

九味通窍汤对人脑胶质瘤的体外药效学研究及组方分析

刘长青, 张雄, 樊宏伟*

(南京医科大学 附属南京医院, 南京市第一医院, 南京 210006)

[摘要] **目的:**对九味通窍汤进行组方拆分,并对各组进行体外抗脑胶质瘤药效学分析,对其体外药效学可能的作用机制进行探索,为探究全方起效的物质基础提供实验依据。**方法:**根据君臣佐使组合原理将九味通窍汤拆分成 7 个组方,选用人源神经胶质瘤 U251 细胞进行体外药效筛选,采用噻唑蓝 (MTT) 法测定各个组方对细胞活力的影响;采用流式细胞术比较所得体外药效最佳组方 IV 与全方 ($10, 4, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 U251 细胞 24 h 对细胞的凋亡影响;采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测全方及组方 IV 对凋亡蛋白 p53 和抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达影响;组方 IV 的醇提物用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯及水饱和正丁醇梯度萃取,采用 MTT 法测定各萃取部位对 U251 细胞增殖的抑制作用。**结果:**组方 IV 对细胞的抑制作用最为明显,且具有浓度依赖性;细胞经 $10, 4, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组方 IV, 全方处理 24 h 后凋亡率显著高于空白组 ($P < 0.01$);细胞经 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组方 IV, 全方处理后 Bcl-2 蛋白表达水平较空白组显著降低 ($P < 0.01$), p53 蛋白表达较空白组显著提高 ($P < 0.01$);组方 IV 梯度萃取后部位 III 对细胞活力的抑制作用最为明显,且具有浓度依赖性。**结论:**组方 IV 细胞活力抑制作用明显,诱导细胞凋亡明显,并可以降低 Bcl-2, 并提高 p53 蛋白的表达;部位 III 抑制脑胶质瘤细胞活力明显。

[关键词] 九味通窍汤; 脑胶质瘤; 组方分析; 体外药效学; 凋亡蛋白 p53; B 淋巴细胞瘤-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0148-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017070148

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1354.052.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 13:54

In Vitro Pharmacodynamics and Prescription Analysis on Jiawei Tongqiao Decoction in Human Glioma U251 Cells

LIU Chang-qing, ZHANG Xiong, FAN Hong-wei*

(Nanjing First Hospital, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the compositions of Chinese herbal prescription Jiawei Tongqiao decoction and its pharmacodynamic *in vitro*, explore its poaile mechanism and provide experimental basis for its effectiveness. **Method:** Jiawei Tongqiao decoction was separated into seven prescriptions based on the principles of Jun, Chen, Zuo, Shi. After alcohol extract enrichment, U251 cells of anthropogenic brain glioma were used inmethylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay to determine the effect of different prescriptions on cell survival. Flow cytometry instrument was used to compare the effect of optimal prescription IV ($10, 4, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and whole prescription on cells apoptosis. Western blot was used to detect apoptosis-related protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and p53 expression differences between the optimal prescription IV and the whole prescription. Alcohol extraction of the optimal prescription IV was concentrated with petroleum ether, chloroform and ethyl acetate, and then MTT was applied to determine the effect of various extraction parts on cell survival. **Result:** Prescription IV had the most obvious inhibition effect on U251 cells in a concentration-dependent manner.

[收稿日期] 20160908(005)

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LZ111117)

[第一作者] 刘长青,在读硕士,从事临床药理学研究,Tel:15951756332,E-mail:liucqabe@163.com

[通讯作者] *樊宏伟,硕士生导师,主任药师,从事临床药理学研究,Tel:025-52887031,E-mail:fanhongwei178@sina.com

The apoptosis rates in prescription IV treatment group (10, 4, 1 g · L⁻¹) and whole prescription were all significantly higher than those in blank group after 24 h ($P < 0.01$). The Bcl-2 protein expression levels of prescription IV group and the whole prescription group were significantly lower than those in blank group ($P < 0.01$), and p53 protein expression levels were significantly higher ($P < 0.01$). The directive ingredients in part III of prescription IV were more comprehensive after gradient extraction. **Conclusion:** Prescription IV is the optimal prescription, and part III is the most effective part with the anti-proliferative effect on U251 glioma cells.

