

肿瘤和抑制蛋白激酶活性,且在人的肿瘤细胞中能选择性地抑制表皮生长因子受体(EGFR)^[3]。蒲葵果实水提取物和乙醇提取物体外有抑制细胞增殖,抗氧化作用,在非特异性酯酶实验中,乙醇提取物还能诱导 HL-60 细胞的单核细胞或巨噬细胞分化且有剂量依赖性^[14]。

本实验通过对蒲葵籽的 4 个提取物进行初筛,表明蒲葵籽的醋酸乙酯提取部分(P3)具有体外抗 HIV-1 活性。P3 能阻断 HIV-1 慢性感染细胞与正常细胞的融合,提示其作用靶点或靶点之一可能为阻断病毒进入细胞。通过基因工程重组 HIV-1 蛋白酶和逆转酶的体外活性抑制实验,发现提取物 P3 能有效的抑制蛋白酶活性,也有微弱的抑制逆转录酶活性。由此可见,蒲葵籽的醋酸乙酯提取物具有较强的体外抗 HIV-1 活性,其作用机制可能主要为阻断病毒进入和抑制 HIV-1 蛋白酶活性。目前本课题组正在对蒲葵籽的醋酸乙酯提取物 P3 进行进一步的分离纯化,希望从中筛选出具有抗 HIV 活性的化合物,明确其作用机制。

参考文献:

- [1] 何小玉,崔建国,黄初升,等. 蒲葵根中脂肪油的 GS-MS 联用分析[J]. 化工技术与开发, 2003, 32(2): 32.
- [2] 钟振国,张凤芳,张雯艳,等. 蒲葵根提取物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中药材, 2007, 30(1): 60-63.
- [3] Huang W C, Hsu R M, Chi L M, et al. Selective downregulation of EGF receptor and downstream MAPK

- pathway in human cancer cell lines by active components partially purified from the seeds of *Livistona chinensis* R. Brown [J]. *Cancer Lett*, 2007, 248(1): 137-146.
- [4] 黄才,覃燕梅,梁念慈. 石上柏和蒲葵籽对蛋白激酶 C 活性的影响[J]. 中草药, 1995, 26(8): 414-416.
 - [5] 张高红,唐宏,郑永唐. 蛋白酶 C 在 HIV 复制中的作用与药物发现[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(9): 1025-1029.
 - [6] Liu G J, Wang J P, Xiao J C, et al. Preparation and characterization of three monoclonal antibodies against HIV-1 p24 capsid protein [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(3): 203-208.
 - [7] 王云华,王睿睿,杨柳萌,等. HIV-1 蛋白酶的表达、纯化及其抑制剂体外筛选方法的建立[J]. 中国病毒学, 2006, 21(2): 126-130.
 - [8] Wang R R, Gu Q, Yang L M, et al. Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105: 269-273.
 - [9] Wang J H, Tam S C, Huang H, et al. Site-directed PEGylation of trichosanin retained its anti-HIV activity with reduces potency *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317: 965-971.
 - [10] Wang Y H, Tang J G, Wang R R, et al. A novel Beta-carboline compound with anti-HIV-1 actions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4): 1091-1095.
 - [11] 刘志平,崔建国,黄初升,等. 蒲葵籽中有效化学成分的研究[J]. 中草药, 2007, 38(2): 178-180.
 - [12] 陈屏,杨峻山. 蒲葵籽化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(5): 665-667.
 - [13] Sartippour M R, Liu C, Shao Z M, et al. *Livistona* extract inhibits angiogenesis and cancer growth [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(6): 1355-1357.
 - [14] Cheung S, Tai J. *In vitro* studies of the dry fruit of Chinese fan plant *Livistona chinensis* [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14: 1331-1336.

