

川西獐牙菜不同部位对人胃癌细胞 MGC-803 增殖抑制作用和细胞周期的影响

王海霞^{1,2}, 黄慧明², 苑祥³, 徐奎¹, 曹长年^{1*}, 赵红平^{2*}

1. 青海大学化工学院, 青海 西宁 810016

2. 清华大学生物力学与医学工程研究所, 北京 100084

3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810000

摘要: 目的 研究藏药川西獐牙菜提取物对人胃癌细胞 MGC-803 增殖抑制作用和细胞周期的影响。方法 MTT 法测定川西獐牙菜石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位和甲醇总提取物部位对人胃癌细胞 MGC-803 的增殖抑制作用; 流式细胞术检测正丁醇部位对细胞周期的影响; 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法检测正丁醇部位的主要化学成分。结果 藏药川西獐牙菜各提取部位对人胃癌细胞 MGC-803 增殖均有抑制作用, 正丁醇部位的增殖抑制效果最佳且具有明显的量效关系; 用正丁醇部位处理 MGC-803 细胞, 表现出明显的 S 期周期阻滞; HPLC-MS/MS 检测结果表明正丁醇部位的主要化学成分为 1,7,8-三羟基-3-甲氧基咕吨酮、1,8-二羟基-3,5-二甲氧基咕吨酮、1,3,6,7-四羟基咕吨酮-2-β-D-葡萄糖、2'-间羟基苯甲酰獐牙菜苷、獐牙菜苷-6'-O-葡萄糖和 1-羟基-2,3,5-三甲氧基咕吨酮-1-O-[β-D-吡喃木糖(1-6)-β-D-吡喃葡萄糖]。结论 川西獐牙菜各部位对人胃癌细胞 MGC-803 均具有增殖抑制作用, 正丁醇部位的抑制作用最强且能够通过改变细胞周期分布抑制人胃癌细胞 MGC-803 的生长, 其中主要成分为咕吨酮类化合物。

关键词: 川西獐牙菜; 胃癌; 细胞增殖; 细胞周期; 高效液相色谱-串联质谱; 咕吨酮类

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)05-0735-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.006

Inhibition on proliferation and cell cycle of MGC-803 cancer cells treated with extracts of Tibetan medicine *Swertia mussoitii*

WANG Hai-xia^{1,2}, HUANG Hui-ming², YUAN Xiang³, XU Kui¹, CAO Chang-nian¹, ZHAO Hong-ping²

1. School of Chemical Engineering, Qinghai University, Qinghai Xining 810016, China

2. Institute of Biomechanics and Medical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Qinghai Xining 810008, China

Abstract: Objective To investigate proliferation and cell cycle of MGC-803 cancer cells treated with butanol extracts of Tibetan medicine *Swertia mussoitii* (BESM). **Methods** Proliferation of human gastric cancer MGC-803 cells treated with BESM were assayed by MTT *in vitro*, and the change of cell cycles treated with BESM was detected by flow cytometry. The main compounds of BESM have been analyzed by HPLC-MS-MS. **Results** BESM could inhibit the proliferation of human gastric cancer MGC-803 cells; After treating with BESM, MGC-803 cell cycle was arrested remarkably at S phase. The main compounds from BESM were 1,7,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone, 1,8-dihydroxy-3,5-dimethoxyxanthone, 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-2-β-D-glucopyranosyl, 2'-m-hydroxybenzoylsweroside, 6'-O-glucopyranosylsweroside, and 1-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-3,5-dimethoxyxanthone. **Conclusion** BESM could inhibit the growth of human gastric cancer MGC-803 cells, and can be used to regulate MGC-803 carcinoma cells proliferation by inhibiting cells in S phase, and the main component of it is xanthone.

