

糙叶败酱提取物抗肿瘤作用机制研究

王学习¹, 赵健雄¹, 陈 茹¹, 程卫东¹, 白德成^{2*}

(1. 兰州大学中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学 医学实验中心, 甘肃 兰州 730000)

摘 要:目的 观察糙叶败酱提取物诱导细胞凋亡过程中自由基和线粒体膜电位的变化。方法 D-101 大孔吸附树脂分离糙叶败酱水提物, 糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 荷瘤小鼠, 观察生命延长率; 透射电镜观察细胞凋亡情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 激光共聚焦显微镜检测细胞自由基水平和线粒体膜电位变化。结果 糙叶败酱提取物可引起 S_{180} 细胞的凋亡, 细胞线粒体膜电位降低, 自由基水平升高。结论 糙叶败酱提取物引起 S_{180} 细胞的凋亡, 与含药血清对细胞内自由基水平和线粒体膜电位的影响有关。

关键词:糙叶败酱; 自由基; 线粒体膜电位

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0572-03

糙叶败酱 *Partrinia rupestris* (Pall.) Juss. subsp. *scabra* (Bunge) H. J. Wang 为败酱科败酱属植物, 异名鸡粪草。常与其同属植物异叶败酱 *Patrinia heterophylla* Bunge 混用, 俗称墓头回。糙叶败酱多糖、皂苷等有一定的体内外抗肿瘤作用^[1,2]。本研究利用 D-101 大孔吸附树脂对糙叶败酱的水提物进行柱色谱分离, 水洗去除大部分多糖和其他无药理活性杂质, 再用稀醇洗脱具有药理活性部分进行抗肿瘤实验, 并探讨其部分机制。

1 材料

1.1 样品: 购入从甘肃庆阳地区采集的墓头回根 20 kg, 经甘肃省医学科学研究院石长拴教授鉴定为糙叶败酱 *P. rupestris* (Pall.) Juss. subsp. *scabra* (Bunge) H. J. Wang。水煎 3 次, 3 h/次, 合并煎液浓缩, 浓缩液进行大孔吸附树脂柱色谱分离, 洗脱液依次为 H_2O 、20% 乙醇、50% 乙醇、80% 乙醇。其中 50% 乙醇洗脱液共计 1 020 个流份, 500 mL/流份, 经薄层色谱鉴别合并 50~680 流份(含多糖 21.4%, 含皂苷 41.8%), 水溶解, 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 进行实验。

1.2 动物: 清洁级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 (18 $\pm$ 2) g, 兰州生物制品研究所提供。

1.3 S_{180} 肉瘤细胞株, 中国医学科学院药物研究所引种, 本所传代保种。

1.4 药物与试剂: 环磷酰胺, 上海华联制药有限公司产品, 批号 040606; 碘化丙啶 (PI), Sigma 公司产品; 乙酰乙酸盐-2,7-二氯氢化荧光素 (D-399), 美国 Molecular Probes 公司产品, D-399 溶于二甲基亚砜中配成 1 mg/mL 储备液, -20 $^{\circ}C$ 贮存, 负载

时用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 稀释成 5 $\mu g/mL$ 的应用液; 罗丹明 123 (Rh-123), 美国 Eugene Oregon 公司产品, Rh-123 溶于二甲基亚砜中配成 1 mg/mL 储备液, -20 $^{\circ}C$ 贮存, 负载时用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 稀释成 10 $\mu g/mL$ 的应用液。D-101 大孔吸附树脂, 比表面积 $\geq 400 m^2/g$, 兰州四方医药开发公司。

1.5 仪器: JEM-1230 型透射电镜, 日本电子公司; EPICS-XL 型流式细胞仪, 美国 Coulter; TCS SP₂ 型激光共聚焦显微镜系统, 德国 Leica。

2 方法

2.1 分组、给药及含药血清的制备: 清洁级昆明种小鼠 56 只, S_{180} 瘤细胞悬液 ($1 \times 10^7/mL$) ip 接种, 0.2 mL/只。造模小鼠随机分为 4 组: 模型组 (NS), 阳性对照组 (环磷酰胺, 10 mg/kg), 糙叶败酱提取物组 (1.0.5 g/kg)。造模 24 h 后, 所有动物等体积 0.1 mL/10 g, ip 给药, 每天 1 次, 连续 10 d。记录小鼠的死亡时间, 待各组动物死亡至半数时, 处死动物, 计算生命延长率。

生命延长率 = (实验组半数存活时间 - 模型组半数存活时间 / 模型组半数存活时间) $\times 100\%$

另取清洁级昆明种小鼠 40 只, 造模、分组与给药方法同上。于末次给药后 2 h, 抽取腹水, 分离 S_{180} 细胞。同时, 腹主动脉采血, 分离血清, 同组动物血清合并, 0.22 μm 微孔滤膜无菌滤过后, 置 -20 $^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养: 取体外培养的对数生长期 S_{180} 细胞, 用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/mL$, 接种于 6 孔培养板, 2.1 mL/孔, 加入上述采集

的不同组别药物血清 0.7 mL/孔,分别常规培养 24、48、72 h 后用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,检测细胞凋亡率、自由基水平和线粒体膜电位变化。

