

文章编号:1001-6880(2016)12-1875-05

白头翁中抗肿瘤物质的筛选及其作用机制研究

陈凯¹,张文明¹,喻凯^{1*},刘健¹,王伦²¹西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031; ²中国科学院成都生物研究所,成都 610041

摘要:从白头翁中筛选出具有抗肿瘤活性的物质,并进一步研究其作用机制,为开发新的抗肿瘤药物奠定基础。以人肝癌 SNU-387 细胞为研究对象,用 MTT 法检测各白头翁提取物的抗肿瘤活性,获得活性较高的物质。运用 Annexin V-FITC/PI 双染法,通过流式细胞仪检测 BTW10 和 BTW11 对 SNU-387 细胞凋亡的影响;采用 Elisa 法,检测它们对 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达的影响。白头翁皂苷(BTW)类物质多数有抑瘤活性。其中 BTW10 和 BTW11 活性较高,IC₅₀ 分别为 1.633 μg/mL 与 3.104 μg/mL;均能促进 SNU-387 细胞凋亡,促进 Bax 和抑制 Bcl-2 的表达。BTW10 和 BTW11 具有明显的抑瘤作用,其抑瘤机制与其促进 Bax 和抑制 Bcl-2 的表达,破坏线粒体通透性,导致细胞凋亡有关。

关键词:白头翁;人肝癌细胞;细胞凋亡;MTT;Elisa

中图分类号:R966

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.004

Screening of Antitumor Compounds from Radix Pulsatillae and Researching on Their Mechanism

CHEN Kai¹, ZHANG Wen-ming¹, YU Kai^{1*}, LIU Jian¹, WANG Lun²¹School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: The aim of this study was to screen out antitumor compounds from Radix Pulsatillae and to further research their mechanism, so as to lay a foundation for the development of new antitumor drugs. The inhibition effect of Radix Pulsatillae extract (BTWs) on SNU-387 cell were detected by MTT method. Apoptosis induced by BTW10 and BTW11 with higher inhibition were detected with the Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry. The effects on expressions of Bax and Bcl-2 of BTW10 and BTW11 were determined with Elisa method. Most of anemosides showed high inhibition on SNU-387. BTW10 and BTW11 of them showed higher inhibition. Their IC₅₀ were 1.633 μg/mL and 3.104 μg/mL, respectively. They can induce apoptosis of SNU-387, promote the expression of Bax, and inhibit the expression of Bcl-2. Hence, it was concluded that BTW10 and BTW11 had higher inhibition on SNU-387. The mechanisms of inhibition were relevant to their promotion of Bax and inhibition of Bcl-2, damaging permeability of mitochondria and inducing apoptosis.

Key words: Radix pulsatillae; human liver cancer cells; apoptosis; MTT; Elisa

白头翁为毛茛科植物白头翁 [*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel] 的干燥根,具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效^[1]。其化学成分比较复杂,现发现其化学成分主要为小分子成分、木质素类、香豆素类、三萜酸类、三萜皂苷类,其中最后一类为其重要化学成分^[2-4]。近年来,有实验表明,白头翁皂苷类化合物对肝癌、肠癌、胰腺癌和肾癌有显著的抑制肿瘤生长作用^[5-8]。因此本实验采用 MTT 法检测

白头翁中的不同提取物对人肝癌 SNU-387 细胞的细胞毒性,筛选出最佳的抗肿瘤单体化合物,并进一步对这些较强细胞毒性作用的单体化合物进行作用机理进行研究,为开发抗肿瘤新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物

白头翁皂苷(BTW)系列样品(BTW-1 至 BTW-22),由中国科学院成都生物研究所提供,其中 BTW10 和 BTW11 的纯度大于 98%。

1.2 细胞系

人肝癌 SNU-387 细胞株,由中国科学院成都生

物研究所提供。

1.3 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶(HyClone 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Amresco 公司);顺铂(PC, 美国 Sigma 公司, p4394);Annexin V, FITC 漏亡检测试剂盒(日本同仁化学研究所);人 Bax ELISA Kit(美国 RD 公司);人 Bcl-2 ELISA Kit(美国 RD 公司)。

1.4 仪器

HR40-II A2 生物安全柜(Haier);CO₂ 恒温孵箱(ESCO);离心机(Heraeus);倒置相差显微镜(O-LYMPUS);Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 公司);Elx-800 型全自动酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 样品筛选及其 IC₅₀ 的检测