Keywords: *Swertia mussoitii* Franch; gastric cancer; proliferation; cell cycle; HPLC-MS-MS; xanthone

收稿日期: 2016-06-21

基金项目: 国家自然科学基金 (11372162 与 11432008)

作者简介: 王海霞 (1992—), 女 (汉族), 青海平安人, 硕士研究生, 研究方向为天然药物的提取与药理药效研究。

Tel: 15116980812 E-mail: 15116980812@163.com

*通信作者 曹长年 (1960—), 男 (东乡族), 天津市人, 青海大学化工学院教授, 学士学位, 研究方向为天然产物提取与分离。

赵红平 (1974—), 男 (汉族), 重庆开县人, 清华大学生物力学与医学工程研究所副教授, 博士学位, 研究方向为癌症天然药物的提取与药理药效研究。

藏药陈川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 为龙胆科獐牙菜属植物, 在藏药经典书籍《晶珠本草》中有所记载, 为藏茵陈主要植物来源, 具有保肝、抑菌与抗肿瘤等功效^[1-2], 民间多用于治疗各种热病^[3]。近年来研究表明, 藏茵陈类药用植物对淋巴瘤细胞、皮肤癌细胞与肝癌细胞等均有抑制作用^[4-6], 但尚无对胃癌细胞的抑制作用研究。基于此, 本研究以川西獐牙菜为研究对象, 采用甲醇进行回流提取, 利用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇对提取物进行萃取, 获得不同的萃取部位; 将川西獐牙菜各萃取部位作用于人胃低分化黏液腺癌细胞 MGC-803, 检测对胃癌细胞的抑制作用; 随后通过流式细胞术研究正丁醇部位对 MGC-803 细胞周期分布的影响, 并基于高效液相色谱-串联质谱技术 (HPLC-MS/MS) 对正丁醇部位有效化学成分进行研究, 从而为该类药物作为潜在的抗癌药物进行更深层次的研究奠定实验基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

川西獐牙菜, 购自青海省西宁市药材市场, 由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟研究员鉴定为川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 的干燥全草; 碘化丙啶 (PI)、胰蛋白酶, 均购自美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS), 均购自美国 Hyclone 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮噻唑蓝 (MTT), 均购自美国 Ameresco 公司; 五氟尿嘧啶 (5-Fu, 上海旭东海普药业有限公司); 其他化学药品均为分析纯。

1.2 细胞株

人胃癌细胞 MGC-803 细胞株, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.3 仪器与设备

超净工作台 (苏州净化设备公司); 二氧化碳培养箱 (德国 Heraeus 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Agilent 1200 系列 HPLC, G6410B 三重四级杆 LC/MS (美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

称取川西獐牙菜干燥药材 200 g, 粉碎并过筛; 用 10 倍量甲醇加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并甲醇提取液, 自然冷却, 2 000 r/min 离心 10 min,

上清液回收甲醇, 浓缩至浸膏; 浸膏加热水分散, 用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取, 减压浓缩, 分别得到石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位以及甲醇总提取物部位, 将上述各部位样品冻干, 得石油醚部位 4.66 g、醋酸乙酯部位 4.10 g、正丁醇部位 8.41 g、水部位 5.23 g 以及甲醇总提取物部位 6.18 g, 得率分别是 2.3%、2.1%、4.2%、2.6%、3.0%, 备用。

分别称取石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位和甲醇总提取物部位, 用 DMSO 助溶, 配制成 2 mg/mL 的母液, 0.22 μ m 膜滤过除菌, 于 4 $^{\circ}$ C 储存, 临用前用培养液稀释至所需浓度; 实验 DMSO 浓度均未超过 1%, 而在此浓度下对细胞生长状况无影响, 阴性对照组加入同浓度的 DMSO 培养液。

2.2 川西獐牙菜各部位对 MGC-803 细胞增殖的抑制作用 (MTT 法)

