

基于糖酵解机制的白头翁皂苷多成分协同抑制人肺癌 NCI-H460 细胞增殖作用研究

官紫祎^{1,2}, 陈兰英^{1,2*}, 罗颖颖^{1,2}, 崔亚茹¹, 周祎寒^{1,2}, 李雪亮^{1,2}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要:目的 探讨白头翁皂苷中有效成分抑制人肺癌 NCI-H460 细胞增殖作用及其有效成分协同对肿瘤糖酵解机制的作用。方法 体外培养 NCI-H460 细胞, 以 MTT 法检测白头翁皂苷中白头翁皂苷 A3 (A3)、白头翁皂苷 D (PSD)、白头翁皂苷 B4 (B4)、常春藤碱 C (HC)、常春藤碱 D (HD)、常春藤皂苷元 (HY)、白头翁皂苷 R13 (R13) 和白头翁皂苷 PSA (PSA) 的抗肿瘤活性; 通过 CalcuSyn 3.0 软件将筛选出的白头翁有效成分进行配伍及协同抗肿瘤作用研究; 采用生物化学检测法和 Elisa 法检测糖酵解相关代谢产物 (丙酮酸、乳酸、葡萄糖) 和葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 (LDHA)、M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) 和己糖激酶 (HK) 水平; 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术和 Western blotting 技术检测糖酵解相关 41 个成员基因和关键蛋白细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2)、Ras、GLUT1、单羧酸转运体 4 (MCT4) 的表达。结果 体外抗肿瘤结果显示, 白头翁皂苷中以 PSD、R13、PSA 抑瘤活性最强, 其对 NCI-H460 细胞 IC₅₀ 分别为 5.2、4.6、7.9 μg/mL; 运用 CalcuSyn 3.0 软件确定了白头翁皂苷中 3 个有效单体成分配伍比例及判定了配伍后具有协同抗肿瘤效应; 生化和 Elisa 结果显示, 与对照组比较, 白头翁单体组及联合组的丙酮酸、乳酸、葡萄糖、HK、PKM2、LDHA 含量均明显降低, 且 GLUT1 含量明显升高 ($P < 0.05$), 与各单体组相比, 其联合组的丙酮酸、乳酸、葡萄糖、HK、PKM2、LDHA 含量均明显的降低, GLUT1 含量明显升高 ($P < 0.05$); qRT-PCR 结果显示, 单体联合组在网络图中节点最多, 其作用靶点多于各个单体组; Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 白头翁单体联合组可显著性降低细胞 ERK1/2、Ras、GLUT1、MCT4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 白头翁皂苷有效成分联用对 NCI-H460 细胞具有协同抗肿瘤作用, 其可能通过调节肿瘤细胞糖酵解发挥抗肿瘤作用。

关键词: 白头翁皂苷; 协同抗肿瘤; 糖酵解; NCI-H460 细胞; 葡萄糖转运蛋白 1; 乳酸脱氢酶; M2 型丙酮酸激酶; 己糖激酶; 细胞外调节蛋白激酶 1/2; Ras; 单羧酸转运体 4

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5289-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.023

Multi-components from *Pulsatilla Chinensis* saponins synergistically inhibit proliferation of NCI-H460 cells based on tumor glycolysis mechanism

GUAN Zi-yi^{1,2}, CHEN Lan-ying^{1,2}, LUO Ying-ying^{1,2}, CUI Ya-ru¹, ZHOU Yi-han^{1,2}, LI Xue-liang^{1,2}

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective The study was designed to investigate the antitumor effect of *Pulsatilla chinensis* saponins components and the synergistic effect of its effect components on tumor glycolysis. **Methods** NCI-H460 cell lines were cultured *in vitro*, MTT assay was used to detect the inhibitory rate of various components of *Pulsatilla chinensis* saponins. The compatibility and synergistic antitumor effect of different effect components were studied by CalcuSyn 3.0 software. Biochemical assay and Elisa assay were used to detect the glycolysis related metabolites (pyruvate, lactic acid, and glucose) and enzymes (GLUT1, HK, PKM2, and LDHA). Energy metabolism related gene members from KEGG pathway database and key protein (ERK1/2, Ras, GLUT1, MCT4) were detected by qRT-PCR and

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460618); 国家自然科学基金资助项目 (81860720)

作者简介: 官紫祎 (1992—), 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理学研究。E-mail: ziyiguan414@163.com

*通信作者 陈兰英 (1966—), 博士生导师, 研究方向为中药药理学研究。E-mail: clyxy2513@163.com

Western blotting. **Results** The antitumor results *in vitro* showed that PSD, R13 and PSA in *Pulsatilla chinensis* saponins had the strongest antitumor activity for human lung cancer NCI-H460 cells and the IC₅₀ were 5.2, 4.6, and 7.9 μg/mL, respectively. Using Calcsyn 3.0 software to confirm the distribution ratio of three effective monomers in *Pulsatilla chinensis* saponins and determine the synergistic antitumor effect after compatibility. The results of biochemical and Elisa assay showed that the content of pyruvate, lactate, glucose, HK, PKM2 and LDHA were significantly decreased and the GLUT1 content was significantly increased compared with the blank group ($P < 0.05$). Compared with each monomer group, the content of pyruvic acid, lactic acid, glucose, HK, PKM2 and LDHA in the combined group were significantly decreased and the content of GLUT1 was significantly increased ($P < 0.05$). Real-time PCR results show that the combinations group has the most nodes in the network diagram, and its target was more than each monomer group. Western blotting results showed that compared with the blank group, the combinations group significantly decreased the expression of ERK1/2, Ras, GLUT1, and MCT4 protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of effect components of *Pulsatilla chinensis* saponins has synergistic antitumor effect on NCI-H460 cells and the antitumor mechanism may be associated with the regulation of glycolysis.