取对数生长期 SNU-387 细胞,以 1×10^5 个/mL 的细胞接种到 96 孔培养板,200 μL/孔。各孔分为空白组(DMSO)、样品组(DMSO 溶解的待筛选样品,50 μg/mL)、阳性组(DMSO 溶解的顺铂(PC),50 μg/mL),每组平行 5 孔,放入恒温培养箱(37 °C, 5% CO₂)内培养。24 h 后各组加入相应溶液,继续培养 24 h,用 MTT 法,测定各孔的 OD₄₉₀。按下式计算受试物对肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = ((\text{OD}_{490} \text{ 对照孔} - \text{OD}_{490} \text{ 加药孔}) / \text{OD}_{490} \text{ 对照孔}) \times 100\%$$

将具有较高抑制率的样品稀释成 5 个浓度组:50、10、2、0.4、0.08 μg/mL,用上述方法测定其抑制率,并计算其 IC₅₀。

1.5.2 流式细胞术测定细胞凋亡率(Annexin V-FITC/PI 双染)

取对数生长期 SNU-387 细胞,以 1×10^5 个/mL 的细胞接种到 6 孔培养板,3 mL/孔,放入恒温培养箱内培养,培养 24 h 后加样。加药品前先配置好不同浓度的样品溶液(50、10、2 μg/mL),阳性组顺铂的浓度为 50 μg/mL。加样 24 h 后,收集细胞,放入已灭菌的 EP 管中。用 Annexin V-FITC/PI 双染法,向收集好的细胞加入 500 μL 稀释后的 Annexin V Binding Buffer,再依次加 5 μL Annexin V FITC 结合物和 5 μL PI。温室下避光 15 min,再加入 400 μL Annexin V Binding Buffer,1 h 内上机检测细胞的凋亡率。

1.5.3 Elisa 法检测细胞中 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达

取上述“2.2”中 EP 管的细胞,将细胞进行反复

1.5.4 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各剂量组均使用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,同时进行方差分析等相关实验, $P < 0.05$ 判定差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 样品筛选及其 IC₅₀ 的检测

经检测,各样品的抑制率如图 1 所示。

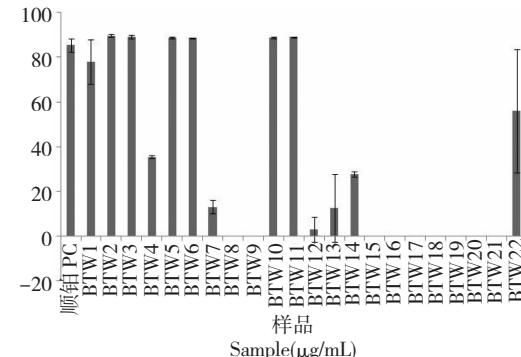


图 1 BTW 系列样品对 SNU-387 细胞生长的抑制率($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 The inhibition of BTW series samples on proliferation of SNU-387 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

选择抑制率超过 50% 的样品,测定其 IC₅₀,结果如(表 1)所示。

表 1 BTW 系列化合物对 SNU-387 细胞抑制的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 IC₅₀ of BTW series samples on SNU-387 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

样品 Sample (μg/mL)	IC ₅₀
顺铂 PC	$5.61 \pm 0.354^*$
BTW1	$46.6 \pm 2.312^*$
BTW2	$4.5 \pm 2.235^*$
BTW3	$5.159 \pm 1.562^*$
BTW5	$1.302 \pm 1.034^*$
BTW6	$5.351 \pm 2.104^*$
BTW10	$1.633 \pm 0.291^*$
BTW11	$3.104 \pm 0.586^*$
BTW22	$59.3 \pm 3.589^*$

* $P < 0.05$ vs blank group.

从结果看出,除了 BTW1 和 BTW22 以外,其他样品均对 SNU-387 细胞具有较高的抑制活性,其 IC_{50} 均低于顺铂的($5.61 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$)。这些样品中,只有 BTW10 和 BTW11 为纯度较高的单一化合物,其 IC_{50} 分别为 $1.633 \pm 0.291 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $3.104 \pm 0.586 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。而其它样品不是单体化合物(BTW2、BTW3、BTW5、BTW6 中分别主要含有 α -常春藤皂苷、黄花败酱甙 C、Hederacolchiside A1、常

春藤皂 H),故不做后续实验的样品。经鉴定 BTW10 为齐墩果酸-3-O- β -D 吡喃葡萄糖-(1→4)- β -D 吡喃葡萄糖-(1→3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1→2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷;BTW11 为齐墩果酸-3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1→6)- β -D 吡喃葡萄糖-(1→4)- β -D 吡喃葡萄糖-(1→3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1→2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷。其结构如图 3 所示。