2.3 细胞凋亡形态学观察:取各组分离的 S_{180} 细胞,常规固定、脱水、切片、染色,透射电镜观察细胞凋亡情况。

2.4 细胞凋亡率的测定:参考黄晓峰方法^[3]。取各组细胞,75% 冷乙醇固定,4℃ 过夜,测试前用 PBS 洗去乙醇,加入 RNA 酶、Triton-100 和 PI 混合液,避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 自由基水平的测定:参考黄晓峰方法^[3]。取各组细胞 0.1 mL 加入 D-399 1 mL,37℃ 避光孵育 45 min;PBS 洗涤,1 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次;将细胞重悬于 0.5 mL PBS 中,激光共聚焦显微镜检测,以荧光强度表示细胞自由基的量。扫描条件:激发光波长 488 nm,发射光波长 520 nm。

2.6 线粒体膜电位的测定:参考黄晓峰方法^[3]。取各组细胞 0.1 mL 加入 Rh-123 1 mL,37℃ 避光孵育 45 min;加 PBS 洗涤,1 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次;将细胞重悬于 0.5 mL PBS 中,激光共聚焦显微镜检测,以荧光强度表示细胞线粒体膜电位高低。扫描条件:激发光波长 488 nm,发射光波长 530 nm。

2.7 统计学方法:用 SPSS 13.0 软件进行 Kaplan-Meier 生存分析和方差分析。

3 结果

3.1 生命延长率:如表 1 所示,糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 荷瘤小鼠,可提高其半数存活时间,进行 Kaplan-Meier 生存分析,与模型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 糙叶败酱提取物对 S_{180} 荷瘤小鼠生命延长率的影响

Table 1 Effect of extract from *P. rupestris* on life prolongation rate of S_{180} mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	半数存活时间/d	生命延长率/%
模型	—	14	13.5	—
环磷酰胺	0.01	14	22.5**	66.7
糙叶败酱提取物	1	14	21.0**	55.6
	0.5	14	18.5**	37.0

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

3.2 细胞凋亡形态学观察:透射电镜观察可见模型组细胞表面有丰富的微绒毛,胞浆丰富;核大,不规则,核膜清楚。各处理组细胞可见不同时期的凋亡细胞:凋亡早期,细胞体积小,细胞膜微绒毛减少或消

失,内质网扩张呈空泡状,并可见核染色质固缩,聚集于核膜。凋亡晚期,细胞皱缩,细胞核碎裂呈块状,胞浆起泡,细胞质内线粒体基质深染,并出现空泡样变及髓样变。见图 1。

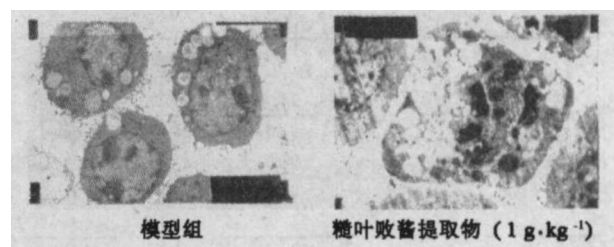


图 1 细胞凋亡形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of cell apoptosis

3.3 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞凋亡率的影响:如表 2 所示,不同剂量提取物作用于 S_{180} 细胞,均发生一定程度凋亡,与模型组比较,差异显著 ($P < 0.01$)。

表 2 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of extract from *P. rupestris* on apoptosis of S_{180} cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	细胞凋亡率/%		
		24 h	48 h	72 h
模型	—	2.40 ± 0.90	2.70 ± 0.88	3.46 ± 1.31
环磷酰胺	0.01	11.57 ± 2.8**	21.60 ± 4.81**	30.39 ± 5.00**
糙叶败酱提取物	1	3.98 ± 2.12	8.86 ± 2.75*	14.10 ± 4.39**
	0.5	2.34 ± 1.19	4.59 ± 2.41	9.13 ± 3.77**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

3.4 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞自由基水平的影响:如表 3 所示,提取物作用于 S_{180} 细胞 24 h 时,对其自由基水平无影响,持续作用 48 h 后,大剂量组细胞自由基水平增加,与模型组比较,有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞自由基水平的影响

($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of extract from *P. rupestris* on free radical level in S_{180} cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	自由基(荧光像素数)		
		24 h	48 h	72 h
模型	—	166.47 ± 40.46	160.39 ± 37.08	164.42 ± 36.49
环磷酰胺	0.01	174.20 ± 38.92	190.46 ± 40.41	203.46 ± 40.82
糙叶败酱提取物	1	179.49 ± 42.27	199.84 ± 36.19*	210.49 ± 34.67*
	0.5	159.28 ± 33.68	182.39 ± 35.57	194.58 ± 32.24

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3.5 糙叶败酱提取物对 H_{22} 细胞线粒体膜电位的影响:如表 4 所示,提取物作用于 S_{180} 细胞 48 h 时,大剂量组细胞线粒体膜电位显著降低,作用 72 h