20(S)-原人参二醇对肺癌 A549 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用

张锐,徐华丽,曲绍春,于小凤,陈明侠,睢大贺*

(吉林大学药学院 药理教研室,吉林 长春 130021)

摘要:目的 研究 20(S)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长抑制作用。方法 采用噻唑蓝(MTT)法观察 20(S)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用,流式细胞术测定 20(S)-原人参二醇对小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及周期的影响,并在裸小鼠人肺癌模型上观察 20(S)-原人参二醇对荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用。结果 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞具有明显的抑制作用并有剂量时间依赖关系,并且流式细胞仪检测时均出现典型凋亡峰,24 小时凋亡率分别为 32.47%、32.75%、33.51%。荷瘤裸小鼠动物实验表明,20(S)-原人参二醇对裸小鼠的肿瘤生长也具有明显的抑制作用,抑瘤率分别为 18.78%、34.37%、50.02%。结论 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞的增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤的生长具有明显的抑制作用。

关键词:20(S)-原人参二醇; A549 细胞; 肺癌; 裸小鼠

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)12-1838-04

收稿日期:2008-03-29

基金项目:国家“九五”重点科技攻关课题(96-901-01-83)

作者简介:张锐(1978-),女,博士研究生,研究方向为抗肿瘤药物研究。Tel: (0431) 85619705 E-mail: zgr1219@163.com

* 通讯作者 睢大贺 Tel: (0431) 85619705 E-mail: suidy@jlu.edu.cn

Inhibition of 20(S)-protopanaxadiol on proliferation of lung cancer A549 cells and tumor growth of nude mice

ZHANG Rui, XU Hua-li, QU Shao-chun, YU Xiao-feng, CHEN Ming-xia, SUI Da-yuan

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To study the effects of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) on the proliferation of human lung carcinoma A549 cell line and the tumor growth of nude mice. **Methods** Human lung carcinoma A549 cell line was treated with PPD. Cell growth rate was determined with MTT assay. The effects of PPD on apoptosis rate and cell cycle were observed by the flow cytometer. The subcutaneous transplantable tumor model of human lung cancer in nude mice was established. The tumor inhibitory rate was calculated to evaluate the anti-tumor effect. **Results** PPD could inhibit the proliferation of human lung carcinoma A549 cell in a time- and dose-dependent manner. The apoptotic peak was observed in the PPD groups with the apoptosis rate of 32.47%, 32.75%, and 33.51% in 24 h, respectively. And PPD inhibited the growth of human lung carcinoma A549 cells in nude mice with the tumor inhibitory rate of 18.78%, 34.37%, and 50.02%. **Conclusion** 20(S)-Protopanaxadiol could inhibit the proliferation of lung cancer A549 cell and the tumor growth of nude mice.

Key words: 20(S)-protopanaxadiol (PPD); A549 cell; lung cancer; nude mice

20(S)-原人参二醇 (protopanaxadiol, PPD) 是从西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的茎叶中提取并开发利用的天然抗癌新药,具有广谱的抗肿瘤作用^[1]。20(S)-原人参二醇对动物移植性肿瘤 B16、Lewis、H₂₂肿瘤、HepG2 和 HeLa 等癌细胞有较强抑制生长作用,对 HeLa 细胞集落形成的抑制强度超过原人参二醇 Rg₃^[2,3];还能使乳腺癌、白血病、淋巴瘤等癌细胞发生程序性死亡,且癌细胞株凋亡率随 20(S)-原人参二醇浓度升高而增加^[4,5]。近年来研究表明 20(S)-原人参二醇对非小细胞型肺癌有显著疗效,且对多药耐药性及晚期癌症有明显抑制作用^[6];本实验采用 20(S)-原人参二醇直接作用于人肺癌 A549 细胞和荷瘤裸小鼠,观察 20(S)-原人参二醇对肺癌细胞和荷瘤裸小鼠肿瘤组织的生长抑制作用。

1 材料

1.1 试剂与仪器:20(S)-原人参二醇(质量分数 98.5%)由浙江亚克药业有限公司提供,批号 020115。羧甲基纤维素钠(CMC,上海化学试剂公司提供);注射用环磷酰胺(CTX,上海华联制药有限公司提供,批号 20040205,规格为 200 mg/支);人肺癌 A549 细胞(中国科学院上海细胞生物研究所提供),RPMI 1640 培养基(Gibcol BRL 公司),胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶(上海生物工程有限公司);碘化丙啶(PI)购于北京鼎国生物有限公司;Rnase A 为 Sigma 产品;超净工作台,CO₂孵育箱,酶标仪(EI×800 Bio2TEK Instruments)。

1.2 动物和细胞株: BALB/C 裸小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,雌雄兼用,每批实验采用同一性别,由中国医学科学院实验动物繁育场提供,合格证号: SCXK11-00-0006,饲养于 SPF 级动物实验室。人小细胞肺癌细胞株 A549,购自中国科学院上海细胞生物研究所。