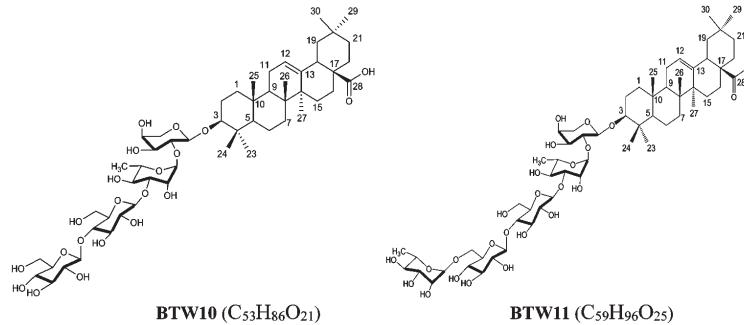


图 2 化合物 BTW 10 和 BTW 11 的结构式
Fig. 2 Chemical structures of BTW10 and BTW11

2.2 BTW10 和 BTW11 对 SNU-387 细胞凋亡的影响

因只有 BTW10 和 BTW11 为纯化了的单体化合物,故只检测了这两个样品对 SNU-387 细胞凋亡的影响。其他样品将进一步分离纯化并鉴定其结构。流式细胞仪检测结果可以看出(图 3),在作用 24 h 后,顺铂浓度在 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时能明显诱导 SNU-387 细胞凋亡,凋亡率达到了 36.6%;而 DMSO 组几乎

不引起细胞凋亡;BTW10 和 BTW11 也能诱导 SNU-387 凋亡,在浓度为 50 、 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其凋亡率分别为 24.0% 、 23.2% 、 22.8% 和 56.0% 、 34.1% 、 32.5% (如表 2)。

2.3 BTW10 和 BTW11 对 Bcl-2 和 Bax 的影响

在作用 24 h 后,以 DMSO 为空白对照组,顺铂在 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时能降低 Bcl-2/Bax,具有显著性差异($P < 0.05$);高浓度 BTW10,能降低 Bcl-2/Bax,具有

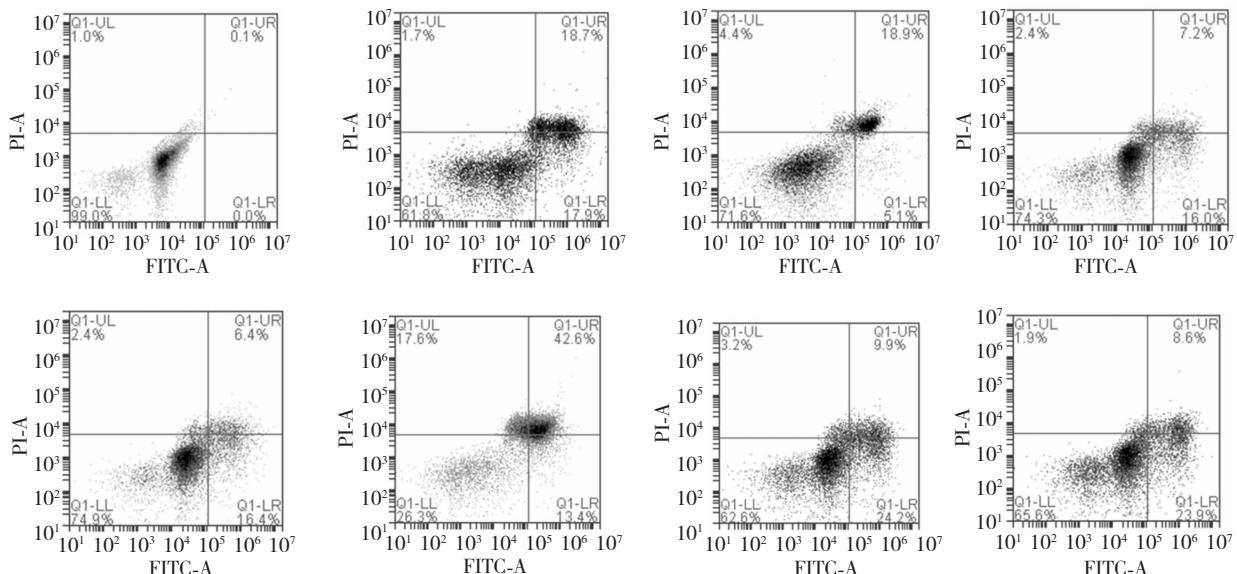


图 3 BTW10 和 BTW11 对 SNU-387 细胞凋亡的影响($n=5$)

Fig. 3 Effect of BTW10 and BTW11 on apoptosis of SNU-387 cells ($n=5$)

表 2 不同浓度下 BTW10 和 BTW11 的细胞凋亡率 ($n=5$)Table 2 Apoptosis rate of BTW10 and BTW11 under different concentrations ($n=5$)

分组 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	凋亡率 Apoptosis rate (%)
DMSO	0	0
顺铂 PC	50	36.6 *
BTW10	50	24.0 *
BTW10	10	23.2 *
BTW10	2	22.8 *
BTW11	50	56.0 *
BTW11	10	34.1 *
BTW11	2	32.5 *

^{*} $P < 0.05$ vs blank group.

