

文章编号:1001-6880(2016)10-1612-06

96 种中药单体抑制血管生成的活性研究

花 慧¹, 张 敏², 陶永辉^{3*}¹ 泰州学院医药与化学化工学院, 泰州 225300; ² 无锡卫生高等职业技术学校, 无锡 214062;³ 江苏省血吸虫病防治研究所 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室 江苏省寄生虫分子生物学重点实验室, 无锡 214064

摘要:采用内皮细胞高通量筛选模型和鸡胚尿囊膜(CAM)实验筛选技术,分析96种中药单体的抑制血管生成的活性。筛选结果表明有11种中药单体对Eahy-926细胞的增殖有一定的抑制作用且呈剂量依赖关系,有10种中药单体具有抑制CAM血管形成的作用。秦皮素、汉防己甲素、和厚朴酚、蝙蝠葛碱、鲁斯可皂苷元、高粱姜素、染料木素、隐绿原酸、齐墩果酸和 α -倒捻子素,这10种单体化合物值得进一步研究。

关键词:中药单体;高通量筛选模型;Eahy 926 细胞

中图分类号:R287

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.021

Anti-angiogenesis Effects of 96 Compounds from Chinese Medicine

HUA Hui¹, ZHANG Min², TAO Yong-hui^{3*}¹ College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300, China;² Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China; ³ Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Key Laboratory of Parasitic Disease Control and Prevention (Ministry of Health), Jiangsu Provincial Key Laboratory of Parasite Molecular Biology, Wuxi 214064, China

Abstract: 96 Compounds from Chinese medicine were assayed against Eahy-926 cell *in vitro* and 11 of them on the chorioallantoic membrane (CAM) *in vivo*. The results showed that 11 compounds had a dose-dependent inhibition of growth in Eahy-926 cells *in vitro*, and 10 of them significantly inhibited angiogenesis on CAM at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{egg}$. Compounds fraxetin, tetrrandrine, honokiol, dauricine, ruscogenin, galangin, genistin, 4-dicaffeoylquinic acid, oleanolic acid and α -mangostin showed anti-angiogenesis activity, and were worth further studying.

Key words: compounds from Chinese medicine; high throughput screening; Eahy-926 cell

肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成,因此抑制肿瘤血管生成,可阻断肿瘤的营养供应,从而达到了控制肿瘤生长和转移的目的。这种治疗方法被称为“抗肿瘤血管生成疗法”^[1]。血管的生长分为以下几个步骤:基底膜降解,内皮细胞增殖、迁移、形成管网^[2]。如果抑制内皮细胞的增殖,理论上就有可能最终抑制血管的形成,因此,大量围绕着内皮细胞为靶点设计的药物大量呈现,如:恩度(enostar)、烟曲霉素衍生物(TNP-470)、血管抑制剂(angiotatin)等^[3,4]。但这些药物的疗效仍差强人意,与有效、低毒、无耐药性的期待相距甚远。本研究基于以上理论及实际情况,设计从天然产物的单体中寻找发现目标化合物,本次实验研究共选择96

种中药单体化合物。以内皮细胞为高通量筛选模型,快速评价他们的活性,再以体内CAM实验加以验证。以期能找到有效的抑制肿瘤血管生成的先导化合物。

1 实验材料

Eahy 926 是原代 HUVEC 与 A549 细胞融合的细胞株,由江南大学无锡医学院提供; RPMI 1640 培养基、胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品; 酚罗丹明 B(SRB)、胰蛋白酶、L-谷氨酰胺(华美生物工程公司); 受精鸡蛋购自无锡市马山种鸡场; 96 个中药单体由购自上海永恒生物科技有限公司(纯度 > 95%)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

Eahy 926 细胞在 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度条

收稿日期:2016-06-01 接受日期:2016-08-31

基金项目:泰州学院博士基金(QD2016009)