取对数生长期 MGC-803 细胞, 用 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度至 5×10^3 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中; 培养 12 h 后加药, 加入石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位和甲醇总提取物部位, 每个浓度设 6 个复孔, 分别设 7 个浓度梯度, 终浓度分别为 1 400、1 200、1 000、800、600、400、200 μ g/mL, 空白对照组加入等体积的 RPMI 1640 培养液, 阴性对照组加入含同浓度 DMSO 的培养液, 阳性对照组加含有 25 μ g/mL 5-Fu 的培养液^[7]。继续培养 48 h 后, 于实验终止前 4 h 每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 继续孵育, 待实验终止时, 吸弃培养基, 加入 200 μ L DMSO, 震荡 5 min, 用酶标仪在 570 nm 处检测吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次。计算各部分对 MGC-803 的存活率。

存活率 = 给药组 A 值 / 空白对照组 A 值

2.3 川西獐牙菜正丁醇部位对 MGC-803 细胞形态的影响

细胞接种情况同“2.2”项, 培养 12 h 后加药, 加入 200、400、800 μ g/mL 正丁醇部位样品, 对照组加入相同浓度的 DMSO 溶液, 作用 48 h 后, 普通光学显微镜观察细胞形态的变化。

2.4 流式细胞术检测正丁醇部位对 MGC-803 细胞周期变化的影响

取对数生长期细胞, 以 1×10^5 个/mL 浓度接种

于12孔培养板内,每孔2 mL,培养24 h。设对照组与正丁醇部位组,正丁醇部位组分别加入终浓度为600、400、200 $\mu\text{g/mL}$ 的正丁醇部位样品,对照组加入相同浓度的DMSO溶液,处理24 h。1 000 r/min离心5 min收集空细胞,冷PBS洗2次,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL;70%乙醇固定过夜;离心去除乙醇,PBS洗涤2次,10 $\mu\text{g/mL}$ PI (PBS溶液,含0.2% Triton X-100、0.1 mmol/L EDTA和100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A)于室温暗处染色30 min,转入流式管,流式细胞仪检测,分析细胞周期分布。

2.5 HPLC-MS/MS 分析

正丁醇部位样品溶于乙腈溶液,流动相为:水(A)-乙腈(B);洗脱程序为:0~30 min,5%~85% (B);30~40 min,85%~95% (B);体积流量1 mL/min;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长254 nm;电喷雾离子化(ESI)源;正离子检测;脱溶剂气(N_2)体积流量9.0 L/min;扫描范围100~1 500 m/z 。

2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件对实验数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 人胃癌细胞 MGC-803 的增殖抑制实验

川西獐牙菜水部位、石油醚部位、正丁醇部位、醋酸乙酯部位以及甲醇总提取物对MGC-803细胞均具有明显的抑制,且成良好的剂量相关性,与对照组比较差异显著($P < 0.05$ 、0.01)。正丁醇部位、醋酸乙酯部位、甲醇提取部位对MGC-803癌细胞株的增殖抑制效果好于石油醚部位和水部位;正丁醇部位的增殖抑制率与醋酸乙酯部位、甲醇提取部位比较,差异显著($P < 0.05$),且各部位浓度为600 $\mu\text{g/mL}$ 时,存活率分别为 $(42.4 \pm 1.30)\%$ 、 $(53.5 \pm 1.63)\%$ 、 $(62.4 \pm 0.55)\%$ 、 $(85.0 \pm 1.0)\%$ 、 $(86.9 \pm 1.70)\%$,结果表明正丁醇部位对人胃癌细胞MGC-803的增殖抑制效果最好。结果见图1。

