

南方红豆杉水提物对肿瘤细胞增殖抑制作用的研究

张 晶¹ 舒琦瑾² 高继良¹ 张 乐¹

摘要 目的 研究南方红豆杉水提物对人胃腺癌细胞株 SGC-7901 和人乳腺癌株 MCF-7 增殖的抑制作用和机制。**方法** 采用二苯基四氮唑溴盐比色法(MTT 法)检测南方红豆杉水提物和紫杉醇对 SGC-7901 和 MCF-7 细胞增殖的抑制作用;光镜观察其对 2 种细胞形态的影响;流式细胞仪检测其对 2 种细胞凋亡的影响。**结果** 南方红豆杉水提物对肿瘤细胞的增殖有抑制作用;其抑制作用机制为诱导细胞凋亡。**结论** 南方红豆杉水提物对肿瘤细胞的增殖有抑制作用。

关键词 南方红豆杉;抑制作用;人胃癌 SGC-7901 细胞;人乳腺癌 MCF-7 细胞

Study on Inhibitory Effects of *Taxus chinensis* var. *mairei* Aqueous Extract on the Proliferation of Tumor Cells ZHANG Jing¹, SHU Qi-jin², GAO Ji-liang¹, and ZHANG Le¹ 1 Tumor Department, Hangzhou Xiaoshan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (311200), China; 2 Department of Oncology, First Clinical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310006), China

ABSTRACT Objective To study the inhibitory effects of *Taxus chinensis* var. *mairei* Aqueous Extract (TAE) on SGC-7901 and MCF-7 cells, and to explore its mechanisms. **Methods** The inhibitory effects of TAT and Paclitaxel on the proliferation of SGC-7901 and MCF-7 cells were tested by MTT method. Their effects on the morphology of SGC-7901 and MCF-7 cells were observed by microscope. Its effects on the cell apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** The TAE had inhibitory effects on the proliferation of tumor cells, and its mechanisms were correlated to inducing the apoptosis of tumor cells. **Conclusion** TAE had inhibitory effects on the proliferation of tumor cells.

KEYWORDS *Taxus chinensis* var. *mairei*; inhibitory effect; SGC-7901 cell; MCF-7 cell

细胞死亡可以分为程序性死亡(细胞凋亡)和非程序性死亡(细胞自噬和坏死)^[1]。1992 年英国科学家 Hickman 等提出将诱导肿瘤细胞凋亡作为肿瘤治疗研究中的主要目标和手段,自此从凋亡机制方面研制抗肿瘤药物逐渐成为国际肿瘤研究的重点。近年来,人们在研究中发现中药能够有效地诱导肿瘤细胞的凋亡,这不仅为肿瘤的治疗提供了新的方法,同时也为中药的发展开辟了新的途径。

红豆杉是红豆杉科红豆杉属植物总称,是世界上公认的濒临灭绝的天然珍稀抗癌植物。《本草纲目》曾记载红豆杉可治疗霍乱、伤寒,具有排毒等疗效,《现代中药大辞典》、《本草推陈》等医药书中对其功效

有如下记载:“其性味苦、平,有小毒,归心经,功效:消肿散结,主治:肿瘤、肾病、风湿等”。目前已经从红豆杉中分离出 400 多种化合物,包括紫杉烷类化合物和少量的非紫杉烷类化合物^[2]。虽然目前对南方红豆杉的研究很多,但主要是对其醇提物紫杉醇的研究,对其水提物的研究尚未见报道。水煎剂是中药应用的传统方式及临床应用的主要形式,红豆杉水煎剂已在临床广泛应用,且安全有效。本课题通过对南方红豆杉水提物的研究,以紫杉醇为对照,为天然药物南方红豆杉的开发应用提供理论和实验依据。

材料与方法

1 细胞系及细胞培养 人胃腺癌细胞株 SGC-7901、乳腺癌细胞株 MCF-7 均购自中国科学院上海细胞生物研究所。用体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,细胞呈贴壁生长,实验时均取对数生长期细胞。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2081051);浙江省中医药管理局重点资助项目(No.2009ZA003)