* 通讯作者 Tel:86-018118898106; E-mail:110509667@qq.com

件下,培养于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,常规传代。

2.2 分析样品制备与筛选

96 个中药单体化合物称重,编号,记录,溶解。溶解方法如下表 1。难溶的样品加少量 DMSO (< 0.1%) 助溶,样品浓度均稀释为 30 μg/mL。

2.3 SRB 法检测 96 种样品分别对 EaHy-926 细胞生长的抑制作用

取对数生长期 EaHy-926 细胞,用 0.25% 胰酶消化,以含体积分数为 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释,制成单细胞悬液,按每孔 6000 ~ 7000 个细胞接种于 96 板,37 °C、5% CO₂ 过夜,加入相同浓度的不同样品溶液(最终浓度 10 μg/mL) 分别以单纯的培养液和未经药物作用的细胞作为空白对照和阴性对照,每组设 4 个复孔(实验重复 3 次),每块 96 孔板可同时检测 19 个样品,继续培养 48 h。参照文献^[5]将细胞山氯乙酸固定,SRB 染色、Tris 碱溶解处理,用 MK3 型酶标仪在波长 A570 处测定每孔 A 值。计算抑制率(%),抑制率 = [(对照组的 A 值 - 药物组的 A 值) / (对照组的 A 值 - 空白组的 A 值)] × 100%。

白对照和阴性对照,每组设 4 个复孔(实验重复 3 次),每块 96 孔板可同时检测 19 个样品,继续培养 48 h。参照文献^[5]将细胞山氯乙酸固定,SRB 染色、Tris 碱溶解处理,用 MK3 型酶标仪在波长 A570 处测定每孔 A 值。计算抑制率(%),抑制率 = [(对照组的 A 值 - 药物组的 A 值) / (对照组的 A 值 - 空白组的 A 值)] × 100%。

2.4 SRB 法检测 11 种样品分别对 EaHy-926 细胞生长抑制的量效关系

方法同 2.2,每孔 6000 ~ 7000 个细胞接种于 96 板后,次日,加入不同浓度的不同样品溶液(0.5 ~ 10 μg/mL) 分别以单纯的培养液和未经药物作用的细胞作为空白对照和阴性对照(分为两组,一组为培养基,一组为 DMSO < 0.1% 组)。其他步骤同上。

表 1 样品名称表

Table 1 Sample information

编号 No.	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	分类 Classification	溶解方式 Dissolution method	抑制率 Inhibition rate (10 μg/mL)
5	辛弗林盐酸盐	Synephrine hydrochloride	生物碱盐	水	2%
10	金雀花碱	Cytisine	生物碱	水	2%
11	乙酰紫堇灵	Chelidonine	生物碱	水	2%
13	汉防己甲素	Tetrandrine	生物碱	水	88%
30	四氢巴马亭	Tetrahydropalmatine;	生物碱	DMSO	25%
31	N-甲基金雀花碱	N-methylcytisine	生物碱	DMSO	16%
32	刺桐桔林碱	Erythrociline	生物碱	DMSO	7%
55	蝙蝠葛碱	Dauricine	生物碱	水	89%
73	原阿片碱	Protopine	生物碱	水	17%
78	澳洲茄碱	Solasonine	昔类甾体生物碱	水	2%
1	三叶豆紫檀昔	Trifolirhizin	黄酮昔	水	12%
8	山奈昔	Kaempferol 3,7-L-dirhamnoside	黄酮	水	2%
9	新芒果昔	Neomangiferin	黄酮	水	13%
12	大豆昔	Daidzin	异黄酮	水	13%
15	甘草昔	Liquiritin	黄酮	DMSO	5%
16	柚皮昔二氢查尔酮	Naringin dihydrochalcone	黄酮	水	13%
17	圣草酚	Eriodictyol	黄酮	DMSO	42%
19	牡荆素	Apigenin8-C-glucoside	黄酮	DMSO	26%
21	槐属昔	Sophoricoside	黄酮昔	水	21%
24	金丝桃昔	Hyperoside	黄酮醇昔	DMSO	12%
25	黄芩昔	Baicalin	黄酮	DMSO	90%
26	柚皮素	Naringenin	二氢黄酮	DMSO	12%
28	芹菜昔	Apiin	黄酮	水	20%
29	香叶木素	Diosmetin	黄酮	DMSO	47%