Key words: *Pulsatilla chinensis* saponins; synergistic antitumor; glycolysis; NCI-H460 cells; GLUT1; LDHA; PKM2; HK; ERK1/2; Ras; MCT4

肺癌是最为常见的恶性肿瘤之一，居于全球恶性肿瘤发生率的首位，在其组织病理学分类中，75%~80%为非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）^[1]。目前，针对 NSCLC 的抗肿瘤药物并未取得良好的治疗效果，并且多数抗肿瘤药物严重损伤了患者正常细胞的同时也使肿瘤细胞产生耐药性。因此，从天然的植物中寻找抑制肿瘤细胞生长，并具有低毒性的药物及成分一直是抗肿瘤研究的热点。

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的干燥根，始载于《神农本草经》，性寒、味苦，具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效^[2]。临床上常用其治疗热毒血痢、症瘕积聚、细菌性痢疾等。现代药理研究表明，白头翁具有抗肿瘤、增强免疫功能、抗病原微生物等作用^[3]。近年来，对白头翁的化学成分进行提取、分离及鉴定，发现其主要成分为三萜皂苷类化合物，且此类提取物或其中的化学成分均能抑制多种肿瘤细胞生长^[4-6]，但是，白头翁抗 NSCLC 增殖作用和有效成分作用机制尚不明确。肿瘤为了满足其生物合成的供给及持续增殖，需要通过调整糖酵解途径来维持生长和生存，本研究基于肿瘤细胞糖酵解机制，探讨白头翁皂苷有效成分在抗肿瘤中的作用及其有效成分间的协同效应，以期通过构建白头翁多成分-多靶点网络模型科学诠释白头翁皂苷的多成分、多机制的抗肿瘤作用，为白头翁的临床运用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞，购自于中国科

学院上海生命科学研究院细胞资源中心，由本实验室传代保种。

1.2 药品与试剂

白头翁皂苷 A3（A3，批号 129724-84-1）、白头翁皂苷 D（PSD，批号 68027-15-6）、白头翁皂苷 B4（B4，批号 129741-57-7）、常春藤碱 C（HC，批号 14216-03-6）、常春藤碱 D（HD，批号 760961-03-3）、常春藤皂苷元（HY，批号 465-99-6）均购于南京春秋生物科技有限公司，质量分数≥98%；白头翁皂苷 R13（R13，批号 20131204）和白头翁皂苷 PSA（PSA，批号 20131204）均由江西中医药大学中药制剂制造技术国家工程研究中心天然药物研究事业部提供，质量分数≥98%；顺铂（批号 150402），江苏豪森药业股份有限公司。

RPMI 1640 培养基，北京索莱宝科技有限公司；胎牛血清，Biological Industries 公司；四甲基偶氮唑盐（MTT），美国 Sigma 公司；丙酮酸含量测定试剂盒和乳酸含量测定试剂盒，均购于南京建成生物技术有限公司；葡萄糖测定试剂盒，中生北控生物科技股份有限公司；葡萄糖转运蛋白 1（GLUT1）检测试剂盒、乳酸脱氢酶（LDHA）检测试剂盒、M2 型丙酮酸激酶（PKM2）检测试剂盒和己糖激酶（HK）检测试剂盒均购于由武汉优尔生科技股份有限公司；TriZol 裂解液，美国 Ambion 公司；SuperScript III 逆转录酶，美国 Invitrogen 公司；SYBR Green PCR Mastermix，美国 Applied Biosystems 公司；RIPA 高效蛋白裂解液、蛋白定量测试试剂盒（BCA Protein Assay Kit）均购于上海碧云天生物技术有限公司；山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠

IgG, 购于北京全式金生物技术有限公司; β -actin 抗体, 美国 CST 公司; GLUT1、单羧酸转运体 4 (MCT4)、Ras 抗体均购于美国 Abcam 公司; 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 抗体, 美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 仪器

生物安全柜 (美国 Thermo Fisher 公司); CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司); SpectraMax I3 多功能酶标仪 (美国 MD 公司); 荧光倒置显微镜 (德国 LEICA 公司); Real-time PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

NCI-H460 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 次日换液, 3~4 d 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

从液氮罐中取出 NCI-H460 细胞冻存管, 迅速置于 37 °C 恒温水浴中解冻, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除冻存液, 分别加入已配制的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 吹打均匀并移至细胞培养瓶中, 于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中静置培养, 传 3 代后, 取对数生长期细胞, 调整密度为 4×10^4 个/mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 继续培养 24 h 后, 将细胞进行分为 A3 组、PSD 组、B4 组、R13 组、PSA 组、HC 组、HD 组、HY 组、顺铂组, 分别加入培养基 100 μ L, 使每组药物终质量浓度均为 3.125、6.25、12.5、25、50 μ g/mL, 另设对照组 (加入不含药物的 RPMI 1640 培养基 100 μ L) 和调零组 (不加细胞只加 RPMI 1640 培养基 100 μ L), 药物组每组均设 5 个复孔, 对照组和调零组每组均设 3 个复孔。将 96 孔板置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 加入 5 mg/L MTT 20 μ L, 继续培养 4 h 后, 弃上清, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡溶解 10 min, 酶标仪于 490 nm 处测定各孔吸光度值 (A) 值, 重复实验 3 次。取其均值计算细胞抑制率和半数有效抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.3 药物协同作用评价

