

# 走马胎中三萜皂苷成分 H1 对 6 株肿瘤细胞增殖及对 A549 肺癌细胞凋亡及细胞周期的影响

谷永杰<sup>1,2</sup>, 穆丽华<sup>2</sup>, 董宪喆<sup>2</sup>, 姚成东<sup>2</sup>, 刘屏<sup>2\*</sup>

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853)

**[摘要]** **目的:**研究紫金牛科紫金牛属植物走马胎 *Ardisia gigantifolia* 中的三萜皂苷成分 H1 对不同肿瘤细胞株增殖的影响,并检测 H1 对 A549 肺癌细胞凋亡及细胞周期的影响。**方法:**以细胞密度为  $3 \times 10^7/L$  细胞悬液每孔  $90 \mu L$  接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,各组分别加入不同浓度(终浓度分别为 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu mol \cdot L^{-1}$ )的 H1 药液分别作用于 MCF-7, HepG2, HeLa, A549, Bel-7402, BGC-823 肿瘤细胞株 24, 48, 72 h, 并设阴性对照组。采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT 比色法)检测 H1 对肿瘤细胞株增殖的影响,筛选对 H1 敏感的细胞株,用荧光倒置生物显微镜观察细胞形态学变化、采用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。**结果:**H1 作用于 MCF-7, HepG2, HeLa 等 6 株肿瘤细胞 24, 48, 72 h 后的  $IC_{50}$  为 4.26 ~ 6.45  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 其中 A549 细胞株对 H1 最为敏感。终浓度为 0, 1.25, 2.5, 5  $\mu mol \cdot L^{-1}$  的 H1 干预 A549 细胞 24 h 后,中、高剂量组的细胞凋亡形态明显,发生早期凋亡;总凋亡率分别为 2.2%, 7.0%, 14.2%, 56.4%, 各剂量组与正常组比较均有统计学意义;细胞阻滞发生在  $G_2$  期,使 S 期急剧增加。**结论:**H1 对 6 种肿瘤细胞株有一定程度的抑制作用,对 A549 细胞增殖的抑制作用较显著,其诱导 A549 细胞的凋亡机制可能与对细胞周期阻滞有关。

**[关键词]** 走马胎; 三萜皂苷; 抗肿瘤活性; 凋亡; 细胞周期

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0130-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100130

## Effect of Triterpenoid Saponins H1 from *Ardisia gigantifolia* on Proliferation of Six Different Tumor Cell Lines and Apoptosis and Cell Cycle of A549 Tumor

GU Yong-jie<sup>1,2</sup>, MU Li-hua<sup>2</sup>, DONG Xian-zhe<sup>2</sup>, YAO Cheng-dong<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>2\*</sup>

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Department of Clinical Pharmacology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of triterpenoid saponins (H1) from *Ardisia gigantifolia* on the proliferation of different tumor cell lines. We select the A549 lung cancer cell line as target cell and detect the influence of triterpenoid saponins H1 on cell apoptosis and cell cycle. **Method:** The three different concentration of H1 (1.25, 2.5, 5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ), were applied to target cells for 24, 48, 72 hours respectively. The control group was not treated. The MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric method was used to detect the tumor cell line proliferation and select the cell lines sensitive to H1. The fluorescent inverted biological microscope was used to observe cell morphology and cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry instrument. **Result:** After comparing the  $IC_{50}$  of H1 acted on the target cell line (MCF-7, HepG2, HeLa, A549, Bel-7402 and BGC-823) for 24, 48, 72 h, the A549 cell line was proved to be

**[收稿日期]** 20131220(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31000153)

**[第一作者]** 谷永杰, 硕士, 初级药师, 从事药理学工作, Tel:010-66936678, E-mail: guyongjie200886@126.com

**[通讯作者]** \* 刘屏, 研究员, 博士生导师, 从事药理学研究工作, Tel:010-66936676, E-mail: Liuping301@126.com

the most sensitive one, a certain concentration of H1 intervention on A549 cells can lead to typical morphological changes and early apoptosis. Cell block was occurred in G<sub>2</sub> period, which makes S period increased dramatically. The difference between Medium and high dose group and the negative control group differences were statistically significant. **Conclusion:** The H1 in a certain range of doses can inhibit the proliferation of six different tumor cell lines and select the A549 tumor cell as target on cell apoptosis and cell cycle. The mechanism of apoptosis induced by A549 cell may be related to cell cycle arrest.

