

文章编号: 1000-5013(2009) 04 0425- 04

三种中草药对人肝癌细胞 SMMC7721 体外增殖抑制

陈碧强¹, 林 毅¹, 明艳林², 陈良华², 童庆宣²

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门华侨亚热带植物引种园 药用植物与植物药研究中心, 福建 厦门 361002)

摘要: 采用四甲基偶氮唑盐(MTT) 比色法和细胞凋亡形态观察, 初步探讨白英、毛麝香和使君子 3 种中草药的醇提取物对肝癌细胞 SMMC7721 体外增殖的抑制效果. 结果表明, 白英醇提取物对肝癌细胞 SMMC7721 有很强的抑制作用, 当抑制率为 50% 时, 样品的质量浓度(ρ_{50}) 达到 $25.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 且经 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 72 h 后, 细胞逐渐变圆, 体积缩小, 有凋亡小体形成, 呈典型的凋亡现象; 使君子、毛麝香的醇提取物对细胞抑制作用较弱, 在药物质量浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 SMMC7721 细胞的抑制率分别为 43.88%, 20.88%, 二者的 ρ_{50} 均大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 中草药; 肝癌细胞 SMMC7721; 四甲基偶氮唑盐比色法; 细胞凋亡; 体外增殖; 抑制

中图分类号: R 730.52; R 282.710.3

文献标识码: A

原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第三, 仅次于胃癌和食管癌. 目前, 肝癌的治疗方法主要包括外科治疗、放射治疗、化学治疗、中医药治疗等. 其中, 中医药在治疗原发性肝癌中占有重要地位, 尤其在防治方面有一定优势. 与前三者治疗方法相比, 具有独特的优势, 即通过稳定瘤体、改善症状来达到“带瘤生存”的目的^[1]. 近年来, 国内外均从中草药中发现了大量的具有抗肿瘤作用的化合物, 如靛玉红、马蔺子甲素、冬凌草甲素等^[2], 其中有些化合物已开发成抗癌药物, 如榄香烯乳等^[3]. 但迄今为止, 临床抗肝癌药物仍然非常少, 因此, 从传统中草药中筛选抗肝癌药物具有重要的意义. 已有的研究表明, 使君子科植物使君子(*Quisqualis indica* L.) 的成熟果实主要含有氨基酸、有机酸、脂肪酸、蔗糖等化合物, 具有保护肝脏、抗 AIDS 病毒^[4,5] 和抑菌^[6] 等作用; 茄科植物白英(*Solanum lyratum* Thunb.) 的全草含有 β -羟基甾体生物碱苷^[7], 有抗肿瘤、抗过敏、抑菌、抗炎和增强免疫功能等活性^[8]; 玄参科植物毛麝香(*Adenosma glutinosum* (L.) Druce) 的全草含挥发油, 其成分有 α -侧柏烯、 β -月桂烯、 α -松油烯、 γ -松油烯等^[7], 具有广谱杀菌、减轻炎症反应和治疗肝炎等作用^[9,10]. 然而, 3 种中草药对肝癌的作用效果仍未见系统研究. 本文以肝癌细胞 SMMC7721 为模型, 初步探讨这 3 种中草药醇提取物对肝癌细胞的体外抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料

白英、毛麝香、使君子均采自福建厦门地区, 经从事植物分类的张永田教授鉴定: 白英为茄科(*Solanaceae*) 植物白英(*Solanum lyratum* Thunb.) 的全草; 毛麝香为玄参科(*Scrophulariaceae*) 植物毛麝香(*Adenosma glutinosum* (L.) Druce) 的全草; 使君子为使君子科(*Combretaceae*) 植物使君子(*Quisqualis indica* L.) 的成熟果实. 人肝癌细胞株 SMMC7721 购自中国科学院上海细胞库.

收稿日期: 2008-07-22

通信作者: 林 毅(1976-), 男, 副教授, 主要从事生物医药与生物农药的研究. E-mail: lyhxm@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40601046); 厦门市科技创新基金重点项目(3502Z20062008)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 试剂和仪器

RPMI 1640, DMEM, 新生牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(上海吉泰生物科技有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, 北京华美生物工程公司), 其余均为分析纯. 旋转蒸发仪(日本 EYELA 公司);冷冻干燥机、酶标仪、二氧化碳培养箱(美国 THERMO 公司);洁净工作台(中国安泰公司);纯水机(英国 PALL 公司);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)等.

