

乙酰氧基胡椒酚乙酸酯亚微乳对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响

华海婴¹, 姜玉军^{1,2}, 游晓英^{1,2}, 叶启霞¹

1. 郑州大学医药科学研究所, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 研究乙酰氧基胡椒酚乙酸酯 (ACA) 亚微乳和 ACA 原料药对 HeLa 细胞生长和凋亡的影响。方法 用 5、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ ACA 亚微乳和 ACA 原料药处理 HeLa 细胞, MTT 比色法检测 ACA 亚微乳和原料药作用 24、48、72、96 h 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用; 倒置显微镜观察 HeLa 细胞形态改变; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。结果 ACA 亚微乳和原料药均可明显抑制 HeLa 细胞增殖, 其中 ACA 亚微乳的抑制效果较好; 经 ACA 亚微乳和原料药处理的 HeLa 细胞显示典型的凋亡形态改变; HeLa 细胞凋亡率与 ACA 处理时间、浓度呈正相关; ACA 亚微乳和 ACA 原料药均使 HeLa 细胞阻滞于 S 期, 且 ACA 亚微乳作用强于 ACA 原料药。结论 与 ACA 原料药相比, ACA 亚微乳抑制 HeLa 细胞增殖和诱导凋亡的作用更显著。

关键词: 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯 (ACA); 亚微乳; HeLa 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0729-05

Effects of 1'-acetoxychavicol acetate submicron emulsion on proliferation and apoptosis of HeLa cells

HUA Hai-ying¹, JIANG Yu-jun^{1,2}, YOU Xiao-ying^{1,2}, YE Qi-xia¹

1. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To investigate the effects of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) submicron emulsion and its drug substance on HeLa cells. **Methods** Human HeLa cell was cultured and treated with 5, 12.5, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$ ACA submicron emulsion and its drug substance, respectively. MTT was used to detect the inhibition of proliferation in 24, 48, 72, and 96 h. Inverted microscope was performed to observe the morphologic changes of HeLa cells. Flow cytometry was used to evaluate apoptosis and cell cycle. **Results** ACA submicron emulsion and its drug substance could significantly inhibit the proliferation of HeLa cells. Cells cultured with ACA submicron emulsion and its drug substance were observed to present typical apoptosis and cell cycle changes. Flow cytometry revealed a time- and dose-dependent relationship. **Conclusion** Both ACA submicron emulsion and its drug substance could inhibit the proliferation of HeLa cells, and the inhibition of ACA submicron emulsion is better.

Key words: 1'-acetoxychavicol acetate (ACA); submicron emulsion; HeLa cells; proliferation; apoptosis

乙酰氧基胡椒酚乙酸酯 (1'-acetoxychavicol acetate, ACA) 是从姜科植物大高良姜 *Alpinia galanga* (L.) Swartz 的根茎和种子中分离得到的单体, 为大高良姜等挥发油中最主要的有效成分, 也是其辛香味的主要组分。研究表明, ACA 具有抗人类免疫缺陷病毒 (HIV)、抗黄嘌呤氧化酶、抗氧化、抑制溃疡、抑菌、抗结核病毒、杀虫、抗肿瘤等作用, 其抗癌谱较广且无明显的不良反应, 使得 ACA 在生物学、医学、药学和营养学等领域具备巨大的

开发潜力^[1-5]。但 ACA 几乎不溶于水, 在水溶液中不稳定, 可发生水解等反应, 成为开发临床制剂的障碍。亚微乳是以提高难溶性药物的溶解度、减少刺激性、提高药物靶向性等为目的的静脉注射用脂肪乳剂, 近年来已有地西洋、异丙酚、依托咪酯等亚微乳品种上市^[6]。本课题组将 ACA 制成亚微乳^[7], 探讨其对 HeLa 细胞增殖和凋亡的抑制作用, 以期 ACA 亚微乳作为候选创新药物的临床前研究提供依据。