编号 No.	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	分类 Classification	溶解方式 Dissolution method	抑制率 Inhibition rate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
33	杨梅素	Myricetin	黄酮醇	DMSO	19%
34	刺芒柄花素	Formononetin	黄酮	DMSO	60%
35	芸香柚皮苷	Narirutin	黄酮	DMSO	11%
37	木樨草素	Luteolin	黄酮	DMSO	12%
38	蒙花苷	Buddleoside	黄酮	DMSO	21%
39	紫云英苷	Astragalin	黄酮苷	DMSO	20%
41	山奈素	kaempferide	黄酮	DMSO	43%
43	异甘草苷	Liquiritin	黄酮	DMSO	7%
45	草质素	Herbacetin	黄酮	DMSO	88%
48	高粱姜素	Galangin	黄酮	DMSO	65%
51	升麻素	Cimifugin	色原酮	水	30%
52	染料木素	Genistin	黄酮	水	65%
54	大豆昔元	Daidzein	黄酮	DMSO	7%
56	橙皮苷	Hesperidin	黄酮苷	水	38%
58	柚皮苷	Naringin	双氢黄酮	水	17%
60	3-异倒捻子素	3-isomangostin	黄酮	DMSO	19%
61	黄豆黄苷	Daidzin	异黄酮苷	水	2%
62	淫羊藿苷	Icraian	黄酮	DMSO	72%
65	染料木苷	Genistin	黄酮苷	DMSO	17%
69	黄豆黄素	Glycitein	异黄酮	DMSO	21%
70	毛蕊异黄酮苷	Calycosin-7-glucoside	异黄酮	DMSO	24%
74	芹菜苷	Apiin	黄酮苷	水	19%
76	芦丁	Rutin	黄酮	DMSO	21%
81	马卡因	Maackiaain	黄酮	DMSO	18%
82	杨梅苷	Myricetin	黄酮	DMSO	6%
86	γ -倒捻子素	γ -Mangostin	氧杂蒽酮	DMSO	82%
89	阿福豆苷	Benzoic Acid	黄酮苷	水	27%
90	香蒲新苷	afzerin	黄酮苷	水	21%
91	水仙苷	Narcissoside	黄酮苷	DMSO	19%
93	异甘草苷	Isoliquiritoside	黄酮	水	17%
94	β -倒捻子素	β -Mangostin	氧杂蒽酮	DMSO	19%
95	α -倒捻子素	α -Mangostin	氧杂蒽酮	DMSO	88%
96	1,3,5,8-四羟基-2,4-双(3-甲基-2-丁烯基)-9H-氧杂蒽-9-酮	Gartanin	氧杂蒽酮	DMSO	28%
2	黄芪皂苷 II	Astragaloside-II	皂苷	水	12%
36	环黄芪醇	Cycloastragenol	三萜皂苷	DMSO	1%
42	人参皂苷 Rg3	Ginsenoside Rg3	皂苷	水	16%
47	鲁斯可皂苷元	Ruscogenin	皂苷	DMSO	91%
75	齐墩果酸	Oleanolic acid	皂苷	DMSO	90%
77	重楼皂苷 I	Polyphyllin I	皂苷	水	12%
79	重楼皂苷 V	Paris saponin V	皂苷	DMSO	25%

