

紫丁香苷抗肿瘤活性筛选及作用机制研究

秦淑红^{1,2,3}, 朱爱华^{1,2,3}

(1. 陕西新药技术开发中心, 陕西西安 710075; 2. 陕西省创新药物研究中心, 陕西西安 710075; 3. 陕西省中药与天然药物研发重点实验室, 陕西西安 710075)

摘要 [目的] 筛选对紫丁香苷较敏感的人肿瘤细胞系, 研究其抗癌机理。[方法] 采用四氮唑盐法(MTT法)测定药物的体外抑制作用, 通过测定 Caspase-3 活性研究细胞凋亡通路在抗癌活性中的作用。[结果] 在常见的 15 种人肿瘤细胞中, 紫丁香苷的半数抑制浓度 IC_{50} 低于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的有人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3, 紫丁香苷可促进肿瘤细胞中细胞凋亡因子 Caspase-3 活性增加。[结论] 人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3 对紫丁香苷较为敏感, 紫丁香苷的抑制作用呈现出剂量依赖的特点; 细胞凋亡途径在紫丁香苷的抗肿瘤活性中起着一定的作用。

关键词 紫丁香苷; 抗肿瘤; 细胞凋亡**中图分类号** S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)14-0107-02**Study on the Screening and Mechanism of Syringin Anticancer Activity**QIN Qiu-hong^{1,2,3}, ZHU Ai-hua^{1,2,3} (1. Shaanxi New Drug Technology Development Center, Xi'an, Shaanxi 710075; 2. Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xi'an, Shaanxi 710025; 3. Key Laboratory of Research and Development of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710075)

Abstract [Objective] To screen human tumor cell lines sensitive to syringin, and study its anticancer mechanism. [Method] To determine the inhibitory effect of syringin *in vitro* using tetrazolium salt (MTT) assay, and study the role of apoptosis pathway by assay of Caspase-3 activity. [Result] Among the 15 common human tumor cell lines, syringin IC_{50} of hepatoma cell HepG2 and prostate cancer cell PC-3 were below 100 $\mu\text{g/mL}$. Syringin can promote the activity of Caspase-3 in tumor cells. [Conclusion] Hepatoma cell HepG2 and prostate cancer cell PC-3 are more sensitive to syringin, and the inhibition of syringin presents a dose-dependent manner. The cell apoptosis pathway plays a role in the anticancer activity of syringin.

Key words Syringin; Anticancer; Cell apoptosis

紫丁香苷(syringin)是从五加科和木犀科根茎中提取分离得到的一种典型的酚苷类化合物。从其化学结构分析, 紫丁香苷的苷元为芥子醇, 其衍生物属于苯丙醇类物质, 具有抗氧化活性。临床研究显示紫丁香苷可能具有多种药用功能^[1], 例如增强免疫力^[2]、降血脂^[3]、抗氧化^[4]、抗抑郁^[5]、防止心肌缺血^[6]、抗炎镇痛^[7]、抗高血糖^[8]、抗抑郁^[9]、抗肿瘤活性^[10]及保肝作用^[11]等, 具有良好的药用价值与开发前景。对含有紫丁香苷成分的中药材祖师麻、救必应、木兰属植物、丁香属植物以及刺五加等的抗肿瘤活性的研究报道显示紫丁香苷可能是这些天然药物的抗肿瘤活性成分。目前针对紫丁香苷抗癌活性的研究较少, 其抗肿瘤的药效学并不明确^[12]。笔者对倒卵叶五加中提取分离的紫丁香苷的抗肿瘤作用进行了系统性筛选, 针对较敏感的细胞类型的细胞凋亡信号通路进行了测定, 以探究其抗肿瘤作用是否通过诱导细胞凋亡途径得以实现, 以期紫丁香苷的药学应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药品 紫丁香苷(陕西中药研究所提供); 氟尿嘧啶注射液[上海旭东海普药业有限公司(批号 FA161208)]; RP-MII640 培养基(美国 GE 公司); 胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司); 胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司); 二甲基亚砜(昊科生物工程有限责任公司); MTT(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备 Spectramax Plus 384 酶标仪(美谷分子仪器有限公司); 11231BBC86 生物安全柜(山东博科生物产业有限公司); WJ-2 CO₂ 培养箱(上海跃进医疗器械厂); XD-202 倒置显微镜(南京江南永新光学有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞株及培养条件。 试验所用细胞株均购于中国典型培养物保藏中心, 根据各细胞株最适培养基进行细胞培养传代。