显著差异 ($P < 0.05$)，而在中、低浓度下，虽有一定程度的降低，但无统计学意义 ($P > 0.05$)；高、中、低浓度的 BTW11 均能显著降低 Bcl-2/Bax ($P < 0.05$) (如表 3)。

表 3 BTW10 和 BTW11 对 SNU-387 细胞 Bcl-2/Bax 影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 3 Effect of BTW10 and BTW11 on Bcl-2/Bax of SNU-387 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Bcl-2/Bax
DMSO	0	1.94 ± 0.09
顺铂 PC	50	$1.51 \pm 0.08^*$
BTW10	50	$1.60 \pm 0.08^*$
BTW10	10	1.82 ± 0.05
BTW10	2	1.84 ± 0.11
BTW11	50	$1.48 \pm 0.10^*$
BTW11	10	$1.64 \pm 0.09^*$
BTW11	2	$1.61 \pm 0.04^*$

^{*} $P < 0.05$ vs blank group.

3 讨论与结论

白头翁始载于《神农本草经》，主温疟狂易寒热、症瘕积聚、癰气、逐血止痛、金疮，其中“症瘕积聚”为现代医学中肿瘤的范畴，这说明古人已把白头翁用于治疗肿瘤。白头翁类的化合物有很多种，已有文献报道^[9]，白头翁皂苷 D 对肝癌细胞有一定的抗癌作用，但并未研究它的机制，而本文从白头翁类其它化合物入手，研究它的抗癌作用，进而研究它的抗癌机制。本实验研究发现，白头翁系列样品

(BTW2、BTW3、BTW5、BTW6、BTW10、BTW11) 在体外对人肝癌 SNU-387 细胞有明显的抑制增殖作用，具有较好的体外抗肿瘤活性。

细胞死亡分为两种方式，即坏死与凋亡，细胞凋亡又称程序性细胞死亡 (Programmed cell death, PCD)^[10]。它是一个主动的过程，在凋亡刺激信号的刺激下，经过一系列的信号途径转导，启动细胞内的死亡机制，细胞开始程序性死亡的过程，其形态学特征的改变是 DNA 的裂解、染色质的固缩、膜的发泡、细胞的皱缩以及最终形成凋亡小体^[11-15]。流式细胞仪结果发现 BTW10 和 BTW11 均能诱导人肝癌 SNU-387 细胞凋亡，且凋亡率和样品浓度有一定剂量关系。

细胞凋亡的通路主要有三个：外源性途径(死亡受体途径)、内源性途径(线粒体途径)和内质网途径，其中以线粒体通路最为经典，也是研究比较热门的一个通路。在整个线粒体通路中，Bcl-2 蛋白家族的促凋亡蛋白 Bax 是这个途径的主要介导者^[16,17]，在凋亡刺激信号产生时，Bax 得到活化转入到线粒体上，破坏线粒体通透性，释放细胞色素 C，从而诱导下游凋亡信号的产生。当然除了促凋亡蛋白外，还有与之相对立的抑凋亡蛋白 (Bcl-2 等)，Bcl-2 家族成员中的抗凋亡蛋白和抑凋亡蛋白构成了线粒体途径凋亡的“分子开关”^[18,19]。Bax 和 Bcl-2 通过形成同源二聚体或异源二聚体来调节细胞的凋亡，当 Bax 形成同源二聚体则会诱导细胞凋亡的产生^[20,21]，当 Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时，则表现为抑制细胞凋亡。所以 Bcl-2/Bax 升高还是降低决定了细胞的凋亡与否，当 Bcl-2 过度表达此时形成异源二聚体，抑制细胞凋亡，相反引起其细胞凋亡则由于 Bax 占优势^[22,23]。Elisa 试验结果表明，阳性药顺铂、BTW10、BTW11 均能降低 Bcl-2/Bax。因此可推断 BTW10 和 BTW11 诱导细胞凋亡的机制是通过上调 Bax 和下调 Bcl-2，从而使线粒体发生一系列的改变，导致 Caspase 蛋白激活，启动细胞凋亡程序。关于这两个化合物对肝癌细胞影响的研究，还未见有报道，因此本结果为进一步将白头翁开发抗肿瘤新药奠定了一定基础。

