

3.2 黄连解毒汤 70% 醇提物对 S₁₈₀ 小鼠 MDR 模型 MDR 表达产物 LRP 过度表达的影响:经化疗诱导 4 周后传代 10 d 的小鼠耐药 S₁₈₀ 肿瘤细胞 LRP 表达率与诱导 4 周比较无明显变化,而给予黄连解毒汤 70% 醇提物明显逆转了耐药 S₁₈₀ 肿瘤细胞 LRP 的过度表达,与模型对照组比较差异极显著 ($P < 0.001$),见表 1。

3.3 黄连解毒汤 70% 醇提物对 S₁₈₀ 小鼠 MDR 模型 MDR 表达产物 TOPO II 表达的影响:黄连解毒汤 70% 醇提物显著逆转由化疗诱导后的获得性耐药小鼠 S₁₈₀ 细胞 TOPO II 的过度表达,而诱导后传代 10 d 的模型对照组与诱导后 4 周时其表达率无明显差异,提示黄连解毒汤 70% 醇提物可能通过逆转 TOPO II 的过度表达,干预化疗引起的 MDR,见表 1。

4 讨论

肿瘤化疗获得性 MDR 的发生,可见到肿瘤细胞 MDR 基因、耐药蛋白过度表达,肿瘤细胞 TOPO II 等相关酶活性增加等表现。耐药基因和耐药蛋白的过度表达时,可将化疗药物经跨膜转运排出细胞并阻止药物进入细胞核,使化疗药物不能发挥细胞毒性作用^[4~6];TOPO II 活性增强,增强 DNA 修复能力,拮抗化疗药物的细胞毒性^[6],还原性谷胱甘肽酶活性增加,与化疗药物结合,阻止化疗药物作用于肿瘤细胞,而产生耐药性。中药生物碱具有干预和逆转肿瘤 MDR 的作用^[7]。

本研究应用模拟临床肿瘤患者临床化疗诱导小鼠 S₁₈₀ 细胞表达产生耐药性,观察了黄连解毒汤

70% 醇提物体内给药对肿瘤细胞耐药相关生物活性物质 P₁₇₀、LRP、TOPO II 表达的影响,结果显示黄连解毒汤 70% 醇提物可以明显逆转小鼠 S₁₈₀ 细胞耐药基因 MDR 的表达产物 P₁₇₀、肺耐药蛋白 LRP 过度表达,抑制细胞拓扑异构酶 II (TOPO II) 的活性。提示黄连解毒汤 70% 醇提物可以抑制肿瘤细胞 MDR 的产生,其干预机制可能是通过对耐药基因和耐药蛋白表达的调控,相关酶活性的影响而实现的。

References:

- [1] Zheng H Z, Dong Z H, She J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中医药现代研究) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1997.
- [2] Xu L J, Wang Z M, Sun F J, *et al.* Establishing mice model of multidrug resistance of tumor induced by combined-chemotherapy [J]. *Lab Anim Comp Med* (实验动物与比较医学), 2005, 25(4): 215-217.
- [3] Yin G P, Gu Q, Chen M, *et al.* Establishing of mouse ascites model induced with S₁₈₀ cell line to obtain multi-drug resistance gene expression [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 2001, 5(21): 282-285.
- [4] Ha M H, Tsuruo T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(3): 1454-1458.
- [5] List A F. Non-p-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance [J]. *Semin Hematol*, 1997, 34(4): 20-24.
- [6] Ballatori N, Reber J F. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione [J]. *Semin Liver Dis*, 1998, 18(4): 377-387.
- [7] Sun F J, Wang N, Li G H, *et al.* Effect of matrin on the expression of P₁₇₀, LRP and TOPO II of obtained multi-drug resistance of mouse S₁₈₀'s tumour cell [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 2004, 27(11): 838-840.

