

藤梨根中乌苏烷三萜化合物 A 对 宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响

程齐来^{1,2}, 喻亚飞¹, 李映辰¹, 黄志勤², 刘塔斯^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 赣南医学院药学院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:从赣南藤梨根中提取分离得到乌苏烷三萜化合物 A(2 β , 3 β , 23-三羟基-12-烯-28-乌苏酸, ursolic compound A), 研究其对宫颈癌 HeLa 细胞株的增殖抑制作用。方法:应用 E-MEM 培养基建立宫颈癌 HeLa 细胞体外培养体系, 将 4 种不同浓度(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 ursolic compound A 作用后的宫颈癌细胞(每孔含 2 000 细胞)在 96 孔细胞培养板上培养 24, 48 h; 细胞活力采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测, 乳酸脱氢酶(LDH)活性用噻唑蓝(MTT)法测定, 肿瘤细胞增殖情况采用免疫比色法检测。结果:与对照组相比, 用 0.5 ~ 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ursolic compound A 处理过的 HeLa 细胞, 其乳酸脱氢酶释放率随着剂量增大和时间延长而增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); CCK-8 和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)检测结果表明, 化合物 A 比对照药物抗宫颈癌活性相对较强, 作用效果呈浓度与时间依赖性, 宫颈癌细胞的活性也相应不断下降, 同时该化合物对宫颈癌细胞株的增殖抑制作用也较明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:Ursolic compound A 对 HeLa 细胞增殖有一定抑制作用。

[关键词] 乌苏烷三萜化合物 A; 增殖抑制; 人宫颈癌 HeLa 细胞株

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240084

Effect of Ursolic Compound A from Root of *Actinidia chinensis* on Proliferation of Cervical Cancer HeLa Cells CHENG Qi-lai^{1,2}, YU Ya-fei¹, LI Ying-chen¹, HUANG Zhi-qin², LIU Ta-si^{1*} (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. School of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 2 β , 3 β , 23-trihydroxy-urs-12-en-28-olic acid (ursolic compound A) from the root of *Actinidia chinensis* on the proliferation of cervical cancer HeLa cells. **Method:** HeLa cells (2×10^3 cells/well) treated by ursolic compound A of different concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were cultured in 96-well plates for 24, 48 h after the cervical cancer HeLa cell lines *in vitro* culture system was established by Essential Medium-Eagle (E-MEM) medium; the viability of HeLa cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The activity of lactic dehydrogenase (LDH) was measured by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay. Immune colorimetry was used to test the proliferation of HeLa cells. **Result:** Compared with the control group, for HeLa cells treated by ursolic compound A of different concentrations, the release rate of LDH was increased in a dosage and time dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results of BrdU and CCK-8 showed that, the inhibitory effect of ursolic compound A to HeLa cell was stronger than control drugs, and its inhibitory effect was in a dosage and time dependent manner. The activity of cervical cancer cells would be decreased accordingly, and at the same time, the compound had significant inhibition effect on the proliferation of cervical cancer cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Ursolic compound A has an inhibitory effect on the proliferation of HeLa cells.

[Key words] ursolic compound A; inhibitory proliferation; cervical cancer HeLa cells

[收稿日期] 20150408(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360627); 江西省自然科学基金项目(20132BAB205088); 湖南省研究生科研创新项目(CX2014B358)

[第一作者] 程齐来, 博士, 副教授, 从事中药资源开发与利用研究, Tel: 18970786158, E-mail: cq_l_57@126.com

[通讯作者] * 刘塔斯, 博士生导师, 教授, 从事中药资源开发与利用研究, Tel: 13036794420, E-mail: liutasi@126.com