1.3 实验方法

1.3.1 样品的提取 将3种中草药白英、毛麝香、使君子烘干, 用高速组织捣碎机搅碎成粉末状. 采用浸渍法, 加入8倍量的体积分数为95%的乙醇进行提取、抽滤; 滤渣再加入5倍量的95%乙醇提取2~3次, 合并滤液. 用旋转蒸发仪进行减压浓缩, 得到浸膏. 最后, 冷冻干燥. 将上述样品用于肿瘤细胞毒性检测.

1.3.2 抗肿瘤活性测定 SMMC7721用新生牛血清的RPMI1640培养液于37℃, 体积分数为5%的CO₂及饱和湿度条件下培养. 贴壁的细胞用0.25%胰蛋白酶消化. 测定方法^[1]: 收获对数生长期的细胞, 按照每孔每微升50个细胞的量接种入96孔板中, 在37℃, 5%的CO₂培养箱中室温培育24h, 然后加入一系列不同质量浓度的药液200μL(药物质量浓度梯度为6.25, 12.5, 25, 50, 100mg·L⁻¹)继续培养. 用药组 and 对照组(加细胞不加药)均设4个复孔, 每个板均设有8个空白对照孔(不加细胞仅加等量培养基), 实验重复3次.

经过药物处理72h后, 吸掉上清液, 每孔加200μL的MTT(500mg·L⁻¹)后置于37℃室温培育4h, 小心吸弃上清液, 每孔加入200μL的DMSO终止反应; 用微孔板快速振荡器振荡20min, 使结晶物充分溶解. 用酶标仪在波长492nm下测定光密度值(D), 并根据下式计算生长抑制率(η).

$$\eta = [1 - (D_1 - D_0) / (D_2 - D_0)] \times 100\%$$

上式中, D₀, D₁, D₂分别为空白组、用药组和对照组的光密度值.

1.3.3 形态学观察 将对数生长期的细胞接种于盖玻片上, 用药组加入50mg·L⁻¹的药液, 对照组加等量培养液. 在37℃, 5%的CO₂培养箱中室温培育72h. 然后, 在倒置显微镜下观察对照组和用药组的细胞生长状况及形态学改变, 以及细胞凋亡过程.

2 实验结果

2.1 醇提取物对肝癌细胞的抑制作用

3种中草药的醇提取物对SMMC7721细胞增殖的抑制作用, 如表1所示. 由表1可以看出, 毛麝香、使君子、白英的醇提取物对体外培养的人肝癌细胞SMMC7721均有一定的抑制作用, 但抑制程度并不相同. 其中, 白英的醇提取物对SMMC7721细胞的抑制作用最大, 当抑制率为50%时, 样品的质量浓度(ρ₅₀)达到25.85mg·L⁻¹; 而使君子、毛麝香的醇提取物对细胞抑制作用较弱, 在药物质量浓度达到100mg·L⁻¹时, 样品对SMMC7721细胞的抑制率分别为43.88%, 20.88%, 二者的ρ₅₀均大于100mg·L⁻¹.

表 1 中草药醇提取物对 SMMC7721 细胞增殖的抑制作用

样品	η / %					ρ ₅₀ / mg·L ⁻¹
	ρ= 6.25 mg·L ⁻¹	ρ= 12.5 mg·L ⁻¹	ρ= 25 mg·L ⁻¹	ρ= 50 mg·L ⁻¹	ρ= 100 mg·L ⁻¹	
毛麝香	6.33±2.50	- 0.31±3.69	5.25±5.63	29.85±10.45	20.88±8.89	> 100
使君子	1.36±2.64	- 7.48±7.76	18.36±6.59	21.87±3.64	43.88±5.89	> 100
白英	- 0.16±6.85	45.96±7.40	71.13±8.38	63.85±8.39	60.65±3.27	25.85±5.05

2.2 药物作用后肝癌细胞形态学观察

根据MTT研究结果, 选用质量浓度为50mg·L⁻¹的白英、使君子、毛麝香醇提取物来作用肝癌细胞SMMC7721, 并在72h后进行形态学观察. 3种中草药醇提取物实验的用药组(右图)和对照组(左图)的细胞形态, 如图1所示. 图1中, 箭头所示为药物作用后凋亡细胞. 从图1可知, 3种中草药醇提取物都能够使SMMC7721逐渐变圆, 体积缩小, 细胞核染色质浓缩, 有凋亡小体的形成, 呈典型的凋亡现象. 其中, 白英组的凋亡现象最为明显, 而对照组细胞饱满舒展, 贴壁成片生长.