沙苑子抗肿瘤活性部位体内外筛选

刘春宇¹, 顾振纶², 杜崇民¹, 杨吉成^{3*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215123;

3. 苏州大学 细胞和分子生物学教研室, 江苏 苏州 215123)

沙苑子为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. ex Bunge 干燥成熟的种子,具有温补肝肾、固精、缩尿、益肝明目的功能。药理研究表明沙苑子提取物具有改善血液流变学指标、降低

血压、调节血脂、抑制血小板聚集、保护肝脏、增强免疫功能、抗炎、镇痛及调节中枢神经系统等作用^[1]。近年来,本课题组对沙苑子的有效成分和药理活性进行了深入研究,实验证明沙苑子黄酮具有较好的保肝、

收稿日期: 2006-12-10

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究项目 (06KJB360105); 苏州市社会发展科技项目 (SS0515)

作者简介: 刘春宇, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药有效成分及药理作用研究。

Tel: (0512) 65221518 E-mail: chunyu1998@msn.com

* 通讯作者 杨吉成 Tel: (0512) 65880107 E-mail: yangjicheng@suda.edu.cn

抗纤维化、降血脂等药理作用^[2~6],还发现沙苑子提取物具有显著的抗肿瘤作用,为了进一步阐明沙苑子抗肿瘤活性成分,本课题组应用溶剂萃取法和大孔吸收树脂柱相结合的方法分离沙苑子乙醇提取物,采用 MTT 法测定各部位体外对人早幼粒白血病细胞 HL-60、人肝癌细胞 SMMC-7721、人低分化胃肠癌细胞 BGC-823、人肺癌细胞 A549 和人宫颈癌细胞 HeLa 的抗肿瘤活性,同时采用 S₁₈₀ 小鼠肉瘤模型进行体内筛选,期望从中找出沙苑子抗肿瘤活性成分。

1 材料与方法

1.1 材料:沙苑子药材由苏州雷允上药业集团公司提供,产地为陕西渭南,由苏州市药品检验所吴银生主任药师鉴定为豆科植物扁茎黄芪 *A. complanatus* R. Br. ex Bunge 的种子;黄酮吸附树脂 ZTC—5 柱(天津正天澄清技术有限公司,南开大学研制);RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品;MTT 为 Sigma 产品;小牛血清为四季青公司产品;顺铂注射液为江苏豪森药业股份有限公司产品(批号 041101);环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司(批号 04123021)。乙醇为药用乙醇,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物和细胞系:昆明种小鼠,雄性,SPF 级,18~22 g,由苏州大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:XCYK(苏)2002-0008;实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2002-0037。人早幼粒白血病细胞 HL-60、人肝癌细胞 SMMC-7721、人胃癌细胞 BGC-823、人肺癌细胞 A549、人宫颈癌细胞 HeLa 和小鼠肉瘤细胞 S₁₈₀ 均引自中国科学院上海细胞生物研究所的细胞库。

1.3 方法

1.3.1 沙苑子乙醇提取物的制备:沙苑子 10 kg,95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,滤过,减压回收,制成沙苑子乙醇提取物,备用。

1.3.2 各部位的提取与分离:取沙苑子乙醇提取物,加 10 倍量的蒸馏水,加热溶解,冷却后,石油醚萃取 3 次,回收石油醚,得沙苑子油部分(A1);母液上已处理好的黄酮吸附树脂 ZTC—5 柱,蒸馏水洗脱至无色,浓缩,为沙苑子多糖(A2);用 20% 乙醇溶液洗脱得沙苑子总皂苷(A3);用 70% 乙醇溶液洗脱色谱柱,得沙苑子总黄酮(A4)。A2 含沙苑子多糖 52%,A3 含沙苑子总皂苷 57%,A4 含沙苑子总黄酮 62%。

1.3.3 体外抗肿瘤活性部位筛选:HL-60、SMMC-7721、BGC-823、A549 和 HeLa 细胞用 RPMI-1640 培养液(含 10% 的小牛血清,100 kU/L 青霉素,