**[Key words]** *Ardisia gigantifolia*; triterpenoid saponins; antitumor activity; apoptosis; cell cycle

走马胎 *Ardisia gigantifolia* Stapf 为紫金牛科紫金牛属植物的干燥根茎,具有祛风湿壮筋骨、活血化瘀、止血生肌等功效<sup>[1]</sup>。从本属植物中发现越来越多的生物活性成分,特别是三萜皂苷具有显著的抗肿瘤活性,对胃癌、肝癌、结肠癌、鼻咽癌、宫颈癌、肺癌、膀胱癌、胸腺癌等癌细胞均有抑制作用<sup>[2]</sup>。本实验室前期研究也发现从走马胎中提取分离的皂苷类成分具有显著的抗肿瘤活性,H1 为走马胎中提取分离得到的结构新颖的化合物,化学名为:3 $\beta$ -O-{ $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-吡喃阿拉伯糖基}-16,28,30-三羟基-齐墩果烷-12-烯。本研究考察 H1 对乳腺癌细胞 MCF-7、肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402、肺癌细胞 A549、胃癌细胞 BGC-823、宫颈癌细胞 HeLa 6 株肿瘤细胞的细胞毒作用,并进一步从诱导凋亡、阻滞周期方面研究该化合物抑制 A549 肿瘤细胞增殖的作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402、人肺癌细胞 A549、人胃癌细胞 BGC-823、人宫颈癌细胞 HeLa 均由中国医学科学院药植物研究所药理毒理研究中心毕明刚研究员惠赠,由本实验室复苏、传代、培养。

**1.2 药品和试剂** H1 为本实验室从走马胎药材中提取、分离得到的化合物,纯度为 98.6%,DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司),RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司),MTT(北京 Solarbio 公司),Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(江苏碧云天生物技术公司),PI 碘化吡啶(Sigma 公司)。

**1.3 仪器** HPLC 高效液相色谱仪(日立),超净工作台(北京亚泰科隆公司),全波长微孔板光度计(美国 Dynex 公司),MCO-15AC 型二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司),IX51 型荧光倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司),FCM 型流式细胞仪(FACS

Calibur 美国 BD 医疗器械有限公司),紫外分光光度计(美国 Unico 公司),1420-012 型酶标仪(Perkin Elmer 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养**<sup>[3]</sup> 将细胞置于含体积分数为 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度的条件下培养,其中 MCF-7 细胞用 DMEM 培养基培养。2 d 换液 1 次,细胞生长至 70% ~ 80% 融合时传代,取对数生长期的细胞用于实验。

**2.2 MTT 法检测化合物 H1 体外抗肿瘤细胞增殖活性**<sup>[4]</sup> 取对数生长期细胞消化成单细胞悬液,用完全培养基稀释至密度为 3 × 10<sup>7</sup>/L,以每孔 90 μL 接种于 96 孔板中,培养 24 h。然后各组分别加入不同浓度(终浓度分别为 0,1.25,2.5,5,10,20 μmol·L<sup>-1</sup>)的 H1 药液,每组设置 5 个复孔。继续培养 24,48,72 h 后,加入终质量浓度为 5 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液,37℃ 避光孵育 4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡溶解 10 min,在 490 nm 波长处检测吸光度(A)。根据公式计算细胞抑制率:

$$\text{细胞抑制率} = 1 - [(A \text{ 受试药组} - A \text{ 空白组}) / (A \text{ 正常组} - A \text{ 空白组})] \times 100\%$$

采用 Excel 软件对抑制率和浓度做相关性分析,并采用曲线回归法计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

**2.3 H1 对 A549 细胞形态的影响**<sup>[5]</sup> 将 A549 细胞消化成单细胞悬液,以 1 × 10<sup>8</sup>/L 接种于 12 孔板中,每孔加 500 μL,每组设 3 个复孔,培养 24 h 后,换成含有终浓度分别为 0,1.25,2.5,5 μmol·L<sup>-1</sup> 的含药培养基,继续培养 24 h 置于荧光显微镜下观察细胞形态。

**2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡**<sup>[6]</sup> 将 A549 细胞以 1 × 10<sup>8</sup>/L 的密度接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,培养 24 h 后换成等体积的含 H1 药的培养基,继续培养 24 h,收集细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,离心收集细胞。向各细胞沉淀中加入 195 μL 的 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 μL 的 Annexin V-

FITC, 轻轻混匀, 室温避光孵育 20 min, 弃上清, 加入 190  $\mu\text{L}$  的 Annexin V-FITC 结合液, 重悬细胞, 加入 10  $\mu\text{L}$  PI 染色液, 轻轻混匀, 立即用流式细胞仪检测。

凋亡率 = 凋亡的细胞数 / 总细胞数  $\times 100\%$

**2.5 流式细胞仪检测细胞周期**<sup>[6]</sup> 细胞处理方法同 2.4, 收集的细胞先用 PBS 洗涤 2 次, 用预冷的 70% 乙醇在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  固定过夜。用 100  $\mu\text{L}$  RNase A ( $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 悬浮细胞,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min 后加入 400  $\mu\text{L}$  PI ( $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $4\text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

