

## 黄芪甲苷对人参皂苷 CK 肿瘤细胞摄取及抗肿瘤作用的影响

汪晶<sup>1,2</sup>, 杨蕾<sup>1,2</sup>, 金鑫<sup>1,2</sup>, 严红梅<sup>1,2</sup>, 孙娥<sup>1,2</sup>, 侯健<sup>1,2</sup>, 张振海<sup>1,2\*</sup>, 贾晓斌<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

**摘要:** 目的 考察黄芪甲苷(AS-IV)对人参皂苷 CK(GCK)肿瘤细胞摄取和抗肿瘤药效的影响。方法 采用人非小细胞肺癌细胞 A549 作为肿瘤细胞模型,通过 MTT 法比较两者配伍与单用 GCK 的细胞毒性;用荧光法和 HPLC 法考察了 AS-IV 与配伍 GCK 后细胞对 GCK 的摄取率变化,建立裸鼠荷瘤模型考察 AS-IV 对 GCK 的体内增效作用。结果 配伍 AS-IV 后, GCK 对 A549 细胞的生长抑制作用增强,肿瘤细胞对 GCK 的摄取增加,且随着 AS-IV 比例的升高,效果更加显著。荷瘤小鼠实验表明,AS-IV 增加了 GCK 的体内抗肿瘤作用。结论 AS-IV 配伍 GCK 具有增强 GCK 抗肿瘤药效的作用。

**关键词:** 黄芪甲苷; 人参皂苷 CK; 肺癌细胞 A549; 细胞摄取; 细胞毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2308-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.017

## Effect of astragaloside IV on tumor cellular uptake and antitumor efficacy by ginsenoside compound K

WANG Jing<sup>1,2</sup>, YANG Lei<sup>1,2</sup>, JIN Xin<sup>1,2</sup>, YAN Hong-mei<sup>1,2</sup>, SUN E<sup>1,2</sup>, HOU Jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhen-hai<sup>1,2</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1,2</sup>

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of astragaloside IV on tumor cellular uptake and antitumor efficacy by ginsenoside compound K (GCK). **Methods** The human lung adenocarcinoma cell line A549 was prepared as an antitumor model, the cytotoxicity of the mixtures of GCK and astragaloside IV to A549 cells was determined by MTT assay, the cellular uptake of GCK was detected by fluorescence microscopy, and the intracellular GCK was determined by HPLC. The enhancement of astragaloside IV *in vivo* efficacy by GCK was evaluated by nude mice bearing tumor model. **Results** The effect of GCK on the inhibition of A549 cell proliferation was enhanced in the presence of astragaloside IV and astragaloside IV could increase the uptake rate of GCK in A549 cells, with the proportion of astragaloside IV increasing, the cytotoxicity was significantly stronger than GCK and the uptake rate was improved. *In vivo* antitumor assay of mice bearing tumor indicated that astragaloside IV could enhance the antitumor efficacy of GCK. **Conclusion** Preliminary results indicate that the mixture of GCK and astragaloside IV have the effect of enhancing antitumor efficacy.

**Key words:** astragaloside IV; ginsenoside compound K; human lung adenocarcinoma cell line A549; cell uptake; cytotoxicity

黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)为黄芪的主要活性成分之一,现代药理研究表明,AS-IV具有抗肿瘤、增强机体免疫功能、强心、降压、降血糖、抗疲劳、利尿、抗衰老等作用<sup>[1-3]</sup>。人参皂苷 CK(ginsenoside compound K, GCK)为人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

经肠道细菌作用转化而来,具有抗过敏、抗肿瘤、抗炎、抗衰老、保肝等药理作用<sup>[4-6]</sup>。研究<sup>[7-8]</sup>表明 AS-IV 和人参皂苷配伍用于心脑血管疾病的治疗,可增加药效,减少心脏毒性。尽管 GCK 具有较好的抗肿瘤作用,但其水溶性及膜渗透性较差,存在