作者单位:1. 杭州市萧山区中医院肿瘤科(杭州 311200);2. 浙江中医药大学附属第一医院临床医学院肿瘤科(杭州 310006)

通讯作者:舒琦瑾, Tel: 18657113831, E-mail: shuqjhz@yahoo.com.cn

2. 药物及制备

2.1 南方红豆杉水提物的制备 南方红豆杉: 购自浙江省中医院中药房(宁波泰康红豆杉生物工程股份有限公司生产, 批号: 110615, 8 g/袋)。南方红豆杉水提物的制备参考文献[3], 80 g 南方红豆杉 3 次煎煮药液经真空抽滤器过滤, 电磁炉上浓缩至约 100 mL, 旋转蒸发仪上浓缩成约 40 mL 药液, 入真空干燥箱中干燥, 得浸膏, 按 100% 浓度计算得率。取 1 g 水提物, 加入 10 mL 超纯水, 溶解、离心, 取上清液, 再经 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 制成母液浓度 100 mg/mL, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 紫杉醇注射液 紫杉醇注射液购自太极集团四川太极制药有限公司(批号: H19994040, 规格: 5 mL:30 mg)。紫杉醇分子式: $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$, 相对分子量为 853.92, 以其为实验用紫杉醇母液, 浓度计为 6 mg/mL。

3 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司); Hylcone 胎牛血清(美国 Thermo 公司); 0.25% 胰酶-EDTA(杭州吉诺生物医药技术有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT 粉, 美国 Sigma 公司); 0.9% 生理盐水(百特医疗用品有限公司); 0.01 mol/L PBS(美国 Gibco 公司); 凯基 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京市凯基生物技术有限公司, 批号: 10C1008A); Elx808 型酶标仪(美国 BioTek 公司); FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); BX20 型荧光显微镜摄像机(日本 OLYMPUS 公司)。

4 MTT 药物敏感性实验 收集对数期细胞, 以 RPMI-1640 培养液调整细胞悬液浓度约 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μL 。5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 至细胞单层铺满孔底, 以 RPMI-1640 培养液稀释药物至不同浓度, 每孔加入 100 μL , 南方红豆杉水提物浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL, 紫杉醇浓度分别为 2、4、6、8、10、12 $\mu\text{g/mL}$, 试验中每个浓度设 4 个复孔, 并设空白对照组。培养 24 h 后, 倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 96 孔板利用虹吸原理弃去培养液。每孔加入 100 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长处测量各孔的吸光值(OD 值)。按下列公式计算细胞生长抑制率: 细胞生长抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$ 。剂量和效应关系用药物浓度抑制软件(LOGIT 法)版本 1.0.0 求两种药物的半数抑制率(IC_{50})。

5 细胞凋亡形态学观察 取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液接种于 60 mm 无菌培养皿中, 50×10^4 个/皿。培养箱内培养 24 h 贴壁后弃上清, 空白对照组加入 RPMI-1640 培养液, 药物组浓度分别为: 南方红豆杉水提物 2.0、2.5、3.0 mg/mL, 紫杉醇 SGC-7901 细胞为 6、9、12 $\mu\text{g/mL}$, MCF-7 细胞为 4、6、8 $\mu\text{g/mL}$ 。24 h 后光镜观察细胞形态变化。

6 细胞凋亡检测 以凯基膜联蛋白-V 异硫氰酸荧光素标记法(Annexin V-FITC 标记法)定量检测细胞凋亡。取对数期生长细胞, 制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液接种于 60 mm 无菌培养皿中, 50×10^4 个/皿。培养箱内培养 24 h 贴壁后弃上清, 用 RPMI-1640 培养液稀释药物, 南方红豆杉水提物浓度分别为 2.0、2.5、3.0 mg/mL, 紫杉醇浓度: SGC-7901 细胞为 6、9、12 $\mu\text{g/mL}$, MCF-7 细胞为 4、6、8 $\mu\text{g/mL}$ 。作用 24 h 后, 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 终止, 离心, 收集, 用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min 离心 5 min), 收集细胞数约 3×10^5 个, 加入 500 μL 的 Bind Buffer 悬浮细胞, 分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶(Propidium Iodide), 混匀后室温避光孵育 15 min, 上流式细胞仪检测分析, 激发波长为 488 nm。实验重复 3 次。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 F 检验, 组间两两比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