1.3.2 体外抗肿瘤活性测定。 分别取处于指数生长期的贴壁肿瘤细胞, 用含 10% 胎牛血清的培养基稀释成约 20 000 个细胞/mL, 96 孔板中每孔加入 200 μL 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 每孔加入设定浓度的受试药物, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 弃上清, 每孔加入 200 μL 新鲜配制的含有 0.2 mg/mL MTT 的无血清培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h, 弃上清, 并加入 200 μL DMSO, 轻微振荡后测定参考波长 450 nm、检测波长 570 nm 下的光吸收值(OD 值); 或取处于指数生长期的悬浮细胞, 用含 10% 胎牛血清的培养基细胞, 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 每孔加入设定浓度的受试药物, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 加入三联液(10% SDS, 5% 异丁醇, 0.012 mol/L HCl) 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后测定 570 nm 光吸收值(OD 值)。按下列公式计算生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (1 - \text{用组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$$

以同一样品的不同浓度对肿瘤细胞生长抑制率作图可得到剂量反映曲线, 从中求出样品的半数抑制浓度(IC_{50})。

1.3.3 Caspase-3 活性测定。 培养细胞以 PBS 缓冲液快速

基金项目 陕西省青年科技新星计划项目(2016KJXX-31)。**作者简介** 秦淑红(1986—), 女, 重庆人, 工程师, 博士, 从事生物医药研究与开发工作。**收稿日期** 2018-02-09

漂洗 2 次,加入细胞裂解液 100 μL ,并加入浓度为 1 mg/mL 的 Caspase-3 酶作用底物 Ac-DEVD-AMC 5 μL ,用 PBS 缓冲液加到 200 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,置于分光光度计下检测 OD₄₄₀ 光吸收值。

2 结果与分析

2.1 紫丁香苷对 15 株人肿瘤细胞的抗肿瘤活性筛选 MTT 检测结果表明,紫丁香苷对 15 种人肿瘤细胞具有不同程度的抑制作用。由表 1 可知,紫丁香苷对 15 种人肿瘤细胞的体外半数抑制浓度 IC₅₀ 为 40.13 ~ 382.15 $\mu\text{g/mL}$ 。其中,紫丁香苷体外抑制作用较强的是人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3,IC₅₀ 分别为 40.13、88.08 $\mu\text{g/mL}$ 。

从表 2 可以看出,不同浓度的紫丁香苷对人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3 的生长抑制率均随着药物浓度升高而升高,呈现出明显的剂量依赖性。

2.2 细胞凋亡在紫丁香苷抗肿瘤活性中的作用 针对对紫丁香苷较为敏感的人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3,对其用药后的细胞凋亡因子 Caspase-3 相对活性进行了测定。通过测得的 OD₄₄₀ 与存活率之间的比值得到细胞凋亡因子 Caspase-3 的相对活性。由表 3 可知,人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3 的细胞凋亡因子 Caspase

-3 相对活性均会随着紫丁香苷的浓度增大而升高。该结果表明,细胞凋亡信号通路很可能在紫丁香苷的抗肿瘤活性中起着一定的作用。

表 1 紫丁香苷对 15 株人肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性筛选
Table 1 Screening of syringin antitumor activity in vitro on 15 human tumor cell lines

编号 Code	肿瘤细胞 Cancer cell	IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
1	HepG2	40.13
2	PC-3	88.08
3	A549	113.82
4	HeLa	146.34
5	ACHN	173.57
6	COC1	228.35
7	A875	246.71
8	IMR-32	257.12
9	PANC-1	289.27
10	Caco-2	316.54
11	BIU-87	324.52
12	HS-746T	336.58
13	MCF-7	341.09
14	Eca-109	344.23
15	KG-1	382.15

表 2 紫丁香苷对 HepG2、PC-3 的生长抑制作用以及 IC₅₀
Table 2 The growth inhibition effect of syringin on HepG2 and PC-3 and IC₅₀

