

新疆阿魏树脂不同分离部位 对结肠癌细胞 HCT116 的抑制作用

周龙龙¹, 张海英^{1,2*}, 任燕¹, 周倩¹

(1. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学第四附属医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的: 分析新疆阿魏树脂不同分离部位对结肠癌细胞 HCT116 抑制作用的活性, 并确定其有效活性部位。方法: 通过磺酰罗丹明 B 比色法 (SRB) 与流式细胞术以细胞密度 1×10^5 个/mL, 药物质量浓度 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (流式细胞术药物浓度为 62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 检测新疆阿魏树脂不同分离部位 (石油醚部位、乙酸乙酯部位、甲醇部位) 对结肠癌细胞 HCT116 药物作用 24 h 后的增殖抑制与凋亡作用, 以 IC_{50} 和总凋亡率作为指标衡量其各分离部位抑制肿瘤的活性效能。结果: 石油醚部位: 对结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制 IC_{50} 68.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总凋亡率为 $(43.4 \pm 1.1)\%$; 乙酸乙酯部位: IC_{50} 43.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总凋亡率为 $(56.2 \pm 0.9)\%$; 甲醇部位: IC_{50} 59.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总凋亡率为 $(46.7 \pm 3.1)\%$ 。结论: 新疆阿魏树脂乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位对结肠癌细胞 HCT116 细胞毒性作用较强并能促进其大量凋亡, 初步确定为新疆阿魏树脂抗肿瘤活性部位。

[关键词] 新疆阿魏; 结肠癌 HCT116 细胞; 磺酰罗丹明 B 比色法; 细胞凋亡; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0183-04

[doi] 10.11653/syfy2013230183

Inhibition Activity of Different Separation Parts of *Ferula sinkiangensis* Resin on HCT116 Human Colon Cancer Cell

ZHOU Long-long¹, ZHANG Hai-ying^{1,2*}, REN Yan¹, ZHOU Qian¹

(1. Xingjiang Medcial University, Wulumuqi 830000, China;

2. The Fourth Affiliated Hospital of Xingjiang Medcial University, Wulumuqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To study inhibitory activity the different separation parts of *Ferula sinkiangensis* resin on HCT116 human colon cancer cell and determine its effective active site. **Method:** The effects of the different separate parts of *F. sinkiangensis* resin (petroleum ether parts, ethyl acetate parts, methanol parts) on colon cancer cells HCT116 proliferation and apoptosis were observed, IC_{50} and total apoptosis rate were used to evaluate tumor suppression activity performance by SRB and flow cytometry with cell concentration $1 \times 10^5/\text{mL}$, and drug concentration of 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (flow cytometry drug concentration was 62.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). **Result:** IC_{50} of petroleum ether unit was 68.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the total apoptosis rate was $(43.4 \pm 1.1)\%$; IC_{50} of ethyl parts: 43.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, total apoptosis rate was $(56.2 \pm 0.9)\%$; IC_{50} methanol Department of 59.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, total apoptosis rate was $(46.7 \pm 3.1)\%$. **Conclusion:** Ferula resin ethanol extract ethyl acetate fraction can promote their apoptosis, initially identified as anti-tumor activity in *F. sinkiangensis* resin parts.

[Key words] *Ferula sinkiangensis*; HCT116 colon cancer cells; SRB; apoptosis; anti-tumor activity

新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 其树脂为我国药典收载药材阿魏主要来源, 其味苦、辛,

[收稿日期] 20130715(002)

[基金项目] 国家自然科学基金(81260625)

[第一作者] 周龙龙, 硕士在读, 从事中药药理研究, E-mail: zls56567@163.com

[通讯作者] * 张海英, 硕士生导师, 副主任药师, 副教授, Tel: 0991-5814127, E-mail: zzhyy2583@126.com

性温,归脾、胃经,具有消食、化瘕、散痞、杀虫的功效,用于肉食积滞,瘀血癥瘕,腹中痞块,虫积腹痛^[1]。在维吾尔医药中有悠久的历史,维吾尔医中为三级干热,有截疟,止痢,解毒,除臭,杀虫,消积,祛痰,疏风,消食健胃,通经止痛,祛风寒,排泻多余黏液质,强筋健脑的作用^[2]。近些年来,其所来源的阿魏属的多个阿魏种,在国外多被发现具有抗肿瘤活性,如我国一直进口阿魏做使用的 *Ferula assafoetida* 的树脂中提取的倍半萜香豆素 galbanic acid 能抑制肿瘤血管内皮因子的生成从而致死肿瘤的作用^[3],又如 *F. vesceritensis* 根中提取的胡萝卜稀倍半萜类成分能够致使人乳癌细胞(mcf-7)的快速凋亡^[4]等等。我国恶性肿瘤发病率和死亡率排序中结肠癌位列前茅,同时结肠癌发病率在我国不断升高。为了提高结肠癌防治水平,需要不断寻找和开发新的抗结肠癌药物,新疆阿魏作为国产阿魏抗肿瘤方面的常作为治疗消化系统癌症的复方的君药使用,但单味药的相关基础研究十分匮乏^[5]。因此本研究选取 SRB 法检测细胞增殖抑制率与流式细胞术检测凋亡的方法,以结肠癌细胞 HCT116 为对象,初步分析新疆阿魏树脂不同分离部位的抗肿瘤活性,并确定其有效活性部位。