收稿日期: 2011-10-31

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目 (112102310022); 河南省预研专项基金项目 (10yy0036)

作者简介: 华海婴 (1957—), 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物制剂及肿瘤药理学。

Tel: (0371)66658210 E-mail: hua_haiying@hotmail.com

1 材料

1.1 药物与试剂

ACA, 购自美国 LKT 实验室, 批号 A0817, 规格 1 g; ACA 亚微乳, 自制^[7], 批号 20101126。细胞周期染色溶液和 AnnexinV/PI 细胞凋亡试剂盒, 杭州联科生物公司。其余试剂均为分析纯。RPMI 1640 培养基、MTT、DMSO, Solarbio 公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; Hoechst 33342, Sigma 公司。

1.2 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞, 由郑州大学基础医学院细胞培养室传代保种。细胞于含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养, 隔天传代至对数生长期的细胞备用。

1.3 主要仪器

超净工作台, 苏州净化设备厂; CK40—32RPC 倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; PAS 流式细胞仪, 德国 Partec 公司。

2 方法

2.1 对 HeLa 细胞生长的影响

将适当浓度的 HeLa 细胞悬液接种于 96 孔板中, 实验设对照组、亚微乳对照组、ACA 原料药组和 ACA 亚微乳组, 细胞常规培养 24 h 后, 除对照组外, 其他各组分别加入空白亚微乳、ACA 原料药、ACA 亚微乳, 并使其终浓度分别为 5、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 每个浓度设 5 个复孔。分别于培养 24、48、72、96 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后弃上清液, 加 DMSO, 振荡溶解 10 min, 以空白孔调零, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度 (A) 值。计算细胞生长抑制率, 并利用改良寇氏法计算 IC_{50} 。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{给药组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$$

2.2 对 HeLa 细胞形态的影响

配制 $3 \times 10^4/\text{L}$ 细胞悬液并接种于预置盖玻片的 6 孔培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后弃上清液, 分别加入含 ACA 原料药 (200、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和 ACA 亚微乳 (200、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的培养基, 每孔 2 mL, 每个浓度设 2 个复孔, 对照组加不含药的培养基。培养 48 h 后取出盖玻片, PBS 清洗, 细胞固定液固定 10 min, PBS 清洗, 避光、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 Hoechst 33342 染色 10 min, 倒置荧光显微镜下观察, 拍照。

2.3 对 HeLa 细胞细胞周期和凋亡的影响

加细胞悬液于 6 孔板中, 培养 24 h 后弃上清液,

分别加入含 ACA 原料药 (100、50、25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和 ACA 亚微乳 (100、50、25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的培养基, 对照组加不含药的空白培养基, 每个浓度设 3 个复孔。培养 48 h 后收集细胞, 检测细胞凋亡时分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5、10 μL , 避光染色 5 min; 检测细胞周期时加入 PI 1 mL, 避光染色 30 min; 流式细胞仪分析细胞周期分布和凋亡率。

2.4 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 ANOVA 单因素方差分析法, 采用 SPSS 11.7 软件包进行统计学处理。

3 结果

3.1 对 HeLa 细胞生长的影响

ACA 亚微乳组与亚微乳对照组相比、ACA 原料药组与对照组相比, A 值差异均显著 ($P < 0.05$); ACA 亚微乳组与 ACA 原料药组的 A 值差异也显著 ($P < 0.05$); 相同浓度时 ACA 亚微乳的抑制率高于 ACA 原料药。随着培养时间的延长, ACA 亚微乳组的抑制率逐渐提高, 而 ACA 原料药组在 72 h 前的抑制率随时间的延长而升高, 但作用 72 h 后抑制率随时间延长而下降。ACA 原料药作用于 HeLa 细胞 24、48、72、96 h 的 IC_{50} 分别为 96.53、79.55、66.41、169.82 $\mu\text{mol}/\text{L}$; ACA 亚微乳作用于细胞 24、48、72、96 h 的 IC_{50} 分别为 42.39、29.50、14.06、10.12 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。结果见表 1 和图 1。