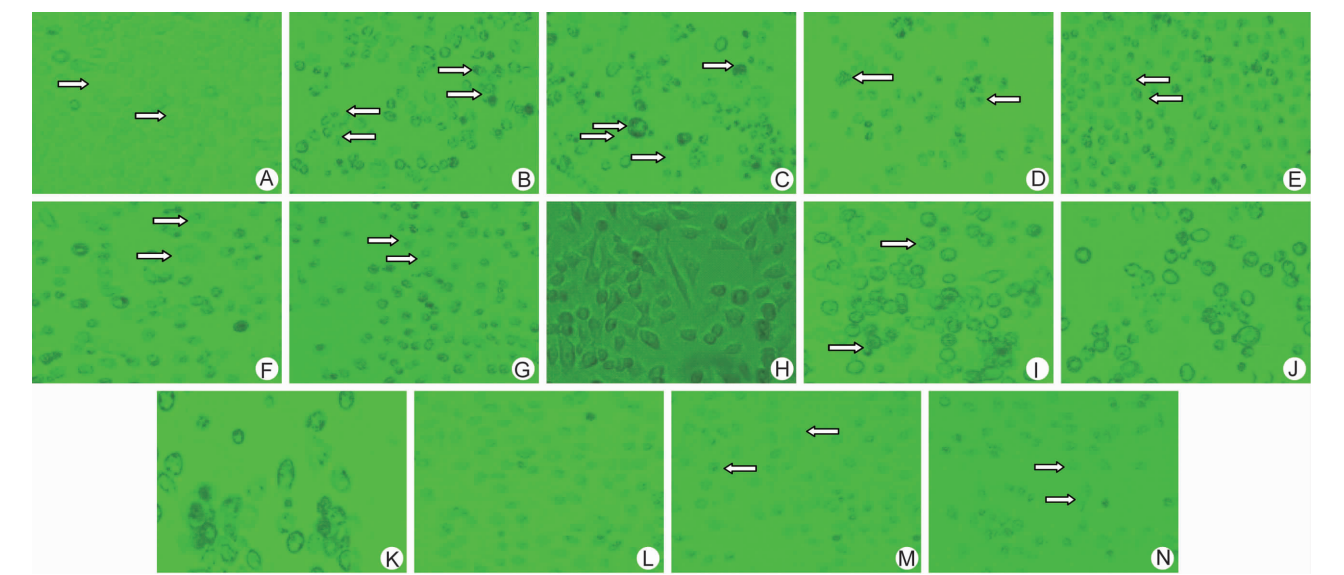
结 果

1 MTT 法药物敏感试验结果(表 1) 与空白对照组比较, 南方红豆杉水提物和紫杉醇分别作用于 SGC-7901、MCF-7 细胞 24 h 后, 对 SGC-7901 和 MCF-7 细胞均有明显的抑制作用, 且随着药物浓度的增加, 其抑制作用逐步增强, 呈剂量-效应关系($P < 0.05$, $P < 0.01$)。南方红豆杉水提物对两种肿瘤细胞的 IC_{50} 相近, 组间无明显差异。而紫杉醇作用于两种肿瘤细胞的 IC_{50} 差异较大, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明肿瘤细胞对南方红豆杉水提物的敏感性无明显差异, 而对紫杉醇的敏感性有显著差异。

2 南方红豆杉水提物和紫杉醇处理后肿瘤细胞形态的比较(图 1) 光镜观察南方红豆杉水提物和紫杉醇分别处理 SGC-7901、MCF-7 细胞 24 h 后, 与正常细胞比较, 随着红豆杉水提物剂量增加, SGC-7901