收稿日期: 2016-01-27

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81403119)

作者简介: 汪晶, 助理研究员。E-mail: wjpharmacy@126.com

\*通信作者 贾晓斌, 研究员。Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: ji Xiaobinpharmacy@163.com

张振海, 副研究员。Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: davidpharm@aliyun.com

细胞外排现象, 限制了其药效的发挥。研究发现 AS-IV 通过减少 P-糖蛋白(P-gp)的表达, 抑制 P-gp 介导的药物外排, 从而提高所配伍药物的抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。为进一步提高 GCK 的药效, 本实验在肺癌细胞 A549 模型上考察 AS-IV 对 GCK 药效及细胞摄取的影响, 并采用裸鼠荷瘤模型初步证明 AS-IV 和 GCK 的配伍增效作用, 为 AS-IV 与 GCK 的配伍增效及其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Millipore 超纯水仪(Millipore, Bedford, MA, 美国); KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP-211D 分析电子天平(德国 Sartorius 公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); H-7650 日立透射电子显微镜(日立高新技术国际贸易有限公司, 日本); 85-2 恒温磁力加热搅拌器(金坛市奥瑞电器厂); 酶标仪(美国 Bio-rad 公司); 荧光显微镜(Olympus 公司)。

### 1.2 药品与试剂

AS-IV 原料药(大连美仑生物技术有限公司, 质量分数>98%, 批号 O1106A); GCK 原料药(自制, 质量分数 90%); GCK 对照品(景竹生物科技有限公司, 质量分数 98%, 批号 JZ15010202); DAPI(全称?) (Sigma 公司, 批号 083M4157V); DiR 染料(上海哥兰低温设备有限公司, 批号 D60017); 香豆素-6 (Aldrich, 批号 1001283600); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 南京生兴生物技术有限公司); DMEM 不完全高糖培养基(南京凯基生物科技发展有限公司); 胎牛血清(Gibco); 乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 细胞与动物

人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司; 裸鼠由常州卡文斯实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(苏)2011-0003。

## 2 方法与结果

### 2.1 统计学方法

结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 组间比较采用单因素方差分析。

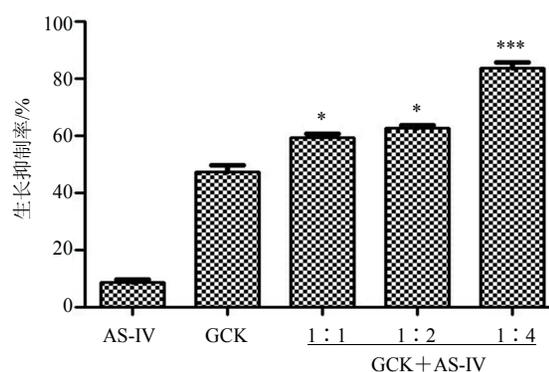
### 2.2 细胞毒性实验

取状态良好并处于对数生长期的肺癌细胞 A549, 胰酶消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释并吹散, 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于

96 孔板, 100  $\mu$ L/孔, 置 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h 使其贴壁。将 GCK 与 AS-IV 于少量二甲亚砜(DMSO)中溶解, 以无血清 DMEM 培养基分别稀释, GCK 的终浓度为 42  $\mu$ mol/L, GCK 与 AS-IV 的物质的量比为 1:1、1:2、1:4 (DMSO 体积分数均低于 0.1%), 每孔加 100  $\mu$ L; 同时设对照孔, 加入等量空白培养基; 设 AS-IV 单用组, 加入 AS-IV 终浓度为 160  $\mu$ mol/L, 每个浓度 6 个复孔, 继续于培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu$ L, 置培养箱中孵育 4 h。甩板, 小心吸去孔内剩余液体, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 于振荡器上震荡 10 min 后, 于酶联免疫检测仪 570 nm 处检测各孔的吸光度(A)值, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