[Key words] Jiuwei Tongqiao decoction; brain glioma; prescription analysis; pharmacodynamic *in vitro*; p53; B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)

脑神经胶质瘤是中枢神经系统中最常见的肿瘤,具有恶性程度高、生长迅速并向周围组织浸润的特点,是神经系统中最多发的恶性肿瘤。临床上的治疗方法很多,疗效均不理想或是毒副作用较大,易造成患者机体免疫功能低下,而导致肿瘤复发^[1]。因此,寻找有效且不良反应小的药物或者治疗方法至关重要。九味通窍汤是在清代王清任所创通窍活血汤的基础上,根据临床脑胶质瘤治疗过程实际应用情况,经加减组方而成,由黄芪(生)、白花蛇舌草、制天南星、川芎等 9 味中药材组成^[2-3],该方活血化瘀,其中川芎引血上行,促进全方有效成分透过血脑屏障发挥治疗作用,使全方具有良好的抗肿瘤活性,且可以提高患者机体的免疫功能。同时具有毒副作用低,不易产生耐药性等特点^[4-7]。九味通窍汤虽具有良好的临床应用基础,但其药效物质基础难以确定,是制约其发展的瓶颈。中药单味药材中可能有上百甚至几百个单体成分,而九味通窍汤药味众多,起效成分难以确定,成分间相互作用更是无法控制。本课题组前期研究表明九味通窍汤醇提物体外抗脑胶质瘤作用良好^[6-7],为分析全方起效的物质基础,本文借鉴黄连解毒汤全方“组合-配伍”提取的比较研究^[8],根据君臣药组合、君佐药组合、君使药组合、君臣佐药组合和君佐使药组合^[9-10],将九味通窍汤全方拆分为 7 个代表性的组方,观察各组方对 U251 细胞活力抑制作用以及对凋亡的影响,并检测抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和凋亡蛋白 p53 表达变化。进一步对体外效应最佳组方进行梯度萃取,使复方药物有效成分更加集中,药理作用和临床疗效增强^[11]。为进一步筛选最优组方、效应成分和探究其作用机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 细胞株 U251 细胞株购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 药物 九味通窍汤药材黄芪(批号 150807),

白花蛇舌草(批号 150214),天南星(批号 150129-1),蜈蚣(批号 15080801),党参(批号 15033001),川芎(批号 150323),熟地黄(批号 15030301),桃仁(150110),白芷(150901)均购自南京医药股份有限公司,由南京中医药大学王春根教授鉴定符合 2015 版《中国药典》规定;替尼泊苷(美国百时美施贵宝公司,批号 2B01213)。

九味通窍汤根据君臣佐使配伍组合拆分为以下 7 个组方:组方 I (黄芪、白花蛇舌草),组方 II (黄芪、白花蛇舌草、川芎),组方 III (黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星),组方 IV (黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣),组方 V (黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣、党参、熟地黄),组方 VI (黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣、党参、熟地黄、桃仁),组方 VII (黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣、党参、熟地黄、桃仁、白芷)。根据处方量称取各组方药材粗粉,加入 10 倍量 85% 乙醇浸泡过夜,回流提取 2 h,热过滤。滤渣再加入 8 倍量 85% 乙醇回流提取 2 h,热过滤,合并滤液,至旋转蒸发仪上浓缩,定容至质量浓度为 2 000 g · L⁻¹ 的醇提液,得到药液 I,药液 II,药液 III,药液 IV,药液 V,药液 VI,药液 VII。

1.3 试剂与仪器 噻唑蓝(MTT)试剂盒,全蛋白抽提试剂盒,蛋白免疫印迹(Western blot)检测试剂盒(中国凯基生物公司,批号分别为 KGA311, KGP250, KGP1201); FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (美国 BD 公司,批号 556547); SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒, ECL 检测试剂盒, Bradford 蛋白含量检测试剂盒, 预染蛋白分子量(中国凯基生物公司,批号分别为 KGP113, KGP1123, KGA801, KGP441); p53, Bcl-2, GAPDH, 羊抗兔 IgG-HRP(中国凯基生物公司,批号分别为 KG22606, KG22169, KGAA002, KGAA35)。

Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); BD FACS Calibur II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);