藤梨根即猕猴桃根,系猕猴桃科植物猕猴桃 *Actinidia chinensis* 的根,有清热解毒,活血,祛风湿等功效,主要用于治疗肝炎;血痢;热淋;风湿湿热;无名肿毒等^[1]。藤梨根作为一种民间使用的中药,在江西赣南地区具有悠久的历史,特别是在赣州市的崇义县、信丰县、定南县、龙南县等地,广泛应用藤梨根治疗肺癌,胃癌,肝癌,鼻咽癌,结肠癌等。猕猴桃种质资源在我国分布也极为广泛,主要分布于江西、四川、广西、和湖北。本课题组2008~2014年对江西赣南地区中草药资源调查结果也进一步证实,在赣南野生猕猴桃中药资源非常丰富,因此研究开发猕猴桃属植物,特别是研究其抗癌作用,有着显著的社会效益和经济效益。

尽管藤梨根民间应用较多,但目前国内外对藤梨根大部分研究主要集中于化学成分提取分离鉴定、提取物(水煎液、乙酸乙酯有效部位、正丁醇有效部位等)的抗肿瘤作用及含藤梨根复方抗肿瘤作用等,对从藤梨根中提取分离得到的抗肿瘤活性成分特别是乌苏酸类的研究相对较少。以往研究表明,猕猴桃科植物根里面的主要化学成分是五环三萜类、黄酮类、萜醌、酚类等^[2]。本课题组通过前期的研究,已经从其中分离鉴定得到一些三萜类化合物,其中的一个乌苏烷三萜化合物 A (compound A),又名 $2\beta, 3\beta, 23$ -三羟基-12-烯-28-乌苏酸 ($2\beta, 3\beta, 3$ -trihydroxy-urs-12-en-28-olic acid),属于乌苏烷型三萜类,而现代研究表明一些三萜和三萜皂苷特别是具有羧基的该类化合物具有一定的抗肿瘤活性^[3-4],乌苏烷型三萜大多是乌苏酸(熊果酸)的衍生物。在前期研究基础上,本项目主要研究 compound A 对人宫颈癌细胞增殖的抑制作用,进一步探讨藤梨根抗肿瘤作用的药效物质基础,以期为赣南中草药藤梨根的深入研发提供技术支持。

1 材料

1.1 药物及试剂 采用溶剂提取法和多种柱色谱的方法对藤梨根进行分离,利用理化分析和波谱技术对所得到的化合物进行鉴定,最终得到乌苏烷型 compound A,采用 Agilent110 HPLC, DAD 检测器,面积归一法测定其纯度,结果含量 >97%;实验前用水-二甲基亚砷(DMSO)20:1溶解;E-MEM 培养基(Sigma 公司,批号 S130405),DMSO(批号 S140107),细胞计数试剂(CCK-8)试剂盒(批号 S131102),四唑盐(MTT,批号 S140101),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 S140209),均为 Sigma 公司,5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU, Sigma 公司,批号

S131002)。

1.2 细胞株 HeLa 细胞株,赣南医学院科研中心惠赠。

1.3 仪器 BB15 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司),354 型酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法^[5-7]

2.1 细胞培养 将 HeLa 细胞接种于含 2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺,10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹ 的青霉素和链霉素 100 mg·L⁻¹ 的 E-MEM 培养基中,在 37℃,5% CO₂,95% 饱和湿度的恒温密闭培养箱中进行一般培养。每天检查细胞增殖状况,2~3 d 传代 1 次。后续实验都采用对数生长期的 HeLa 细胞。

2.2 细胞活力检测 细胞活力使用 CCK-8 检测分析。将不同浓度(0.5,1.0,2.0,4.0 μmol·L⁻¹)的 compound A 接触过的宫颈癌细胞(每孔含 2 000 细胞)在 96 孔板上培养 24,48 h,用二甲亚砷 DMSO 为对照溶剂,最终浓度 ≤0.1%。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37℃ 恒温培养 4 h,用酶标仪在波长 450 nm 处测定每孔的吸光度 A。HeLa 细胞株活性用 $A_{处理组} / A_{对照组} \times 100\%$ 表示。每种浓度重复测定 5 次(n=5)。