2 方法

2.1 对 A549 细胞生长的抑制作用:取对数生长期的 A549 细胞,调整细胞浓度为 4×10^5 /mL,接种于 96 孔培养板,细胞对照组(1% DMSO)和药物处理组加入 100 μ L 细胞悬液,每组设 3 个复孔,空白对照组加入 RPMI 1640 全培养基,每孔 100 μ L。细胞贴壁 24 h 后,药物处理组分别加入终浓度为 12.5、25、50、100、200 μ mol/L 20(S)-原人参二醇,100 μ L/孔,细胞对照组加入含 1% DMSO 的 RPMI 1640 培养液 100 μ L/孔,空白对照组只加入 RPMI 1640 培养液 100 μ L/孔。将 96 孔培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱分别培养 12、24、36、48、72 h 后,加入 5 mg/mL MTT 10 μ L,继续培养 4 h,弃上清液,加入 DMSO 100 μ L/孔,溶解紫色结晶体,振荡 10 min,待结晶溶解后置于酶标仪,测定 570 nm 的吸光度(A)值,计算抑制率[抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%]。实验重复 3 次,将作用时间和抑制率经一定变换后用非线性回归拟合计算,求得作用 24 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.2 对 A549 细胞凋亡及周期的影响:取对数生长期的 A549 细胞,调整细胞数为 5×10^5 个,接种于 6 孔培养板内,贴壁 24 h,分别加入终浓度为 100、50、

25 μmol/L 的 20(S)-原人参二醇,终质量浓度为 1 μg/mL 的 CTX。作用 24 h 后,用胰酶消化细胞,收集 1×10⁵ 个细胞于 70% 冰乙醇固定过夜,离心弃掉乙醇,用 PBS 洗涤 1 次,将细胞重悬于 300 μL PBS 中,加入 Rnase A 和 PI 室温避光染色 30 min,流式细胞仪激发波长 488 nm 检测凋亡率及各周期细胞比例。每批实验重复 3 次。

2.3 裸小鼠人肺癌模型的建立: A549 细胞在 37 °C、5% CO₂, 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,用无菌 PBS 液重悬制成 5×10⁷/mL 的单细胞悬液,每只裸小鼠于右侧腹股沟区皮下接种 0.2 mL 细胞悬液,每天观察各注射点有无红肿破溃。

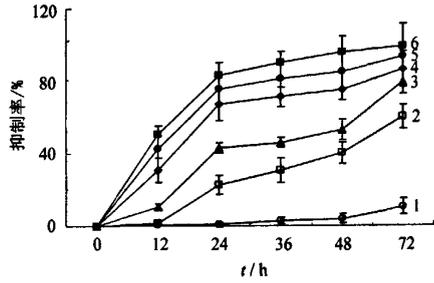
2.4 抑瘤实验:造模 7 d 后,注射局部出现明显皮丘,所有裸鼠均出现直径 8~10 mm 的皮下结节,移植瘤模型建立。将 40 只裸小鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分为模型组,给予 1% 羧甲基纤维素钠;阳性药对照组,给予 CTX 30 mg/kg;20(S)-原人参二醇大、中、小剂量组,分别给予 20(S)-原人参二醇 100、50、25 mg/kg。分组当日开始给药,1% 羧甲基纤维素钠和 20(S)-原人参二醇每日 ig 给药,连续 15 d,CTX 隔日 ip 给药,共 7 次。观察肿瘤体积和生长速度,停药后第 2 天处死裸鼠,称体质量,剥离瘤组织,称取瘤质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(1-实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%]。

2.5 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析。

3 结果

3.1 对 A549 细胞增殖的抑制作用:由图 1 可见随着 20(S)-原人参二醇浓度的升高,对细胞增殖的抑制率也逐渐升高,不同浓度的 20(S)-原人参二醇对细胞均有抑制作用。同时,在显微镜下观察细胞的形态变化,结果发现,在给药组中细胞皱缩、破裂、聚集成团,培养液中散在细胞碎片,其 24 h 的 IC₅₀ 值为 39.75 μmol/L,说明 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞增殖具有明显的抑制作用,且随着时间的增加抑制作用加强,存在时间剂量关系。

