

雪菊对肝癌和肺癌细胞体外抗肿瘤作用研究

帕尔哈提·买买提依明¹, 令狐晨², 朱青梅², 阿依吐伦·斯马义^{2*}

(1. 阿克苏地区库车县人民医院, 新疆阿克苏 842000; 2. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要 [目的]研究雪菊不同提取物对体外培养肿瘤细胞的抑制作用。[方法]体外培养人肝癌细胞(7404)及人非小细胞肺癌细胞(A549),用不同浓度的雪菊总黄酮纯化物、粗提物及总多糖分别对细胞作用后,MTT法检测细胞生长抑制率,流式细胞仪测细胞的凋亡率。[结果]通过MTT的方法得出雪菊不同提取物对7404和A549均有抑制作用,并呈现出浓度和时间的依赖性。流式细胞仪检测总黄酮纯化物能增强7404和A549细胞的凋亡率。[结论]雪菊不同提取物对2种癌细胞的增殖有明显抑制作用,其作用机制可能与增强细胞凋亡有关。

关键词 雪菊;人肝癌细胞;人非小细胞肺癌细胞;生长抑制;细胞凋亡;抗肿瘤

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-046-03

Study on the Antitumor Activity in vitro of Different Extracts from Coreopsis Tinctoria Flowers of Kunlun Mountain

PARHAT · Mmti¹, LING Hu-chen², ZHU Qing-mei², AYTULUN · Simayil^{2*} (1. People's Hospital of Kuqa Aksu Region, Aksu, Xinjiang 842000; 2. Pharmacy College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011)

Abstract [Objective] To investigate the anti-proliferation effect of different extracts from Coreopsis Tinctoria flowers of Kunlun Mountain on the cancer cells. [Method] The liver cancer 7404 cells and the lung cancer A549 cells were cultured in vitro. The total flavonoids and the total polysaccharides of Coreopsis Tinctoria flowers interfere the cells in logarithmic phase of growth. The viability of cells was measured by MTT. The cell apoptosis was detected with flow cytometry. [Result] Different concentrations of the total flavonoids and the total polysaccharides were cytotoxic to cells in a time and dose dependent manner. The purified extracts of the total flavonoids could enhance apoptosis rate of the cells. [Conclusion] The anti-proliferative effect of different extracts from Coreopsis Tinctoria flowers of Kunlun Mountain on the cells was better. The mechanism may be related to the inhibition apoptosis rate of the cells.

Key words Coreopsis Tinctoria flowers of Kunlun Mountain; 7404; A549; Anti-proliferation; Apoptosis rate of the cells; Anti tumor

雪菊又名“血菊”,为菊科金鸡菊属(Coreopsis)植物,是目前新疆与雪莲齐名的野生植物^[1]。雪菊具有降血压、降血脂、抗衰老、抗癌、抗炎等生物活性^[2]。国内关于雪菊的体外抗肿瘤并未报道,国外的报道仅限于雪菊的单体对小鼠皮肤肿瘤抑制作用^[3]。癌症俨然成为危害了人类健康的头号杀手。由于主流的治疗癌症的方法存在诸多缺陷,世界科学家开始把抗肿瘤药物研究的目光转移到天然产物上,一些具有抗肿瘤作用的天然活性成分陆续从中草药中被分离发现^[4]。笔者在此体外培养人肝癌细胞(7404)及人非小细胞肺癌细胞(A549),用不同浓度的雪菊总黄酮纯化物、粗提物及总多糖分别对细胞作用后,MTT法检测细胞生长抑制率,流式细胞仪测细胞的凋亡率,探讨雪菊总黄酮和总多糖对人肝癌细胞和人非小细胞肺癌细胞的增殖的抑制作用,为雪菊的药理活性深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器。CO₂培养箱(美国 Thermo 公司);Benchmark PLUS 型全波长酶标仪(美国 BIORAD 公司);流式细胞仪(美国 BECKMAN 公司);倒置荧光三目显微镜(美国 Cool-SNAP);ZHJH-1214C 型超净工作台(中国上海智城有限公司);TP114 型电子天平(美国丹佛公司);Br4i 型低温离心机(美国 Jouan 公司)。