表4 糙叶败酱提取物对 S_{180} 细胞线粒体膜电位的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of extract from *P. rupestris* on mitochondrial membrane potential of S_{180} cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	线粒体膜电位(荧光像素数)		
		24 h	48 h	72 h
模型	—	180.44 $\pm$ 30.14	194.11 $\pm$ 28.31	184.96 $\pm$ 40.73
环磷酰胺	0.01	162.98 $\pm$ 50.83	149.92 $\pm$ 39.19*	133.69 $\pm$ 31.48**
糙叶败酱提取物	1	175.20 $\pm$ 40.22	162.16 $\pm$ 30.44*	131.54 $\pm$ 28.62**
	0.5	190.64 $\pm$ 44.38	169.39 $\pm$ 30.57	146.37 $\pm$ 29.14*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

后,大、小剂量组细胞线粒体膜电位均显著降低,与模型组比较,有统计学意义($P<0.05, 0.01$)。

4 讨论

研究表明,细胞凋亡时胞内活性氧自由基(ROS)生成增加,清除ROS的能力下降,大量自由基能与蛋白质、DNA和脂质体等反应,引起蛋白质氧化,DNA链断裂,细胞膜起泡和脂质过氧化等变化^[4]。本实验中糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 细胞,细胞内的自由基水平增多,可能使DNA链断裂,导致细胞凋亡。

研究发现,线粒体膜电位的变化在细胞凋亡过程中起重要作用,是细胞凋亡的关键环节^[5~7]。Minamidawa等^[8]应用激光扫描共聚焦显微镜和光敏剂Chloromethyl-X-rosamine研究正常人细胞时发现:用光源照射充满这种光敏剂的线粒体,可出现线粒体膜内部去极化和线粒体膨胀,从而引起细胞凋亡。另外,Fabio等^[9]的研究也支持这一观点。Zamami等^[10]的实验表明,线粒体膜电位的降低是细胞凋亡早期的一个不可逆改变。大多数凋亡信号通过诱导线粒体膜通透性转运通道(mitochondrial per-

meability transition pore, MPT)的开放或线粒体肿胀,导致线粒体膜电位下降,进而允许线粒体呼吸链蛋白细胞色素C、凋亡诱导因子等从线粒体释放到胞浆。它们直接或间接地激活凋亡蛋白caspase-3等系列因子使一组核蛋白裂解,最终诱导细胞凋亡^[11,12]。

糙叶败酱提取物作用于 S_{180} 细胞,细胞内荧光强度明显减弱,线粒体膜电位明显降低,可引起细胞凋亡的发生。此作用与其对细胞内自由基水平和线粒体膜电位的影响有关。

参考文献:

- [1] 陈金秀,马培志,王怀璋. 墓头回总苷片治疗大肠癌的临床研究[J]. 中草药, 1999, 30(7): 528-529.
- [2] 王怀璋,王迎红,陈金秀,等. 墓头回总苷片治疗大肠癌的临床观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001, 8(1): 37-39.
- [3] 黄晓峰. 荧光探针技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2004.
- [4] 惠宏襄,赵小宁,金明,等. 自由基与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(1): 12-16.
- [5] Halestrap A P, Doran E, Gillespie J P, et al. Mitochondria and cell death[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 170-177.
- [6] 孙岳平,陈国强,蔡循,等. 氧化酚诱导急性早幼粒细胞性白血病细胞凋亡的研究[J]. 癌症, 1999, 18(1): 1-4.
- [7] 蔡循,陈国强,贾培敏,等. 三氧化二砷诱导血液肿瘤细胞凋亡的机制研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(6): 452-455.
- [8] Minamidawa T, Sriratanana A. Chloromethyl-X-rosamine photosensitizes mitochondria and induces apoptosis in intact human cells[J]. J Cell Sci, 1999, 112(14): 2419-2430.
- [9] Fabio D L, Roberta M, Marcella C, et al. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium[J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1366: 69-78.
- [10] Zamami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo[J]. J Exp Med, 1995, 181: 1661-1672.
- [11] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91: 479-489.
- [12] Wickremasinghe R G, Hoffbrand A V. Biochemical and genetic control of apoptosis; relevance to normal hematological control of apoptosis[J]. Immunol Today, 1997, 18: 44-51.

买麻藤乙醇提取物抗氧化和抑制肿瘤作用的研究

姚柳利¹, 代光辉^{1*}, 张永煜², 陶萍²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200030)

摘要:目的 研究买麻藤 50% 和 95% 乙醇提取物对小鼠体内抗氧化作用及其对人肝癌 BEL-7402 细胞、人白血病 HL-60 细胞的体外抑制活性。方法 D-半乳糖造成实验性衰老小鼠模型,通过测定血清、肝、脑等组织内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和ATP活性来观察买麻藤乙醇提取物对小鼠抗氧化能力的影响;

收稿日期:2007-06-27

基金项目:上海交通大学农科合作研究基金资助项目(AE150039)

作者简介:姚柳利(1980—),女,上海人,硕士研究生,主要从事植物化学研究。E-mail: yll791212@sjtu.edu.cn

*通讯作者 代光辉 Tel: (021) 34205762 E-mail: ghдай@sjtu.edu.cn