

白头翁寒热药性的细胞评价

王 征, 张 宁, 孙艳妮, 刘建利*

西北大学生命科学学院 西部资源与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

摘要: **目的** 通过实验室前期建立的中药寒热药性的细胞评价方法评价中药白头翁的寒热药性。**方法** 用噻唑蓝 (MTT) 比色法考察白头翁对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞体外增殖的影响, 倒置显微镜观察白头翁对细胞形态特征的影响, 台盼蓝染色法分析白头翁的细胞毒作用。**结果** 白头翁在所选质量浓度 10~400 $\mu\text{g/mL}$ 内抑制细胞增殖。形态学观察表明白头翁能使细胞密度减小, 细胞固缩变圆, 颗粒感增加。台盼蓝染色表明白头翁对这两种细胞没有细胞毒作用。**结论** 白头翁性寒, 对所用细胞没有细胞毒作用。

关键词: 白头翁; MTT 法; HeLa 细胞; SGC-7901 细胞; 台盼蓝染色

中图分类号: R285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2013) 05 - 0359 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.009

Evaluation of cold-heat characteristics of *Pulsatillae Radix*

WANG Zheng, ZHANG Ning, SUN Yan-nin, LIU Jian-li

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Objective To evaluate the cold-heat characteristics of *Pulsatillae Radix* by the method we have set up. **Methods** MTT assay was used to investigate the effect of *Pulsatillae Radix* on the proliferation of HeLa and SGC-7901 cells *in vitro*. The morphological changes of HeLa and SGC-7901 cells treated with *Pulsatillae Radix* were observed through inverted microscope. Trypan-blue staining was used to analyze the cytotoxicity of *Pulsatillae Radix*. **Results** *Pulsatillae Radix* could inhibit the proliferation of HeLa and SGC-7901 cells in the concentration range of 10—400 $\mu\text{g/mL}$. Morphological observation showed *Pulsatillae Radix* in the concentration range we have chosen could decrease the density of HeLa and SGC-7901 cells and condense the cells. Trypan-blue staining showed *Pulsatillae Radix* had no cytotoxicity on HeLa and SGC-7901 cells. **Conclusion** *Pulsatillae Radix* is a cold drug and has no cytotoxicity.

Key words: *Pulsatillae Radix*; MTT assay; HeLa cells; SGC-7901 cells; Trypan-blue staining

白头翁始载于《神农本草经》,为毛茛科多年生草本植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的根,其味苦、温,无毒。《中药学》认为其味苦,性寒^[1]。上述文献表明对白头翁寒热药性的认识存在分歧,为了对其寒热药性有一个客观的认识,有必要进行实验研究。本实验室前期建立了评价中药寒热药性的细胞学方法。该方法基于温热药作用于机体表现为生理功能的亢奋,而寒凉药则表现为抑制^[2]。这在用寒、热中药所造的寒证和热证动物模型上也有体现,如热药使动物体温上升、中枢兴奋、代谢

增强;而寒药则相反^[3-4]。这说明中药寒、热药性是客观存在的。由此推测寒、热中药对于离体培养细胞的生长代谢也有一定的影响,即在一定浓度范围内,热药可能会促进细胞生长、代谢、增殖,而寒药会表现为抑制。如果能够用实验证明中药寒热药性与培养细胞的生长情况有相关性,则无疑会提供一种新的评价中药寒、热药性的简便方法^[5-6]。由于人肿瘤细胞相对于正常细胞容易培养,因此,特别适合于这项研究。这项研究也将为从细胞水平认识中药药性开辟新的思路。

收稿日期: 2013-06-20

基金项目: 国家自然科学基金 (20872118); 教育部博士点基金 (20070697012); 陕西省重大科技专项 (2008ZDKG-67); 陕西省重点实验室基金 (08JZ74, 02JS15) 资助项目

作者简介: 王 征,在读博士,现从事天然产物的仿生合成及结构修饰研究。Tel: 18729250806 E-mail: wazh0405@126.com

*通信作者 刘建利 E-mail: jiliu@nwu.edu.cn

噻唑蓝 (MTT) 可透过细胞膜进入细胞内, 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶于水的蓝紫色的甲臞 (formazan) 结晶并沉积在细胞中, 结晶物能被二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量^[7]。通常认为细胞膜丧失完整性, 细胞即可被认为已经死亡。台盼蓝 (Trypan Blue) 是检测细胞膜完整性最常用的生物染色试剂。健康的正常细胞能够排斥台盼蓝, 而死亡细胞膜的完整性丧失, 通透性增加, 细胞可被台盼蓝染成蓝色。依据此原理, 细胞经台盼蓝染色后, 可通过显微镜, 直接镜下计数或拍照后计数, 实现对细胞存活率比较精确的定量分析。