表 1 南方红豆杉水提物和紫杉醇对 SGC-7901、MCF-7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)								
组别	n	浓度	SGC-7901 细胞			MCF-7 细胞		
			生长抑制率(%)	IC ₅₀	OD 值	生长抑制率(%)	IC ₅₀	OD 值
空白对照	4	—			0.828 ± 0.076			0.807 ± 0.076
紫杉醇	4	2 μg/mL	10.70	(8.38 ± 0.91) μg/mL	0.739 ± 0.017 *	5.45	(6.20 ± 0.88) μg/mL [△]	0.763 ± 0.087 *
		4 μg/mL	15.58		0.699 ± 0.024 *	20.45		0.642 ± 0.033 *
		6 μg/mL	21.26		0.652 ± 0.039 *	44.61		0.447 ± 0.053 *
		8 μg/mL	42.51		0.476 ± 0.035 *	72.00		0.226 ± 0.017 **
		10 μg/mL	56.16		0.363 ± 0.026 **	85.00		0.121 ± 0.007 **
		12 μg/mL	78.71		0.176 ± 0.006 **			0.112 ± 0.018 **
南方红豆杉水提物	4	1.0 mg/mL	4.22	(2.23 ± 0.13) mg/mL	0.793 ± 0.070 *	4.83	(2.29 ± 0.15) mg/mL	0.768 ± 0.032 *
		1.5 mg/mL	21.74		0.648 ± 0.040 *	17.84		0.663 ± 0.055 *
		2.0 mg/mL	46.50		0.443 ± 0.063 **	31.97		0.549 ± 0.050 *
		2.5 mg/mL	62.56		0.310 ± 0.072 **	59.12		0.330 ± 0.058 **
		3.0 mg/mL	72.71		0.226 ± 0.061 **	76.58		0.189 ± 0.056 **
		3.5 mg/mL	81.52		0.153 ± 0.009 **	83.15		0.136 ± 0.018 **

注:与空白对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 SGC-7901 细胞比较,[△]*P* < 0.05



注:A 为 SGC-7901 细胞空白对照组,B、C、D 分别为紫杉醇浓度 6、9、12 μg/mL 处理组 SGC-7901 细胞光镜图片;E、F、G 分别为南方红豆杉水提物浓度 2.0、2.5、3.0 mg/mL 处理组 SGC-7901 细胞光镜图片;H、I、J、K 分别为紫杉醇浓度 4、6、8 μg/mL 处理组 MCF-7 细胞光镜图片;L、M、N 分别为南方红豆杉水提物浓度 2.0、2.5、3.0 mg/mL 处理组 MCF-7 细胞光镜图片。箭头所指表示不同药物作用后细胞的典型形态变化

图 1 南方红豆杉水提物和紫杉醇处理后肿瘤细胞形态的比较 (×100)

和 MCF-7 细胞的增殖受抑制,形态发生明显变化,细胞核固缩,细胞膜出芽,冒泡但完整性好;而随着紫杉醇剂量的增加,细胞肿胀,出现无膜性小体,细胞完整性破坏,成片细胞死亡。

3 南方红豆杉水提物和紫杉醇对 SGC-7901、MCF-7 细胞凋亡的影响比较(表 2,图 2) 与对照组比较,经南方红豆杉水提物处理 24 h 后的细胞早期凋亡比例均有明显升高(*P* < 0.05,*P* ≤ 0.01),且早期凋亡的比例呈现一定的剂量-效应关系;而经紫杉醇处理 24 h 后的细胞坏死和晚期凋亡的比例均有明显升高(*P* < 0.05,*P* < 0.01),且坏死和晚期凋亡的比例呈