PowerPac™ 基础电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司,型号分别为 Model 680, FACS Calibur II, 552BR 164209, 164-5051); UV-2540 型分光光度计(日本 Shimadzu 公司); BOXChemiXR5 型凝胶成像系统(美国 Syngene G 公司)。

2 方法

2.1 细胞活力及抑制率检测 取各组方药液用 1% DMSO-DMEM 的溶液配制成含生药 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 再依次稀释 5 倍, 得含生药 $40, 8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

取对数生长期的 U251 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 取 $100 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板中, 每组设 4 个复孔, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱培养 24 h 后, 依次加入各质量浓度受试药物 $100 \mu\text{L}$, 同时设空白组(不加药物), 替尼泊苷组(加入替尼泊苷 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 将 96 孔板在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 及 100% 湿度的细胞培养箱中孵育 72 h, 以 550 nm 为检测波长, 采用 MTT 法检测细胞活力。根据各组吸光度 A 计算各给药组的抑制率(B), 半数抑制浓度(IC_{50}), 比较各给药组对细胞抑制作用的强弱。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取生长状况良好 U251 细胞, 调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板, 培养 24 h 贴壁后分为 3 组, 空白组(不加药物), 替尼泊苷组(加入替尼泊苷), 药物组(加入 $10, 4, 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组方 IV, 全方提取液)继续培养 24 h, 不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 预冷 PBS 清洗, 加入 Binding Buffer 缓冲液悬浮细胞, 加入 FITC Annexin V $5 \mu\text{L}$, PI $5 \mu\text{L}$ 混匀, 避光 15 min 后流式细胞仪检测。

2.3 Western blot 法检测细胞中 Bcl-2, p53 蛋白表达 取生长状况良好 U251 细胞作为实验细胞, 计数板计数并调整细胞悬液密度为 1.0×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板, 培养 24 h 贴壁后分为空白组(不加药物), 药物组(加入 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组方 IV, 全方提取液)继续培养 24 h, 收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, 进行蛋白定量(Bradford 法), 计算出上样体积, 加入上样缓冲液, 混匀。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至硝酸纤维素膜。将膜放入 TBST 中清洗, 转移到含有封闭液的平皿中, 脱色摇床摇晃 1 h。膜转移到塑封膜中, 加入一抗(1:2 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗, 加入二抗, 室温下孵育 1 h, 漂洗。将 ECL 发光液试剂 A 与试剂 B 1:1 混合, 均匀滴在膜正面, X 射线光片准确压在膜上压片曝光。曝光完成后, 迅速浸入显影液 2 min, 待出现明显条带后终止显

影。水冲洗 X 射线光片, 加入定影液定影 5 min, 水冲洗残留定影液, 晾干。胶片显影后扫描, Image J 软件分析。

2.4 组方 IV 组分分离 将组方 IV 用极性从小到大的石油醚(部位 I), 三氯甲烷(部位 II), 乙酸乙酯(部位 III), 水饱和正丁醇(部位 IV) 来萃取, 用 3 倍量的有机溶剂各萃取 3 次, 合并萃取液连同残留水层(部位 V), 于旋转蒸发器浓缩至适宜体积, 于氮气吹干仪 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 完全挥干, 得到各部位萃取物。

2.5 各萃取部位的体外药效学检测 取各部位萃取物分别用 1% DMSO-DMEM 溶液 2 mL 复溶, 定容至含生药 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 再依次稀释 5 倍, 得含生药 $40, 8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。方法同 2.1 项, 进行组方 IV 各萃取部位体外药效学分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t 检验分析样本均数间的差异, 计量数据符合正态分布且方差齐性组间比较, 采用单因素方差分析, 非正态分布采用秩和检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 九味通窍汤 7 个组方对 U251 细胞的抑制作用 经 IC_{50} 计算软件得出, 组方 I ~ VII 的 IC_{50} 分别为 $104.81, 58.07, 41.38, 38.54, 57.21, 45.21, 41.17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。组方 I ~ VII 作用 U251 细胞 72 h 后, 在一定质量浓度范围内, 随着药物浓度的升高, 对细胞的抑制率越高。与空白组比较, 组方 I ~ VII 对细胞活力的抑制作用明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。组方 IV 与其他组比较, 整体对细胞活力的抑制作用最佳, 为体外抑制效应最优组。见表 1。