2.3 LDH 测定 乳酸脱氢酶活性按照 LDH 试剂盒说明进行测定。取对数生长期的 HeLa 细胞,胰酶消化为单个细胞,作细胞计数,以 E-MEM 培养液稀释为终密度为 2×10^4 /mL 的单细胞悬液,每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中(接种 $4 \times 9 = 36$ 孔),置 37℃,5% CO₂ 培养箱中过夜,待细胞贴壁后进行试验。每孔分别添加 1% 的胎牛血清(FBS)和 4 种不同浓度 compound A (0.5,1.0,2.0,4.0 μmol·L⁻¹),持续培养 24 h 或者 48 h,每个浓度设 4 个复孔,并设只加细胞、不加药液的对照孔和只加培养液的调零孔。培养结束每孔加乳酸脱氢酶试剂和催化剂(1:45) 50 μL,在室温下培养 30 min,反应通过添加 50 μL 的停止液来结束,在波长 490 nm 处采用 MTT 测定 LDH。Triton X-100 培养液作为阳性对照。结果用 LDH 释放率表示。每种浓度重复测定 5 次(n=5)。

2.4 BrdU 检测细胞增殖 使用免疫比色法测定在 DNA 合成过程中掺入的 BrdU 数目检测细胞增殖情况,依据试剂盒说明进行检测。将 2 000 cells/well 与不同浓度的 compound A (0.5,1.0,2.0,4.0 μmol·L⁻¹)96 孔板培养 24,48 h,加 BrdU(终浓度 100 μmol·L⁻¹)继续作用 2 h,添加 anti-BrdU-POD 工作液,常温下细胞固定培养 2 h。于 490 nm 处测定免疫复合

物。其吸光度 A 直接与 DNA 中的掺入的 BrdU 数目相关,代表细胞增殖状况。每种浓度重复测定 5 次 ($n=5$)。

2.5 不同实验 IC_{50} 值的比较 以依托泊苷以及乌苏酸(UA)为阳性对照药物,在上述 2.2,2.3,2.4 实验的同时,取对数生长期 HeLa 细胞,制成 1×10^5 / mL 的悬液,按每孔 100 μ L 接种于 3 块 96 孔培养板。24 h 后加药,实验设空白组和阴性组及 5 种不同浓度药物组 (etoposide 组, UA 组, compound A 组),终浓度分别为 0.5,1,2,4,8,16 μ mol \cdot L⁻¹,每个浓度设 8 个复孔。分别培养 24,48,72 h,加 MTT 50 μ g/孔,继续培养 4 h 后加 DMSO 200 μ L/孔,酶标仪上机检测(震荡 10 min,测单波长 570 nm 处 A)。按 $(A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{加药组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白对照组}})$ 计算 3 种药物对细胞的生长抑制率及 IC_{50} (用 SPSS 17.0 软件计算)。

2.6 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。实验数据都源于超过 3 个独立相同模型的实验。数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,随后进行 Dunnett 多重比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞毒性 LDH 释放和 CCK-8 测定细胞活性

3.1.1 LDH 释放 2.0,4.0 μ mol \cdot L⁻¹ 的 compound A 作用 HeLa 细胞 24,48 h 后,LDH 释放增加,尤其是处理 48 h 后,相对于对照组,在 2.0,4.0 μ mol \cdot L⁻¹ LDH 释放显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。compound A 对 HeLa 细胞的毒性表现出了浓度和时间的依赖性。见表 1。

表 1 Ursolic compound A 对 HeLa 细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects on LDH release of ursolic compound A in HeLa cell ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度 / μ mol \cdot L ⁻¹	LDH 释放率/%	
		24 h	48 h
对照	-	2.48 \pm 0.67	5.60 \pm 1.05
compound A	0.5	0.98 \pm 0.45	1.25 \pm 0.83
	1.0	3.27 \pm 0.51	6.11 \pm 1.00
	2.0	6.45 \pm 0.46 ²⁾	8.23 \pm 0.98 ¹⁾
	4.0	12.43 \pm 1.13 ²⁾	12.52 \pm 1.02 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.1.2 CCK-8 测定细胞活性 在 compound A 作用浓度增加及作用时间延长后,细胞的活性也相应的随着下降。compound A 于同一浓度 4.0 μ mol \cdot L⁻¹