现一定的剂量-效应关系。

讨 论

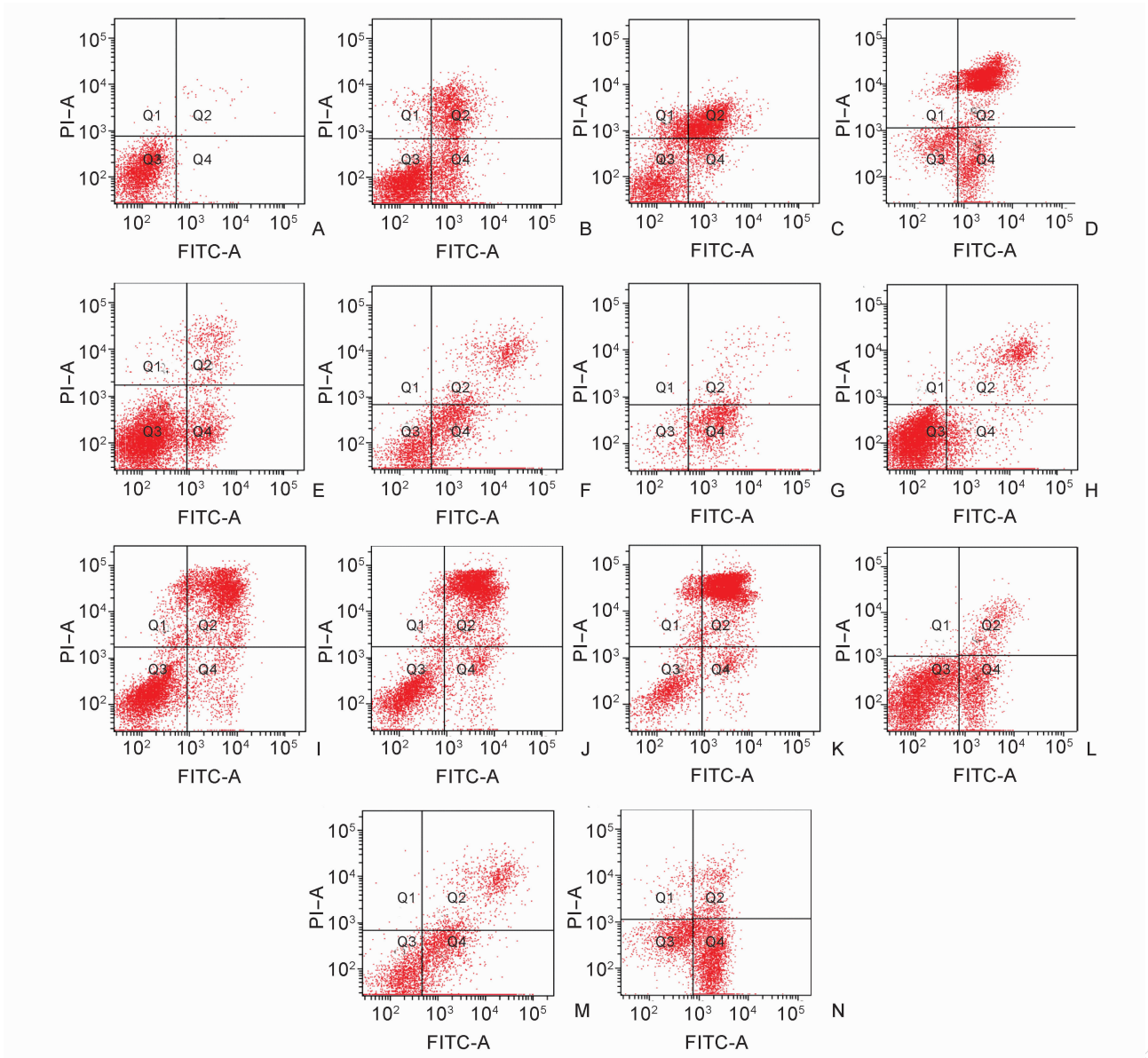
自 1971 年美国化学家首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)分离出具有独特结构的二萜类成分——紫杉醇以来,紫杉醇以其独特的抗癌活性引发红豆杉属植物的研究热潮^[4,5]。而临床应用的化疗药物紫杉醇仅为红豆杉的有效成分之一,且树皮中紫杉醇的含量仅为 0.01%,提取分离难度颇大^[6]。