3.2 九味通窍汤全方、组方 IV 对 U251 细胞凋亡的影响 采用全方、组方 IV 提取液处理细胞 24 h 后, 与空白组比较, U251 细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及坏死率均有升高, 细胞凋亡率具有明显的浓度依赖性($P < 0.05, P < 0.01$)。与全方比较, 组方 IV 高剂量时凋亡率显著升高($P < 0.01$), 组方 IV 低剂量时凋亡率明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 九味通窍汤全方、组方 IV 对 U251 细胞 Bcl-2, p53 蛋白表达的影响 采用 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 全方、组方作用 U251 细胞 24 h 后, 与空白组比较, 全方、组方 IV 处理 U251 细胞后 Bcl-2 显著降低($P < 0.01$); 全方、组方 IV 对抗凋亡蛋白 Bcl-2 明显的抑制作用。与空白组比较, 全方、组方 IV 处理 U251 细胞后, p53 表达显著升高($P < 0.01$), 全方、组方 IV 对凋亡蛋白 p53 具有明显的促进作用。见表 3, 图 1。

表 1 九味通窍汤 7 个组方对 U251 细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Anti-proliferation effect of seven prescriptions from Jiuwei Tongqiao decoction on U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	组方 I		组方 II		组方 III		组方 IV	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	1.879 ± 0.036	-	1.879 ± 0.036	-	1.879 ± 0.036	-	1.879 ± 0.036	-
替尼泊苷	6 × 10 ⁻⁴	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾
九味通窍汤	200	0.512 ± 0.052	72.7 ²⁾	0.258 ± 0.014	86.3 ²⁾	0.161 ± 0.034	91.4 ²⁾	0.143 ± 0.006	93.4 ²⁾
	40	1.493 ± 0.084	20.5 ²⁾	1.360 ± 0.012	27.6 ²⁾	1.500 ± 0.051	20.2 ²⁾	1.285 ± 0.035	31.6 ²⁾
	8	1.591 ± 0.047	15.3 ²⁾	1.736 ± 0.005	7.6 ²⁾	1.600 ± 0.060	14.8 ²⁾	1.662 ± 0.013	11.6 ²⁾
	1.6	1.649 ± 0.012	12.2 ²⁾	1.830 ± 0.030	2.6	1.678 ± 0.045	10.7 ²⁾	1.836 ± 0.021	2.3

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	组方 V		组方 VI		组方 VII	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	1.879 ± 0.036	-	1.879 ± 0.036	-	1.879 ± 0.036	-
替尼泊苷	6 × 10 ⁻⁴	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾	0.899 ± 0.054	52.2 ²⁾
九味通窍汤	200	0.190 ± 0.008	89.9 ²⁾	0.122 ± 0.003	93.5 ²⁾	0.103 ± 0.018	94.5 ²⁾
	40	1.602 ± 0.043	14.7 ²⁾	1.340 ± 0.048	28.7 ²⁾	1.182 ± 0.031	37.1 ²⁾
	8	1.668 ± 0.013	11.2 ²⁾	1.760 ± 0.028	6.3 ¹⁾	1.803 ± 0.034	4.0
	1.6	1.745 ± 0.007	7.1 ²⁾	1.856 ± 0.011	1.2	1.840 ± 0.021	2.1

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 2 九味通窍汤全方、组方 IV 对 U251 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Jiuwei Tongqiao decoction whole prescription and prescription IV on apoptosis of U251 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	早期凋亡	晚期凋亡	凋亡率
空白	-	3.11 ± 0.71	0.20 ± 0.55	3.65 ± 0.74
替尼泊苷	6 × 10 ⁻⁴	38.73 ± 1.42 ²⁾	20.45 ± 0.72 ²⁾	68.45 ± 0.45 ²⁾
全方	10	18.70 ± 0.14 ²⁾	30.40 ± 1.94 ²⁾	70.48 ± 0.05 ²⁾
	4	21.96 ± 0.14 ²⁾	15.55 ± 0.34 ²⁾	44.05 ± 0.12 ²⁾
	1	17.05 ± 0.58 ²⁾	8.60 ± 0.23 ²⁾	25.85 ± 0.34 ²⁾
	10	29.20 ± 0.34 ^{2,4)}	24.50 ± 0.47 ^{2,4)}	78.78 ± 0.44 ^{2,4)}
组方 IV	4	20.63 ± 1.01 ²⁾	10.10 ± 0.51 ^{2,4)}	37.75 ± 0.05 ^{2,4)}
	1	11.55 ± 0.71 ^{2,4)}	6.08 ± 0.54 ^{1,3)}	29.08 ± 0.25 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与全方同剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 全方、组方 IV 对 U251 细胞 Bcl-2, p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jiuwei Tongqiao decoction whole prescription and Prescription IV on Bcl-2 and p53 protein expression levels in U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Bcl-2/GAPDH	p53/GAPDH
空白	-	1.029 ± 0.012	0.059 ± 0.007
组方 IV	4	0.405 ± 0.013 ²⁾	0.444 ± 0.008 ²⁾
全方	4	0.343 ± 0.019 ^{2,4)}	0.708 ± 0.051 ^{2,4)}