处理 24,48 h 以后,宫颈癌细胞活性由 39.15% 降低到 18.12%。见表 2。

表 2 Ursolic compound A 对 HeLa 细胞活性的影响 (CCK-8, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects on activity of ursolic compound A in HeLa cell (CCK-8, $\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度 / μ mol \cdot L ⁻¹	细胞活性/%	
		24 h	48 h
对照	-	100.00 \pm 1.05	100.00 \pm 2.24
compound A	0.5	98.38 \pm 1.20	98.45 \pm 2.36
	1.0	90.65 \pm 0.59 ¹⁾	84.53 \pm 4.05 ²⁾
	2.0	71.07 \pm 1.81 ²⁾	44.72 \pm 0.85 ²⁾
	4.0	39.15 \pm 1.64 ²⁾	18.12 \pm 1.66 ²⁾

3.2 BrdU 测定细胞增殖 4 种浓度 (0.5 ~ 4.0 μ mol \cdot L⁻¹) compound A 处理 HeLa 细胞 48 h 后,细胞增殖分别从 99.05% 下降到 24.80%。compound A 作用 24 h 后对 HeLa 细胞增殖的影响呈相同作用趋势。见表 3。

表 3 Ursolic compound A 对 HeLa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effects on cell proliferation of ursolic compound A in HeLa cell ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度 / μ mol \cdot L ⁻¹	细胞增殖率/%	
		24 h	48 h
对照	-	100.00 \pm 0.38	100.00 \pm 1.04
compound A	0.5	100.00 \pm 1.12	99.05 \pm 0.96
	1.0	98.85 \pm 1.03	85.76 \pm 2.01 ¹⁾
	2.0	50.31 \pm 1.15 ²⁾	48.42 \pm 1.13 ²⁾
	4.0	45.89 \pm 0.88 ²⁾	24.80 \pm 1.23 ²⁾

3.3 不同实验 IC_{50} 的对比 通过检测常用的抗肿瘤药物依托泊苷和 compound A 结构类型相似的 UA 的 IC_{50} 来对比药物的细胞毒性,不同试药的 IC_{50} 见表 4。

基于以上 3 种细胞水平的试验中,compound A 呈现出一定的抗肿瘤潜力,发挥了相对较强的抗宫颈癌细胞作用, IC_{50} 各自对应值是 3.82 μ mol \cdot L⁻¹ (LDH 测定),1.43 μ mol \cdot L⁻¹ (CCK-8 测定),1.57 μ mol \cdot L⁻¹ (BrdU 测定)。

4 讨论

女性常发的恶性肿瘤多为乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌,其中宫颈癌发生率较高,排名第二。各种抗肿瘤药物的研发也进入刻不容缓的时期,寻找低毒,效率高,副作用少的药物,一直被视为现阶段科研工作者的研究重点^[8]。中草药抗肿瘤有一定优势,毒副作用低,对

表 4 不同测定方法下 ursolic compound A 和对照药与肿瘤细胞作用 48 h 的细胞毒性

Table 4 Cytotoxicity of ursolic compound A and contrast drugs at different cell level measurement method

药名	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹		
	LDH	CCK-8	BrdU
依托泊苷	13.24	10.32	5.10
乌苏酸	9.45	5.72	4.60
compound A	3.82	1.43	1.57

免疫调节作用显著,可有效延长病人的存活时间。

最近一段时期,中草药由于其安全性和不良反应少等优点已成为肿瘤医学的研究热点之一。研究者利用中草药抗肿瘤的优势,结合中医理论对中草药进行了研究发现如山绿茶、白头翁、山核桃、小白菊等具有良好的抗肿瘤作用^[9-10]。体内动物实验证实,A. eriantha 根的有机提取物有一定的抗肿瘤作用^[11]。许多细胞实验也证明,不同品种来源的猕猴桃根,如藤梨根的正丁醇部位,山梨猕猴桃根乙醇部位对多种肿瘤细胞均有不同程度的抑制作用^[12]。