鉴于:(1)紫杉醇在红豆杉中的微克级含量、提取分离难度较大^[6],需采取有机溶剂浸取;(2)水环境中的

表 2 南方红豆杉水提物和紫杉醇对 SGC-7901、MCF-7 细胞凋亡的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度	SGC-7901 细胞				MCF-7 细胞			
			UL (%)	LL (%)	LF (%)	UF (%)	UL (%)	LL (%)	LF (%)	UF (%)
空白对照	3	—	0.3 ± 0.006	85.4 ± 1.44	8.8 ± 0.15	5.4 ± 0.64	0.1 ± 0.006	88.9 ± 1.44	9.7 ± 0.16	1.3 ± 0.44
紫杉醇	3	4 μg/mL	—	—	—	—	5.0 ± 1.41	51.0 ± 3.12	6.5 ± 1.92	37.6 ± 2.16 *
		6 μg/mL	0.4 ± 0.01	70.5 ± 3.18	10.8 ± 1.75	15.3 ± 0.67	2.8 ± 1.02	33.3 ± 2.17	8.0 ± 0.77	55.8 ± 3.56 **
		8 μg/mL	—	—	—	—	5.9 ± 0.72	14.6 ± 1.51	5.2 ± 0.12	74.3 ± 3.02 **
		9 μg/mL	10.5 ± 1.02	44.2 ± 1.74	6.7 ± 1.05	38.7 ± 1.9 *	—	—	—	—
		12 μg/mL	3.3 ± 1.08	11.5 ± 0.76	17.8 ± 1.15	67.4 ± 2.1 **	—	—	—	—
南方红豆杉水提物	3	2.0 mg/mL	0.9 ± 0.01	83.8 ± 2.5	10.4 ± 1.07	4.9 ± 0.3	0.5 ± 0.03	72.4 ± 6.53	20.9 ± 1.07	6.2 ± 0.96
		2.5 mg/mL	0.3 ± 0.02	60.2 ± 2.56	35.3 ± 1.05 *	4.2 ± 0.3	0.2 ± 0.01	61.7 ± 2.12	36.0 ± 1.84 *	2.0 ± 0.02
		3.0 mg/mL	0.3 ± 0.005	30.1 ± 3.12	60.0 ± 2.51 **	9.6 ± 1.12	2.7 ± 0.01	20.9 ± 1.08	67.5 ± 3.53 **	8.9 ± 1.01

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;UF 为坏死 + 晚期凋亡;LL 为正常活细胞;LF 为早期凋亡;UL 为机械损伤



注:A 为 SGC-7901 细胞空白对照组;B、C、D 分别为紫杉醇浓度 6、9、12 μg/mL 处理组 SGC-7901 细胞图片;E、F、G 分别为南方红豆杉水提物浓度 2.0、2.5、3.0 mg/mL 处理组 SGC-7901 细胞图片;H 为 MCF-7 细胞空白对照组;I、J、K 为紫杉醇浓度 4、6、8 μg/mL 处理组 MCF-7 细胞凋亡图片;L、M、N 分别为南方红豆杉水提物浓度 2.0、2.5、3.0 mg/mL 处理组 MCF-7 细胞凋亡图片

图 2 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪分析南方红豆杉水提物和紫杉醇处理 SGC-7901、MCF-7 细胞凋亡图片

紫杉醇在低温和中性偏酸条件相对稳定,高温及强碱条件可强烈促进其降解,紫杉醇在 60 ℃以上、中性的水中会迅速降解^[7]。得出如下推理:南方红豆杉水提物的主要活性成分并非紫杉醇。本实验通过对比南方红豆杉水提物与紫杉醇对不同肿瘤细胞的体外抑制作用充分证明了此推理,并表明二者的作用机理完全不同。