编号 No.	中文名称 Chinese name	英文名称 English name	分类 Classification	溶解方式 Dissolution method	抑制率 Inhibition rate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
85	伪原薯蓣皂苷	pseudoprotodioscin	皂苷	水	19%
3	秦皮素	Fraxetin	香豆素	DMSO	89%
14	秦皮乙素	Esculetin	香豆素	DMSO	13%
84	七叶苷(秦皮甲素)	Esculin hydrate	香豆素	水	20%
20	和厚朴酚	Honokiol	木脂素	DMSO	84%
23	肉豆蔻木脂素	Benzene methanol	木脂素	DMSO	35%
53	芝麻素	Sesamin	木脂素	DMSO	16%
4	奇壬醇	Kirenol	二萜	DMSO	32%
7	黄独素 B	Diosbulbin B	二萜	DMSO	25%
22	穿心莲内酯	Andrographolide	二萜内酯	DMSO	76%
27	双-(5-甲酰基糖基)醚	5,5'-oxydimethylenebis(2-furfural)	二萜内酯	DMSO	81%
59	异连翘酯苷 A	Isoforsythiaside	二萜内酯	水	21%
36	环黄芪醇	Cycloastragenol	三萜皂苷	DMSO	1%
63	哈巴苷	Harpagide	环烯醚萜	水	6%
18	松果菊苷	Echinacoside	苯乙醇苷	水	12%
40	芒果苷	mangiferin	多酚	DMSO	30%
44	白藜芦醇	Resveratrol	多酚	DMSO	35%
80	去氢二异丁香酚	Dehydrodiisoeugenol	苯酚	DMSO	10%
88	乙酰化白藜芦醇	Acetyl-trans-resveratrol	多酚	DMSO	8%
87	新绿原酸	neochlorogenic acid	苯丙素	水	18%
66	异阿魏酸	Isoferulic acid	酚酸	水	13%
67	阿魏酸	Ferulic acid	酚酸	水	8%
68	隐绿原酸	4-Dicaffeoylquinic Acid	酚酸	DMSO	46%
71	对-香豆酸	p-Coumaric acid	酚酸	水	1%
92	绿原酸	Camptothecine	酚酸	水	15%
18	松果菊苷	Echinacoside	苯乙醇苷	水	12%
46	莽草酸	Shikimic Acid	有机酸	水	12%
49	厚朴酚	Magnolol	联苯	DMSO	90%
57	异类叶升麻苷	Isoacteoside	甾苷	水	15%
64	β -谷甾醇	sitosterol	甾醇	水	6%
50	5-O-甲基维斯阿米醇苷	4'-O-beta-Glucopyranosyl -5-O-Methylvisamminol	苷	水	20%

2.5 CAM 实验

按文献^[5]方法制备 CAM 模型, 将受精的鸡蛋至 37 ± 0.5 ℃水浴恒温箱中孵化, 在孵化 7 d 的鸡胚气室端开一个直径 1 cm \times 1 cm 的小窗, 暴露尿囊膜, 将预先制备好的含同剂量样品(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 0.5% 甲基纤维素膜放在绒毛尿囊膜血管较少的部位, 用灭菌透明胶带封窗后继续孵化, 48 h 后揭除胶带, 10% 甲醛固定, 待血管内血液凝固后, 以甲基

纤维素膜为中心剪下 CAM, 贴于载玻片上, 观察计数, 以甲基纤维素膜为中心统计大、中、小血管数。记录数据。

2.6 统计分析

采用 SPSS 1310 软件进行分析, 组间比较采用方差分析。

3 实验结果

3.1 96种样品细胞活性初步筛选结果

当样品浓度设置在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 经活性检测, 抑制率 >35% 的样品有 3#、13#、17#、20#、22#、23#、25#、27#、29#、34#、41#、44#、45#、47#、48#、49#、52#、55#、56#、62#、68#、75#、86#、95#。结果如表 1 所示。

3.2 11种中药单体细胞活性量效关系曲线

将初步筛选有活性的药物进行量效关系测试, 其中有良好的量效关系的各药为: 3#、13#、20#、47#、48#、52#、55#、68#、75#、86#、95#。筛选结果如图 2 所示。