参考文献

- 1 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), Part 1. Beijing: China Medical Science

- Press, 2010.
- 2 Liu WK, Ho JC, Cheung FW, et al. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur J Pharmacol*, 2004, 498(1-3): 71-78.
 - 3 Cai Y(蔡鹰), Lu Y(陆瑜), Liang BW(梁秉文), et al. Experimental studies *in vivo* anti-tumor effect of Pulsatilla. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1999, 30: 929-931.
 - 4 Zhong Q(钟邱), Ni QZ(倪琼珠). *Pulsatilla chinensis* saponins on inhibition of tumor cells. *Chin Med Mat*(中药材), 2004, 27: 604-605.
 - 5 Hong SW, Jung KH, Lee HS, et al. SB365 inhibits and angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellulai carcinoma through modulation of PI3K_Akt_mTOR signaling pathway. *Cancer Sci*, 2012, 103: 1929-1937.
 - 6 Hong SW, Jung KH, Lee HS, et al. SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway. *Food Chem*, 2013, 136(1): 26-33.
 - 7 Hong SW, Jung KH, Lee HS, et al. SB365, Pulsatilla saponin D suppresses proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *Onclogy Reports*, 2013, 30: 801-808.
 - 8 Hong SW, Jung KH, Lee HS, et al. SB365, Pulsatilla saponin D, targets c-Met and exerts antiangiogenic and antitumor activities. *Carcinogenesis*, 2013, 4: 2156-2169.
 - 9 Xu K(徐坤), Su Z(苏展), Wang YL(王永林), et al. Effect of Pulsatilla saponin Don hepatocarcinoma *in vivo* and *in vitro*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2014, 36: 240-244.
 - 10 Zhao YC(赵彦超), Gu Y(顾耘). Research progress in cell apoptosis pathway. *Mod J Med*(现代医学), 2013, 41: 285-288.
 - 11 Luo YY(罗颖颖), Chen LY(陈兰英), Cui YR(崔亚茹), et al. Effects of *Pulsatilla chinensis* saponins on proliferation and apoptosis of HT29 cells. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中药新药与临床), 2013, 29(5): 52-56.
 - 12 Lu LH(陆立鹤), Wu WK(吴伟康). Research progress in cell death way. *Int J Pathol Clin Med*(国际病理科学与临床杂志), 2005, 25: 507-510.
 - 13 Tu XQ(涂显琴). Research in anti-tumor activity of extracts isolated from *Anthriscus sylvestris*. Chengdu: Southwest Jiaotong University (西南交通大学), MSc. 2012.
 - 14 Xu QJ(许秋菊), Hou LL(侯莉莉), Hu GQ(胡国强), et al. Molecular mechanism of ophiopogonin B induced cellular autophagy of human cervical cancer HeLa cells. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2013, 48: 855-859.
 - 15 Ma GQ(马国琴), Li TQ(李天庆). Research in chemical component and pharmacological effects of *Lithospermum erythrorhizon*. *Gansu J Tradit Chin Med*(甘肃中医学院学报), 2013, 32(2): 78-80.
 - 16 Wang HX(王海侠), Zheng XY(郑新勇), Gao J(郜尽), et al. Pulchnenoside B4 inhibits proliferation and induces apoptosis of human liver cancer cell line HepG2 *in vitro*. *J Shanghai Jiaotong Univ*(上海交通大学学报), 2011, 31: 1481-1485.
 - 17 Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, et al. The bcl-2 family reunion. *Mol Cell*, 2010, 37: 299-310.
 - 18 Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecul Cellul Biochem*, 2011, 351(1-2): 41-84.
 - 19 Wu Z(吴振), Wu LJ(吴立军), Tian DZY(田代真一), et al. Shikonin induce Hela cell apoptosis via a caspase-dependent mechanism. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2004, 20: 540-543.
 - 20 Yuan CL(袁春里), Sun L(孙立), Yuan ST(袁胜涛), et al. Pharmacological activities and possible mechanism of effective components in *Ophiopogonis radix*. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2013, 22: 2496-2501.
 - 21 Liu Q, Chen WC, Jiao Y, et al. Pulsatilla saponin A, an active molecule from *Pulsatilla chinensis* induces cancer cell death and inhibits tumor growth in mouse xenograft models. *J Surgical Res*, 2014, 188: 387-395.
 - 22 Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, et al. Mitochondrial implication in accidengtal and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Biomembranes*, 2013, 29: 185-193.
 - 23 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzsmi N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*, 1999, 189: 381-394.