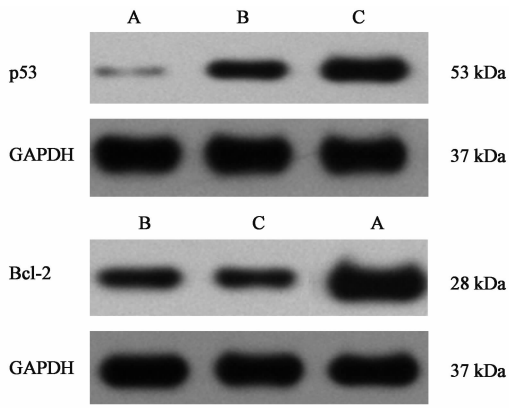
3.4 组方 IV 5 个萃取部位对 U251 细胞的抑制作用

组方 IV 的 5 个萃取部位作用 U251 细胞 72 h 后, 部位 I ~ V 的 IC₅₀ 分别为 108.89, 59.59, 47.79,

68.87, 184.75 g·L⁻¹。部位 I 至部位 V 与空白组, 对细胞活力的抑制作用明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。部位 III 与其他部位比较, 对细胞活力的抑制升高。见表 4。

4 讨论

中药方剂是在中医药基本理论的指导下, 以药物性能和治疗目的为依据, 按君、臣、佐、使的组方原则, 结合中药的配伍规律组成的^[9]。中药合理的配伍是中药复方的核心, 也是复方不同于单味药的主要奥妙所在。近年来随着肿瘤发病率的攀升, 许多中药复方抗肿瘤研究成为焦点。中药复方往往具有广泛的疾病治疗范围及较少的副作用。九味



A. 正常组; B. 组方 IV (4 g·L⁻¹) 组; C. 九味通窍汤全方 (4 g·L⁻¹) 组

图 1 全方、组方 IV 对 U251 细胞 Bcl-2, p53 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Jiuwei Tongqiao decoction whole prescription and prescription IV on Bcl-2 and p53 protein expression

通窍汤由黄芪(生)、白花蛇舌草、川芎、党参、制天南星、熟地黄、桃仁、蜈蚣、白芷组成,重用黄芪、白花蛇舌草。近年大量研究证明黄芪在抗肿瘤方面具有可靠作用。不论是黄芪的粗提取物还是单体成分,都表现出抗感染、抗氧化、抗肿瘤、免疫兴奋、治疗糖尿病、心脏保护、护肝、抗病毒等活性^[5]。黄芪在抗肿瘤方面的研究表明其对阳性乳腺癌细胞、胃癌(BGc-823)细胞、卵巢癌(SKOV3)细胞、小鼠肝癌及骨肉瘤等均具有抑制作用^[12-15]。在白花蛇舌草抗肿瘤研究中,发现其可以抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡并提高免疫功能^[5]。近期研究表明,白花蛇舌草对乳腺癌(MCF-7)细胞、白血病(HL60)细胞、直肠癌(HT-29)细胞等均具有均增殖抑制及