3.2 对 A549 细胞凋亡及周期的影响:流式细胞仪分析显示,20(S)-原人参二醇组及 CTX 组均出现典型的亚 G₁ 期凋亡峰,CTX 组及 100、50、25 μmol/L 20(S)-原人参二醇组凋亡率分别为 10.51%、32.47%、32.75%、33.51%,各剂量 20(S)-原人参二醇组凋亡率均高于对照组及 CTX 组 (P<0.05)。20(S)-原人参二醇组细胞处于 G₀/G₁ 期的比率明显



1~6-0,12.5,25,50,100,200 μmol·L⁻¹ 20(S)-原人参二醇
1-6-0,12.5,25,50,100,200 μmol·L⁻¹ 20(S)-protopanaxadiol
图 1 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Inhibition of 20(S)-protopanaxadiol on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

高于对照组 (P<0.05,0.01),处于 S 期的细胞的比率则明显低于对照组 (P<0.05,0.01),而 G₂+M 期相对稳定,说明 20(S)-原人参二醇组肿瘤细胞增殖指数下降,细胞生长受阻于 G₀/G₁ 期,细胞趋于成熟,见表 1。

表 1 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞凋亡和周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of 20(S)-protopanaxadiol on apoptosis and cycle of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C/ (μmol·L ⁻¹)	细胞周期比例/%			凋亡率 (Sub G ₁)/%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ +M	%
对照	-	68.36±12.15	26.66±18.29	4.98±7.01	10.51±3.79
CTX	1 μg·mL ⁻¹	80.25±9.14*	33.91±9.64	5.83±5.04	32.41±3.26***
20(S)-原人参二醇	25	80.77±8.02*	10.94±12.73*	8.29±6.43	32.47±3.61***
参二醇	50	82.20±3.98**	12.15±8.83*	5.54±5.75	32.75±2.66***
	100	84.60±7.88**	7.57±9.49**	7.82±4.31	33.51±4.40***

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001
*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs control group

3.3 荷瘤裸小鼠人肺癌模型的建立情况:所有 40 只裸小鼠在实验过程中均成活,各个细胞悬液接种点未见红肿破溃及出血表现。在细胞悬液接种的第 7 天,各个接种点均可见肿瘤结节,直径 8~10 mm。在实验中观察到裸小鼠在给予 20(S)-原人参二醇后无异常表现。肿瘤组织从裸小鼠上剥离下来进行肉眼观察,呈结节状,灰白色,质地偏硬,表面有假包膜,容易与周围组织剥离,用药组肿瘤横断面大部分可见中央出现明显的坏死灶,模型组则少见坏死灶。

3.4 抑瘤实验:由表 2 可见,除 CTX 组外,20(S)-原人参二醇各组裸小鼠实验前后体质量没有明显的差异,在 15 d 给药后,可明显抑制人小细胞肺癌在裸鼠体内的生长,其抑瘤率为 18.78%~50.02% (P<0.001),并呈现正相剂量依赖型药效关系。

表 2 20(S)-原人参二醇对人肺癌 A549 裸小鼠肿瘤生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Inhibition of 20(S)-protopanaxadiol on growth of human lung tumor A549 cells in nude mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物数/只		体质量/g		瘤质量/ g	抑瘤率/ %
		开始	结束	开始	结束		
模型	-	8	8	20.00±1.31	20.25±1.98	1.30±0.38	-
CTX	30	8	8	20.38±1.51	18.50±1.69	0.32±0.14***	75.35
20(S)-原人参二醇	25	8	8	20.13±1.25	21.25±1.58	1.05±0.35	18.78
	50	8	8	19.63±0.92	20.52±1.77	0.85±0.34*	34.37
	100	8	8	19.88±1.25	20.75±1.49	0.65±0.41**	50.02