GCK、GCK 与 AS-IV (1:2) 分别孵育 24 h, 对 A549 细胞生长的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值分别为(42.28 $\pm$ 0.36)、(36.45 $\pm$ 0.21)  $\mu$ mol/L, 发现与 AS-IV 配伍后 GCK 对 A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值降低, 差异具有显著性( $P < 0.05$ )。GCK (42  $\mu$ mol/L)、GCK 与 AS-IV 配比分别为 1:1、1:2、1:4 孵育 A549 细胞 24 h 的细胞生长抑制率见图 1。可见, GCK 与不同比例 AS-IV 配伍对 A549 细胞生长的抑制率高于 GCK 组, 且差异显著( $P < 0.05, 0.001$ )。AS-IV 以近 4 倍于 GCK 浓度给药对细胞的抑制率为 8.72%, 说明 AS-IV 体外对 A549 细胞的生长无明显抑制作用。



与 GCK 组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$   
\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs GCK group

图 1 GCK、AS-IV 与两者不同比例配伍对 A549 细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Inhibition of GCK, AS-IV, and mixture of GCK and AS-IV in different ratios on proliferation of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 2.3 细胞荧光摄取实验

香豆素-6 自身是一种荧光染料, 由于存在跟人参皂苷一样的 P-糖蛋白 (P-gp) 外排作用, 细胞摄取不佳, 故选择香豆素-6 作为替代物先行进行细胞荧光摄取实验。将 A549 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 24 孔培养板, 孵育 24 h 使其贴壁, 弃去旧培养基, 给予经无血清的 DMEM 培养基稀释的香豆素-6 和加入不同比例 AS-IV 的香豆素-6 溶液 (香豆素-6 与 AS-IV 的物质的量比 1:1、1:2、1:4), 分别继续培养 2 h。孵育结束后, 快速弃去培养液, 加入冷的 PBS 终止细胞摄取, 并冲洗细胞 3 次后, 4 °C 下用无水乙醇固定 30 min, 加 DAPI 染料进行染色 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 继续孵育 10 min, 适量 PBS 冲洗, 于荧光显微镜下观察细胞摄取情况。图 2 反映了香豆素-6、不同比例 AS-IV 和香豆素-6 的混合溶液的细胞摄取能力, 图中蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核, 绿色荧光为进入细胞的香豆素-6。单用香豆素-6 组的细胞绿色荧光较弱, 随着 AS-IV 的加入及配比的提高, 细胞内绿色荧光逐渐增强, 说明 AS-IV 的加入能使更多的香豆素-6 进入肿瘤细胞。

### 2.4 细胞摄取 GCK 实验

**2.4.1 供试品溶液的制备** 将 A549 细胞接种于 6 孔板上, 于细胞培养箱中培养 24 h, 弃去原培养基, 分别加入经无血清培养基稀释的 GCK (42  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )