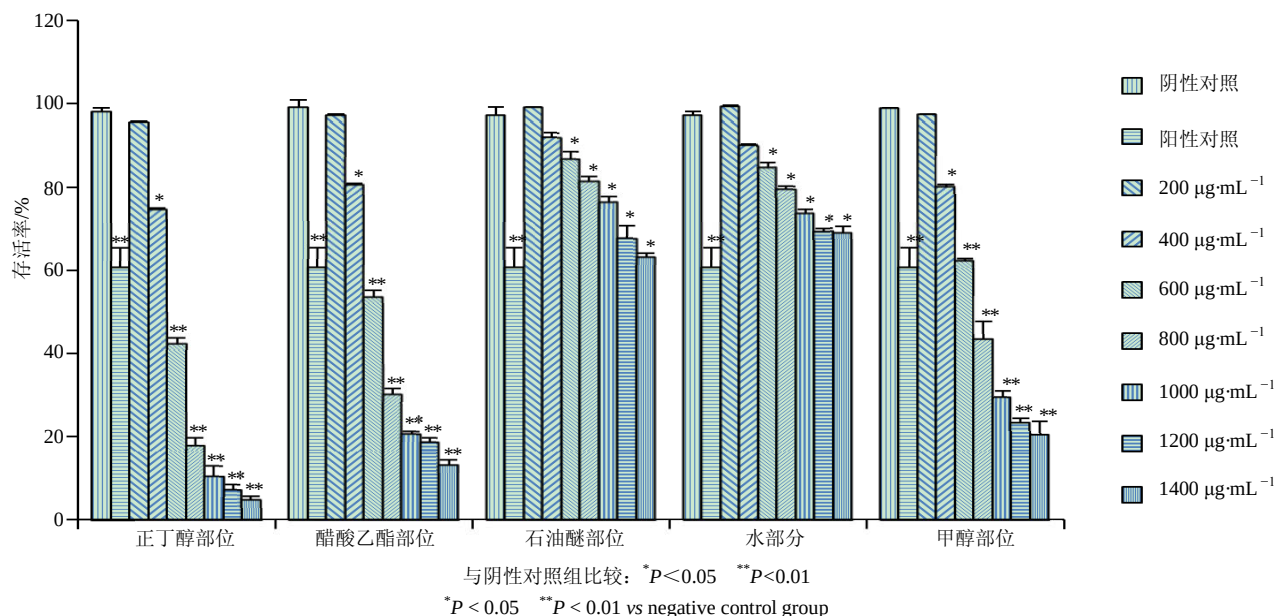


图1 川西獐牙菜各部位对人胃癌细胞MGC-803生存能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Survival effect of *S. mussoitii* extracts on MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 正丁醇部位对 MGC-803 细胞形态的影响

由图2可知,对照组细胞贴壁生长,轮廓清晰;正丁醇浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞出现皱缩变圆和胞质空泡状改变,并随着浓度增加细胞变化显著,直至出现死亡;当浓度达800 $\mu\text{g/mL}$ 时MGC-803细胞几乎全部漂浮死亡。

3.3 正丁醇部位对 MGC-803 细胞周期分布的影响

川西獐牙菜正丁醇部位在较高浓度下能够诱导人胃癌细胞MGC-803细胞周期阻滞,且成剂量

相关性,流式细胞术检测结果见图3。与对照组比较,600 $\mu\text{g/mL}$ 正丁醇部位作用后,S期比例显著增加($P < 0.05$);400、600 $\mu\text{g/mL}$ 正丁醇部位作用后,G1期比例显著降低($P < 0.05$ 、0.01),结果见表1。