基金项目 乌鲁木齐市科学技术计划项目(Y121310009)。

作者简介 帕尔哈提·买买提依明(1962-),男,维吾尔族,新疆阿克苏人,主管药师,从事中药民族药研究。*通讯作者,教授,硕士生导师,从事药物分析和天然药物化学研究。

收稿日期 2015-06-29

1.1.2 试剂。胚胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 141012);二甲基亚砷(美国 MP Biomedicals 公司,批号 M5178);培养基(美国 HyClone 公司,批号 AZG190856);噻唑蓝 MTT(美国 sigma 公司,批号 M5655);凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号 3337788);胰酶(美国 Gibco 公司,批号 25200)。

1.1.3 肿瘤细胞。人肝癌细胞(7404)和人非小细胞肺癌细胞(A549)由新疆第一附属医院基础医学研究所阿尔孜古丽·吐尔逊老师惠赠。

1.1.4 药材。昆仑雪菊为菊科金鸡菊属(Coreopsis)植物,于2013年6~9月在新疆和田地区昆仑山采集,经新疆医科大学药学院天然药物化学/生药学教研室帕丽达·阿布力孜教授鉴定为菊科金鸡菊品种。

1.1.4.1 昆仑雪菊总黄酮提取物。雪菊于60℃干燥1h,研磨,过三号筛,备用。称取雪菊适量,按1:20投料比加50%乙醇40ml,浸泡1h,利用超声微波协同萃取仪萃取30min,过滤,滤液减压浓缩得其浸膏,测定总黄酮含量为22.56%。

1.1.4.2 总黄酮纯化物。由雪菊总黄酮粗提物经聚酰胺纯化工艺获得,总黄酮含量为68.04%。

1.1.4.3 昆仑雪菊总多糖。雪菊于60℃干燥1h研磨,过三号筛,备用。称取雪菊适量,1:20投料比,加40ml蒸馏水,浸泡1h,利用超声微波协同萃取仪,超声30min,过滤,滤液减压浓缩得其浸膏,测定总多糖含量为24.74%。

1.2 方法

1.2.1 供试液的制备。精密称定雪菊总黄酮粗提取物、纯化物及总多糖浸膏各0.1g,用二甲基亚砷(DMSO)溶解于10ml容量瓶中,配制成质量浓度为5g/L的3种供试液,4

℃冰箱保存,临用前用培养液稀释分别配制成不同浓度的3种供试液,并保证各供试液中DMSO的体积分数<0.1%。

1.2.2 MTT法测细胞增殖抑制率。取对数生长期的细胞用胰酶消化,以含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液稀释细胞,调整7404和A549细胞悬浮液密度为 3×10^4 个/ml,将配制好的细胞悬液加入96孔培养板中,每孔200 μl,置37℃,5%CO₂培养箱中培养24 h后,观察其贴壁情况,贴壁状况良好后,将每孔的培养液轻轻取出,将雪菊总黄酮纯化物、粗提物及总多糖3个试验组分别加入最终浓度为50、100、200、400、600 μg/ml提取物的培养液200 μl,空白对照组则加入等体积溶剂的培养液,阳性对照组则为浓度为20 μg/ml的顺铂,每组4个孔,置37℃,5%CO₂培养箱中培养,分别培养48、72、96 h,培养结束前4 h,每孔加MTT 20 μl继续培养4 h后,弃去上清液,然后每孔加DMSO 150 μl,振荡混匀后,用Benchmark PLUS型全波长酶标仪检测各孔在波长490 nm处的吸光度值,并按公式计算细胞生长抑制率,生长抑制率=(1-试验组平均OD值/对照组平均OD值)×100%^[5]。