表 4 组方 IV 5 个萃取部位对 U251 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Anti-proliferation effect of 5 parts from prescription IV on U251 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	部位 I		部位 II		部位 III	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	2.454 ± 0.043	-	2.454 ± 0.042	-	2.454 ± 0.042	-
替尼泊昔	6 × 10 ⁻⁴	1.245 ± 0.037	49.3 ²⁾	1.245 ± 0.037	49.3 ²⁾	1.245 ± 0.037	49.3 ²⁾
组方 IV	200	0.937 ± 0.013	61.8 ²⁾	0.704 ± 0.004	71.3 ²⁾	0.530 ± 0.019	79.4 ²⁾
	40	1.730 ± 0.028	29.5 ²⁾	1.458 ± 0.054	49.6 ²⁾	1.616 ± 0.032	35.1 ²⁾
	8	2.012 ± 0.010	17.9 ²⁾	2.025 ± 0.008	17.5 ²⁾	1.972 ± 0.044	19.6 ²⁾
	1.6	2.314 ± 0.049	5.7 ¹⁾	2.282 ± 0.088	7.7 ¹⁾	2.132 ± 0.051	13.1 ²⁾

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	部位 IV		部位 V	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	2.454 ± 0.042	-	2.454 ± 0.042	-
替尼泊昔	6 × 10 ⁻⁴	1.245 ± 0.037	49.3 ²⁾	1.245 ± 0.037	49.3 ²⁾
组方 IV	200	0.503 ± 0.026	79.5 ²⁾	1.104 ± 0.039	55.0 ²⁾
	40	1.693 ± 0.065	31.0 ²⁾	1.758 ± 0.062	28.4 ²⁾
	8	2.269 ± 0.064	7.5 ¹⁾	2.108 ± 0.114	15.1 ²⁾
	1.6	2.418 ± 0.012	1.5	2.211 ± 0.026	9.9 ²⁾

促凋亡作用^[16-18]。搭配使药川芎、白芷载药上行,通行诸经气血,制天南星具有抗肿瘤作用,党参为益补药,熟地黄补血养精,桃仁疏通血脉,蜈蚣通经络。在中药临床应用与实验研究中,研究单味药往往难以反映出其在各复方中的真实作用,而复方由于药味多,成分间作用关系复杂,明确其作用机制较为困难^[8]。因此,本文根据九味通窍汤组方配伍原则,并深入地九味通窍汤各药味进行化学成分分析后,将其拆分重组成 7 个组方,经体外药效学考察结果 72 h 效果最佳^[7],在评价对比各组方药物体外药效学后,得出组方 IV 的部位 III 的体外抗癌活性最佳。组方 IV 是由黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣组成,两味君药黄芪、白花蛇舌草起主导药效,加入川芎引药上行,制天南星、蜈蚣辅助药效,共同发挥抗肿瘤作用。

本研究采用 20(IC₅₀ 的 1/2), 10, 4, 1, 0.5, 0.2 g·L⁻¹ 药物作用细胞 24 h 后,发现 20 g·L⁻¹ 药物作用 U251 细胞后细胞形态变化严重,死亡细胞较多。采用 0.5, 0.2 g·L⁻¹ 药物作用细胞后,检测结果显示细胞凋亡影响较小。因此,采用 10, 4, 1 g·L⁻¹ 药物测定细胞凋亡率。本研究进而对九味通窍汤起效的机制进行探讨, Bcl-2 是一种原癌基因,可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡,是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一^[19]。p53 是一种人体抑癌基因,能与细胞 DNA 特异结合,阻止 DNA 复制和引发细胞凋亡,为迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因^[20-21]。Sharma 等^[22] 研究表明槲皮素(九味通窍汤中含量较高单体)诱导肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 细胞凋亡的途径,是由独立的 p53 蛋白介导的 Akt 信号通路,对应于 p-Akt 蛋白的表达减少,

下游分子 Bcl-2 和半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)-9 和 Caspase-3 的也下调, 指示细胞凋亡。本文采用 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 全方与组方 IV 作用 U251 细胞 24 h 后 Bcl-2, p53 蛋白表达水平变化明显。其他具有标志性的蛋白含量变化有待分析。

综上所述, 对九味通窍汤拆分后进行体外药效分析, 得出组方 IV 的部位 III 体外抑制 U251 细胞效果最佳, 说明有效成分较多集中在黄芪、白花蛇舌草、天南星、川芎、蜈蚣的提取物的乙酸乙酯部位。研究结果对分析该方的抗肿瘤的主要作用药物具有提示性作用, 具体结论的得出还需要体内药效学验证。且中药复方治疗肿瘤, 不仅对肿瘤有直接抑制作用, 还可提高免疫力, 发挥扶正固本的重要作用。本文仅评价了各组方药物体外药效, 对各组方其他效应缺乏全面的评价, 不利于全面正确的评价组方作用。因此, 各组方体内药效的开展对全面评价组方极其重要。

[参考文献]

[1] 刘丽, 任远, 李昊文, 等. 黄芪皂苷对神经胶质瘤的体外抑制作用及机制研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(3): 35-39.