浓度 Concentration// $\mu\text{g/mL}$	HepG2				PC-3			
	OD ₅₇₀	抑制率 Inhibition ratio//%	IC ₅₀ // $\mu\text{g/mL}$		OD ₅₇₀	抑制率 Inhibition ratio//%	IC ₅₀ // $\mu\text{g/mL}$	
160.00	0.195 ± 0.010	65.1	40.13		0.208 ± 0.002	58.4	88.08	
80.00	0.216 ± 0.017	61.4			0.275 ± 0.003	45.1		
40.00	0.274 ± 0.017	50.9			0.365 ± 0.008	27.0		
20.00	0.331 ± 0.002	40.6			0.434 ± 0.004	14.2		
10.00	0.441 ± 0.040	21.0			0.495 ± 0.004	7.8		
5.00	0.488 ± 0.014	12.5			0.498 ± 0.009	1.2		
2.50	0.527 ± 0.019	5.6			0.498 ± 0.013	0.5		
1.25	0.553 ± 0.031	0.9			0.498 ± 0.015	0.2		
0.63	0.556 ± 0.022	0.2			0.500 ± 0.030	0.0		

表 3 细胞凋亡因子 Caspase-3 的相对活性
Table 3 The relative activity of apoptosis factor Caspase-3

肿瘤细胞 Cancer cell	浓度 Concentration $\mu\text{g/mL}$	OD ₄₄₀	抑制率 Inhibition ratio %	存活率 Survival rate %	OD ₄₄₀ /存活率 OD ₄₄₀ / Survival rate
HepG2	80	0.261 ± 0.004	61.4	38.6	0.676
	10	0.324 ± 0.002	21.0	79.0	0.409
PC-3	80	0.332 ± 0.006	45.1	54.9	0.605
	10	0.387 ± 0.003	7.8	92.2	0.420

3 结论与讨论

目前对紫丁香苷抗肿瘤活性的研究非常少,且还没有研究涉及该药对不同肿瘤活性研究的系统性评价,紫丁香苷抗肿瘤活性的药效学并不明确。在该研究中,采用抗肿瘤药物筛选常用的 MTT 法,以氟尿嘧啶为阳性对照,对常见的 15 种人肿瘤细胞类型的紫丁香苷抗肿瘤活性进行探究和评价,结果发现紫丁香苷对人肝癌细胞 HepG2 以及人前列腺癌细胞 PC-3 具有明显的抗肿瘤活性,IC₅₀ 分别为 40.13、

88.08 $\mu\text{g/mL}$,且均呈现出明显的剂量依赖性。根据紫丁香苷的芥子醇结构分析,其很可能具有抗氧化活性,可以有效地抵御或减少自由基的伤害,减少肿瘤诱导的发生。目前已有研究报道紫丁香苷有保肝护肝的功效^[11],这与该研究的抗肝癌细胞活性结果相一致。

通过测定用药后的细胞凋亡因子 Caspase-3 的相对活性,发现紫丁香苷可以诱导肿瘤细胞的细胞凋亡信号通路,因此,细胞凋亡很可能在紫丁香苷抗肿瘤活性中起着一定的作用。

参考文献

[1] 陈日道,邹建华,贾景明,等.天山雪莲悬浮细胞培养物中紫丁香苷的分离及含量测定[J].药学报,2009,44(4):436-439.
[2] 张勇.紫丁香苷的测定及其降血脂、增强免疫力的研究[D].长春:吉林大学,2004:1-53.
[3] NIU H S,HSU F L,LIUC I M. Role of sympathetic tone in the loss of syringin-induced plasma glucose lowering action in conscious wistar rats[J]. Neurosci Lett,2008,445(1):113-116.

(下转第 112 页)