3.4 HPLC-MS/MS 分析

基于HPLC-MS/MS对正丁醇部位主要物质的化学成分进行了分析,HPLC色谱图如图4所示,其中峰1~6的紫外和质谱数据详见表2。

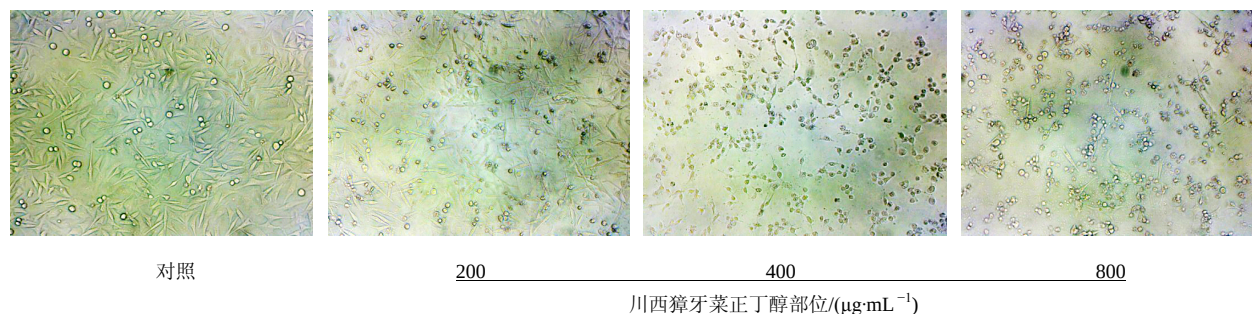


图 2 川西獐牙菜正丁醇部位对人胃癌细胞 MGC-803 形态的影响
Fig. 2 Effect of BESM on morphological changes of MGC-803 cells