[2] 汪宁, 刘青云, 彭代银, 等. 通窍活血汤对脑缺血大鼠脑组织中 CGRP、ET、IL-1 β 、TNF- α 的影响[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1295-1297.

[3] LIU C Z, ZHOU L H, SHUI Z. Tongqiao Huoxue tang and Buyang Huanwu tang for treatment of vascular dementia--a report of 36 cases [J]. J Tradit Chin Med, 2003, 23(4): 243-245.

[4] 陈秀珍, 朱大诚, 王艳辉. 白花蛇舌草药理作用及临床应用研究新进展[J]. 中药材, 2009, 32(1): 157-161.

[5] 刘明华, 任美萍, 陈健平, 等. 黄芪皂苷抗肿瘤活性研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 68-70.

[6] 吴梦莹, 臧元帅, 樊宏伟. 九味通窍汤的体外抗脑胶质瘤作用及化学成分分析[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(3): 32-36.

[7] 臧元帅, 吴梦莹, 余黎, 等. 九味通窍汤及其不同萃取部位的体外药效学考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 41-44.

[8] 朱华旭, 潘林梅, 李欢, 等. 黄连解毒汤全方与“组合-配伍”提取的比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1815-1818.

[9] 王鸣, 杨文华. 中药对药君、臣、佐、使配伍规律研究[J]. 中医杂志, 2013, 54(22): 1974-1975.

[10] HE Y, GAI Y Q, WU X B, et al. Quantitatively analyze composition principle of Ma Huang Tang by structural equation modeling [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(3): 851-858.

[11] 张晓东, 张磊, 潘国凤. 中药有效部位新药研发中有效部位筛选存在问题浅析[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(4): 58-59.

[12] Ibrahim L F, Marzouk M M, Hussein S R, et al. Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(4-5): 386-393.

[13] Fathiazad F, Khosropanah M K, Movafeghi A. Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(11): 1069-1078.

[14] JIAO R, LIU Y, GAO H, et al. The anti-oxidant and antitumor properties of plant polysaccharides [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(3): 463-488.

[15] HAN R, WU W Q, WU X P, et al. Effect of total flavonoids from the seeds of *Astragali complanati* on natural killer cell function [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 15(173): 157-165.

[16] GU G, Barone I, Gelsomino L, et al. *Oldenlandia diffusa* extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ER α /Sp1-mediated p53 activation [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(10): 3363-3372.

[17] PU F, CHEN F, LIN S, et al. The synergistic anticancer effect of cisplatin combined with *Oldenlandia diffusa* in osteosarcoma MG-63 cell line *in vitro* [J]. Onco Targets Ther, 2016, 11(9): 255-263.

[18] LU P H, CHEN M B, JI C, et al. Aqueous *Oldenlandia diffusa* extracts inhibits colorectal cancer cells via activating AMP-activated protein kinase signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 255-263.

[19] WANG Q, WANG Z, CHU L, et al. The effects and molecular mechanisms of MiR-106a in multidrug resistance reversal in human glioma U87/DDP and U251/G cell lines [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125473.

[20] MIAO W, LIU X, WANG H, et al. p53 upregulated modulator of apoptosis sensitizes drug-resistant U251 glioblastoma stem cells to temozolomide through enhanced apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4165-4173.

[21] XU L X, LI Z H, TAO Y F, et al. Histone acetyltransferase inhibitor II induces apoptosis in glioma cell lines via the p53 signaling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33(1): 108-123.

[22] Sharma A, Bhat M K. Enhancement of carboplatin and quercetin-induced cell death by roscovitine is Akt dependent and p53 independent in hepatoma cells [J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(4): 4-14.

[责任编辑 张丰丰]