

## 采用两种细胞模型评价野菊花的寒热属性

王 征, 张 宁, 成 程, 李红民, 刘建利\*

西北大学生命科学学院 西部资源与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

**摘要:** 目的 通过考察野菊花对人胃癌细胞株 SGC-7901、人宫颈癌细胞株 HeLa 生长的促进或抑制作用, 评价其寒热属性。方法 用 MTT 比色法考察野菊花对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的影响; 倒置显微镜观察野菊花对细胞形态特征的影响; 台盼蓝染色法分析野菊花对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞的细胞毒活性。结果 野菊花质量浓度  $\leq 20 \mu\text{g/mL}$  时对细胞生长有促进作用, 使细胞密度增加、结构致密、生长旺盛, 单个细胞略变大。台盼蓝染色表明野菊花对两种细胞无细胞毒活性。结论 野菊花药性温热, 且对 SGC-7901 细胞、HeLa 细胞无细胞毒活性。

**关键词:** 野菊花; 药性; HeLa 细胞; SGC-7901 细胞; 细胞增殖; 细胞毒活性

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2012)08 - 1586 - 04

## Evaluation on cold and hot characteristics of dried capitulum of *Chrysanthemum indicum* by two cellular models

WANG Zheng, ZHANG Ning, CHENG Cheng, LI Hong-min, LIU Jian-li

Key Laboratory of Resource and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract: Objective** To evaluate the cold and hot characteristic of the dried capitulum of *Chrysanthemum indicum* by two cellular models (growth promotion and inhibition of human cervical carcinoma HeLa and gastric carcinoma SGC-7901). **Methods** MTT assay was used to investigate the effect of the dried capitulum of *C. indicum* on the growth of HeLa and SGC-7901 cells *in vitro*. Morphological changes of HeLa and SGC-7901 cells treated with the dried capitulum of *C. indicum* were observed through invert microscope. Trypan-blue staining was used to analyze the cytotoxicity of the dried capitulum of *C. indicum* on HeLa and SGC-7901 cells. **Results** The dried capitulum of *C. indicum* could promote the growth and proliferation of HeLa and SGC-7901 cells at the concentration  $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ . Morphological observation showed the dried capitulum of *C. indicum* could increase the cell density, structure density, and cell vitality, and single cell became bigger. Trypan-blue staining showed the dried capitulum of *C. indicum* had no cytotoxicity on HeLa and SGC-7901 cells. **Conclusion** The results reveal that the dried capitulum of *C. indicum* shows a warm or hot characteristic and has no cytotoxicity.

**Key words:** dried capitulum of *Chrysanthemum indicum* L.; drug characteristic; HeLa cells; SGC-7901 cells; cell proliferation; cytotoxicity

野菊花为菊科多年生草本植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序<sup>[1]</sup>。《本草纲目》记载其“苦、辛，温”；《本草汇言》言其“气凉”；《中药学》记载其“苦、辛，微寒”<sup>[2]</sup>。文献记载中对野菊花寒热药性的描述存在分歧。中医认为温热药给药后使机体生理功能表现为亢奋，而寒凉药则表现为抑制，这在用寒、热中药制备寒证和

热证动物模型的实验中得到证实，即热药使动物体温上升、中枢兴奋、代谢增强；而寒药则相反。而作用于人体的寒热药性也应该在培养的细胞上有类似的体现，即温热药可能会促进细胞生长、代谢、增殖，而寒凉药对此表现为抑制。如果能够证明中药寒热药性与培养细胞的生长有相关性，则无疑提供了一种新的评价中药寒、热药性的简便方法。基

收稿日期: 2012-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872118); 教育部博士点基金资助项目 (20070697012); 陕西省重大科技专项资助项目 (2008ZDKG-67); 陕西省重点实验室基金资助项目 (08JZ74, 02JS15)