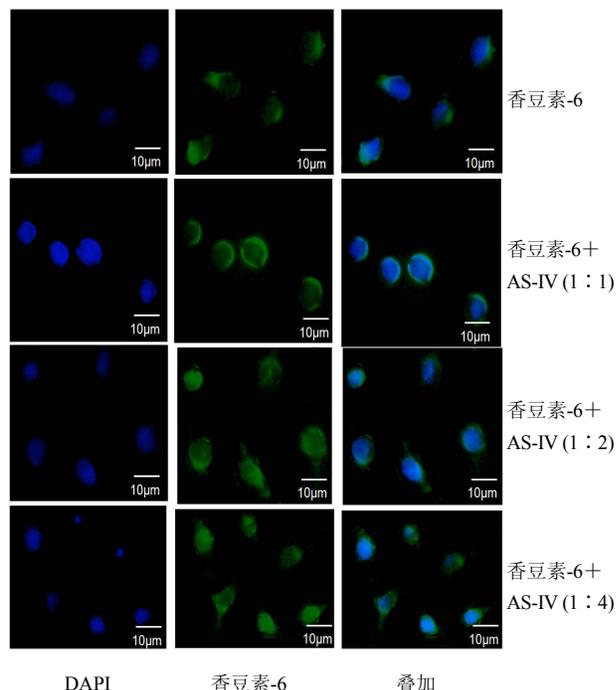


图 2 AS-IV 对香豆素-6 细胞摄取的影响

Fig. 2 Effect of AS-IV on cell uptake of coumarin-6

或 GCK 与 AS-IV 配比为 1:1、1:2、1:4 的混合物, 孵育 4 h 后, 弃去培养基, 加入冷的 PBS 终止细胞摄取, 并冲洗细胞以除去未摄取药物。加入 1 mL 裂解液, -20 °C 下冷冻 30 min 后刮取细胞, 37 °C 下融化并收集细胞悬液, 离心, 吸取上清液置于另一离心管中, 氮气吹干, 甲醇复溶, 过 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜, 定容, 即得供 HPLC 测定 GCK 供试品溶液。

**2.4.2 对照品溶液的配制** 精密称取 GCK 对照品 11.60 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 1.16 mg/mL 对照品储备液。精密吸取 GCK 对照品储备液分别加甲醇稀释成 124.00、62.00、31.00、15.50、7.75、3.87、1.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对照品溶液, 备用。

**2.4.3 色谱条件** 色谱柱为 Agilent  $\text{C}_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈-水 (60:40); 检测波长为 203 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.4.4 线性关系考察** 取“2.4.2”项中配制的系列对照品溶液, 按上述色谱条件进样, 以对照品溶液的进样质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积积分值 (A) 为纵坐标, 得到标准曲线:  $A = 3.0353C + 9.9883$ ,  $r^2 = 0.9997$ , 结果显示, GCK 在 1.94~124.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性关系良好。

**2.4.5 精密度试验** 精密吸取 GCK 31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对照品溶液, 连续进样 6 针, 记录 GCK 峰面积, 结果峰面积 RSD 值为 1.35%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.6 稳定性试验** 精密称取 GCK 供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样 20  $\mu\text{L}$ , 测定 GCK 的峰面积, 考察 GCK 溶液的稳定性。结果 GCK 在 12 h 内保持稳定, RSD 值为 0.93%。

**2.4.7 重复性试验** 平行制备 6 份 GCK 供试品溶液, 进行测定, 结果 GCK 质量浓度的平均值为 26.43  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , RSD 为 1.02%, 表明此方法重复性良好。

**2.4.8 加样回收率试验** 根据《中国药典》2010 年版第二部附录 XIXA 项下方法, 设计高、中、低 (18.6、24.8、31.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 3 个质量浓度, 且每个质量浓度平行制备 3 份供试品溶液, 进行加样回收率试验。结果平均加样回收率为 98.95%, RSD 为 1.28%, 表明此测定方法回收率良好。

**2.4.9 细胞对 GCK 的摄取率** 细胞对 GCK 的摄取率按照公式计算: 摄取率 = 细胞摄取 GCK 药物量 / 初始 GCK 加药量。各组药物作用后细胞的摄取率

结果见表 1。相比 GCK 组，不同比例的 AS-IV 和 GCK 配伍，A549 细胞对 GCK 的摄取率均有所提高，且随着 AS-IV 比例的增加而摄取率增加明显，GCK 也更容易被 A549 细胞摄取。

