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 酶标仪; 电子天平; CO₂ 培养箱; 超净工作台; 倒置显微镜。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞均为贴壁细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液进行常规培养及传代, 每 2~3d 换液一次, 收集对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 实验药品溶液的制备 将 Fr-2、Fr-3、Fr-4、Fr-6、Fr-8、Fr-9 和总提取物等 7 种提取物溶于 DMSO 中, 配制成 10 mg/ml 的溶液, 再用 10% 胎牛血清稀释成 1 mg/ml 的储备液, 过滤除菌后, 分装置于 -20 °C 冰箱避光贮存。实验组所用的提取物, 实验时用 10% 胎牛血清稀释成终浓度分别为 1000.00 μg/ml、500.00 μg/ml、250.00 μg/ml、125.00 μg/ml、62.50 μg/ml、31.25 μg/ml、15.125 μg/ml 的样品液; DMSO 组即阴性对照组, 实验时用 10% 胎牛血清稀释成终浓度为 10%、5%、2.5%、1.25%、0.625%、

① 基金项目: 2014 年广西壮族自治区级大学生创新创业训练计划立项项目(201410599030); 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019193)

② 通讯作者, E-mail: 278793730@qq.com

0.3215%、0.15125%待用;阳性对照组即顺铂组,实验时用 10%胎牛血清稀释成终浓度为 32 μg/ml、16 μg/ml、8 μg/ml、4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml 的溶液待用。

1.2.3 MTT 法检测提取物抗肿瘤活性部位的筛选 收集对数生长期的细胞,密度调整为 5×10^4 /ml,以每孔 100 μl 接种于 96 孔板,常规培养 24 h 后,吸去上清液,加入 90 μl 培养基和 10 μl 制备好的提取物、DMSO 或顺铂溶液。每个样品浓度设 3 个复孔,每块 96 孔板设 3 个空白对照,继续培养 44 h 后,每孔加 10 μl 的 MTT 溶液(5 mg/ml),4 h 后吸去上清,每孔加 DMSO 100 μl,低速振荡 5 min,于酶标仪上测定各孔吸光度值(A),计算半数抑制浓度 $lgIC_{50} = X_m - I \times [P - (3 - P_m - P_n) / 4]$, [公式中, X_m : 1 g 最大剂量; I : 1 g(最大剂量/相临剂量); P : 阳性反应率之和; P_m : 最大抑制率; P_n : 最小抑制率]。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率 根据 MTT 实验结果,选择 IC_{50} 值最低的 Fr-2,检测其对 Tca8113 细胞周期和凋亡率的影响。Fr-2 组为终浓度 40 μg/ml 的 Fr-2 溶液,顺铂组为 4 μg/ml 的顺铂溶液,DMSO 组为 10%胎牛血清稀释的 DMSO 溶液,具体药品溶液的制备参照 1.2.2 步骤。检测药物作用 24 h、48 h 和 72 h 后 Tca8113 细胞的周期和凋亡率,具体实验步骤按照试剂说明书操作。重复实验 3 次,取其平均值。

1.2.5 Bcl-2 蛋白表达量和 Caspase-3 活性的检测

Tca8113 细胞培养及分组如前述步骤,药物作用 48 h 后,消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次备用。Bcl-2 蛋白的检测采用武汉博士德公司的人 Bcl-2 ELISA 试剂盒,按照说明书的步骤使用 ELISA 方法检测。Caspase-3 活性的检测采用碧云天公司的 Caspase-3 活性检测试剂盒,具体实验步骤按说明书进行。重复实验 3 次,取其平均值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水茄提取物体外抗肿瘤活性部位的筛选 实验结果显示:7 种水茄提取物中,Fr-2(10%乙醇洗脱部位样品)对 4 种肿瘤细胞均有较强的抑制作用,抑制活性表现为 Tca8113 > CNE-1 > HepG-2 > A-549,其 IC_{50} 分别是 (34.26 ± 6.84) mg/L、 (45.52 ± 8.26) mg/L、 (76.84 ± 15.81) mg/L 和 (189.37 ± 13.42) mg/L,见表 1。

2.2 Fr-2 对 Tca-8113 细胞周期分布的影响 实验结果显示:Fr-2 处理 Tca8113 细胞 24 h 后,与 DMSO 组相比,Fr-2 组 G_1 期、 G_2 期、S 期细胞的比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$);48 h 及 72 h 后,与 DMSO 组相比,Fr-2 组 G_1 期细胞的比例有所增加,S 期细胞的比例有所减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。