作者简介: 王 征, 在读博士, 主要研究方向为天然产物的仿生合成及结构修饰。Tel: 18729250806 E-mail: wazh0405@126.com

\*通讯作者 刘建利 E-mail: jlliu@nwu.edu.cn

于上述分析以及为了对野菊花药性有一个客观的认识,本实验室在前期研究中建立了评价中药寒热属性的细胞学方法<sup>[3]</sup>,结果显示常用的10多种热药和寒药对培养细胞的生长确实存在促进或抑制作用,证明该方法在评价寒热药性方面是可行的。本实验应用该方法、采用人胃癌细胞株 SGC-7901 和人宫颈癌细胞株 HeLa 评价野菊花寒热属性,为其临床合理应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

野菊花,购自西安藻露堂医药超市,经西北大学生命科学学院房敏峰高级工程师鉴定为野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。HyClone 改良型 RPMI 1640 培养液,赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司;无支原体胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO)、磷酸缓冲液 (PBS)、台盼蓝染料,西安沃尔森生物技术有限公司;0.25%胰蛋白酶,西安舟鼎国生物技术有限公司。

### 1.2 仪器

$\mu$ Quant 酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱, Sanyo 公司;96 孔板、超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;倒置光学显微镜,重庆光学仪器厂。

### 1.3 细胞

人胃癌细胞株 SGC-7901 由第四军医大学提供;人宫颈癌细胞株 HeLa 由西安交通大学医学院提供。

## 2 方法

### 2.1 药液的制备

精确称取野菊花 20 g,每次加水适量,煎煮 3 次,每次 30 min,煎液合并后浓缩、定容至 20 mL,质量浓度为生药 1 g/mL。药液在 10 000 r/min 条件下离心 30 min,上清液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,无菌水稀释至生药 10 mg/mL,备用。

### 2.2 细胞培养

将 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞消化于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 (pH 7.0~7.4) 中,恒温培养箱中在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下进行传代培养。

### 2.3 MTT 法检测细胞增殖

分别取对数生长期 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞,胰酶消化后调整细胞密度为  $5 \times 10^7/L$ ,接种于

96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后更换新鲜培养液 (每孔 200  $\mu$ L)。实验分成 9 组:8 个给药组加入不同体积的野菊花煎液 (10 mg/mL),使其终质量浓度分别为 5、10、20、50、100、200、400、800  $\mu$ g/mL,对照组加培养液,同时设调零孔,每组 3 个复孔。加药完毕将培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h,更换新鲜培养液 (每孔 180  $\mu$ L),每孔加入新配制的 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L,继续培养 4 h。吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,震荡 10 min (60 次/min) 后用酶标仪测定 490 nm 处吸光度 (A) 值。计算细胞增殖抑制率。抑制率为正值,表示对细胞增殖有抑制作用;抑制率为负值,表示对细胞增殖有促进作用<sup>[4]</sup>。实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$$

### 2.4 显微镜观察细胞形态改变

按“2.3”项方法对 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞进行分组和给药,细胞培养 48 h,更换新鲜培养液 (每孔 200  $\mu$ L),在倒置光学显微镜 ( $\times 4$ ) 下寻找视野,然后观察 ( $\times 10$ ) 细胞形态。

### 2.5 台盼蓝染色观察细胞形态的改变

按“2.3”项方法对 HeLa 细胞及 SGC-7901 细胞进行分组和给药,细胞培养 48 h,更换新鲜培养液 (每孔 180  $\mu$ L),每孔加入 0.4% 台盼蓝染液 20  $\mu$ L,作用 5 min 后在普通光镜下观察。

### 2.6 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对细胞增殖的影响

野菊花煎液质量浓度为 5、10、20  $\mu$ g/mL 时,对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的抑制率为负值,即对这两种细胞生长表现为促进作用;质量浓度  $\geq 50$   $\mu$ g/mL,细胞增殖抑制率均为正值,即对细胞生长表现为抑制作用,与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。这与先前对肉桂、花椒、仙茅的实验结果一致,即有些热药在低质量浓度时对细胞生长、代谢、增殖表现为促进作用,而在高质量浓度时则表现为抑制;寒药不论给药量大小均表现为抑制作用<sup>[5]</sup>。