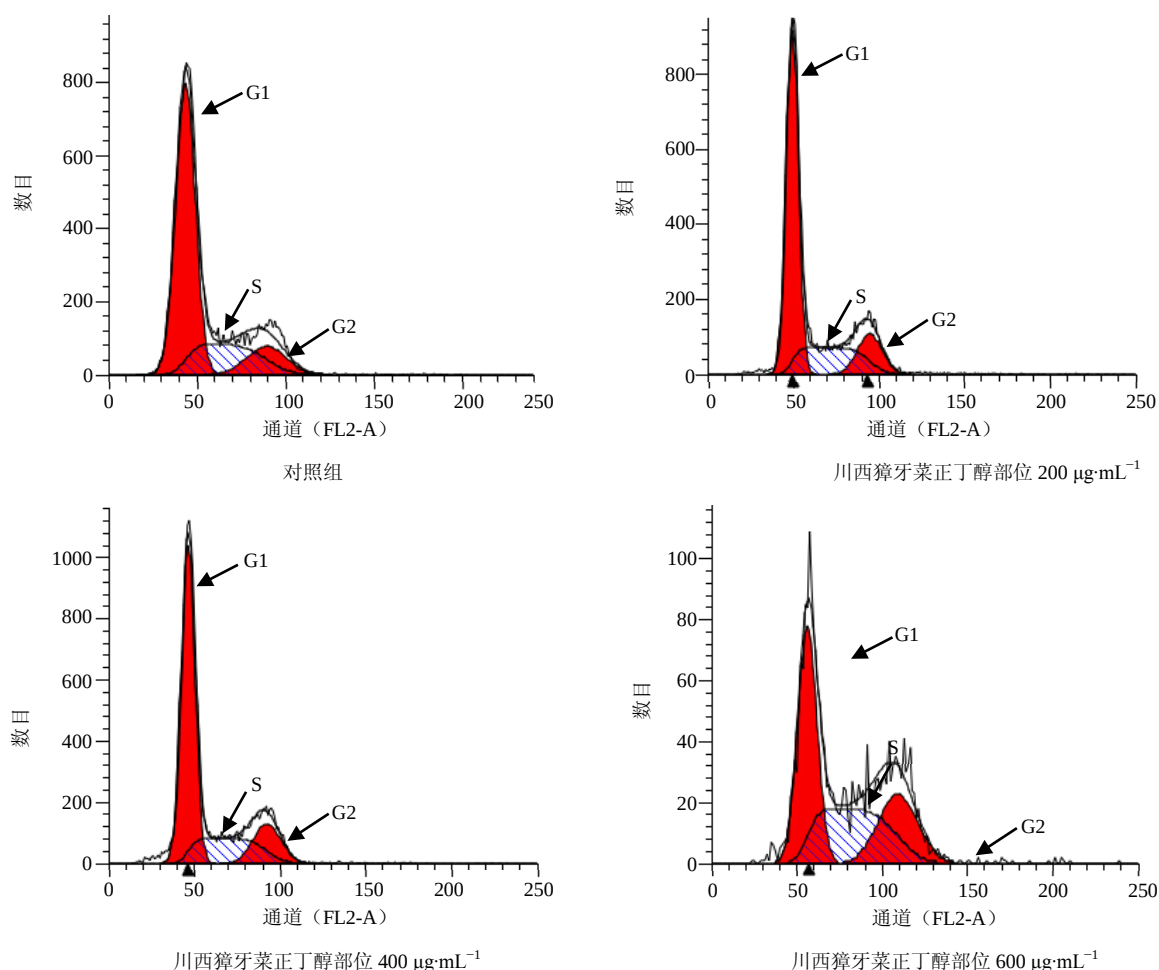


图 3 川西獐牙菜正丁醇部位对人胃癌细胞 MGC-803 周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of BESM on cell cycle changes of MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究首先采用 MTT 法进行川西獐牙菜不同萃取部位以及甲醇粗提物对人胃癌细胞 MGC-803 的细胞增殖抑制实验, 结果表明正丁醇部位、乙酸乙酯部位以及甲醇提取物对 MGC-803 细胞均具有

明显的抑制, 且成良好的浓度依赖性, 其中正丁醇部位抑制效果最佳。显微观察对不同浓度正丁醇部位样品对细胞形态的影响, 同时通过流式细胞仪测定了样品处理后细胞周期的变化, 结果发现, 不同浓度的正丁醇部位样品作用于细胞 48 h 后, 可影响

表1 川西獐牙菜正丁醇部位对人胃癌细胞 MGC-803 周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of BESM on cell cycle changes of MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	周期分布/%		
		G1	S	G2
对照	—	65.25 $\pm$ 0.56	21.37 $\pm$ 4.30	12.68 $\pm$ 2.59
川西獐牙菜正丁醇部位	200	62.06 $\pm$ 1.05	23.60 $\pm$ 0.54	14.52 $\pm$ 14.42
	400	57.97 $\pm$ 1.20*	29.03 $\pm$ 0.19	14.12 $\pm$ 0.81
	600	23.94 $\pm$ 1.59**	47.73 $\pm$ 2.06*	26.61 $\pm$ 1.30*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

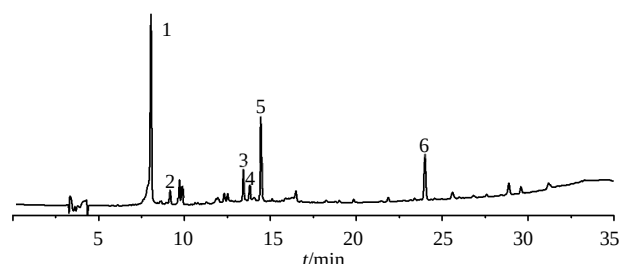


图4 正丁醇部位 HPLC 色谱图

Fig. 4 Butanol extract HPLC chromatograms

细胞周期的正常进行, G1 期细胞百分比例下降, S 期细胞百分比例上升, 说明药物处理后细胞周期阻滞在 S 期, 且随着药物浓度增加而增加。

通过 HPLC-MS/MS 对样品化学成分的分析结果表明, 正丁醇部位样品含有 1,7,8-三羟基-3-甲氧基咕吨酮、1,8-二羟基-3,5-二甲氧基咕吨酮、1,3,6,7-四羟基咕吨酮-2- β -D-葡萄糖、2'-间羟基苯甲酰獐牙菜苷、獐牙菜苷-6'-O-葡萄糖和 1-羟基-2,3,5-三甲氧基咕吨酮-1-O- $[\beta$ -D-吡喃木糖 (1-6) - β -D-吡喃葡萄糖]

表2 峰1~6 的紫外和质谱数据

Table 2 UV and MS data of peaks 1—6

峰位	UV λ_{max}	m/z	MS/MS	化合物
1	245,322	274	254,231	1,7,8-三羟基-3-甲氧基咕吨酮 ^[8]
2	245,322	288	273,259	1,8-二羟基-3,5-二甲氧基咕吨酮 ^[8]
3	254,320	422	261,247	1,3,6,7-四羟基咕吨酮-2- β -D-葡萄糖 ^[9]
4	258,320	478	375,305	2'-间羟基苯甲酰獐牙菜苷 ^[9]
5	258,320	520	359,289	獐牙菜苷-6'-O-葡萄糖 ^[10]
6	285,330	596	435,303	1-羟基-2,3,5-三甲氧基咕吨酮-1-O- $[\beta$ -D-吡喃木糖 (1-6) - β -D-吡喃葡萄糖] ^[11]