取对数生长期的 NCI-H460 肿瘤细胞, 调整密度为 4×10^4 个/mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 继续培养 24 h 后, 将细胞分为 PSD 组、R13 组、

PSA 组、PSD+R13+PSA 组, 另设对照组 (加入不含药物的 1640 培养基 100 μ L) 和调零组 (不加细胞只加 RPMI 1640 培养基 100 μ L), 药物组每组均设 5 个复孔, 对照组和调零组每组均设 3 个复孔。根据单体药物的 IC₅₀ 值, 运用 Calcsyn 软件处理得出 PSD、R13 和 PSA 的中效浓度 (Dm) 分别为 6.54、5.53、7.88 μ g/mL, 确定 Dm 为药物联用的比值, 单体联合组以各单体 Dm 值之和为中浓度, 并以 1.5 倍的比例进行稀释, 作用于 NCI-H460 细胞, 通过 MTT 法计算增殖抑制率, 并且根据 Chou-Talalay 中效原理, 采用 Calcsyn 3.0 软件计算出抑制率-联合指数 (Fa-CI) 以对定量水平下的效应进行定性描述。通过计算白头翁各个单体成分 CI 值, 判断各个成分药物的相互作用关系 (CI < 1, 两药协同作用, CI = 1, 两药相加作用, CI > 1, 两药拮抗作用) [7-8]。

2.4 葡萄糖、丙酮酸和乳酸含量检测

取对数生长期的 NCI-H460 细胞, 调整密度为 10^5 个/mL, 每孔 3 mL 接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后, 根据 Calcsyn 3.0 软件计算得出 PSD、R13 和 PSA 的协同配伍浓度, 对细胞进行分组和给药, 分别为 PSD 组 (终质量浓度为 5.5 μ g/mL)、R13 组 (终质量浓度为 4.6 μ g/mL)、PSA 组 (终质量浓度为 6.8 μ g/mL)、PSD+R13+PSA 联合组 (终质量浓度为 5.5 μ g/mL + 4.6 μ g/mL + 6.8 μ g/mL) 和对照组 (加入等体积培养基), 每组均设 3 个复孔, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 48 h 后, 终止培养, 收集各组上清于离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 同时收集细胞, 对细胞进行计数, 按照试剂盒说明书对葡萄糖、丙酮酸和乳酸含量进行测定。

2.5 糖酵解相关酶水平检测

取对数生长期的 NCI-H460 细胞, 按 “2.4” 项下方法培养、分组及给药后, 弃上清, PBS 洗涤细胞 2 次, 用胰酶消化并收集细胞于离心管, 2 000 r/min 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 最后加入适量 PBS 重悬细胞, 用一定功率的匀浆器处理细胞悬液, 使细胞破碎。按照试剂盒说明书对 GLUT1、HK、PKM2、LDHA 水平进行检测。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测糖酵解相关基因表达水平

取对数生长期的 NCI-H460 细胞, 按 “2.4” 项下方法培养后, 将细胞分为 PSD 组 (终质量浓度为 5.5 μ g/mL)、R13 组 (终质量浓度为 4.6 μ g/mL)、

PSA 组 (终质量浓度为 6.8 $\mu\text{g/mL}$)、PSD+R13 组 (终质量浓度为 5.5 $\mu\text{g/mL}$ +4.6 $\mu\text{g/mL}$)、PSD+PSA 组 (终质量浓度为 5.5 $\mu\text{g/mL}$ +6.8 $\mu\text{g/mL}$)、R13+PSA 组 (终质量浓度为 4.6 $\mu\text{g/mL}$ +6.8 $\mu\text{g/mL}$) 及 PSD+R13+PSA 联合组 (终质量浓度为 5.5 $\mu\text{g/mL}$ +4.6 $\mu\text{g/mL}$ +6.8 $\mu\text{g/mL}$)，另设对照组 (加入等体积培养基)，每组均设 3 个复孔。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中继续培养 24 h 后，终止培养，弃上清，PBS 液洗涤细胞 2 次，采用 Trizol 一步法提取总 RNA。紫外分光光度仪估算 RNA 纯度，并用 1% 甲醛变性琼脂糖电泳验证其完整性，调整总 RNA 的浓度至 600 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，取 1 μL 将其逆转录为 cDNA。逆转录体系、PCR 扩增体系及反应条件均参照试剂盒中的说明书设定。同一样品中，设 3 个重复管，ABI 7500 Software v2.0.4 进行数据检测和处理，以 GAPDH 为内参校正，计算 fold change (≥ 2 为表达显著上调基因， ≤ 0.5 为表达显著下调基因)，求得目的基因的相对表达水平。

2.7 Western blotting 检测糖酵解相关蛋白的表达

取对数生长期的 NCI-H460 细胞，按“2.6”项下方法培养、分组及给药后，弃上清，PBS 洗涤细胞 2 次，加入含 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液，冰上裂解 30 min，超声破碎细胞，12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，取上清液，按照蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。将各组蛋白浓度调至等浓度，与一定量的 loading buffer 混匀后，于沸水中加热 10 min 使蛋白变性，将各组样品进行 SDS-PAGE 电泳，转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后，孵一抗 Ras (1:10 000)、ERK1/2 (1:2 000)、GLUT1 (1:100 000)、MCT4