**2.6 数据分析** 采用 SPSS 13.0 分析软件对数据

进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组内数据进行正态分布检验, 组间数据进行方差齐性检验和单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 H1 对肿瘤细胞株的增殖抑制作用** 不同浓度的 H1 对 6 种肿瘤细胞株的增殖均有一定的抑制作用, 各肿瘤细胞株间无明显差异, 其中 A549 细胞株对 H1 最敏感, 24 h, 48 h, 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 ( $4.55 \pm 0.99$ ), ( $4.26 \pm 0.98$ ), ( $4.51 \pm 0.46$ )  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 差异无统计学意义; H1 对 A549 细胞的增殖抑制作用与药物干预时间无明显相关性, 但与药物浓度有相关, 具有典型的浓度依赖性, 见表 1 和图 1。

表 1 H1 作用于不同的肿瘤细胞株不同作用时间的  $\text{IC}_{50}$  值 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

时间/h	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
	MCF-7	HepG2	HeLa	A549	Bel-7402	BGC-823
24	$4.67 \pm 0.61$	$5.67 \pm 0.79$	$5.32 \pm 0.28$	$4.55 \pm 0.99$	$5.12 \pm 0.41$	$5.70 \pm 0.24$
48	$4.56 \pm 0.66$	$5.39 \pm 0.68$	$5.78 \pm 0.46$	$4.26 \pm 0.98$	$5.93 \pm 0.98$	$5.37 \pm 0.65$
72	$4.73 \pm 0.47$	$6.45 \pm 0.51$	$5.97 \pm 0.42$	$4.51 \pm 0.46$	$5.77 \pm 0.92$	$4.61 \pm 0.49$

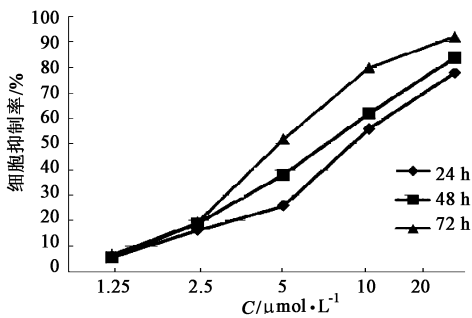


图 1 不同浓度的 H1 对 A549 细胞株抑制的影响

**3.2 H1 干预后 A549 细胞株形态学的变化** 在荧光显微镜下观察, 正常组细胞形态规则, 呈梭型贴壁生长, 胞浆饱满, 融合成片; 经  $2.5, 5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 干预后的 A549 细胞形态变圆, 体积缩小, 数量减少, 贴壁的细胞出现皱缩、变形, 细胞单个散在, 细胞间距明显变大; 经  $1.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 干预的 A549 细胞的形态无明显变化, 见图 2。

**3.3 H1 对 A549 细胞凋亡的影响** 浓度为 0,  $1.25, 2.5, 5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 干预 A549 细胞 24 h, 细胞早期凋亡率分别为 0.8%, 2.6%, 4.9%, 8.4%; 晚期凋亡率分别为 1.4%, 4.4%, 9.3%, 48%, 各剂量组与正常对照组比较差异具有统计学意义。

**3.4 H1 对 A549 细胞周期的影响** 正常组细胞多分布于  $G_1$  期, 约占总细胞数的 70%, S 期和  $G_2/M$  期各占约 8.6% 和 21.4%;  $1.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 干预细胞 24 h 后与正常对照组比较差异无统计学意

义。  $2.5, 5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 作用于细胞后 S 期细胞明显增加,  $G_2/M$  期细胞明显减少, 与正常组相比差异有显著性统计学意义。

表 2 不同浓度的 H1 干预 A549 细胞 24 h 后对细胞凋亡的影响

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	%	
		早期凋亡率	晚期凋亡率
正常	-	0.8	1.4
H1	1.25	2.6 <sup>1)</sup>	4.4 <sup>1)</sup>
	2.5	4.9 <sup>1)</sup>	9.3 <sup>1)</sup>
	5	8.4 <sup>1)</sup>	48 <sup>1)</sup>

注: 与正常组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

表 3 不同浓度 H1 干预 A549 细胞 24 h 后对周期的影响

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	%		
		$G_1$	S	$G_2/M$
正常	-	70	8.6	21.4
H1	1.25	68	10.4	21.6
	2.5	52.6 <sup>1)</sup>	34 <sup>1)</sup>	10.4 <sup>1)</sup>
	5	42 <sup>1)</sup>	57.2 <sup>1)</sup>	0.8 <sup>1)</sup>