1 材料

1.1 细胞株

人宫颈癌细胞株 HeLa 由西安交通大学医学院提供。人胃癌细胞株 SGC-7901 由第四军医大学提供。

1.2 仪器

μ Quant 酶标仪 (美国 Bio-Tek)、CO₂ 培养箱 (Sanyo 公司)、细胞 96 孔培养板、普通倒置光学显微镜、超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 药品与试剂

白头翁 *Pulsatillae Radix* 购自西安藻露堂医药超市, 经西北大学生命科学学院房敏峰高级工程师鉴定为 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的根; HyClone 改良型 RPMI-1640 培养液 (赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司, 批号 1041001)、四季青无支原体胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 20100628011)、MTT、DMSO、磷酸缓冲液 (PBS)、0.25% 胰蛋白酶 (西安舟鼎国生物技术有限责任公司)、台盼蓝染料 (西安沃尔森生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 受试药品溶液的制备

称取白头翁药材 20 g, 煎煮 3 次, 每次 30 min, 合并煎液, 浓缩, 定容至 20 mL, 质量浓度为 1 g/mL。药液 10 000 r/min 离心 30 min, 上清液用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过, 无菌水稀释至 10 mg/mL, 备用。

2.2 细胞培养

将 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞消化于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 (pH 7.0~7.4) 中, 在恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行传代培养。

2.3 MTT 实验

分别取对数生长期 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞, 调整细胞密度为 5×10^7 /L, 接种于 96 孔板上, 每孔加入 200 μ L RPMI-1640 培养基, 置于恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h, 待细胞贴壁后, 更换新鲜培养液 (200 μ L/孔), 实验组加入等体积不同浓度的药品溶液 (10 mg/mL), 使得每个浓度梯度的终质量浓度分别为 10、20、50、100、200、400 μ g/mL; 同时设置对照组和调零孔, 每个处理组设置 3 个平行孔。加药完毕后 96 孔板置于恒温培养箱中培养 48 h, 换新鲜培养液 (180 μ L/孔), 每孔加入 20 μ L 新鲜配制的 MTT 溶液 (5 g/L), 继续在恒温培养箱中培养 4 h。吸弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10 min (60 次/min) 后, 用酶联免疫标测定仪测定 490 nm 处吸光度 (A) 值。按下列公式计算细胞抑制率。抑制率为正值表示对细胞生长增殖有抑制作用, 负值表示对细胞有促增殖作用^[8]。实验重复 3 次。

$$\text{细胞抑制率} = (1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值})$$

2.4 台盼蓝染色

参照“2.3”项下步骤将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后接种于 96 孔板, 培养 48 h 后更换新鲜培养基, 每孔加入 20 μ L 0.4% 台盼蓝染液, 作用 5 min 后在普通光镜下观察。

2.5 统计学处理

采用 SPSS15.0 进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 白头翁对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞体外增殖的影响

从表 1 可以看出, 白头翁 (10~400 μ g/mL) 对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞的增殖都表现为抑制作用, 以抑制率对浓度作图, 所得曲线见图 1。

从图 1 中可以直观的看到白头翁对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞的增殖整体上表现为抑制, 其抑制率与浓度变化趋势大致相同。白头翁对 HeLa 细胞的最大抑制率所对应的质量浓度为 200 μ g/mL, 最小抑制率对应的质量浓度为 10 μ g/mL。相对于 HeLa 细胞, 白头翁对 SGC-7901 细胞增殖的最大抑制率所对应的质量浓度为 400 μ g/mL, 最低抑制率对应质量浓度为 20 μ g/mL。

总的来说, 白头翁对 HeLa 和 SGC-7901 细胞增殖的影响表现为抑制, 且对两种细胞的抑制曲线大

表1 白头翁对 HeLa 和 SGC-7901 细胞体外增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of *Pulsatillae Radix* on proliferation of HeLa and SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%	细胞	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
HeLa	10	1.197 \pm 0.156*	23.00	SGC-7901	10	0.874 \pm 0.043	13.29
	20	1.182 \pm 0.052**	24.00		20	0.945 \pm 0.038*	6.25
	50	0.647 \pm 0.095**	52.10		50	0.854 \pm 0.056	15.28
	100	0.367 \pm 0.015**	76.20		100	0.568 \pm 0.089*	43.65
	200	0.327 \pm 0.015**	79.00		200	0.398 \pm 0.012**	60.52
	400	0.335 \pm 0.082**	78.44		400	0.295 \pm 0.024**	70.73
对照	—	1.554 \pm 0.043	—	对照	—	1.008 \pm 0.088	—