(1:1 000)、 β -actin (1:1 000)，4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜，用 TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:8 000)，室温摇床孵育 1.5 h，TBST 再次洗膜 3 次，每次 10 min，加入 ECL 工作液，采用全自动化学发光成像系统对蛋白条带进行显影，以空白组蛋白含量为 1，对各组蛋白含量进行半定量分析。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行 One-way ANOVA 方差分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 白头翁皂苷各成分对 NCI-H460 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示，PSD、R13 和 PSA 对 NCI-H460 细胞增殖具有明显的抑制作用，并且呈时间和剂量依赖性，其抑制作用明显高于其他各单体成分，通过计算得到的 IC_{50} 值分别为 (5.2 $\pm$ 0.3)、(4.6 $\pm$ 0.1)、(7.9 $\pm$ 0.5) $\mu\text{g/mL}$ ，均具有良好的抗肿瘤活性，见表 1 和图 1。

3.2 PSD、R13 和 PSA 对 NCI-H460 细胞的协同抗增殖作用

通过运用 MTT 法计算增殖抑制率及 CalcuSyn 3.0 软件计算 CI 值，结果显示，当抑制率 >0.55 时，其 $\text{CI}<1$ ，表示当抑制率 >0.55 时，PSD+R13+PSA 为协同作用。PSD+R13+PSA 的 $\text{Dm}=1.86$ ，小于各个有效成分 Dm 值，且曲线的 $r=0.944\ 51$ ，曲线可信度高，表明 PSD+R13+PSA 具有协同效应，见表 2。

表 1 白头翁皂苷各成分不同质量浓度对 NCI-H460 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Inhibition rate of each concentration of *Pulsatilla chinensis* saponin component in NCI-H460 tumor cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	抑制率/%	成分	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	抑制率/%	成分	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	抑制率/%
A3	3.125	-5.0 $\pm$ 3.7	R13	3.125	37.6 $\pm$ 8.4	HD	3.125	7.1 $\pm$ 2.9
	6.250	-5.8 $\pm$ 2.5		6.250	57.5 $\pm$ 4.3		6.250	15.1 $\pm$ 3.1
	12.500	-3.2 $\pm$ 6.3		12.500	99.4 $\pm$ 0.1		12.500	25.2 $\pm$ 24.1
	25.000	-8.1 $\pm$ 0.3		25.000	99.7 $\pm$ 0.1		25.000	16.2 $\pm$ 1.6
	50.000	3.5 $\pm$ 4.1		50.000	99.3 $\pm$ 0.8		50.000	11.5 $\pm$ 4.5
PSD	3.125	26.3 $\pm$ 14.4	PSA	3.125	25.9 $\pm$ 6.2	HY	3.125	14.4 $\pm$ 1.5
	6.250	59.1 $\pm$ 3.5		6.250	40.8 $\pm$ 1.5		6.250	14.0 $\pm$ 4.2
	12.500	91.3 $\pm$ 6.7		12.500	49.5 $\pm$ 4.8		12.500	21.7 $\pm$ 2.8
	25.000	99.7 $\pm$ 0.0		25.000	99.6 $\pm$ 0.1		25.000	54.7 $\pm$ 3.7
	50.000	99.7 $\pm$ 0.1		50.000	99.5 $\pm$ 0.2		50.000	98.1 $\pm$ 0.1
B4	3.125	-1.7 $\pm$ 5.1	HC	3.125	18.8 $\pm$ 5.5	顺铂	3.125	72.2 $\pm$ 1.8
	6.250	-2.6 $\pm$ 6.5		6.250	15.6 $\pm$ 5.7		6.250	81.7 $\pm$ 1.2
	12.500	2.0 $\pm$ 8.1		12.500	17.6 $\pm$ 2.6		12.500	96.4 $\pm$ 0.2
	25.000	1.7 $\pm$ 5.8		25.000	16.4 $\pm$ 6.5		25.000	98.0 $\pm$ 0.3
	50.000	3.6 $\pm$ 3.0		50.000	9.4 $\pm$ 1.5		50.000	98.8 $\pm$ 0.4

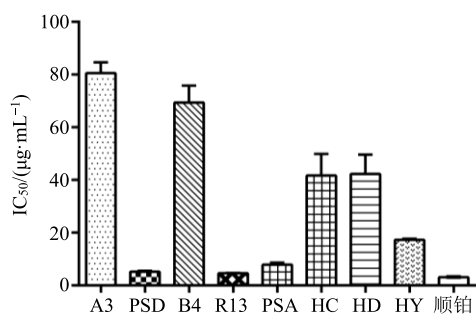


图 1 白头翁皂苷各成分对 NCI-H460 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibitory effects of saponins from *P. chinensis* on NCI-H460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 PSD、R13 和 PSA 对 NCI-H460 细胞增殖作用的联合效应