1.2.3 检测细胞凋亡。取7404和A549的对数生长期细胞,以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于6孔培养板,培养24 h后,观察其贴壁状况,状态良好时,分别加入100、200、400 μg/ml不同浓度的雪菊总黄酮纯化物,并设立细胞对照组(不加药物),再置于37℃,5%CO₂的培养箱中分别培养72 h后终止培养,把各孔的细胞培养液分别吸到15 ml离心管中,PBS洗涤贴壁细胞,用胰酶将细胞消化下来,加完全培养液终止后,收集并放入离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入1 ml PBS轻轻重悬细胞并计数,取含有 2×10^5 个细胞悬浮液,1 000 r/min离心5 min,弃去上清,加入100 μl缓冲液,分别加入5 μl Annexin V-FITC和PI,轻轻混匀。室温避光孵育15 min,再加入400 μl的缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计分析 试验数据均采用SPSS 17.0统计软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MTT法检测雪菊不同提取物对细胞增殖的抑制作用 用浓度分别为50、100、200、400、600 μg/ml的雪菊不同提取物的溶液作用于人肝癌细胞7404,72 h后,观察不同浓度的样品对7404细胞增殖的影响,结果(表1)发现,雪菊总黄酮粗提取物、纯化物及雪菊总多糖对7404细胞增殖均有抑制作用,其IC₅₀分别为261.58、52.27、531.21 μg/ml,且抑制率均随样品浓度的增大而增大,呈现出剂量效应关系,各浓度组与对照组比较,有显著性差异($P < 0.01$)。通过各提取物的IC₅₀比较,得出雪菊总黄酮纯化物比雪菊黄酮粗提取物及其总多糖对细胞的抑制作用强。

表1 雪菊物不同浓度提取物对7404细胞生长的抑制作用

组别	浓度	OD 值	抑制率	IC ₅₀
	μg/ml		%	μg/ml
对照	0	0.96 ± 0.01	—	—
阳性对照	20	0.10 ± 0	89.58	—
总黄酮粗提物	50	0.88 ± 0.01 AB	8.33	261.58
	100	0.78 ± 0 AB	18.75	
	200	0.28 ± 0.01 AB	70.83	
	400	0.24 ± 0.01 AB	75.00	
	600	0.23 ± 0 AB	76.04	
总黄酮纯化物	50	0.67 ± 0.01 AB	30.62	52.27
	100	0.34 ± 0 AB	64.58	
	200	0.25 ± 0.01 AB	73.95	
	400	0.22 ± 0 AB	77.08	
	600	0.19 ± 0.03 AB	80.20	
总多糖	50	0.74 ± 0.01 AB	22.91	531.21
	100	0.72 ± 0 AB	25.00	
	200	0.65 ± 0 AB	32.29	
	400	0.63 ± 0.01 AB	34.37	
	600	0.40 ± 0.01 AB	58.33	

注:A表示与空白对照组比较差异极显著($P < 0.01$);B表示与阳性对照组比较差异极显著($P < 0.01$)。

用浓度分别为50、100、200、400、600 μg/ml的雪菊不同提取物的溶液作用于人非小细胞肺癌细胞A549,观察不同浓度的样品对A549细胞增殖的影响,结果(表2)发现,雪菊总黄酮粗提取物、总黄酮纯化物及总多糖对A549细胞增殖均有抑制作用,其IC₅₀分别为230.45、93.62、454.29 μg/ml,且抑制率均随样品浓度的增大而增大,呈现出剂量效应关系,各浓度组与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。通过各提取物的IC₅₀比较,得出雪菊总黄酮纯化物比黄酮粗提取物及其总多糖对细胞的抑制作用强。