表 1 水茄提取物体外抗肿瘤活性部位的筛选 $(\bar{x} \pm s)$

组别	IC_{50} (mg/L)			
	CNE-1 细胞	A-549 细胞	Tca8113 细胞	HepG-2 细胞
Fr-2	45.52±8.26	189.37±13.42	34.26±6.84	76.84±15.81
Fr-3	402.47±17.85	641.39±35.48	169.03±12.54	735.34±65.87
Fr-4	459.51±28.41	215.58±28.41	174.14±19.83	419.12±45.26
Fr-6	445.91±16.52	422.23±28.25	236.44±29.78	554.19±55.02
Fr-8	440.09±26.57	403.12±30.01	247.47±37.46	637.82±42.39
Fr-9	427.47±27.19	614.82±44.21	318.34±33.55	405.21±50.27
总提取物	733.75±56.34	638.27±52.11	387.31±40.29	508.37±49.51
顺铂	1.66±0.32	9.67±1.13	3.82±0.69	2.59±0.48

表 2 Fr-2 对 Tca-8113 细胞周期分布的影响 $(\bar{x} \pm s, \%)$

组别	24 h			48 h			72 h		
	G_1 期	G_2 期	S 期	G_1 期	G_2 期	S 期	G_1 期	G_2 期	S 期
Fr-2 组	63.12±2.17	9.54±1.61	27.34±0.94	66.16±1.28 ^b	9.21±0.93	24.62±1.20 ^b	70.00±1.02 ^a	9.42±0.86	20.58±0.77 ^a
顺铂组	67.16±0.77 ^b	10.57±1.16	22.27±1.91 ^b	73.53±2.65 ^a	10.53±1.44	16.59±1.59 ^a	80.42±3.27 ^a	9.88±1.29	9.69±1.98 ^a
DMSO 组	61.62±2.08	9.34±0.92	29.04±2.99	62.01±2.00	9.46±0.39	28.53±2.38	61.06±2.16	9.88±0.58	29.06±2.42

注:与 DMSO 组比较,a: $P < 0.01$;b: $P < 0.05$

2.3 Fr-2 对 Tca-8113 细胞凋亡的影响 实验结果显示:Fr-2 可诱导 Tca8113 细胞凋亡,并随着药物作用的时间增加,其凋亡率也增加;与 DMSO 组相比

较,Fr-2 组 Tca8113 细胞的凋亡率显著增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 Fr-2 对不同时间 Tca8113 细胞
凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
Fr-2 组	9.44 ± 1.94 ^b	15.13 ± 1.90 ^a	21.04 ± 2.12 ^a
顺铂组	20.45 ± 2.16 ^a	29.30 ± 2.93 ^a	36.92 ± 3.56 ^a
DMSO 组	5.70 ± 0.47	5.85 ± 0.21	5.83 ± 0.31

注:与 DMSO 组比较,a: $P < 0.01$;b: $P < 0.05$

2.4 Fr-2 对 Tca8113 细胞 Bcl-2 蛋白表达量和 Caspase-3 活性的影响 实验结果显示:Fr-2 作用 Tca8113 细胞 48 h 后,Bcl-2 蛋白表达量下降,与 DMSO 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Fr-2 组中催化的 Caspase-3 酶活力单位量与 DMSO 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 4。

表 4 Fr-2 对 Tca8113 细胞 Bcl-2 表达
和 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 (ng/ml)	Caspase-3 (酶活力单位)
Fr-2	6.99 ± 0.56 ^b	15.56 ± 1.61 ^a
顺铂组	2.90 ± 0.31 ^a	32.09 ± 3.91 ^a
DMSO 组	10.85 ± 1.50	9.77 ± 1.12