### 4 讨论

本研究表明走马胎中分离得到的三萜皂苷化合物 H1 对 MCF-7, HepG2, A549 等 6 种肿瘤细胞株有明显的增殖抑制作用, 而对不同类型的肿瘤细胞株无明显的选择性, 表明该化合物抗癌谱较广; 笔者考察

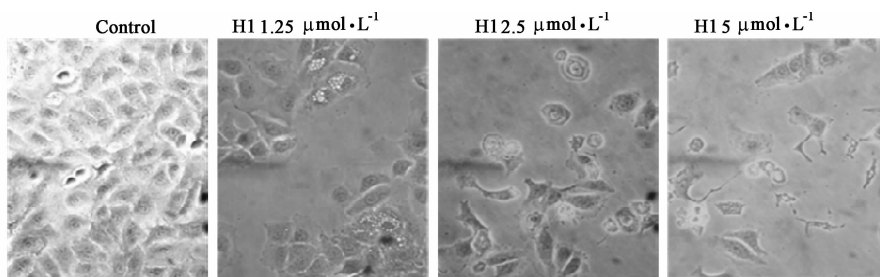


图2 不同浓度的 H1 作用 A549 细胞 24 h 后细胞形态的变化

了 H1 在 24, 48, 72 h 对 6 种肿瘤细胞株增殖的抑制作用, 发现其无明显的时间依赖性, 但有明显的浓度依赖性; 这可能与化合物 H1 本身的结构特征、化学性质及作用机制有关; 本研究还发现肺癌细胞 A549 对 H1 最为敏感, 其  $IC_{50}$  值为  $4.26 \sim 4.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 因此作者进一步研究了 H1 对 A549 细胞形态、细胞凋亡和细胞周期的影响。

大多数药物通过诱导肿瘤细胞凋亡达到抗肿瘤的目的<sup>[7-8]</sup>, 形态学变化是判断细胞凋亡的基础, 本研究发现经 H1 干预的 A549 肺癌细胞在形态学上呈典型的凋亡形态, 作者采用流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测后发现 H1 能诱导凋亡, 阻滞细胞增殖, 且随 H1 浓度增加, 细胞凋亡率逐渐增加, 具有剂量依赖性; 研究结果还发现  $2.5, 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 H1 干预细胞 24 h 后,  $G_2/M$  期明显低于正常对照组。细胞周期阻滞导致肿瘤细胞凋亡发生的机制可能是增加了细胞 DNA 损伤的频率和/或程度, 并可能同时降低了机体的抗损伤修复能力, 细胞周期的阻滞既为损伤 DNA 的修复提供了“缓冲时间”, 但也增加了 DNA 及其修复系统“暴露”于外源性有害刺激的时间和几率。作者推断化合物 H1 可能损伤了肿瘤细胞的 DNA, 将细胞阻滞在 S 期, 并且阻滞了蛋白质和 RNA 合成而进一步诱导凋亡, 抑制细胞增殖, 具体作用机制还需进一步的深入研究。

Mu Li-Hua 等发现走马胎中的 4 个齐墩果烷型三萜皂苷化合物对 HeLa, EJ, HepG-2 和 BGC 4 种不同的肿瘤细胞株均有显著的抗肿瘤作用<sup>[9]</sup>。本研究中的化合物 H1 和上述报道中的化合物 2 相比, 有相同的 6 个糖的糖链结构, 不同之处在于 H1 母核的 13, 28 环氧桥发生了开环, 同时 30 位的乙酰甲

基取代发生了改变。本实验中化合物 H1 对上述 HeLa, HepG-2 和 BGC 肿瘤细胞也表现出了较好的毒性, 活性与化合物 2 相当, 说明 13, 28 环氧桥或 30 位乙酰甲基可能为活性基团之一, 还需进一步确证。化合物 H1 对 6 种肿瘤细胞株都表现出较好的抑制作用, 对 A549 细胞增殖的抑制作用最显著, 其诱导 A549 细胞的凋亡机制可能与周期阻滞有关。

#### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1087.
- [2] 黄伟. 百两金抗肿瘤活性成分研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 2 版. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 63.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1786.
- [5] 司维柯, 肖桃元, 康格非. 苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 的细胞形态影响和相关增殖因素的变化[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 554.
- [6] 杜琴, 胡兵, 沈克平, 等. 白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 263.
- [7] 郭晓辰, 张军平. 中药调控血管平滑肌细胞凋亡的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 288.
- [8] 刘玉军, 李刚, 马睿, 等. 天龙抗肿瘤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 262.
- [9] Mu Li-Hua, Wei Ning-Yan, Liu Ping. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia*[J]. *Planta Medica*, 2012, 78(6): 617.

[责任编辑 聂淑琴]