2.5 体内抗肿瘤活性实验

收集对数期生长的 A549 细胞，调整细胞浓度

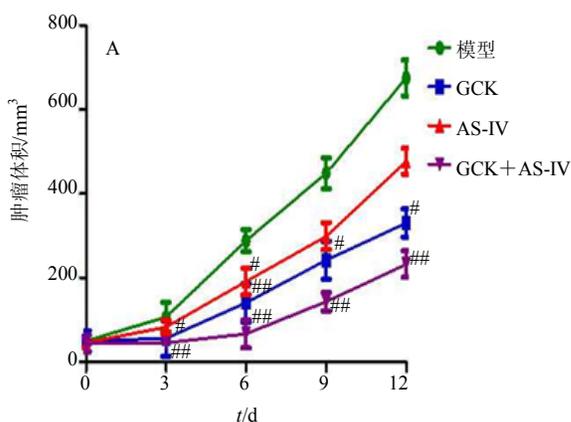
表 1 GCK、GCK 与不同比例 AS-IV 配伍作用 A549 细胞 4 h 后细胞对 GCK 的摄取率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Uptake rates of GCK in A549 cells treated with GCK and mixture of GCK and AS-IV in different ratios for 4 h ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	配比	GCK 摄取率/%	提高率/%
GCK	—	26.97±0.27	—
GCK+AS-IV	1 : 1	32.89±0.62*	21.95
	1 : 2	38.24±0.33*	41.78
	1 : 4	44.14±0.46**	63.66

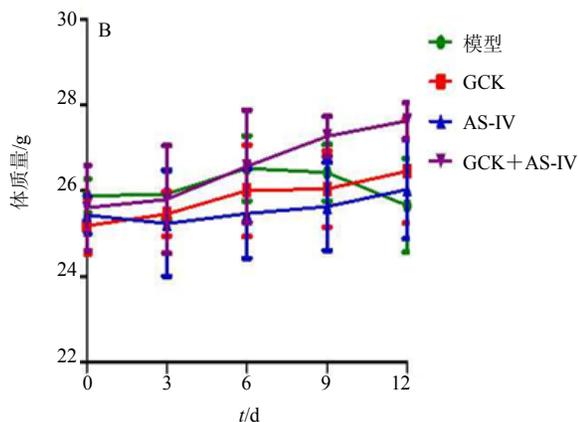
与 GCK 组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs GCK group



为  $2 \times 10^7$  个/mL，接种于小鼠背部靠近右前肢处 (0.2 mL/只)。待荷瘤体积达到 50 mm<sup>3</sup> 左右，随机分为以下 4 组：模型组 (生理盐水 0.2 mL/只)、GCK 组 (GCK 溶液 0.2 mL/只, 30 mg/kg<sup>[6,10]</sup>)、AS-IV (AS-IV 溶液 0.2 mL/只, 30 mg/kg)、GCK 与 AS-IV 配伍组 (GCK 与 AS-IV 混合溶液 0.4 mL/只, 30 mg/kg+30 mg/kg)。各组每隔 2 d ip 给药 1 次，给药 4 次，每天监测肿瘤体积变化及裸鼠体质量变化。肿瘤体积 =  $(a \times b^2) / 2$ ，其中  $a$  代表瘤体最长直径， $b$  表示垂直于  $a$  的最短直径。在实验结束时，将动物处死，获取肿瘤，并称质量。

图 3 反映了给予小鼠不同的药物，肿瘤的生长情况及小鼠体质量变化。表 2 反映了给药后各组小鼠肿瘤质量的变化。结果表明，随着时间的变化，AS-IV 组肿瘤体积与模型组有一定的差异，说明 AS-IV 具有一定的抗肿瘤活性；配伍组及 GCK 组肿瘤体积与模型组均有明显的差异，且配伍组抑瘤率较 GCK 组高，说明 AS-IV 对 GCK 有增效作用。



与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图 3 GCK、AS-IV、GCK 和 AS-IV 配伍对肿瘤体积 (A) 和裸鼠体质量 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of GCK, AS-IV, and mixture of GCK and AS-IV on tumor volumes (A) and body weight (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

表 2 不同给药组抑瘤率 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Tumor inhibitory ratio of different drug treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	平均瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	0.787 ± 0.327	—
GCK	30	0.448 ± 0.262##	43.14
AS-IV	30	0.596 ± 0.337	24.34
GCK+AS-IV	30+30	0.385 ± 0.214###*	51.11