### 3.2 对细胞形态的影响

在野菊花煎液对两种细胞增殖具最强促进作用的质量浓度 (10  $\mu$ g/mL) 和对 SGC-7901 细胞具有最强抑制作用的质量浓度 (200  $\mu$ g/mL) 下,HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞的形态观察见图 1。可见对

表 1 野菊花煎液对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 1 Effect of dried capitulum of *C. indicum* decoction on proliferation of HeLa and SGC-7901 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别    | $\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | SGC-7901 细胞   |         | HeLa 细胞       |         |
|-------|---|---------------|---------|---------------|---------|
|       |   | A 值           | 抑制率 / % | A 值           | 抑制率 / % |
| 对照    | —   | 0.942±0.105   | —       | 0.528±0.036   | —       |
| 野菊花煎液 | 5   | 1.046±0.113*  | -11.04  | 0.734±0.126*  | -39.00  |
|       | 10  | 1.201±0.040** | -27.50  | 0.835±0.054** | -58.10  |
|       | 20  | 0.981±0.042   | -4.1    | 0.658±0.092   | -24.60  |
|       | 50  | 0.818±0.079   | 13.12   | 0.248±0.006** | 53.01   |
|       | 100                                       | 0.442±0.0123* | 53.02   | 0.108±0.011** | 79.50   |
|       | 200                                       | 0.320±0.068*  | 66.03   | 0.155±0.051** | 70.60   |
|       | 400                                       | 0.370±0.082** | 60.72   | 0.104±0.006** | 80.30   |
|       | 800                                       | 0.405±0.104** | 57.01   | 0.102±0.001** | 80.70   |

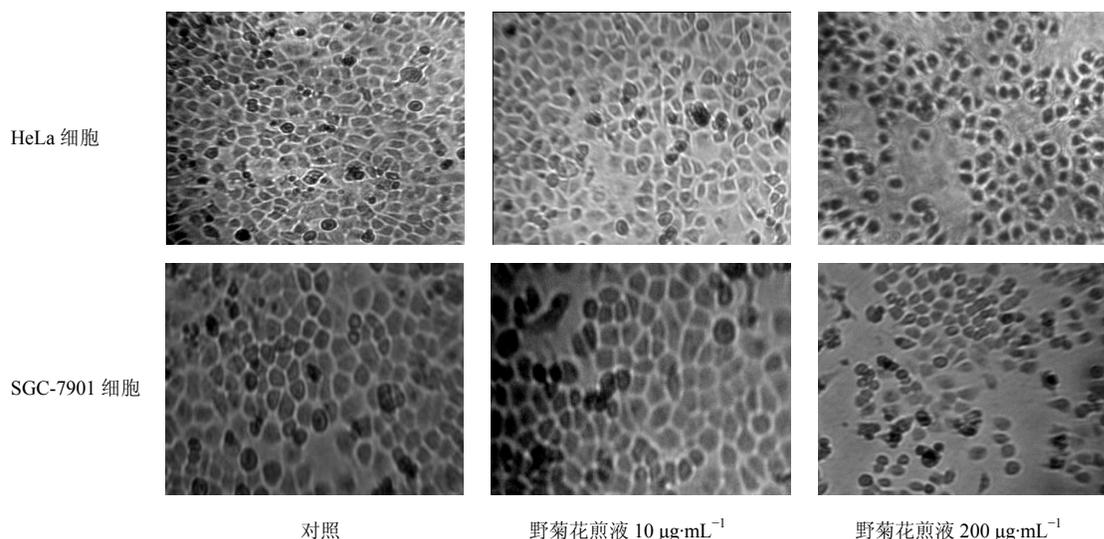
与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

图 1 野菊花煎液对 HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of dried capitulum of *C. indicum* decoction on cell morphous of HeLa and SGC-7901 cells