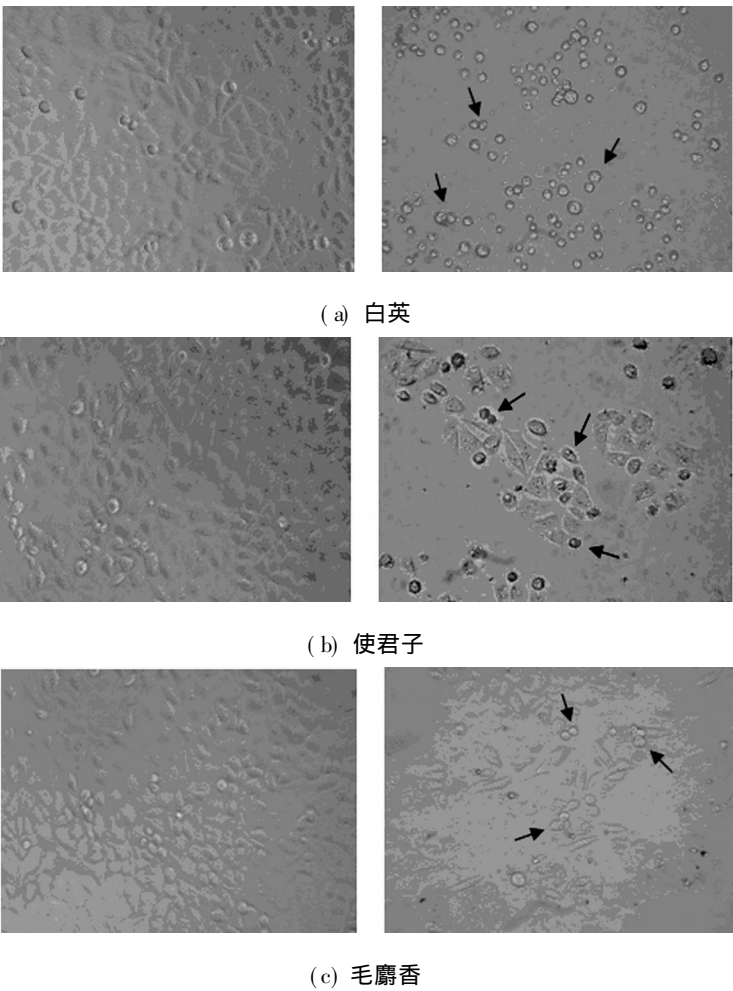


图 1 中草药醇提取物对 SMMC7721 细胞作用的形态观察

Fig. 1 Effect of ethanol extracts of Chinese herbs on the morphology of SMMC7721 cells

3 讨论

MTT 测定结果表明,使君子、毛麝香和白英对肝癌细胞 SMMC7721 均有不同程度的增殖抑制作用.白英的增殖抑制作用最强,其 ρ_{50} 为 $25.85\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 当质量浓度为 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对细胞的抑制率达到 71.13% ;在质量浓度为 $0\sim 25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,随着药物质量浓度的增加,抑制率随之增大,呈现明显的质量浓度与效应依赖关系;而当质量浓度高于 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制率略呈现降低的趋势.

细胞形态学研究亦表明,在光学显微镜下,对照组细胞具有肿瘤细胞典型的形态特征,而用药组细胞出现细胞凋亡现象. 其中,白英组的凋亡现象最为明显. 相比较而言,使君子和毛麝香的醇提取物对细胞抑制作用较弱,在药物质量浓度达到 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 SMMC7721 细胞的抑制率分别为 43.88% , 20.88% . 根据研究结果和国际新药筛选标准,白英具备抗肝癌药物开发的可能.