Table 2 Combined effects of PSD, R13, and PSA on proliferation of NCI-H460 cells

PSD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R13/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	PSA/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NCI-H460	
			Fa	CI
3.29	3.23	4.61	0.2	8.75
4.30	3.98	5.67	0.3	4.06
5.35	4.73	6.73	0.4	2.17
6.54	5.53	7.88	0.5	1.23
8.00	6.47	9.21	0.6	0.70
9.96	7.67	10.93	0.7	0.38
13.00	9.45	13.46	0.8	0.18

表 3 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞葡萄糖、丙酮酸和乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of PSD, R13, PSA, and combination on content of glucose, pyruvate, and lactate levels in NCI-H460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	单个细胞中含量/nmol		
		葡萄糖	丙酮酸	乳酸
对照	—	1.33 ± 0.16	0.41 ± 0.00	14.11 ± 1.69
PSD	5.5	7.89 ± 0.52***	0.32 ± 0.01*#	10.65 ± 0.18***
R13	4.6	11.54 ± 0.42***	0.34 ± 0.01***	8.59 ± 0.06***
PSA	6.8	12.64 ± 1.12***	0.27 ± 0.01**	8.94 ± 0.19***
PSD+R13+PSA	5.5+4.6+6.8	63.31 ± 0.12**	0.25 ± 0.00**	4.25 ± 0.06**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 PSD+R13+PSA 比较: # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$, 表 4、5 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs PSD + R13 + PSA group, same as Tables 4 and 5

明, 根据各组药物与基因表达之间的关系, 基于 Cytoscape 软件建立多成分、多基因抗肿瘤网络模型, 其中 PSD 组、R13 组、PSA 组和单体联合组总共涉及个 41 基因, 其中 PSD 组基因变化数有 11 个, R13 组基因变化数有 8 个, PSA 组基因变化数有 4 个, PSD+R13 组基因变化数有 2 个, PSD+PSA 组基因

3.3 PSD、R13、PSA 和单体联合对葡萄糖、丙酮酸和乳酸的影响

采用生化法检测 PSD、R13、PSA 和单体联合作用后 HCl-H460 细胞上清葡萄糖、丙酮酸和乳酸水平, 结果表明, 与对照组比较, 各给药组均可明显升高葡萄糖水平、降低丙酮酸和乳酸水平。与各单体组比较, 单体联合组细胞葡萄糖水平显著升高、乳酸水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 PSD 和 R13 组比较, 单体联合组细胞丙酮酸水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

3.4 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞糖酵解相关酶水平的影响

采用 ELSIA 检测 PSD、R13、PSA 和单体联合对糖酵解相关酶水平的影响, 结果表明, 与对照组比较, 单体联合组细胞 GLUT1、HK、PKM2、LDHA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 PSA 组比较, 单体联合组细胞 GLUT1 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 R13 组比较, 单体联合组细胞 HK 和 PKM2 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 PSD、R13 和 PSA 组比较, 单体联合组细胞 LDHA 水平显著降低 ($P < 0.01$), 见表 4。

3.5 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞糖酵解相关基因表达水平的影响

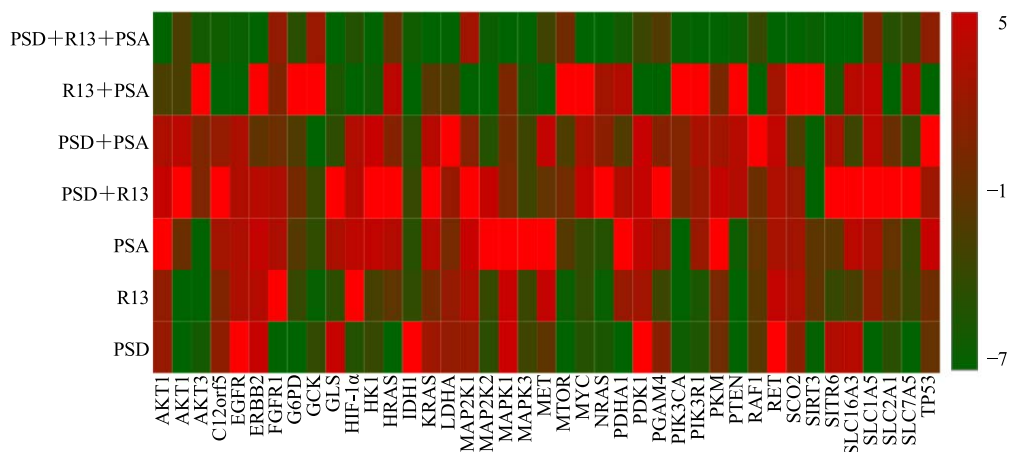
采用 qRT-PCR 检测 PSD、R13、PSA 和单体联合对肿瘤糖酵解相关 41 个基因表达的影响, 结果表

变化数有 7 个, R13+PSA 组基因变化数有 19 个, PSD+R13+PSA 组基因变化数有 22 个。

PSD+R13+PSA 组基因变化数最多, 在网络图中节点最多, 表明单体联合组在糖酵解中变化的相关基因的个数和成分的个数呈正比关系, 这反映了中药多成分、多基因的特点。见图 2、3。