注:与 DMSO 组比较,a: $P < 0.01$;b: $P < 0.05$

3 讨论

MTT 法和磺酰罗丹明 B(SRB) 比色法是体外筛选抗肿瘤药物的常用检测方法,MTT 法即四甲基偶氮唑盐法广泛用于人类各种肿瘤细胞药敏试验,其具有简单、快速和精确等特点,而且不涉及作用放射性元素。SRB 法也是标准抗肿瘤药物筛选的方法之一,其操作过程需要同位素掺入法,且实验环节要求严格,步骤较多,操作繁琐,易造成人为误差,主要适用于大规模药物筛选。综合上述因素本实验采用 MTT 法进行水茄提取物体外抗肿瘤活性筛选。对水茄提取物抗肿瘤活性的初步筛选结果表明:Fr-2 对 CNE-1、A-549、Tca8113 和 HepG-2 等四种细胞均有抑制增殖作用,其 48 h 的 IC_{50} 值分别是(45.52 ± 8.26) mg/L、(189.37 ± 13.42) mg/L、(34.26 ± 6.84) mg/L 和 (76.84 ± 15.81) mg/L。虽然 Fr-2 对四种细胞的 IC_{50} 值均高于当前联合化疗中最常用药物之一的顺铂,但是也能说明 10% 乙醇洗脱部位样品(Fr-2)有较强的诱导肿瘤细胞凋亡的能力,其抑制 Tca8113 细胞增殖的能力最强。在我们前期实验中发现提取物 Fr-2 中含有澳洲茄碱的量最多^[3],生物碱不仅有很强的促进肿瘤细胞凋亡的作用,还能抑制肿瘤转移^[4],所以我们推测可能是 Fr-2 的澳洲茄碱发挥了抗肿瘤活性的作用。黄文斯等^[5]的研究也发现澳洲茄碱可以诱导肺癌细胞株 H446 凋亡,其机制与上调促

凋亡相关蛋白 Bax 表达、下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达有关。

采用流式细胞法定性定量检测发现水茄 10% 乙醇洗脱部位样品(Fr-2)能够抑制 Tca8113 细胞增殖并诱导其凋亡。Fr-2 处理 Tca8113 细胞 24 h 后, G_1 期、 G_2 期和 S 期细胞比例与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);但是 48 h 及 72 h 后,与对照组相比,Fr-2 组 G_1 期细胞的比例增加,S 期细胞的比例减少,据差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些实验结果表明 Fr-2 可使 Tca8113 肿瘤细胞生长周期阻滞于 G_1 期,即 S 期的肿瘤细胞向 G_1 期平移,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。进一步检测 Tca8113 细胞的凋亡率,发现 Fr-2 可诱导 Tca8113 凋亡,药物作用时间越长,凋亡率越高。

肿瘤细胞凋亡过程受多种基因严格调控,参与调控的基因包括癌基因如 C-myc、抑癌基因 P53、caspase 家族、Bcl-2 家族等^[6]。Bcl-2 为凋亡抑制基因,是膜的整合蛋白,具有保护细胞的功能,其过度低表达可引起细胞核内氧化还原的失衡,从而提高 Caspase 酶的活性^[7]。本实验中采用 ELISA 方法来研究 Bcl-2 蛋白的表达变化,结果显示药物 Fr-2 能够抑制 Tca8113 细胞中的 Bcl-2 蛋白的表达量。Caspase(Cysteine-requiring Aspartate Protease)是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。Caspase-3 是细胞凋亡过程中的一个关键酶,Caspase-3 可以剪切 Procaspase-3、6、7 和 9,并可以直接特异性剪切许多 Caspase 底物,这些由 Caspase-3 介导的蛋白剪切是细胞凋亡分子机制的重要组成部分^[8]。本实验采用 ELISA 方法来研究 Caspase-3 蛋白酶活性的变化,结果显示药物 Fr-2 能够提高 Tca8113 细胞中的 Caspase-3 蛋白酶的活性。而一般在肿瘤细胞中,Caspase-3 蛋白酶的活性较低,若细胞产生凋亡,其 Caspase-3 蛋白酶的活性则出现增高。所以我们推测 Fr-2 可能通过抑制凋亡抑制分子 Bcl-2 蛋白的表达,进而激活 Caspase-3 蛋白酶的活性,最终达到诱导 Tca8113 细胞产生凋亡和降低细胞增殖的作用。

综上所述,本研究发现 10% 乙醇洗脱部位(Fr-2)是水茄提取物抗肿瘤作用的主要活性部位,Fr-2 能抑制人 CNE-1 细胞、A-549 细胞、Tca8113 细胞和 HepG-2 细胞增殖并诱导细胞凋亡,其抗肿瘤的作用机制与降低 Bcl-2 蛋白的表达、激活 Caspase-3 蛋白酶的活性有关。但是,从 10% 乙醇洗脱部位分离出具有抗肿瘤活性的单体化合物及其诱导肿瘤细胞凋亡的机制有待于进一步研究。

(下转第 167 页)