3.2 对 HeLa 细胞形态的影响

对照组 HeLa 细胞外形规整, 被染成淡蓝色。经 ACA 原料药和 ACA 亚微乳处理后, HeLa 细胞核染色加深, 核固缩成均一的致密物, 进而断裂, 胞膜不断出芽、脱落, 变成数个大小不等的凋亡小体, 另有部分细胞体积变大, 出现大量的多核细胞, 且随给药浓度的增加胞核碎裂程度加大, ACA 亚微乳组出现核碎裂、多核的现象更明显, 表明凋亡细胞数增加。结果见图 2。

3.3 对 HeLa 细胞凋亡率和细胞周期的影响

ACA 亚微乳和 ACA 原料药均可使 HeLa 细胞凋亡率增加, 并呈一定剂量相关性, 但在高浓度时细胞凋亡率明显下降, 在浓度相同时, ACA 亚微乳组的细胞凋亡率高于 ACA 原料药组。结果见表 2。ACA 亚微乳和 ACA 原料药均可诱导 HeLa 细胞周期改变, 使 G_0/G_1 期细胞比例减少, S 期比例增加, ACA 亚微乳的作用强于 ACA 原料药。结果见表 2。

表1 ACA亚微乳和原料药对HeLa细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Effect of ACA submicron emulsion and its drug substance on proliferation of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	A 值			
		24 h	48 h	72 h	96 h
对照	0	0.55 ± 0.04	0.96 ± 0.03	1.49 ± 0.03	1.42 ± 0.06
亚微乳对照	5	0.44 ± 0.02	0.73 ± 0.05	0.95 ± 0.14	1.24 ± 0.07
	12.5	0.42 ± 0.01	0.81 ± 0.06	0.76 ± 0.04	1.62 ± 0.00
	25	0.42 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.24 ± 0.03	1.23 ± 0.05
	50	0.45 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.12 ± 0.00	1.15 ± 0.05
	100	0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.09 ± 0.00	1.10 ± 0.00
	200	0.47 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.09 ± 0.01	1.08 ± 0.00
ACA 原料药	5	0.53 ± 0.03	0.91 ± 0.04	1.40 ± 0.02 [#]	1.34 ± 0.03 [#]
	12.5	0.52 ± 0.04	0.86 ± 0.04 [#]	1.29 ± 0.03 [#]	1.28 ± 0.01 [#]
	25	0.46 ± 0.03 [#]	0.73 ± 0.03 [#]	0.85 ± 0.03 [#]	1.33 ± 0.04 [#]
	50	0.44 ± 0.02 [#]	0.61 ± 0.01 [#]	0.81 ± 0.01 [#]	1.06 ± 0.04 [#]
	100	0.43 ± 0.03 [#]	0.65 ± 0.03 [#]	0.75 ± 0.05 [#]	0.93 ± 0.05 [#]
	200	0.11 ± 0.02 [#]	0.32 ± 0.05 [#]	0.70 ± 0.07 [#]	0.97 ± 0.01 [#]
ACA 亚微乳	5	0.38 ± 0.02 ^{*†}	0.59 ± 0.02 ^{*†}	1.23 ± 0.12 ^{*†}	0.84 ± 0.09 ^{*†}
	12.5	0.35 ± 0.03 ^{*†}	0.54 ± 0.01 ^{*†}	1.30 ± 0.00 ^{*†}	0.55 ± 0.01 ^{*†}
	25	0.33 ± 0.02 ^{*†}	0.33 ± 0.02 ^{*†}	1.27 ± 0.00 ^{*†}	0.13 ± 0.01 ^{*†}
	50	0.25 ± 0.02 ^{*†}	0.32 ± 0.05 ^{*†}	0.66 ± 0.08 ^{*†}	0.08 ± 0.00 ^{*†}
	100	0.25 ± 0.02 ^{*†}	0.25 ± 0.01 ^{*†}	0.41 ± 0.11 ^{*†}	0.07 ± 0.00 ^{*†}
	200	0.09 ± 0.00 [*]	0.11 ± 0.01 ^{*†}	0.10 ± 0.00 ^{*†}	0.07 ± 0.00 ^{*†}