100 mg/L 链霉素),37 ℃、5% CO₂、100% 相对湿度培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代。调整细胞密度为 5×10⁴/mL,每孔 90 μL,培养 5 h,细胞贴壁后加药或培养液 10 μL,实验分对照组,顺铂(10 mg/L)阳性对照组,A1、A2、A3、A4 各设 3 个剂量组(400、200、100 mg/L),每组 3 个复孔。置 37 ℃、5% CO₂ 培养 48 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL。继续培养 4 h,每孔加入 10% SDS-HCl 100 μL 终止反应,紫色颗粒充分溶解后于 570 nm 处测定吸光度(A)值。按下列公式计算抑制率,并用 Logit 法计算 IC₅₀ 值。

抑制率 = (1 - 用药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%

1.3.4 体内抗肿瘤活性筛选:小鼠 S₁₈₀ 肉瘤模型:无菌条件下,抽取小鼠腹腔内连续传代的 S₁₈₀ 细胞,调整细胞浓度至 1×10¹⁰/L,小鼠右腋皮下接种 0.2 mL,接种后随机分成 8 组,每组 10 只,即对照、CTX(25 mg/kg)、A2(200、100 mg/kg)、A3(200、100 mg/kg)、A4(200、100 mg/kg) 组,除对照组外,其余各组每天分别 ig(0.2 mL/10 g) 给药,对照组给予等体积蒸馏水,连续 10 d。末次给药 24 h 后处死小鼠,剥取瘤块称质量,按下式计算抑瘤率。

抑瘤率 = (对照组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 对照组瘤质量 × 100%

1.4 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计程序进行单因子方差分析处理,组间采用 Dunnett 方法比较。

2 结果

2.1 体外抗肿瘤活性部位筛选:沙苑子提取物 A3 和 A4 部位对 HL-60 表现出一定抑制作用,其中 A4 抑制作用显著。A3 对 HL-60 的 IC₅₀ 为 246 mg/L, A4 对 HL-60 的 IC₅₀ 为 46 mg/L,并在测定质量浓度范围内呈现出一定的剂量依赖性抑制作用。A4 对 SMMC-7721 和 HeLa 细胞显示一定的抑制作用,IC₅₀ 分别为 238 mg/L 和 347 mg/L, A3 对 SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 为 678 mg/L,其余各部位无明显抑制作用。对 BGC-823 细胞和 A549 细胞沙苑子提取物各部位均无明显抑制作用。提示,沙苑子提取物 A4(沙苑子总黄酮)可能为沙苑子抗肿瘤的主要活性部位,而 A3(沙苑子总皂苷)也有一定的抗肿瘤作用,结果见表 1。

2.2 体内抗肿瘤活性部位筛选:在体外筛选结果的基础上,采用 S₁₈₀ 小鼠肉瘤模型进一步对 A2、A3 和 A4 3 个组分进行筛选,结果 A4 明显抑制小鼠 S₁₈₀