白英作为抗癌中药之一,已被证明具有重要的生物学活性. 例如,白英总苷对人胃癌细胞 SGC-7901 有显著的体外增殖抑制作用,且呈现良好的质量浓度-效应依赖关系^[12];白英水提液可显著抑制人肝癌 SMMC7721 细胞的增殖,下调 $c\text{-myc}$ 基因 mRNA 表达^[13]. 孙立新等^[14] 也报道白英水提取物及含药血清对 A375 和 HeLa 细胞较敏感,对 L929 细胞作用敏感性次之,对 MCF7 细胞抑制作用较差. 研究结果表明,白英醇提取物同样具有明显的体外抑制肝癌细胞 SMMC7721 的活性. 但是,到底是何种化学成分发挥主要作用,仍需要进一步研究.

研究表明,抗癌药物主要是通过对肿瘤细胞的直接杀伤、诱导凋亡、抑制 DNA 复制、阻断细胞有丝分裂和阻滞细胞周期等多种途径,实现对肿瘤细胞的抑制. 目前,关于白英的抗肿瘤作用的机制仍没有确切的认识,根据初步实验结果,可以认为白英醇提取物主要通过诱发人肝癌细胞 SMMC7721 的凋亡,从

而抑制细胞增殖,但这仍需要更深入的研究进行证实.

参考文献:

- [1] 林丽珠, 蓝韶清. 生存质量的评价在中医药治疗恶性肿瘤领域中的应用[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(2): 158-160.
- [2] NIE C. Development on effective compounds of anti tumor natural medicine[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1999, 30(1): 65-69.
- [3] 谭立欣, 季加孚. 抗癌新药榄香烯乳治疗晚期恶性肿瘤的临床评价[J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(3): 11-12.
- [4] LIN T C, MA Y T, WU J, et al. Tannins and related compounds from *Quisqualis indica*[J]. Chin Chem Soc, 1997, 42(2): 151-155.
- [5] CERDA B, LLORACH R, CERON J J, et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice[J]. European Journal of Nutrition, 2003, 42(1): 18-28.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 1372.
- [7] 宋立人, 洪 恂, 丁绪亮. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 424-425, 653-654.
- [8] 刘姝娟, 蔡淑娴. 茄属植物白英化学成分及药理活性研究进展[J]. 湖南农业科学, 2007(5): 174-176.
- [9] 钟卫红, 莫惠芳, 罗 英. 复方毛麝香洗剂治疗皮肤病疗效观察[J]. 皮肤病防治, 1999, 31(11): 39.
- [10] UEDA J Y, TEZUKA Y, BANSKOTA A H, et al. Antiproliferative activity of vietnamese medicinal plants[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(6): 753-760.
- [11] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996: 284-286.
- [12] 任 靖, 冯国楠, 王敏伟, 等. 白英总苷抗肿瘤作用初步研究[J]. 肿瘤防治, 2006, 33(4): 262-264.
- [13] 兰菲菲, 刘 誉, 陈万群, 等. 白毛藤提取物对肝癌 SMMC 7721 细胞增殖及 c-myc 基因表达的抑制作用[J]. 广东医学, 2006, 27(12): 1779-1782.
- [14] 孙立新, 任 靖, 王敏伟, 等. 白英水提物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 中草药, 2006, 37(1): 98-100.

Inhibitory Effect of Three Kinds of Chinese Herbs on Human Hepatoma Cell Line SMMC7721 *in Vitro*

CHEN Bi-qiang¹, LIN Yi¹, MING Yan-lin²,
CHEN Liang-hua², TONG Qing-xuan²

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Research Center for Medical Plants and Plant Medicine,

Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, Xiamen 361002, China)

Abstract: The anti-proliferative potential of ethanol extracts from *Solanum lyratum*, *Adenosma glutinosum*, and *Quisqualis indica* against hepatoma cell line SMMC7721 were evaluated *in vitro* by MTT assay and morphological observation. Ethanol extract from *Solanum lyratum* demonstrated strong inhibitory effect. When the value of P_{50} was $25.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibitory rate reached 50%. Apoptotic characteristics, including chromatin condensation, cell shrinkage, and the appearance of apoptotic bodies, were observed with $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for 72 h. The other two extracts from *Adenosma glutinosum* and *Quisqualis indica* had faint inhibitory effects, the inhibitory rate with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were 43.88% and 20.88%, respectively.

Keywords: chinese herbs; hepatoma cell line SMMC7721; MTT assay; cell apoptosis

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 陈国华)