度,增强支气管黏膜纤毛运动,促进痰液的排出,从而改善患者通气功能和呼吸困难情况。其不良反应少见,常见一般是上消化道反应。AECOPD患者气道内一般分泌大量的黏液分泌物,可以促进感染,影响气道通畅,加重病情。另外,也有相关的研究^[6]报道了氨溴索联合吸入糖皮质激素、 β_2 受体激动药(沙美特罗替卡松合剂)治疗AECOPD的情况,也取得较好的治疗效果。故本研究基于上述原因设计了三种药物(在沙丁胺醇和布地奈德的基础上加用氨溴索)联合治疗AECOPD,结果证明治疗效果明显优于两种药物(沙丁胺醇和布地奈德)联合治疗,不良反应也没有相应增加,说明三种药物联合治疗安全可靠。

布地奈德为糖皮质激素类药物,对进行性肺功能下降的患者无明显的作用,所以一般情况下不主张全身长期使用,仅在一些重度AECOPD的情况下使用,故本次研究是基于此理论来设计。该药使用后少数患者可能出现声音嘶哑和口腔咽喉部念珠菌感染等不良反应。国内也有有关这方面的研究,如负春梅等^[7]用布地奈德/福莫特罗联合丹参注射液治疗老年AECOPD患者,结果发现可以改变患者的血气指标、血液流变学、内皮细胞功能。

综上所述,结合本次研究结果来分析,观察组采用三种药物联合治疗AECOPD患者,发现观察组患者的 PaO_2 、 PaCO_2 、 FEV_1 及FVC的指标改善明显优于用沙丁胺醇和布地奈德二联药物治疗的对照组患者,疗

效方面观察组也优于对照组,不良反应方面两组出现的概率也没有明显区别,说明三种药物联合治疗AECOPD患者是可取的,值得在临床上借鉴。

参考文献:

- [1] 陈立,赵志刚.临床药物治疗学[M].北京:清华大学出版社,2012:267-275.
- [2] 王芳,张永建,陆娟英.布地奈德、沙丁胺醇联合异丙托溴铵雾化吸入在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中应用的临床观察[J].中国药房,2014,25(44):4150-4152.
- [3] 田图磊.沙丁胺醇联合布地奈德在慢性阻塞性肺疾病急性期呼吸道雾化吸入中的疗效观察[J].湖北民族学院学报:医学版,2015,32(1):36-38.
- [4] 刘江涛.硫酸沙丁胺醇联合噻托溴铵治疗53例AECOPD的疗效研究[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(63):71-72.
- [5] Boskabady M, Boskabady MH, Mansouri F, et al. Pharmacologic bronchodilation response to salbutamol in COPD patients[J]. Indian Journal of Medical Sciences, 2010,64(8):363-372.
- [6] 刘娟.沙美特罗替卡松联合氨溴索治疗COPD急性加重期的临床疗效观察[J].北方药学,2014,11(2):51-52.
- [7] 负春梅,刘华,敬金焕.丹参注射液联合布地奈德/福莫特罗对老年AECOPD患者血气指标、血液流变学、内皮细胞功能的影响[J].中华全科医学,2015,13(7):1057-1059.

收稿日期:2016-01-17;修回日期:2016-04-15

(上接第159页)

参考文献:

- [1] 李金晟.水茄的化学成分及抗肿瘤活性研究[D].上海:上海中医药大学,2013.
- [2] 舒伟虎,张英,叶文才,等.水茄中的苷类化学成分[J].暨南大学学报:自然科学与医学版,2011,32(5):493-497.
- [3] 高洁,朱名毅,黄祖良,等.RP-HPLC测定水茄果实不同提取物中澳洲茄碱含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(17):46-48.
- [4] 彭丽云,刘森,朱名毅,等.生物碱抗肿瘤转移机制的研究进展[J].现代医药卫生,2015,31(5):690-693.
- [5] 黄文斯,王颖,朱海涛,等.澳洲茄碱诱导肺癌细胞株H446凋亡及其机制探讨[J].中国肺癌杂志,2015,18

(7):416-421.

- [6] Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy[J]. Cancer Immunol Immunother,2011,60(8):1173-1180.
- [7] Volkman N, Marassi FM, Newmeyer DD, et al. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis[J]. Cell Death Differ,2014,21(2):206-215.
- [8] Zhong F, Yang J, Tong ZT, et al. Guggulsterone inhibits human cholangiocarcinoma Sk-ChA-1 and Mz-ChA-1 cell growth by inducing caspase-dependent apoptosis and downregulation of survivin and Bcl-2 expression[J]. Oncol Lett,2015,10(3):1416-1422.

收稿日期:2015-12-08;修回日期:2015-12-31