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs model group

4 讨论

人参作为高档滋补珍品已有几千年的历史, 人参的主要活性成分是人参皂苷, 人参皂苷具有抗疲劳、延缓衰老、抑制肿瘤细胞生长、调节中枢神经系统、提高机体免疫力、改善心脑血管供血不足等作用^[7]。关于抗肿瘤作用方面研究最多的是二醇组人参皂苷 20(S)-人参皂苷 Rg₃ 和 Rh₂, 它们在抑制肿瘤血管生成、降低肿瘤微血管密度、诱导肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤转移、对化疗药物减毒增效等方面具有较广泛的抗肿瘤功效^[8,9]。将人参皂苷 Rg₃ 的 3 位上的末端葡萄糖水解掉可得到人参皂苷 Rh₂, 再把人参皂苷 Rh₂ 的 3 位上的最后一个葡萄糖水解掉就得到 20(S)-原人参二醇, 20(S)-原人参二醇作为人参二醇组皂苷化学水解及人肠道菌代谢的最终产物, 有可能比人参皂苷 Rg₃ 和人参皂苷 Rh₂ 具有更强的抗癌活性、抗癌增效减毒作用以及增强机体免疫功能的作用, 而且生物利用度可能更高^[10]。利用高沸点有机溶剂及碱催化降解方法制备了具有天然构型而且产率较高的 20(S)-原人参二醇, 基本解决了常规方法过程复杂、产率低、成本高的问题, 并对其抗肿瘤的作用进行了初步的研究。

本研究采用 MTT 法观察 20(S)-原人参二醇对人小细胞肺癌 A549 细胞增殖的影响, 结果表明 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞的增殖具有明显的抑制作用, 随着药物浓度的增加, 这种抑制作用也逐渐增强, 并且呈现一定的剂量依赖关系; 此外, 流式细胞仪结果显示, 经 20(S)-原人参二醇处理 24 h 后的 A549 细胞出现典型的亚 G₁ 期凋亡峰, 且 20

(S)-原人参二醇阻止肿瘤细胞生长于 G₀/G₁ 期, 初步结果表明 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞的杀伤作用可能由于其对 A549 细胞凋亡的诱导; 在动物实验中, 可以看到 20(S)-原人参二醇组肿瘤质量和模型组的肿瘤质量相比具有显著性差异 (P<0.001), 说明 20(S)-原人参二醇对荷瘤裸鼠的肿瘤生长具有明显的抑制作用。

肺癌的发生是多因素综合作用的结果, 很难从单一因素变化来确定其发病机制。本实验只说明了 20(S)-原人参二醇对 A549 细胞的增殖和荷瘤裸鼠肿瘤生长具有抑制作用, 其具体的作用机制仍有待深入研究。但 20(S)-原人参二醇作为具有抗肿瘤作用的单体皂苷, 其抗肿瘤生长的作用机制可能与其诱导肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤转移、清除肿瘤细胞和组织内的自由基、提高抗氧化水平、通过调控基因表达和信号传导通路来调控肿瘤细胞生长的作用有关。

参考文献:

- [1] 张化莲, 张梅月, 周爱青. 紫杉醇对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长抑制作用 [J]. 肿瘤基础与临床, 2006, 19(4): 291-293.
- [2] Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor super-family [J]. *Nat Rev Can Cer*, 2002, 2: 420-430.
- [3] Xie J T, Wang C Z, Wang A B, et al. Anti-hyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stems of *Panax ginseng* [J]. *Acta Physiol Scand*, 1995, 26: 1104-1110.
- [4] 高永丽, 梁 军, 赵园园, 等. As₂O₃ 对人胃癌细胞株 SCG-7901 裸鼠移植瘤的抗肿瘤机制研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 4(12): 255-258.
- [5] Kollmannsberger C, Mayer F, Kuczyk M, et al. Treatment of patients with metastatic germ cell tumors relapsing after high-dose chemotherapy [J]. *World J Urol*, 2001, 19: 120-125.
- [6] Chester J D, Hall G D, Forster M, et al. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer-current controversies and future direction [J]. *Cancer Treat Rev*, 2005, 30: 343-358.
- [7] Wang W, Zhao Y Q, Elizabeth R, et al. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng* [J]. *Cancer Chem Pharm*, 2006, 10: 280-300.
- [8] Zhao J S, Huang L Y, Belmar N, et al. Oral RDP58 allow CPT-11 dose intensification for enhanced tumor response by decreasing gastrointestinal toxicity [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2851-2859.
- [9] 陈婷梅, 王亚平, 陈地龙, 等. 人参皂苷诱导 K562 细胞凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 235-237.
- [10] Eun-Ah B, Han M J. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg₃ by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 58-63.