与对照组比较: [#]P<0.05; 与亚微乳对照组比较: ^{*}P<0.05; 与ACA原料药组比较: [†]P<0.05

[#]P<0.05 vs control group; ^{*}P<0.05 vs submicron emulsion control group; [†]P<0.05 vs ACA drug substance group

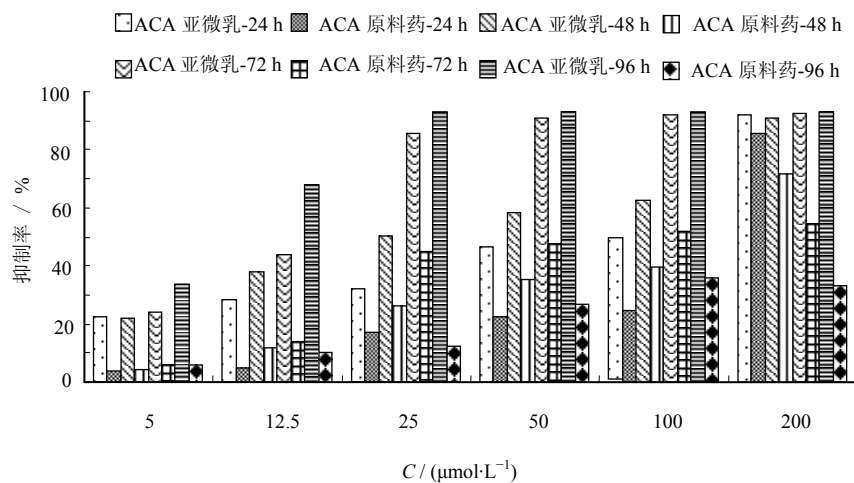


图1 ACA亚微乳和原料药对HeLa细胞的抑制率

Fig. 1 Inhibitory rate of ACA submicron emulsion and its drug substance on HeLa cells

