

竹节香附素 A 对人肝癌细胞 HepG₂ 增殖的抑制作用

林小钦, 李东良*, 杨才生, 何秀华, 方 坚

(福建医科大学福总临床学院·南京军区福州总医院 肝胆内科, 福建 福州 350025)

摘要 目的 探讨竹节香附素 A 对人肝癌细胞 HepG₂ 增殖的影响。方法 将不同质量浓度的竹节香附素 A 与 HepG₂ 细胞共同培养, 采用 MTT 比色法及细胞集落形成法检测竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞生长、增殖的影响。结果 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞生长的 IC₅₀ 为 8.94 μg/mL。与未处理组相比, 5、10、20、40 μg/mL 的竹节香附素 A 分别与 HepG₂ 细胞共同培养 72 h, 在培养 24 h 时的细胞增殖抑制率分别为: (24.81±0.55)%、(39.17±1.30)%、(62.45±7.56)%、(79.93±5.48)%, 在培养 48 h 时的抑制率为 (35.67±0.81)%、(49.73±9.18)%、(71.62±1.03)%、(87.06±1.84)%, 在培养 72 h 时的抑制率为 (42.52±1.31)%、(59.75±7.47)%、(78.85±3.15)%、(91.36±0.84)%; 顺铂对照组在细胞培养 24、48、72 h 的抑制率分别为 (2.60±0.53)%、(60.55±5.66)%、(82.61±8.95)%。竹节香附素 A 各剂量的作用与未处理组相比, 在各时间点均有显著差异 ($P<0.001$); 与顺铂相比, 竹节香附素 A 起效更快, 24 h 检测具有显著差异 ($P<0.001$); 5、10、20 μg/mL 剂量在 24 h 以外的时间点与顺铂相比无差异, 40 μg/mL 剂量在各时间点对 HepG₂ 细胞的抑制作用仍较顺铂的作用强 ($P<0.01$)。集落形成实验显示, 对照组的集落形成率为 45.47%; 而竹节香附素 A 1.25、2.5、5 μg/mL 3 个剂量组仅分别为 15.73%、7.2%、3.33%, 即集落形成抑制率分别为 (66.75±1.66)%、(84.25±3.11)%、(92.55±2.33)%, 与对照组相比有显著差异 ($P<0.001$)。结论 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞增殖有明显抑制作用, 在一定范围内随着试药质量浓度的升高和作用时间的延长而增强。

关键词: 两头尖; 竹节香附素 A; 肝癌细胞

中图分类号: R282.710.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)01-0049-03

Effect of raddeanin A on the proliferation of human hepatic cancer cells HepG₂

LIN Xiao-qin, LI Dong-liang, YANG Cai-sheng, HE Xiu-hua, FANG Jian

(Fujian Medical University Clinical institute of General Hospital. Department of Live and Gallbladder Medicine,

Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of raddeanin A on the proliferation of human hepatic cancer cells HepG₂. **Methods** Human hepatic cancer cells HepG₂ were co-cultured with different concentrations of raddeanin A, the effect of raddeanin A on the growth of HepG₂ cells was examined using MTT assay and colonogenic assay. **Results** Raddeanin A against the HepG₂ cells with IC₅₀ of 8.94 μg/mL. HepG₂ cells were co-cultured with 5, 10, 20, and 40 μg/mL raddeanin A for 72 h, against the cells proliferation with inhibitory rate of (24.81±0.55)%, (39.17±1.30)%, (62.45±7.56)%, and (79.93±5.48)% at 24 h; (35.67±0.81)%, (49.73±9.18)%, (71.62±1.03)%, and (87.06±1.84)% at 48 h; (42.52±1.31)%, (59.75±7.47)%, (78.85±3.15)%, and (91.36±0.84)% at 72 h, respectively, compared with control group. Cisplatin showed the inhibitory rate of (2.60±0.53)%, (60.55±5.66)%, and (82.61±8.95)%, respectively. Each dose group in comparison with the vehiculum group, were significant differences in various time point ($P<0.001$). In comparison with cisplatin group, raddeanin A inhibited more rapidly the proliferation of HepG₂ cells at 24 h ($P<0.001$). Other concentrations of the compound except at 40 μg/mL, have no difference compared with cisplatin, at different times point. Effect of raddeanin A 40 μg/mL against HepG₂ cells proliferation was still stronger than cisplatin ($P<0.01$) at different times point. Colonogenic assay demonstrated that the colony-forming rate were 15.73%, 7.2%, and 3.33%, respectively, viz colony-forming inhibitory rate were (66.75±1.66)%, (84.25±3.11)%,