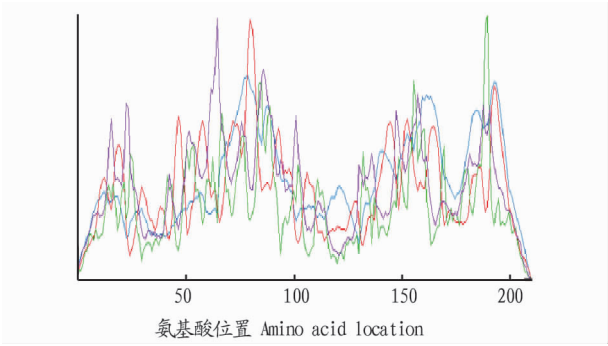


图8 VvCOR413-II 二级结构预测

Fig.8 Secondary structure prediction of VvCOR413-II

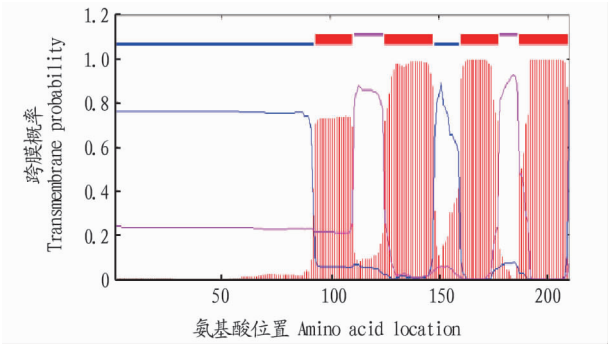


图9 VvCOR413-I 跨膜结构

Fig.9 Transmembrane structure of VvCOR413-I



图10 VvCOR413-II 结构域分析

Fig.10 Domain analysis of VvCOR413-II

可以调节 *COR* 基因的表达能力,同时 *COR* 基因的启动子含有 CRT/DRE 元件,通过 *COR413* 基因自身表达和联动表达模式,提高拟南芥的耐寒性^[8]。与此同时,在山葡萄 *COR413* 基因家族中已发现 4 个成员,通过耐寒试验研究表明, *COR413* 基因家族具有提高植物耐寒能力的功能,但不同种间表达量存在差异^[9]。笔者对山葡萄北冰红的 *VvCOR413-I* 基因进行克隆,并在分子水平上对其特性进行分析,为研究其功能和利用基因工程手段培育葡萄耐寒品种奠定了基础。

参考文献

[1] 龚映雪. 植物响应温度胁迫蛋白质组学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010,38(32):18038-18040.

[2] 廖嘉航. 植物 *COR* 抗寒基因的转入研究[J]. 生物技术世界,2016(5): 35,38.

[3] 黄永会,刘永翔,朱英,等. *COR* 基因在植物抗寒基因工程中的作用[J]. 贵州农业科学,2014,42(12):37-42.

[4] 李志友. *COR* 和 *CBF3* 基因导入番茄的研究[D]. 重庆:西南大学,2007.

[5] 陆艳梅,张金文,魏玉洁,等. 罂粟 *COR* 和 *BBE* 基因 RNAi 载体构建及烟草转化[J]. 药学报,2013,48(7):1169-1177.

[6] 张腾国,郭艳峰,陈琼琼,等. 油菜 *COR* 基因的克隆及原核表达[J]. 甘肃农业科技,2015(4):1-4.

[7] 李良. 播娘蒿抗寒基因 *COR* 的克隆及其生物信息学分析与表达研究[D]. 成都:四川大学,2005.

[8] 吴楚,王政权. 拟南芥中 *CBF* 对 *COR* 基因表达的调控[J]. 植物生理学通讯,2001,37(4):365-368.

[9] 丁小玲,张宁波,焦淑珍,等. 山葡萄 *COR413* 家族基因克隆及其参与低温胁迫的表达分析[J]. 农业生物技术学报,2017,25(3):366-377.

(上接第 108 页)

[4] ES-SAFI N E, KOLLMANN A, KHLIFI S, et al. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alpum* L. structure-activity relationship[J]. LWT,2007,40(7):1246-1252.

[5] NAKAZAWA T, YASUDA T, OHSAWA K. Metabolites of orally administered *Magnolia officinalis* extract in rats and man and its anti depressant-like effects in mice[J]. J Pharm Pharmacol,2003,55(11):1583-1591.

[6] 张迪. 刺五加皂苷单体 B 对大鼠急性心肌缺血的保护作用[D]. 长春:东北师范大学,2006:1-44.

[7] CHOI J, SHIN K M, PARK H J, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin[J]. Planta Med, 2004,70(11):1027-1032.

[8] NIU H S, LIU I M, CHENG J T, et al. Hypoglycemic effect of syringin from

Eleutherococcus senticosus in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Planta Med,2008,74(2):109-113.

[9] KURKIN V A, DUBISHCHEV A V, EZHKOV V N, et al. Antidepressant activity of some phytopharmaceuticals and phenylpropanoids[J]. Pharm Chem J,2006,40(11):614-619.

[10] ZHANG W, ZHANG W D, ZHANG C, et al. Antitumor activities of extracts and compounds from the roots of *Daphne tangutica* Maxim[J]. Phytother Res,2007,21(11):1113-1115.

[11] YANG W J, QI X J, ZHENG Y, et al. Protecting effect of syringin on acute hepatic injury in mice[J]. Nat Prod Res Dev,2007,19:473-474.

[12] 汪琢,姜守刚,祖元刚,等. 刺五加中紫丁香苷的提取分离及抗肿瘤作用研究[J]. 时珍国医国药 2010,21(3):752-753.