表2 雪菊物不同浓度提取物对A549细胞生长的抑制作用

组别	浓度	OD 值	抑制率	IC ₅₀
	μg/ml		%	μg/ml
对照	0	0.88 ± 0.01	—	—
阳性对照	20	0.14 ± 0.01	84.09	—
总黄酮粗提物	50	0.64 ± 0 AB	27.27	230.45
	100	0.56 ± 0 AB	36.36	
	200	0.36 ± 0.01 AB	59.09	
	400	0.28 ± 0 AB	68.18	
	600	0.24 ± 0.01 AB	72.72	
总黄酮纯化物	50	0.53 ± 0.01 AB	39.77	93.62
	100	0.41 ± 0.01 AB	53.40	
	200	0.33 ± 0.01 AB	62.50	
	400	0.27 ± 0.02 AB	69.31	
	600	0.22 ± 0.01 AB	75.00	
总多糖	50	0.68 ± 0 AB	22.72	454.29
	100	0.65 ± 0.01 AB	26.134	
	200	0.62 ± 0 AB	29.54	
	400	0.46 ± 0.03 AB	47.72	
	600	0.35 ± 0.01 AB	60.22	

注:A表示与空白对照组比较差异极显著($P < 0.01$);B表示与阳性对照组比较差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 MTT 法检测相同浓度下雪菊不同提取物对细胞作用时间与抑制率的关系 从雪菊不同提取物浓度为 200 $\mu\text{g/ml}$ 时不同提取物对人肝癌细胞(7404)和人非小细胞肺癌细胞(A549)随时间增长的关系图(图 1)可以看出,样品浓度固定时,随着样品作用时间的增加,雪菊总黄酮粗提物、纯化物及总多糖对各肿瘤细胞增殖的抑制作用增强,呈现时间依

赖性。

2.3 流式细胞仪检测雪菊总黄酮纯化物对细胞凋亡率的影响 流式细胞仪 Annexin V - PI 双标法进行凋亡率的测定,结果(表 3)发现,100、200、400 $\mu\text{g/ml}$ 的雪菊总黄酮纯化物作用 7404、A549 细胞 72 h 后,随样品浓度加大,活细胞比例逐渐减少,细胞凋亡发生率明显增高。

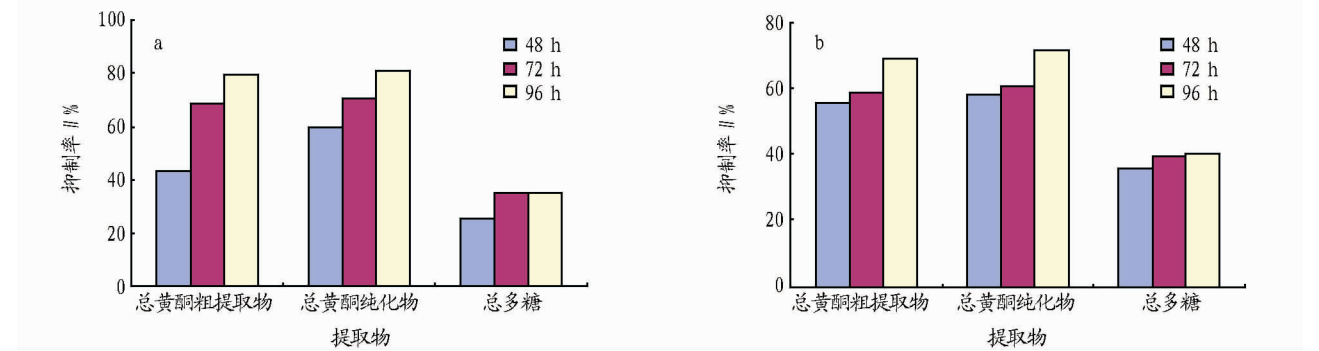


图 1 雪菊不同提取物对 7404(a)和 A549(b)细胞作用时间与抑制率的关系

表 3 雪菊总黄酮纯化物对细胞凋亡率的影响

组别	浓度// $\mu\text{g/ml}$	凋亡率//%
7404	0	1.7
	100	11.6
	200	29.3
	400	47.0
A549	0	3.1
	100	35.3
	200	42.6
	400	52.1