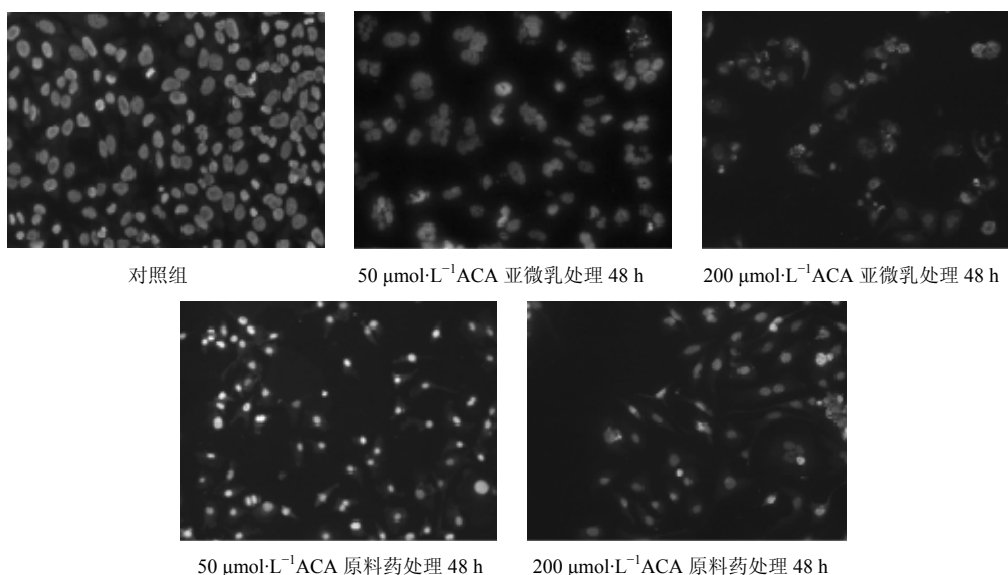


图 2 HeLa 细胞 Hoechst 33342 染色

Fig. 2 Morphology in nucleus of HeLa cells by Hoechst 33342 staining

表 2 ACA 亚微乳和原料药对 HeLa 细胞凋亡率和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Apoptosis rate and cell cycle of HeLa cells treated with ACA submicron emulsion and its drug substance ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞周期 / %			总凋亡率 / %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	0	80.50 ± 3.55	14.43 ± 0.57	5.07 ± 1.04	6.2 ± 0.68 [#]
ACA 亚微乳	25	79.07 ± 1.12 ^{#*}	16.30 ± 0.41	4.63 ± 0.80 [#]	16.7 ± 2.45 [#]
	50	77.50 ± 3.11 [#]	16.03 ± 0.99 [*]	6.48 ± 0.61 ^{#*}	46.5 ± 6.10 [#]
	100	50.45 ± 5.11 ^{#*}	41.44 ± 4.86 ^{**}	8.11 ± 0.61 ^{#*}	29.5 ± 5.11 [#]
ACA 原料药	25	75.01 ± 5.87	20.21 ± 2.47 [#]	4.79 ± 0.61	14.8 ± 1.48 [#]
	50	70.33 ± 3.76 [#]	24.47 ± 3.35 [#]	2.20 ± 1.35 [#]	31.8 ± 4.43 ^{#*}
	100	67.36 ± 6.95 [#]	28.94 ± 4.73 [#]	3.70 ± 0.63 [#]	27.1 ± 4.20 [#]

与对照组比较: [#]P<0.05; 与 ACA 原料药组比较: ^{*}P<0.05

[#]P<0.05 vs control group; ^{*}P<0.05 vs ACA drug substance group

4 讨论

本实验结果表明, ACA 亚微乳和原料药均可抑制 HeLa 细胞生长和诱导细胞凋亡, ACA 亚微乳的作用更显著, ACA 亚微乳的上述作用与用药时间和浓度呈正相关, 可能与其缓释性、增加难溶性药物的溶解度和药物在水相中的稳定性等特点有关。ACA 亚微乳和原料药浓度为 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导细胞凋亡的作用呈剂量相关性, 但在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率明显下降, 可能因为 ACA 对 HeLa 细胞的作用包括诱导凋亡和促进坏死, 所以当 ACA 亚微乳和原料药达到较高浓度时, 对细胞的抑制可能由诱导凋亡转向促进坏死^[8]。细胞周期检测结果表明, ACA 亚微

乳和原料药均可使 HeLa 细胞阻滞在 S 期, 阻止细胞向 G₂/M 期发展, 且 ACA 亚微乳比原料药的作用更强。本课题组前期研究发现 ACA 诱导 MCF-7 细胞凋亡可能与其下调 Bcl-2 和上调 Bax 基因表达有关^[9], 但 ACA 诱导细胞凋亡的具体机制有待进一步研究。

综上所述, 与 ACA 原料药比较, ACA 亚微乳对 HeLa 细胞具有更强的增殖抑制和诱导凋亡的作用, 两药的抗肿瘤作用均具有较佳的量效关系。ACA 及其制剂的抗肿瘤作用及其机制有待深入研究。

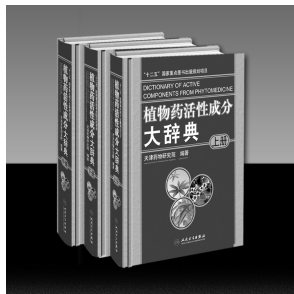
参考文献

[1] Jitoe A, Toshiya M. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis the contained curcuminoids [J]. J