与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 与 GCK 组比较: \* $P < 0.05$

### $P < 0.01$  vs model group; \* $P < 0.05$  vs GCK group

3 讨论

黄芪在传统中医治疗中常用于肿瘤治疗的辅助药物<sup>[11-12]</sup>，其主要活性成分 AS-IV 可下调 Vav3.1，MMP-2、9 等多种与肿瘤细胞增殖有关基因的表达<sup>[13-14]</sup>，还可以通过免疫调节作用，上调细胞毒性 T 淋巴细胞的数量，下调调节性 T 细胞的数量，增强机体对肿瘤的自身免疫<sup>[15]</sup>。与其他药物配伍时，可通过抑制 P-糖蛋白的外排作用，提高受 P-gp 阻滞的药物的生物利用度<sup>[9]</sup>。

本研究通过建立体内外抗肿瘤模型，考察

AS-IV 对 GCK 的增效作用。在细胞模型上, 通过细胞毒性实验和细胞摄取实验考察了 AS-IV 对 GCK 抑制 A549 细胞增殖的影响。MTT 实验结果表明, 两者配伍后对 A549 细胞增殖的抑制作用较单用 GCK 增强。肿瘤细胞摄取实验结果表明, 配伍 AS-IV 后, GCK 的细胞摄取量增加, 增强了 GCK 的细胞毒性。在裸鼠荷瘤模型上, AS-IV 与 GCK 配伍后, 肿瘤抑制效果显著提高。可能的原因是 AS-IV 可逆转 MDR1 基因编码 P-gp, 从而减少细胞对 GCK 的外排作用, 而且 AS-IV 自身也具有一定的抗肿瘤作用, 两者配伍可以达到增效的作用。本研究发现 AS-IV 与 GCK 配伍可增加 GCK 的肿瘤细胞摄取, 其具体机制有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 杨娟, 王洪新, 张英杰, 等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素致小鼠心肌细胞肥大的影响及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3018-3023.
- [2] Tin M M, Cho C H, Chan K, *et al.* Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1347-1355.
- [3] Man S, Gao W, Zhang Y, *et al.* Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 703-714.
- [4] Chen Y, Xu Y, Zhu Y, *et al.* Anti-cancer effects of ginsenoside compound K on pediatric acute myeloid leukemia cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 1-6.
- [5] Yang X D, Yang Y Y, Ouyang D S, *et al.* A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K [J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 208-220.
- [6] Chae S, Kang K A, Chang W Y, *et al.* Effect of compound K, a metabolite of ginseng saponin, combined with  $\gamma$ -ray radiation in human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(13): 5777-5782.
- [7] 陆文娟, 周婧, 马宏跃, 等. 黄芪甲苷、人参总皂苷和西洋参总皂苷对蟾酥致小鼠心律失常的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(1): 61-64.
- [8] 黄小平, 王蓓, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 220-226.
- [9] Wang P P, Xu D J, Huang C, *et al.* Astragaloside IV reduces the expression level of P-glycoprotein in multidrug-resistant human hepatic cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2131-2137.
- [10] 张雪梅. 人参皂苷 C-K 静脉乳剂的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [11] 桑国优, 韦世秀, 刘成军. 黄芪抗肿瘤作用机制和临床应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 3032-3034.
- [12] 甘宁, 陈焕朝. 黄芪注射液辅助化疗治疗老年肺癌的疗效观察 [J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(7): 433-434.
- [13] Qi H, Wei L, Han Y, *et al.* Proteomic characterization of the cellular response to chemopreventive triterpenoid astragaloside IV in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(3): 725-735.
- [14] 马鹏飞, 阮柏, 王德盛, 等. 黄芪甲苷对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及其机制研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(5): 1012-1015.
- [15] Zhang A, Zheng Y, Que Z, *et al.* Astragaloside IV inhibits progression of lung cancer by mediating immune function of Tregs and CTLs by interfering with IDO [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(11): 1883-1890.