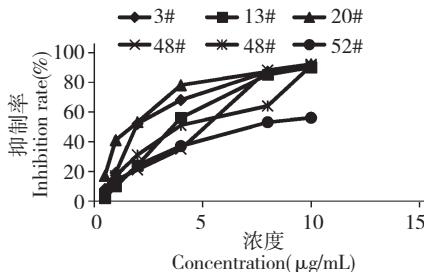


图 1 11 种中药对 EaHy-926 细胞增殖抑制率的剂量依赖关系

Fig. 1 Proliferative inhibition of 11 compounds from Chinese medicine on EaHy-926 cells

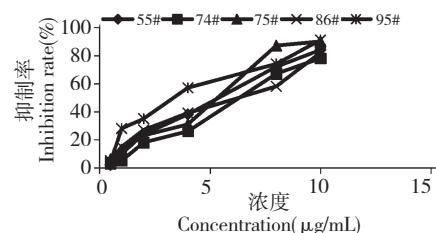


图 2 11 种中药对 EaHy-926 细胞增殖抑制率的剂量依赖关系

Fig. 2 Proliferative inhibition of 11 compounds from Chinese medicine on EaHy-926 cells

3.3 样品对鸡胚绒毛尿囊膜血管形态的影响

由实验采集的数据可见: 有活性的样品组周围 CAM 血管数量明显呈递减趋势, 加药膜附近血管的分布无杂乱、包绕等状, 剂量最大的鸡胚在加药区域存在无血管区或血管断裂现象, 且血管普遍变细, 血管形态异常, 尤为显著的是细小血管数显著减少, 表明样品有明显抑制血管生成作用。实验按大、中、小血管数进行统计, 结果如下表 2 所示。其中 10 种样品胚胎成活率都在 90% 以上, 但 86# 样品 (γ -倒捻子素) 所有胚胎, 在加药 24 h 后观察, 均死亡。考虑 γ -倒捻子素可能对胚胎的发育具有一定得毒性。

表 2 11 种中药单体对 CAM 新生血管生成的影响 ($x \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of 11 compounds from Chinese medicine on neovascularization in CAM ($x \pm s, n = 10$)

编号 No.	样品名称 Name of sample	大血管数 Large vessel	中血管数 Middle vessel	小血管数 Small vessel
-	阴性对照	2.8 ± 0.20	4.2 ± 0.87	19.8 ± 1.03
3	秦皮素	2.1 ± 0.19	3.1 ± 0.36	$8.6 \pm 0.35^*$
13	汉防己甲素	2.2 ± 0.35	2.3 ± 0.57	$6.9 \pm 0.80^*$
20	和厚朴酚	1.9 ± 0.47	2.1 ± 0.21	$7.8 \pm 0.57^*$
55	蝙蝠葛碱	2.4 ± 0.24	3.2 ± 0.67	$8.7 \pm 0.87^*$
47	鲁斯可皂苷元	2.0 ± 0.18	3.1 ± 0.16	$10.6 \pm 0.35^*$
48	高粱姜素	2.2 ± 0.31	2.6 ± 0.52	$8.7 \pm 0.30^*$
52	染料木素	1.9 ± 0.39	2.1 ± 0.18	$9.8 \pm 0.45^*$
74	隐绿原酸	2.7 ± 0.25	3.0 ± 0.93	$11.8 \pm 0.97^*$
75	齐墩果酸	2.2 ± 0.14	3.1 ± 0.18	$7.3 \pm 0.45^*$
86	γ -倒捻子素	死胎	死胎	死胎
95	α -倒捻子素	2.7 ± 0.21	3.0 ± 0.87	$10.8 \pm 1.03^*$

* $P < 0.05$ vs Control

4 讨论与结论

从中药里寻找发现抑制肿瘤血管的生成的药物, 已成为新药研究的热点。传统的中药的有效成

分研究大多以粗提取物为研究对象, 采用组分提取分离-活性检测相结合的方法进行, 但这种方法通常周期长、命中率较低^[6]。本研究是直接以中药单体化合物为研究对象, 通过检测其对体外 EaHy-926 细

胞增殖的影响,高通量筛选有活性的单体。本研究所选的 EaHy-926 细胞是人肺腺癌细胞株 A549 和人脐静脉内皮细胞杂交而成的永生化细胞株,具有血管内皮细胞的特性,已广泛用于内皮细胞相关研究。其检测结果已得到普遍的认可^[7]。