采取非体内细胞的培育手段实施药效测定与细胞毒性研究,在当今世界已经作为一般的研究措施,主要优势是能方便、经济、稳定地开展诸多药物筛选。本研究 MTT 测定结果表明 compound A 呈时间-剂量依赖性抑制 HeLa 细胞增殖,24,48,72 h 时 IC₅₀分别为 1.48,1.45,1.42 μmol·L⁻¹。

本次体外抗肿瘤活性筛选实验研究结果表明,用不同浓度(0.5~4.0 μmol·L⁻¹)野生猕猴桃植物根中分离提取的乌苏烷型三萜化合物 A 处理过宫颈癌 HeLa 细胞后,其 LDH 释放增加,并且呈剂量和时间依赖性;在 CCK-8 和 BrdU 测定过程中,compound A 比依托泊苷以及结构类似物 UA 抗宫颈癌细胞活性相对较强,并且细胞的活性随着化合物浓度及作用时间的增加而相对应的降低,对宫颈癌细胞增殖抑制作用也较突出。由此推断 compound A 具有一定的抑制 HeLa 细胞增殖作用,为该类癌症的防治所需的新的化疗药或其结构相似物的发现提供了非常有利的理论依据。

依托泊苷为目前临床上常用的抗肿瘤药物之一,其不良反应较大是制约其临床广泛应用的主要因素。通过本次实验结果比较,作用于同一宫颈癌 HeLa 细胞,compound A 的 IC₅₀明显低于依托泊苷组,但是两者对正常人宫颈上皮细胞生长的

抑制作用如何,有待进一步深入研究。若能证明在相同作用浓度下,compound A 对正常人宫颈上皮细胞的抑制率明显比依托泊苷低,则可提示 compound A 不良反应更小,可能具有潜在的应用前景。

[参考文献]

[1] 贾照志,曾海. 猕猴桃的药用价值[J]. 中国中医药现代远程教育,2012,10(4):118-121.

[2] 方琴,黄初生,陈希慧,等. 几种猕猴桃属植物中乌苏烷型三萜化合物的谱学研究[J]. 广西师范学院学报:自然科学版,2007,24(4):53-57.

[3] 陈会敏,张静. 熊果酸诱导胃癌细胞 BGC-823 凋亡机制的研究[J]. 武汉大学学报,2006,27(3):299-301.

[4] 黄敬敬,王修珍. 蓝萼甲素对宫颈癌 HeLa 细胞的作用及其相关机制研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(3):421-425.

[5] 程齐来,李洪亮,黄志勤. 青箱苷 A 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡及相关机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(23):200-204.

[6] 程齐来,李洪亮,黄志勤. 山绿茶中 Ilexgenin 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及其相关机制研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(2):306-309.

[7] 程齐来,李洪亮,黄志勤,等. 赣南猕猴桃根中乌苏烷三萜化合物 A 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及机制初步研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(9):2094-2095.

[8] Dalad S, Takayuki N, Hirotoishi T. Effect of epoxides and α-methylene-γ-lactone skeleton of sesquiterpenes from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves on caspase-dependent apoptosis and NF-κB inhibition in human cervical cancer cells [J]. Fito, 2011, 82(7):1093-1097.

[9] Cheng Q L, Liao X M, Huang Z Q. Ilexgenin A-induced apoptosis in cervical cancer HeLa cells and its mechanism[J]. Medi Plan, 2013, 4(3):104-106.

[10] 徐惠君,佟仲生,贾勇圣,等. 小白菊内酯抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中成药,2013,35(9):1985-1988.

[11] 林水花,吴建国,谢通,等. 毛花猕猴桃不同部位的抗肿瘤活性比较[J]. 福建中医药大学学报,2013,23(1):46-49.

[12] 饶敏,吴宁,李红梅,等. 野生猕猴桃根水煎液对人胃癌细胞的抑制作用及机制[J]. 山东医药,2012,52(1):37-38.

[责任编辑 聂淑琴]