表 4 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞糖酵解相关酶水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effect of PSD, R13, PSA and combination on relative enzymes of glycolysis in NCI-H460 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	单个细胞中含量			
		GLUT1/nmol	HK/ μmol	PKM2/nmol	LDHA/nmol
对照	—	16.69 $\pm$ 2.21	4.53 $\pm$ 0.36	761.32 $\pm$ 22.51	1.77 $\pm$ 0.02
PSD	5.5	10.88 $\pm$ 2.90*	3.27 $\pm$ 0.04*	217.40 $\pm$ 15.71**	1.56 $\pm$ 0.07***
R13	4.6	8.42 $\pm$ 2.28**	4.47 $\pm$ 0.11##	708.05 $\pm$ 21.35**	1.72 $\pm$ 0.15***
PSA	6.8	14.45 $\pm$ 5.65***	3.67 $\pm$ 0.35*	635.45 $\pm$ 23.57**	1.67 $\pm$ 0.03***
PSD+R13+PSA	5.5+4.6+6.8	4.63 $\pm$ 0.61**	3.14 $\pm$ 0.14*	649.32 $\pm$ 4.88**	0.50 $\pm$ 0.05**



红色代表上调基因, 绿色代表下调基因

Red-colored clusters represent up-regulated genes, and green colored clusters represent down-regulated genes

图 2 41 个差异基因表达的热图

Fig. 2 Heatmap of expression levels of 41 dysregulated genes

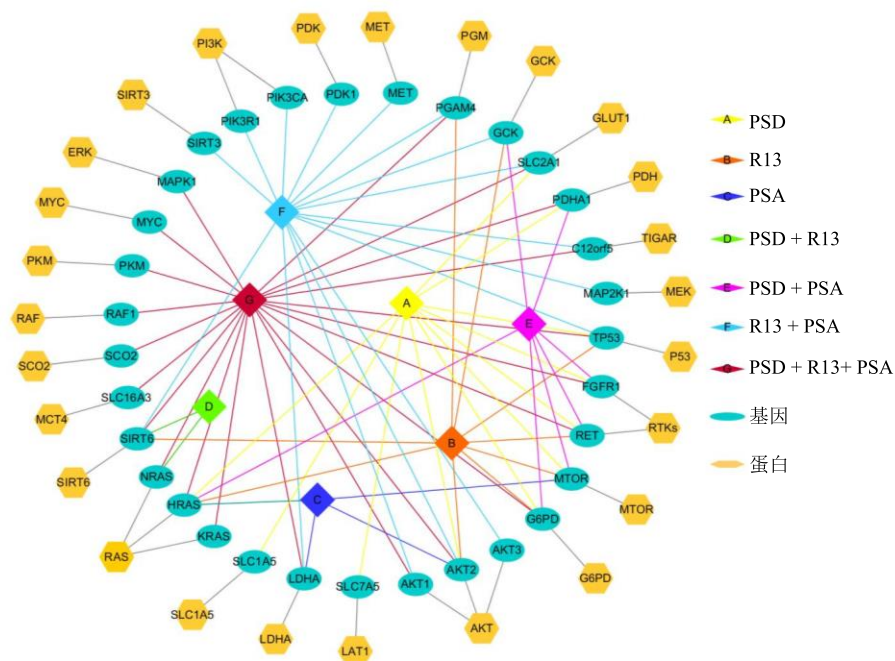


图 3 白头翁皂苷多成分-多基因-多蛋白网络

Fig. 3 Multi-component and multi-gene and multi-protein network model of *Pulsatilla chinensis* saponin

3.6 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞糖酵解相关蛋白表达水平的影响

采用 Western blotting 检测 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞糖酵解相关蛋白表达的影响, 结果表明, 与对照组比较, PSD+R13 组、PSD+R13 组、PSD+PSA 组和 PSD+R13+PSA 组细胞 ERK1/2、Ras、GLUT1 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), PSD 组、R13 组、PSA 组 PSD+R13 组、PSD+PSA 组和 PSD+R13+PSA 组 MCT4 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。其中 PSD+R13+PSA 组可明显降低 ERK1/2、Ras、GLUT1、MCT4 蛋白表达水平, 与 PSD 组、R13 组、PSA 组比较差异显著 ($P<0.05$)。见图 4 和表 5。

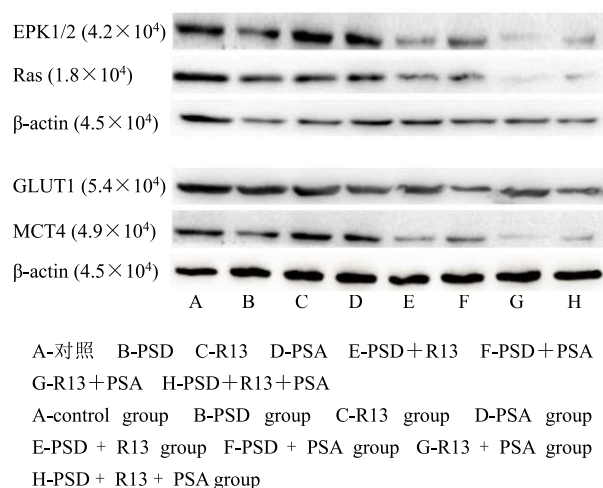


图 4 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞 ERK1/2、Ras、GLUT1、MCT4 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of PSD, R13, PSA and combination on protein expression of ERK1/2, Ras, GLUT1, and MCT4 in NCI-H460 cells