* 通讯作者 李东良(1963—),男,教授,研究生导师,主要从事病毒性肝炎及肝癌的临床与基础研究。

Tel: 0591-22859128 E-mail: dongliangli@gmail.com

and $(92.55 \pm 2.33)\%$, respectively, compared with the control group were significantly different ($P < 0.001$). **Conclusion** Raddeanin A showed significantly inhibitory on proliferation of HepG₂ cells *in vitro*, and at certain range the inhibitory effects was depended on the medicine concentration and treating times.

Key words: *Anemone raddeana* Regel, raddeanin A, HepG₂ cells

竹节香附又称两头尖,为毛茛科植物多被银莲花 *Anemone raddeana* Regel 的干燥根茎,具有祛风除湿,消痈肿之功效,临床上主要用于治疗风寒湿痹、手足拘挛、骨节疼痛等病症^[1]。20世纪80年代对其化学成分研究较多,先后分离并鉴定出多种化合物,主要是三萜皂苷类。在药理活性研究中发现,三萜皂苷中的竹节香附素 A (raddeanin A) 在体外有细胞毒活性^[2-3],对多种肿瘤细胞显示出较强的抑制作用^[4]。但其对人肝癌细胞的作用尚不明确。笔者进一步观察了竹节香附素 A 对人肝癌细胞株 HepG₂ 增殖的抑制作用,旨在为竹节香附素 A 治疗恶性肿瘤提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

竹节香附素 A (成都曼思特生物科技有限公司产品, HPLC 测定其质量分数 $\geq 98\%$), 用二甲亚砜 (DMSO, 上海化学试剂公司生产) 配成 100 mg/mL 储备液, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。顺铂 (齐鲁制药有限公司), DMSO 溶解备用。MTT 溶液 (美国 Sigma 公司), 用 PBS 新鲜配制成 5 mg/mL 备用。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG₂ 购于美国国立癌症研究所, 福建省肿瘤医院免疫实验室传代保存。HepG₂ 细胞在含 10% 胎牛血清 (HyClone 公司产品) 的 RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司) 中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养, 隔天换液 1 次, 2.5 g/L 胰酶/二乙胺四乙酸 (EDTA) 消化传代。取对数生长期细胞制备单细胞悬液进行实验。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

将 HepG₂ 细胞悬液以每孔 200 μL (1×10^4 细胞) 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 且待细胞贴壁生长良好后吸去原培养液, 更换新鲜培养液, 并加药处理。实验分为 7 组: 竹节香附素 A 4 个剂量组, 向 4 组培养基加入竹节香附素 A, 使其终质量浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ (其中 DMSO 终浓度不超过 0.1%); 阴性对照组 (不加药物、加等体积培养液); 阳性对照药顺铂 (6 $\mu\text{g/mL}$) 组; 溶媒对照组 (加等体积 DMSO)。每组均设 4 个复孔。加药后

常规培养, 培养过程不换液, 分别于培养 24、48、72 h 加 MTT (5 mg/mL) 20 μL , 继续培养 4 h 后离心弃上清液, 加 DMSO 150 μL , 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。最后在酶标仪 (STAT FAS-2100) 上用双波长 (492、630 nm) 测定各孔吸光度 (A) 值。试验重复 3 次, 取平均值。按以下公式计算抑制率: 抑制率 (%) = $(1 - \text{药物组 A 值} / \text{阴性对照组 A 值}) \times 100\%$ ^[5], 并计算竹节香附素 A 对 HepG₂ 肝癌细胞生长的半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.4 集落形成试验