肉瘤的生长,抑瘤率均在 30% 以上;A3 高剂量组抑瘤率也在 30% 以上;体内筛选结果提示,A4 (沙苑子总黄酮)有较显著的抑制小鼠 S₁₈₀肉瘤作用,

A3 (沙苑子总皂苷)也有一定的抑制作用,但作用强度不如 A4,结果见表 2。

3 讨论

表 1 沙苑子各提取部位对肿瘤细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibitory rates of various fractions extracted from *Semen Astragali Complanati* on tumor cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	剂量/ (mg · L ⁻¹)	抑制率/%				
		HL-60	SMMC-7721	BGC-823	A549	HeLa
对照	—	—	—	—	—	—
顺铂	10	92.9±2.7	70.5±2.7	95.0±1.8	92.5±2.5	75.0±2.1
A1	400	19.6±3.0	0.0±0.0	6.7±2.5	5.0±2.5	6.2±3.2
	200	12.5±1.8	0.0±0.0	6.7±2.5	5.0±1.8	0.0±0.0
	100	0.0±0.0	0.0±0.0	11.7±2.1	0.0±0.0	3.1±2.1
A2	400	44.6±3.2	9.1±1.5	23.3±2.1	35.0±2.4	18.8±1.8
	200	33.9±2.5	9.1±2.4	16.7±2.5	10.0±2.4	18.8±1.5
	100	19.6±3.5	6.8±3.3	6.7±2.5	7.5±1.8	6.2±3.0
A3	400	60.7±2.4	40.9±3.1	11.7±3.0	32.5±1.5	37.5±3.0
	200	44.6±3.0	38.6±2.6	3.3±3.1	27.5±2.5	25.0±2.7
	100	32.1±2.2	25.0±2.6	5.0±2.0	22.5±2.6	25.0±2.1
A4	400	96.4±1.8	61.4±3.0	31.7±2.0	25.0±2.2	53.1±2.0
	200	89.3±2.0	47.7±3.0	23.3±2.4	17.5±1.9	34.4±1.8
	100	76.8±3.0	29.5±2.4	23.3±3.1	12.5±3.0	12.5±3.1

表 2 沙苑子各提取部位对 S₁₈₀小鼠肉瘤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of various fractions extracted from *Semen Astragali Complanati* on transplant tumor S₁₈₀ in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	—	1.28±0.45	—
CTX	25	0.29±0.09	77.3
A2	200	1.14±0.38	10.9
	100	1.25±0.32	2.3
A3	200	0.87±0.28*	32.0
	100	0.92±0.35	28.1
A4	200	0.44±0.19**	65.6
	100	0.68±0.25**	46.8

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

沙苑子为补益肝肾的传统中药,沙苑子提取物具有改善血液流变学指标、降低血压、调节血脂、保肝、抗肝纤维化和增强免疫功能等作用。文献报道,沙苑子主要含有黄酮类、三萜苷类、有机酸、氨基酸、多肽、蛋白质、鞣质、甾醇、微量元素等成分^[1],但对其抗肿瘤等活性成分的研究尚无文献报道。本实验通过体外和体内方法筛选了沙苑子不同提取组分的抑瘤活性,结果显示,沙苑子黄酮成分无论体外,还是体内均显示显著的抑瘤作用,体外抑瘤实验对 HL-60、SMMC-7721 和 HeLa 细胞有显著的抑制作用,其 IC₅₀值分别为 46、238、37 mg/L;沙苑子总皂苷成分也有一定的抑瘤作用,但强度较弱。体内实验

结果与体外基本一致,沙苑子总黄酮和总皂苷对小鼠肉瘤 S₁₈₀有显著的抑制作用,由此提示,沙苑子总黄酮为沙苑子抗肿瘤的主要活性成分,沙苑子总皂苷可能也是活性成分之一,实验结果为沙苑子抗肿瘤活性单体成分的深入研究提供了依据。

References:

[1] Liu C Y, Gu Z L. The chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus complanatus* R. Br. [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2002, 21(2): 1-3.

[2] Liu C Y, Gu Z L, Han R, et al. Protective effective effect of extract in seed of *Astragalus complanatus* on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1104-1106.

[3] Liu C Y, Gu Z L, Zhang K P, et al. Effect of flavonoids of *Astragalus complanatus* on liver fibrosis induced by DMN in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(1): 110-113.

[4] Liu C Y, Gu Z L, Zhang K P, et al. Effects of flavonoids extracted from *Astragalus complanatus* on liver fibrosis induced by CCl₄ and serum levels of IFN-γ and TGF-β in rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2004, 39(12): 910-912.

[5] Liu C Y, Gu Z L, Han R, et al. Protection of flavonoids from *Astragalus complanatus* seed on acute liver injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1838-1841.

[6] Liu C Y, Gu Z L, Zhou W X, et al. Effect of *Astragalus complanatus* flavonoid on anti-liver fibrosis in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(37): 5782-5786.