4 讨论

肺癌是当今全球分布最广、发病率最高的恶性肿瘤。目前, 临床上针对肺癌治疗的化疗药物主要以顺铂、吉西他滨、紫杉醇等或其联合用药为首选^[9]。虽然这些方法在肺癌治疗中取得了一定的进展, 但患者生存率仍较差, 易产生耐药性等仍是影响肺癌治疗的主要因素。因此, 从中药中寻找高效低毒的抗癌药物是当今许多研究致力于探索的目标。白头翁始载于《神农本草经》, 主温疟狂易寒热、症瘕积聚、瘕气、逐血止痛、金疮, 其中的“症瘕积聚”可以等同于现代医学中的肿瘤, 这表明自古以来白头翁就被用于治疗肿瘤。近年来的研究表明, 白头翁皂苷类化学成分能显著抑制肝癌、肠癌、胰腺癌和肾癌肿瘤生长^[10-13]。前期研究表明, 白头翁皂苷具有良好的抗肿瘤作用, 与文献报道一致^[14]。本研究发现, 白头翁皂苷中 PSD、R13、PSA 类化学成分对 NCI-H460 细胞 IC₅₀ 值分别为 5.2、4.6、7.9 $\mu\text{g/mL}$, 显示出 PSD、R13 和 PSA 均具有良好的抑制肿瘤增殖活性。

为了明确白头翁皂苷中 PSD、R13 和 PSA 3 个单体成分能否协同发挥抗 NCI-H460 细胞增殖作用, 最主要的是寻找一种对联合用药进行科学、合理、安全的评价方法。目前, 评价药物间的相互作用规律的理论基础主要有一些数学模型、受体学说或生物统计等方法^[15-16]。Calculusyn 软件基于 Chou-Talalay 建立的数学模型, 能够通过输入单一药物和联用药物的剂量-效应的值而计算得出 Dm、m、CI 值及 Fa-CI, 对量-效进行定性描述。根据 CI 值可以判断联合用药的相互作用: 相加作用 (additive effect, $CI=1$)、协同作用 (synergism, $0.7<CI<1$)

表 5 PSD、R13、PSA 和单体联合对 NCI-H460 细胞 ERK1/2、Ras、GLUT1、MCT4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of PSD, R13, PSA and combination on protein expression of ERK1/2, Ras, GLUT1, MCT4 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	蛋白相对表达量			
		ERK1/2	Ras	GLUT1	MCT4
对照	—	1.00	1.00	1.00	1.00
PSD	5.5	$0.84 \pm 0.12^{\#}$	$0.60 \pm 0.08^{\#*}$	$0.85 \pm 0.04^{\#}$	$0.83 \pm 0.07^{\#*}$
R13	4.6	$0.91 \pm 0.15^{\#}$	$0.83 \pm 0.17^{\#}$	$0.89 \pm 0.03^{\#}$	$1.26 \pm 0.16^{\#*}$
PSA	6.8	$0.90 \pm 0.07^{\#}$	$0.93 \pm 0.20^{\#}$	$0.80 \pm 0.02^{\#}$	$1.22 \pm 0.10^{\#*}$
PSD+R13	5.5+4.6	$0.44 \pm 0.12^{**}$	$0.50 \pm 0.18^{**}$	$0.72 \pm 0.05^{**}$	$0.78 \pm 0.08^*$
PSD+PSA	5.5+6.8	$0.72 \pm 0.18^*$	$0.62 \pm 0.17^*$	$0.61 \pm 0.02^{**}$	0.96 ± 0.09
R13+PSA	4.6+6.8	$0.32 \pm 0.02^{**}$	$0.29 \pm 0.15^{**}$	$0.67 \pm 0.13^{**}$	$0.25 \pm 0.04^{**}$
PSD+R13+PSA	5.5+4.6+6.8	$0.51 \pm 0.13^{**}$	$0.39 \pm 0.08^{**}$	$0.70 \pm 0.06^{**}$	$0.33 \pm 0.04^{**}$

为轻微协同作用, $0.3 < CI < 0.7$ 为协同作用, $CI < 0.3$ 为强协同作用) 以及拮抗作用 (antagonism, $CI > 1$)。因此, Calcsyn 软件作为中位药效法的计算机操作软件如今在评价药物间的相互作用, 尤其是在肿瘤药物的联合运用中被广泛使用^[7]。Yim 等^[17]运用 Chou-Talalay 原理将 5-氟尿嘧啶和顺铂二者联合, 发现二者联合可通过死亡受体途径和线粒体途径, 抑制宫颈癌细胞的生长。本研究首先运用 Calcsyn 软件确定有效成分联合用药的配伍比例, 其次将配伍后的各成分药物进行联合作用于肿瘤细胞, 再根据 MTT 实验获得的量-效关系数据和运用 Calcsyn 软件对药物联合作用进行定性及定量描述。结果表明, 当有效成分共同作用于肿瘤细胞时, 联合用药的 Dm 值均小于各单体药物, 而且当 $Fa > 0.55$ 时, 其 $CI < 1$, 显示了白头翁皂苷具有多成分协同抗肿瘤的作用特点。