将细胞制成浓度为 250/mL 的细胞悬液, 使其中的细胞充分分散, 按每孔 1 mL 接种于 24 孔板, 培养 24 h 且待细胞贴壁生长良好后吸去原培养液, 更换新鲜培养液, 并加竹节香附素 A, 使其终质量浓度分别为 1.25、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$, 并设阴性对照。每组设 3 个复孔, 连续培养 1 周, 弃上清液, 10×10 倍显微镜下集落计数, 20 个以上的细胞为一个集落。按下式计算集落形成率 (PE) 和集落形成抑制率。PE = (集落数/接种细胞数) × 100%, 集落形成抑制率 (%) = $(1 - \text{给药组集落数} / \text{阴性对照组集落数}) \times 100\%$ ^[5]。

1.5 数据处理

所获数据采用 SPSS 11.5 软件包进行处理, 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 LSD-t 检验, 两样本间比较采用配对 t 检验, 抑制率用 Spearman 秩相关分析。

2 结果

2.1 竹节香附素 A 对肝癌细胞 HepG₂ 的细胞毒性

竹节香附素 A 与阳性对照药物顺铂分别以多种质量浓度与 HepG₂ 细胞共同培养 48 h, 结果两种药物对肿瘤细胞生长的 IC_{50} 分别为 8.94、4.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 竹节香附素 A 对 HepG₂ 细胞增殖的影响

竹节香附素 A 与 HepG₂ 细胞共同培养 72 h, 细胞增殖明显受到抑制, 且抑制作用随其质量浓度的升高和作用时间的延长而增强, 即在一定质量浓度范围内呈量效与时效关系 ($r = 0.972$, $r = 0.949$,

$P<0.001$)。72 h 后各组细胞数迅速减少,呈负增殖状态。在 MTT 检测中,竹节香附素 A 各剂量组在 24、48、72 h 时 A 值均小于阴性对照组,且均具统计学意义 ($P<0.01$),而溶媒对照组与阴性对照组各时间点相比均无统计学意义。与阳性对照药顺铂相比,竹节香附素 A 的抗增殖作用起效更快,在 24 h 各剂量疗效均优于顺铂组 ($P<0.01$);48 h 后顺铂对 HepG₂细胞增殖的抑制作用迅速增强,疗效优于小剂量竹节香附素 A,但大剂量竹节香附素 A (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在各时间点对 HepG₂细胞增殖的抑制作用仍强于顺铂 ($P<0.01$)。结果见表 1,图 1。

表 1 HepG₂细胞经竹节香附素 A 作用不同时间后的吸光度 A_{492} 值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	A 值		
		24 h	48 h	72 h
阴性对照	—	0.379 $\pm$ 0.012	0.557 $\pm$ 0.015	0.711 $\pm$ 0.048
溶媒对照	—	0.371 $\pm$ 0.009	0.561 $\pm$ 0.022	0.710 $\pm$ 0.438
竹节香附素 A	5	0.297 $\pm$ 0.021 * $\Delta\Delta$	0.358 $\pm$ 0.010 **	0.408 $\pm$ 0.027 **
	10	0.217 $\pm$ 0.020 * $\Delta\Delta$	0.280 $\pm$ 0.052 **	0.288 $\pm$ 0.062 **
	20	0.143 $\pm$ 0.032 * $\Delta\Delta$	0.158 $\pm$ 0.006 * Δ	0.148 $\pm$ 0.019 **
	40	0.074 $\pm$ 0.020 * $\Delta\Delta$	0.072 $\pm$ 0.010 * $\Delta\Delta$	0.061 $\pm$ 0.008 * $\Delta\Delta$
顺铂	6	0.372 $\pm$ 0.012	0.220 $\pm$ 0.038 **	0.126 $\pm$ 0.073 **