糖], 与文献中报道的川西獐牙菜或獐牙菜属植物化学成分基本一致。已有文献报道, 藏茵陈类印度獐牙菜苦苷粗提物和獐牙菜苦苷均能有效减轻二甲基苯蒽诱导小鼠皮肤乳头瘤的发生率^[11]; 川东獐牙菜正丁醇部位对肝癌细胞 HepG2 具有抑制作用, 其物质成分中含有獐牙菜苦苷以及其他苦苷类成分^[13]; 藏茵陈类湿生扁蕾中的 4 种酮类化合物对人肝癌细胞株 HepG2 抑制作用呈明显的剂量和时间依赖型^[14]。本研究表明, 川西獐牙菜正丁醇部位的主要成分为咕吨酮类, 其可能构成了川西獐牙菜抗肿瘤药效物质基础。

本课题组将继续对川西獐牙菜正丁醇部位的化学成分及其抗肿瘤活性进行研究, 明确川西獐牙菜抗肿瘤的物质基础, 并对其作用机制等进行深入研究。

参考文献

- [1] 蒂玛尔·丹增彭措, 等. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [2] 孟宪华, 陈德道, 张樱山, 等. 川西獐牙菜的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 176-179.
- [3] 唐 丽, 金振南, 门美佳, 等. 藏药藏茵陈的研究进展

- 及开发利用 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2007, 16(2): 176-178.
- [4] 丁 丁. 芒果苷对淋巴瘤 Rsiji 细胞增殖、侵袭及相关因子 Tiaml 表达的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2011.
- [5] Saha P. Evaluation of the anticarcinogenic activity of *Swertia chirata* Buch. Ham, an Indian medicinal plant, on DMBA-induced mouse skin carcinogenesis model [J]. *Phytother Res*, 2004, 18(5): 373-378.
- [6] 黄华艺, 农朝赞, 郭凌霄. 芒果甙对肝癌细胞增殖的抑制和凋亡的诱导 [J]. 中华消化杂志, 2002, 6(22): 341-343.
- [7] 韦尉元, 吴 琨, 王晓通, 等. 5-Fu 联合人参黄芩复方对人胃癌 MGC-803 细胞生物学行为的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(12): 1647-1651.
- [8] 尚 军, 张国燕, 杨淳彬, 等. 川西獐牙菜的化学成分研究 [J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2008, 4(4): 66-67.
- [9] 孔德云, 蒋 毅, 姚 英, 等. 伸梗獐牙菜的苷类成分 [J]. 中草药, 1995, 26(1): 7-10.
- [10] 李干鹏, 曾思为, 黄飞燕, 等. 西南獐牙菜的化学成分研究 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(5): 350-352.
- [11] 王世盛, 徐 青, 肖红斌, 等. 抱茎獐牙菜中的苷类成分 [J]. 中草药, 2004, 38(8): 847-850.
- [12] Saha P, Mandal S, Das A, *et al.* Amarogentin can reduce hyperproliferation by downregulation of Cox-II and upregulation of apoptosis in mouse skin carcinogenesis model [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(2): 252-259.
- [13] 赵李剑, 左泽乘, 邹洪波, 等. 川东獐牙菜苦甙类成分的提取及其体外抗肿瘤作用研究 [J]. 中医药导报, 2006, 12(5): 62-64.
- [14] Lan D, Liu B, Zhang S D, *et al.* Cytotoxicity, apoptosis-inducing effects and structure-activity relationships of four natural xanthones from *Gentianopsis paludosa* Ma in HepG2 and HL-60 cells [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(7): 669-683.