在细胞实验结果的基础上,再结合 CAM 体内模型进一步确定化合物的活性。但要最终确定单体的药用价值,还需体内模型,如斑马鱼模型,荷瘤小鼠模型得再次实验验证,实验证明,采用这种方法寻找抑制肿瘤血管的生成的先导化合物,显著缩短了早期的药物发现过程,缩短整个药筛周期,促进新药的发现。

本研究所选的 96 种单体化合物包括黄酮、皂苷、生物碱、酚酸、香豆素类,大部分化合物分子量 < 500,经反复试验验证,其中秦皮素、汉防己甲素、和厚朴酚、蝙蝠葛碱、鲁斯可皂苷元、高粱姜素、染料木素、隐绿原酸、齐墩果酸、 γ -倒捻子素、 α -倒捻子素对内皮细胞增殖的抑制作用显著,且经 DAPI 染色,结合显微镜下观察,发现和厚朴酚、齐墩果酸、汉防己甲素、秦皮素、隐绿原酸不仅对细胞增殖有抑制作用,且可以引起细胞的凋亡。经台酚蓝染色 γ -倒捻子素可以引起细胞的坏死,这在 CAM 的实验中同样出现了这一情况,说明 γ -倒捻子素对内皮细胞的抑制作用可能由于其毒性而产生,这一实验现象引起足够的重视。另从筛选的结果可见,10 种单体化合物结构差异较大,并不是结构类似物,这些结果对研究和发现药物作用于内皮细胞的规律有着非常重大的意义。今后的研究工作中应探明他们抑制细胞

增殖机制,其作用于细胞的信号通路。在此基础上还可以对以上的化合物进行组合药效学研究,为更好研究开发抑制肿瘤新生血管的药物打下基础。

参考文献

- Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomed Pharmacother*, 2005, 2:340.
- Sun B, Zhang D, Zhang S, et al. Hypoxia influences vascular mimicry channel formation and tumor invasion related protein expression in melanoma. *Cancer Lett*, 2007, 249: 188-193.
- Chen J(陈娇), Xu W(徐为). Progress on anti-angiogenesis new drugs. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2012, 27:1-4.
- Zhao LM(赵黎明), Xu HM(徐寒梅), Xi T(奚涛). Research development of tumor angiogenesis and angiogenesis inhibitors. *Pharm Biol* (药物生物技术), 2013, 30: 213-216.
- Hua H(花慧), Zhou HJ(邹浩军), Song ZG(宋振国), et al. Study on anti-angiogenesis effects of 31 traditional Chinese medicines. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2015, 30:263-265.
- Li SJ(李韶菁), Du GH(杜冠华). The progress of high throughput pharmacology of cell for drug discovery. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43:84-88.
- Wang GP(王国平), Zhang NG(张宁刚), Yang JL(杨金亮), et al. Proteomic analysis of differential expression proteins in fusion cell line EaHy926 and parent lung adenocarcinoma cell line A549. *Chin Biochem Mol Biol J* (中国生物化学与分子生物学报), 2007, 23:652-659.

(上接第 1601 页)

- Ye ML(叶明立), Zhu Y(朱岩). Application of accelerated solvent extraction (ASE) on the analysis of food and pesticide residue. *Mod Sci Instru* (现代科学仪器), 2003, 1:35-37.
- Administration of quality and technology supervision of Guangdong province(广东省质量技术监督局). Determination of triterpenoid in Ganoderma. 2008, DB44/T 496-2008.
- Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 188.
- Gong B(弓宝), Chen DL(陈德力), Liu YY(刘洋洋), et al. Antioxidant activity of lipids from *Millettia speciosa* root. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2015, 10:1006-1009.
- Chen XH(陈晓花), Chen LX(陈蕾西), Niu YF(牛迎凤), et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Clerodendranthus spicatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:257-261.