与阴性对照组比较: ** $P<0.01$; 与顺铂组比较: $\Delta P<0.05$
 $\Delta\Delta P<0.001$

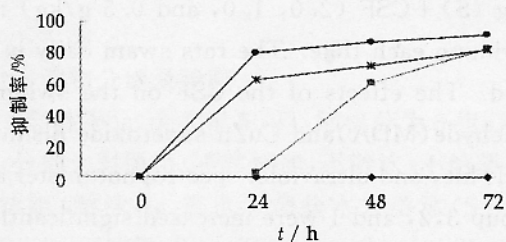


图 1 竹节香附素 A 对 HepG₂细胞增殖的抑制作用

2.3 竹节香附素 A 对 HepG₂细胞集落形成的抑制作用

多种质量浓度的竹节香附素 A 对 HepG₂细胞集落形成具有不同程度的抑制作用,且抑制作用随其质量浓度增加而增强。与阴性对照组相比,竹节香附素 A 给药组集落形成率和集落形成抑制率均有统计学意义 ($P<0.001$),见表 2。

3 讨论

竹节香附载于明朝刘文泰所著《本草品汇精要》^[6]。早在清代,王旭高的“定癌散”就曾以该药材

表 2 竹节香附素 A 对 HepG₂细胞集落形成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	平均集落数	集落形成率/%	集落形成抑制率/%
对照	—	113.67 $\pm$ 8.6	45.47	—
竹节香附素 A	1.25	39.33 $\pm$ 2.52 ***	15.73	66.75 $\pm$ 1.66
	2.50	18.00 $\pm$ 4.58 ***	7.20	84.25 $\pm$ 3.11
	5.00	8.33 $\pm$ 2.08 ***	3.33	92.55 $\pm$ 2.33

与对照组比较: *** $P<0.001$

治疗乳癌。近年来,在对竹节香附活性成分研究中发现竹节香附素 A 具有较强的抑瘤作用^[3-4],对人胃癌细胞 BGC823、人红白血病细胞 K562、人宫颈癌细胞 HeLa 及大鼠成纤维细胞 L929 等肿瘤细胞均显示出较强的抑制作用,但其对人肝癌细胞的作用尚不明确。

在本研究中观察了竹节香附素 A 对肝癌细胞 HepG₂增殖的抑制作用。结果显示竹节香附素 A 对人肝癌细胞 HepG₂生长具有明显抑制作用,IC₅₀为 8.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该活性成分在较低质量浓度就表现出抗肿瘤细胞增殖作用,且这种抑制作用随质量浓度的增加及作用时间的延长进一步加强,即呈剂量-时间相关。另外还发现竹节香附素 A 起效快,24 h 即显示出较强的抑制肝癌细胞生长的作用,而对照药顺铂 48 h 才显效,表明竹节香附素 A 具有强效、快速的抗肿瘤活性,具有潜在的药用价值,但其确切的作用机制尚不清楚。笔者在研究过程发现经竹节香附素 A 处理后,有些细胞胞体缩小,胞核固缩,具有凋亡细胞的某些形态特征,因此,该化合物有可能具诱导肿瘤细胞凋亡的作用。有关竹节香附素 A 在体内的作用方式及其机制有待在以后的研究中进一步探讨,为竹节香附素 A 治疗恶性肿瘤提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京:人民卫生出版社,1959.
- [2] 吴风镔. 中药竹节香附化学成分的研究[J]. 化学学报, 1984,42(3): 253.
- [3] 张嘉岷,曹莉,吴争鸣,等. 竹节香附中三萜类成分的抗肿瘤活性研究[J]. 中国新药杂志,2003,12(3): 191-193.
- [4] 任凤芝,张雪霞,牛桂云,等. 两头尖抗肿瘤活性成分的研究[J]. 中草药,2005,36(12): 1975-1978.
- [5] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2007.
- [6] 刘文泰. 本草品汇精要(上)[M]. 北京:商务印书馆,1959.

(收稿日期 2008-10-22)