实验表明南方红豆杉水提物及紫杉醇对 SGC-7901 和 MCF-7 细胞均有明显的抑制作用,呈剂量-效应关系。南方红豆杉水提物对两种肿瘤细胞的 IC₅₀ 相近,无明显差异。而紫杉醇作用于两种肿瘤细胞的 IC₅₀ 差异较大,有统计学意义($P < 0.05$)。表明肿瘤细胞对南方红豆杉水提物的敏感性无明显差异,而对紫杉醇的敏感性有显著差异。光镜下南方红豆杉水提物作用后肿瘤细胞呈典型的凋亡改变,而紫杉醇主要是引起细胞坏死。细胞凋亡流式定量检测结果亦表明:南方红豆杉水提物以促进肿瘤细胞凋亡为主,紫杉醇作用后以细胞坏死为主。

此外,南方红豆杉水提物具有一定的抑制人肺癌 A549 细胞增殖的作用,并呈一定的剂量依赖性和时间依赖性。能够阻止人肺癌 A549 细胞周期于 G₀/G₁ 期,诱导其凋亡^[8]。

随着研究的不断深入,现已证实肿瘤细胞的迅速生长扩散转移与细胞凋亡过弱或过强有关^[9]。加强对

诱导肿瘤细胞凋亡及机理的研究,无疑会给肿瘤的防治提供新的思路和途径。至于南方红豆杉水提物抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡的确切作用机制,尚需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy [J]. Curr Opin Cell Biol, 2004, 16(6): 663-669.
 - [2] 王圆.红豆杉多糖的提取、纯化及性质研究[D].杭州:浙江工业大学,2005.
 - [3] 李秀云.中药房中药店工作手册[M].广州:广东科技出版社,1991:103.
 - [4] Wani MC, Tayl HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agent VI: the isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.
 - [5] 邱德有,李如玉,李铃.红豆杉及南方红豆杉体细胞胚胎发生的研究[J].林业科学,1998,34(6): 50-54.
 - [6] 于湘莉,苗志奇,李美芽.紫杉醇在水环境中的降解动力学研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2009,27(5):520-523.
 - [7] 舒琦瑾,李萍,王彬彬.南方红豆杉水提物诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其分子机制的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2011,31(9): 1243-1247.
 - [8] 欧阳高亮,李祺福.细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J].国外医学(肿瘤分册),2000,27(5): 266-269.
- (收稿:2012-07-05 修回:2012-09-30)

第十六次全国中西医结合疡科学术交流会征文通知

全国中西医结合疡科学术交流会已经成功举办了十五届,影响不断扩大。为了进一步突出中西医结合的特点,为广大疡科和相关学科以及医药界的同仁提供一个交流经验、沟通信息、拓展业务、合作发展的平台,第十六次全国中西医结合疡科学术交流会暨中国中西医结合学会疡科专业委员会换届会议拟于 2013 年 9 月中旬在青海省西宁市召开。现将会议征文事项通知如下:

征文内容 (1) 有关国内外中医、中西医结合疮疡、糖尿病足、周围血管病、肿瘤、骨伤科、烧伤、皮肤病、肛肠、乳腺病等的临床研究及其理、法、方、药的基础理论研究;(2) 剂型改革,新技术、新药开发及推广等;(3) 治疗与检查仪器的开发及推广使用;(4) 国内外新技术、新方法应用经验介绍。

征文要求 (1) 论文以中医、中西医结合为主要内容。(2) 主题鲜明,层次清楚。总结材料要有客观指标和数据,论证要充分,有实用价值。一般不超过 4 000 字,摘要字数 800~1 000 字以内。(3) 论文须经单位推荐并加盖公章。(4) 论文请采用 word 格式,邮寄打印稿(地址见下),同时发送电子版至:yangzhang1972@126.com。(5) 请自留底稿,恕不退稿。

邮寄地址 天津医院骨科研究所(邮编 300211) 张杨收(请于信封左下角注明“会议稿件”字样);联系人及电话:张杨 1382156622;李兰青 15822130335;电子邮箱:yangzhang1972@126.com。

截稿日期 2013 年 7 月 31 日(以当地邮戳或邮件发送时间为准)。