正常细胞主要利用氧化磷酸化获取能量维持细胞的正常生长, 而肿瘤细胞能量代谢方式各异, 但其更倾向于利用有氧糖酵解来获取细胞增殖和生存所需要的能量^[18]。因此, 肿瘤由于其生长迅速, 常出现葡萄糖摄取量增高、糖酵解增加和乳酸堆积现象^[19]。GLUT1、HK、PKM2、LDHA 是直接参与糖酵解途径的关键酶, 对调控肿瘤细胞生长和增殖有着重要作用^[20]。本实验结果显示, 白头翁皂苷有效成分单体和联合作用后细胞上清液中葡萄糖含量明显升高, 乳酸、丙酮酸及糖酵解关键酶 GLUT1、HK、PKM2、LDHA 的含量均明显降低, 说明白头翁皂苷有效成分能抑制肿瘤细胞糖酵解, 影响肿瘤细胞生长和增殖, 且联合作用之后, 干预肿瘤细胞生长和增殖的效果更为显著。为了验证白头翁有效成分配伍后对肿瘤细胞糖酵解相关基因的影响是否具有协同作用, 依据 KEGG Pathway 数据库中的 central carbon metabolism in cancer 信号通路图, 选择糖酵解有关的 41 个基因为目标, 检测了白头翁皂苷有效成分及其联合作用后对目标基因的影响。结果表明, 通过比较有效成分及其联合作用后基因表达靶点的差异, 构建了白头翁多成分-多基因网络模型, 发现了白头翁有效单体及其混合物在肿瘤细胞糖酵解中影响的相关基因的个数与成分呈正比关系, 在基因水平上阐明了白头翁皂苷多成分、多基因抗肿瘤协同作用特点。

将白头翁皂苷有效成分及其联合作用于肿瘤细胞糖酵解相关基因表达的结果输入 IPA (Ingenuity

Pathway Analysis) 数据库进行分析, 结果显示, 白头翁有效成分联合作用后主要影响肿瘤细胞糖酵解的 Ras/MAPK/ERK1/2 信号通路。Ras/MAPK/ERK1/2 信号通路由以下成员构成: 受体酪氨酸蛋白激酶 (RTKs) -Ras 蛋白-MAPKKK (Raf) -MAPKK (MEK) -MAPK (ERK) -c-Myc 转录因子-DNA 合成。Ras 被 RTKs 激活后, 召集细胞浆内 Raf-1 丝-苏氨酸激酶至细胞膜上, Raf 激酶磷酸化 MAPK 激酶 (MAPKK, 即 MEK), MAPKK 激活 MAPK (即 ERK)。MAPK 被激活后, 转至细胞核内直接激活转录因子, 转录因子启动 c-Myc 的转录。原癌基因 c-Myc 的转录诱导激活 GLS、SLC1A5、GLUT1/GLUT2、PGM 蛋白的转录和翻译^[21]。因此, 本研究选取了 Ras、ERK1/2、GLUT1、MCT4 蛋白, 对其进行蛋白表达水平的验证。实验结果表明, 白头翁皂苷有效成分单体及联合后均能不同程度的影响 Ras、ERK1/2、GLUT1、MCT4 蛋白的表达, 且有效成分单体联合后, 蛋白表达水平降低的更为显著, 从蛋白水平上进一步证实了白头翁皂苷多成分、多蛋白协同抗肿瘤糖酵解的作用特点。

参考文献

- [1] Kim T E, Murren J R. Therapy for stage IIIA, IIIB and IV non-small cell lung cancer [J]. *Clin Pul Med*, 2004, 11(3): 161-174.
- [2] 王 征, 张 宁, 孙艳妮, 等. 白头翁寒热药性的细胞评价 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5): 359-362.
- [3] 姜峰玉, 陈定法, 孙 抒. 白头翁的研究现状和临床应用 [J]. *医学综述*, 2009, 15(24): 3785-3787.
- [4] 钟长斌, 李 祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要 [J]. *中医药学刊*, 2003, 21(8): 1338-1339.
- [5] 石宝俊, 李 茜, 张晓琦, 等. 中药白头翁地上部分的三萜皂苷成分 [J]. *药学报*, 2007, 42(8): 826-866.
- [6] 钟 邱, 倪琼珠. 白头翁中皂苷成分对肿瘤细胞的抑制作用 [J]. *中药材*, 2004, 27(8): 604-605.
- [7] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 68(3): 621-681.
- [8] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [9] Wang Y, Chen L, Huang G, et al. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57391.
- [10] Hong S W, Jung K H, Lee H S, et al. SB365 inhibits and

- angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(11): 1929-1937.
- [11] Hong S W, Jung K H, Lee H S, *et al.* SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 26-33.
- [12] Hong S W, Jung K H, Lee H S, *et al.* SB365, Pulsatilla saponin D suppresses proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(20): 801-808.
- [13] Hong S W, Jung K H, Lee H S, *et al.* SB365, Pulsatilla saponin D, targets c-Met and exerts antiangiogenic and antitumor activities [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(9): 2156-2169.
- [14] 罗颖颖, 陈兰英, 崔亚茹, 等. 白头翁皂苷抑制人 HT29 结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5): 52-56.
- [15] Kuhlmann J. Drug interaction studies during drugdevelopment: Which, when, how [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1994, 32(6): 305-311.
- [16] Tallarida R J. Combination analysis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 11(678): 133-137.
- [17] Yim E K, Lee S B, Lee K H, *et al.* Analysis of the *in vitro* synergistic effect of 5-fluorouracil and cisplatin on cervical carcinoma cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(3): 1321-1329.
- [18] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [19] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [20] 宋奎, 许晓军. 肿瘤细胞的糖酵解能量代谢机制 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(16): 1239-1242.
- [21] Park H, Im J Y, Kmi J, *et al.* Effects of apicidin, a histone deacetylase inhibitor, on the regulation of apoptosis in H-rastransformed breast epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(3): 325-333.