对照组 HeLa 细胞呈上皮样贴壁生长, 细胞间结构紧密, 生长旺盛, 细胞呈不规则多角形, 细胞均质而透明, 核膜、核大; 在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞固缩变圆, 细胞透明度明显下降, 颗粒感增强, 部分细胞脱落, 培养基总不似对照组干净, 表明有脱落细胞残骸存在。对照组 SGC-7901 细胞形态类似于对照组 HeLa 细胞, 也呈不规则的多边形, 细胞致密, 核膜、核仁轮廓明显, 细胞延展、扁平。野菊花质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 可见细胞结构依旧致密, 生长旺盛, 但单个细胞变呈不规则的多边形, 细胞致密, 核膜、核仁轮廓明显, 细胞延展、扁平。野菊花煎液为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 可见细胞密度变化不大, 单

个细胞变大, 但细胞结构致密, 生长旺盛; 在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 细胞密度明显降低, 细胞间结构松散、变圆, 细胞颗粒感增加, 部分 SGC-7901 细胞脱落, 培养基中有悬浮的细胞残骸。

### 3.3 对细胞的毒性

HeLa 细胞和 SGC-7901 细胞经台盼蓝染色后均未见有着色细胞, 表明野菊花煎液在实验质量浓度范围内对这两种细胞均无细胞毒作用。

## 4 讨论

对中药寒热药性的传统认识是前人用药经验的总结, 但也会因为时代、地域等方面的差异出现认识分歧<sup>[5]</sup>。虽然可用寒热证动物模型评价和验证中

药的寒热药性<sup>[6]</sup>,但动物个体之间的差异对实验结果影响很大,大部分情况下很难得出确切的结论。微量量热法的提出和实践是中药寒热药性研究的突破<sup>[7]</sup>,但也应该看到细菌与人体在很多方面上存在巨大差异,故该方法尚需更多的验证。人体细胞是组成人体的基本单位,与人体有更多的相似性,推测中药作用于人体表现的寒热属性在其细胞上也应有类似的效应,故本实验室建立了评价寒热药性的细胞学方法,经过对常用寒热中药的实验证明是可行的<sup>[3]</sup>。中药寒热药性在不同细胞上的表现是否一致,这是本实验想解决的问题之一,本实验结果表明野菊花在两种细胞上的效应是一致的。

野菊花的寒热属性历来就有争议,本实验结果显示其药性为温热,这与《本草纲目》言其“温”是一致的。至于温还是热,本实验方法尚不能区别,原因是每味中药使用量不同,所含成分不同,缺乏比较的共同基础。中医对中药药性最普遍的认识有寒、热、温、凉四性说;也有人认为应是五性说(应加上平性);还有人认为温热本质相同,只是程度上有差异,而寒凉依然,因此应该只有寒热两性,若再加上平性,就是寒热平三性<sup>[8-12]</sup>。至于几性说更合理、更科学,尚需进一步的探讨。

#### 参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版

社, 1977.

- [2] 颜正华. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [3] 程微微, 刘建利, 张宁, 等. 评价中药寒热药性的实验方法研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1122-1126.
- [4] Ye H, Wang K Q, Zhou C H. *et al.* Purification, anti-tumor, and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum* [J]. *Food Chem*, 2008, 111(2): 428-432.
- [5] 胡爱萍. 关于中药药性理论现代化研究的思考 [J]. 光明中医, 2006, 21(10): 20-22.
- [6] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽. 建立和发展中药药性评价平台 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(8): 629-631.
- [7] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 微量热法研究黄连与吴茱萸分煎后配伍时的药性差异 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1893-1897.
- [8] 冯松杰, 塔衣尔江. 中药性味新说 [J]. 新疆中医药, 2004, 22(2): 32.
- [9] 许红峰, 张瑞. 中药剂量与四性的动态相关性分析 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1247-1248.
- [10] 肖小河. 中药药性研究概论 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 481-484.
- [11] 邓家刚, 秦华珍, 郭宏伟, 等. 平性药药性定位及其作用特点的理论探讨 [J]. 广西中医药, 2007, 30(2): 32-33.
- [12] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽. 建立和发展中药药性评价平台 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(8): 629-631.