- Agric Food Chem*, 1992, 40(8): 1337-1340.
- [2] Kutoba K, Nakamura K. Acetoxy-1, 8-cineoles as aroma constituents of *Alpinia galanga* Willd [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(12): 5244-5247.
- [3] Yang X G, Eilerman R G. Pungent principal of *Alpinia galangal* (L.) Swartz and its applications [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(4): 1657-1662.
- [4] Kondo A, Ohigashi H, Murakami A, et al. A potent inhibitor of tumor promoter induced Epstein-Barr virus activation, 1'-acetoxychavicol acetate from *Languas galanga*, a traditional Thai condiment [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(8): 1344-1345.
- [5] 刘成梅, 王芳, 李俦, 等. 超临界 CO₂ 萃取法和乙醇回流提取法提取大高良姜中 1'-乙酰氧基胡椒酚乙酸酯的比较 [J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 292-295.
- [6] 王海凤, 王东凯. 静脉注射用亚微乳的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2006, 4(2): 44.
- [7] 华海婴, 杨婷, 赵永星. 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯亚微乳的制备及其性质考察 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2424-2429.
- [8] 黄涛, 吕刚, 高大新, 等. 康莱特联合阿霉素诱导骨肉瘤细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2005, 14(6): 648-652.
- [9] 申莉, 徐宏平, 华海婴, 等. 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2009(2): 420-421.

“十二五”国家重点图书出版规划项目

《植物药活性成分大辞典》(上、中、下册)



植物中的活性成分是植物药发挥疗效的物质基础, 植物活性成分研究是阐释植物药的生物活性、临床疗效和毒性的必要手段, 也是新药发现和创制的可行途径, 更是中药药效物质基础研究、质量控制以及配伍合理性及作用规律研究的前提和基础。近些年来, 随着国际上植物化学以及天然药物化学学科的迅速发展, 大量的植物活性成分被研究和报道, 形成大量、丰富的植物活性成分研究的信息源。但是, 这些资料作为原始文献散在于成千上万的中外学术期刊上, 不能满足读者对植物活性成分的系统了解、方便查阅和迅速掌握的需要。

天津药物研究院在国家科技部和原国家医药管理局新药管理办公室支持下, 在建立“植物活性成分数据库”的基础上, 组织科研人员经过几年的艰苦努力编纂了大型工具书《植物药活性成分大辞典》。本套书分上、中、下共三册, 共收载植物活性成分 8 719 个, 共约 700 万字。正文中每个活性成分包含英文正名、中文正名、异名(异名之间用分号隔开)、化学名、结构式、分子式和分子量、理化性状(晶型、熔点、溶解性、旋光、紫外、红外、质谱、氢谱和碳谱)、植物来源、生物活性等项内容。并于下册正文后附有三种索引——植物药活性成分中文名、植物药活性成分英文名和植物拉丁名索引。全书涵盖大量国内外专业期刊的翔实数据, 内容丰富、信息量大, 具有反映和体现信息趋时、简便实用的特色; 作者在注重数据科学性、系统性的同时, 着眼于全球药物研发前沿需求与我国市场实际应用的结合, 为新药研究人员选题、立项、准确评价成果提供快速、简便、有效的检索途径, 为植物药的开发、利用提供疗效优异、结构独特的活性分子或先导化合物。

本套书的出版必将为我国“十二五”医药事业发展和天然药物产业发展提供翔实而可靠的科学数据和技术支撑, 为促进植物药资源的利用, 重大创新药物的研究以及促进特色产业的可持续发展提供趋时的数据资源和检索途径。

该书已批准列入“十二五”国家重点图书出版规划项目, 于 2011 年 11 月由人民卫生出版社出版发行, 大 16 开精装本, 每套定价 588 元。