用 MTT 法对雪菊总黄酮粗提取物、总黄酮纯化物及总多糖进行体外抗肿瘤活性进行初步研究,结果表明,雪菊总黄酮粗提物、总黄酮纯化物及总多糖对人肝癌细胞(7404)、人非小细胞肺癌细胞(A549)有一定的抑制作用,其中雪菊总黄酮纯化物对 2 种肿瘤细胞的抑制作用最强,从而进行雪菊总黄酮纯化物诱导细胞凋亡试验,流式细胞仪 Annexin V - PI 双标法测定凋亡率表明,随样品浓度加大,活细胞比例逐渐减少,细胞凋亡发生率明显增高。

综上所述,雪菊总黄酮粗提物、纯化物及总多糖能抑制 7404、A549 细胞的增殖,呈剂量与时间依赖性,总黄酮纯化物抑制作用尤为明显,其抑制细胞增殖的机制可能与其诱导细胞的凋亡有关。但雪菊总黄酮纯化物作为一种天然提取物,其成分复杂,对于是否还存在其他途径,有待进一步的探讨。

3 结论

恶性肿瘤是目前危害人类健康的主要疾病之一。在恶性肿瘤的三大疗法中,药物治疗占有重要的地位。合成的化学类抗肿瘤药物中绝大多数都是以天然抗肿瘤活性成分为先导化合物的。我国有丰富的天然药用动物、植物和矿物资源,自 20 世纪 60 年代以来,我国的医药专家根据各民族运用天然抗肿瘤药物的经验,从民族医药中研究和开发出了一批疗效确切、价格合理的天然抗肿瘤药物。黄酮类化合物是一大类天然产物,广泛存在于植物界,是许多中草药的有效成分,具有抗菌抗病毒活性、抗炎、抗肿瘤活性等。因此该试验所研究的雪菊总黄酮的抗肿瘤活性为雪菊药理活性的研究奠定基础。

MTT 法是一种检测细胞存活和生长的方法,灵敏度高、简便快速,最常用于体外抗肿瘤药物筛选的方法。该试验采

参考文献

[1] 张彦丽,王艳,李新霞,等. 高效液相色谱法测定昆仑雪菊中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):107-109.

[2] 李冬明. 昆仑雪菊的药学研究进展[J]. 浙江中医杂志,2012,47(10):776-777.

[3] YASUKAWA K, AKIHISA T, KASAHARA Y, et al. Inhibitory effect of helianthol C; a component of edible Chrysanthemum, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. Phytomedicine, 1998, 5(3):215-218.

[4] 杜崇良,刘春宇. 黄酮类化合物抗肿瘤研究进展[J]. 中国野生植物资源,2007,26(3):3-5.

[5] 王天山,陆跃鸣,马国祥,等. 鼓槌石斛中化学成分对 K562 肿瘤细胞株生长抑制作用体外实验[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(2):1-3.

(上接第 42 页)

该市的适应性和稳定性,为新品种推广提供科学依据^[6]。

参考文献

[1] 卢秀萍. 培育特色烤烟品种[J]. 中国烟草,2004(22):60-61.

[2] 唐远驹. 烟叶风格特色的定位[J]. 中国烟草科学,2008,29(3):1-5.

[3] 罗定棋,谢强,谢云波,等. 贵州 6 个烤烟新品种在四川泸州的适应性

[J]. 贵州农业科学,2012,40(10):68-75.

[4] 刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:203-223.

[5] 吴国贺,孙立娟,崔昌范,等. 优质中间型烤烟品种筛选初探[J]. 延边大学农学报,2013(1):56-60.

[6] 韩佩良,汪兴,高贵,等. 4 个烤烟品种对比试验研究[J]. 安徽农学通报,2015,21(1):40-44.