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

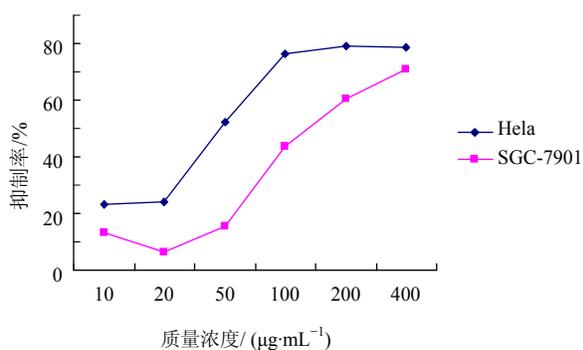


图1 白头翁对 HeLa 和 SGC-7901 细胞增殖抑制率变化

Fig. 1 Inhibitory rate changes of *Pulsatillae Radix* on proliferation of HeLa and SGC-7901 cells

体一致。根据以前所得实验结果判断,白头翁性寒,此与《中药学》所述一致。

3.2 白头翁对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞形态的影响

对照组与加药组在倒置显微镜下观察拍照,见图2。选取抑制浓度最大处的细胞照片与空白对照组比较。由图可以看到,在加药后细胞密度明显降低,细胞形态也发生了显著变化。正常的 SGC-7901 细胞在倒置显微镜下观察呈不规则的多边形,细胞致密,核膜、核仁轮廓明显,细胞延展、扁平。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处细胞密度明显下降,细胞变圆,细胞颗粒感增加。部分 SGC-7901 细胞加药后脱落,细胞器培养基中有悬浮的细胞残骸。HeLa 正常细胞呈上皮形贴壁生长,细胞间结构紧密,生长旺盛。细胞呈不规则多角形,细胞均质而透明,核膜、核仁轮廓明显。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处可以观察到细胞明显固缩变圆,细胞透明度明显下降,颗粒感增强,部分细胞脱落。培养基与对照组相比较浑浊,说明有脱落细胞残骸。

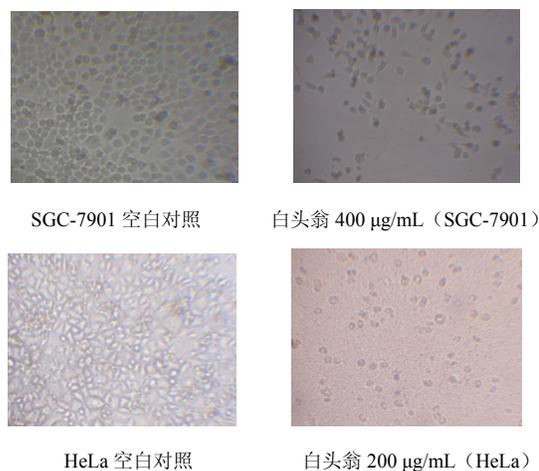


图2 白头翁对 HeLa 和 SGC-7901 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of *Pulsatillae Radix* on cell morphology of HeLa and SGC-7901 cells

3.3 台盼蓝染色

两组细胞经台盼蓝染色后均未见有着色细胞,说明白头翁在本实验所选浓度范围内对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞均没有细胞毒作用。即白头翁通过抑制细胞的生长而影响细胞的增殖而不是通过杀死细胞来影响细胞的增殖。

4 讨论

白头翁作为一种传统的中药,历来对其寒热药性说法不一。《神农本草经》认为其性温,而《中药学》认为其性寒。由于长期以来没有一个科学的评价寒热药性的实验方法,因而无法形成统一的认识。本课题组依据前期实验所建立的评价中药寒热药性的方法,通过 MTT 法检测了白头翁对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞体外增殖的影响,在所选浓度范围内白头翁对这两种细胞的增殖都表现出抑制的作用。且经过台盼蓝染色观察到白头翁对这两种细胞

不产生细胞毒性。根据热药可能会促进细胞生长、代谢、增殖,而寒药会表现为抑制,可以得出白头翁性寒这一科学的结论。这与《中药学》所载一致,并且为《中药学》的观点提供了科学的实验证据支撑。

参考文献

[1] 颜正华. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
[2] 余惠曼, 周红祖, 肖小河, 等. 中药四性的研究进展与展望 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(8): 621-624.
[3] 梁月华. 寒热本质研究进展 [J]. 中医杂志, 1996, 37(12): 747-750.
[4] 袁永明, 陈晓, 潘志强, 等. 寒证热证大鼠模型的红

外热图研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(5): 85-78.
[5] 程微微, 刘建利, 张宁, 等. 评价中药寒热药性的实验方法研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1122-1126.
[6] 王征, 张宁, 刘建利, 等. 采用两种细胞模型评价野菊花的寒热属性 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1586-1589.
[7] 边兴艳. MTT 比色法及其应用 [J]. 国外医学: 临床生物学与检验学分册, 1998, 19(2): 83-85.
[8] Ye H, Wang K Q, Zhou C H. *et al.* Purification, antitumor, and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum* [J]. *Food Chem*, 2008, (111): 428-432.