1 材料

1.1 细胞与药材 HCT116 人结肠癌细胞株(购自上海中科院细胞研究所,试验使用在 5~10 代),新疆阿魏药材经新疆自治区中医院李永和主任药师鉴定为伞形科植物新疆阿魏(*Ferule sinkiangensis* K. M. Shen)的树脂(购自新疆伊犁,新疆伊犁阿克苏自治州药检所检验,检验批号 2012001)。

1.2 仪器 超净工作台(中国上海智诚 ZHJH-C1112B),酶标仪(美国 Thermo 公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),流式细胞仪(美国 MILLPORE 公司, GUAVA EASYCYTE 8HT),10 mL 移液管、5 mL 移液管、100 mm 细胞培养皿、6 孔板、96 孔细胞培养板(美国 COSTAR 公司)移液器(德国 eppendorf 公司)。

1.3 试剂 RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司,批号 1237839),胎牛血清(美国 Hyclone 公司批号 F120121),青链霉素混合液(美国 Hyclone 公司,批号 J120051),0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京 Solarbio 公司,批号 120913),DMSO(美国 Sigma 公司,批号 67685TT),PBS(美国 Hyclone 公司,批号 NYCO830),SRB(美国 Sigma 公司,批号 20223FAV),三氯乙酸(分析级,天津市百世化工有

限公司,批号 20100102),冰乙酸(分析级,天津市百世化工有限公司,批号 20121103),甲醇(分析级,西安化学试剂厂,批号 20081008),95% 乙醇(分析级,天津市富宇精细化工有限公司,批号 20121009)。

2 方法

2.1 新疆阿魏树脂的提取及各萃取部位分离 阿魏树脂 400 g 用 2 000 mL 95% 乙醇超声提取 40 min,过滤,残渣再用 95% 乙醇 1 000 mL 相同方法提取 2 次,过滤,合并提取液,减压浓缩。用硅藻土拌样分散浸膏后,依次用石油醚、乙酸乙酯、甲醇超声萃取。虑过,滤液浓缩干燥。

2.2 SRB 法测定新疆阿魏树脂不同极性部位对结肠癌 HCT116 细胞的增殖抑制作用

2.2.1 分组与给药 收集处于对数生长期细胞,计数调整其密度为 1×10^5 /mL。取 96 孔板每孔加入细胞悬液 100 μ L,四周边缘孔用无菌 PBS 填充,培养 24 h 后加药处理。以新疆阿魏树脂的分离萃取的石油醚、乙酸乙酯、甲醇部位 3 组为药物组,分别用 DMSO 助溶后(DMSO 浓度小于 0.2%)用培养基逐级稀释成 250,125,62.5,31.25,15.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将孔中原有培养基弃去加入含药物的培养基 200 μ L。每组设 3 个复孔将 96 孔板继续放入培养箱中培养 24 h。并在此前设置调零孔、正常对照孔。

2.2.2 细胞固定 药物作用处理终止后,每孔加入 50 μ L 预冷过三氯乙酸(TCA)溶液(50%,*m:V*)固定细胞,TCA 溶液的终浓度为 10%。移入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 1 h,取出用去离子水冲洗 5 遍,室温晾干。

2.2.3 染色 待 96 孔板室温下晾干后,每孔加入 0.4% (*m:V*) 的 SRB 染液 100 μ L,染色 30 min 后倒掉染液,用 1% (*V:V*) 乙酸冲洗 4 次,去除未结合的染料,甩干。

2.2.4 IC_{50} 检测 用 150 μ L Tris-base 碱液(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 10.5)溶解与细胞蛋白结合的染料,脱色摇床上振荡 10 min,采用酶标仪 515 nm 处测定吸光度(*A*)。按下式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{(A_{515\text{对照孔}} - A_{515\text{给药孔}})}{(A_{515\text{对照孔}} - A_{515\text{调零孔}})} \times 100\%$$

根据各浓度抑制率, IC_{50} 采用 Graphpad Prism 5 软件提供 IC_{50} 计算模型计算。以上实验重复 3 次,求出 3 次实验的各浓度的抑制率与 IC_{50} 以平均值作为最终结果。

2.3 检测新疆阿魏不同极性部位对 HCT116 细胞的凋亡作用

2.3.1 分组与给药 收集处于对数生长期细胞,计

数调整其密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 于 6 孔板,每孔加 1 mL 细胞悬液培养 24 h。设正常对照组与新疆阿魏分离萃取的石油醚部位、乙酸乙酯部位、甲醇部位 3 个给药组,按照上述配药方法陪配置成 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,弃去原来培养基,每孔加入 2 mL 含药培养基,培养 24 h。

2.3.2 细胞收集 从 6 孔板中收集经药物处理后 24 h 的细胞悬液,细胞计数细胞密度控制在 $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{mL}$ 。用 PBS 清洗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min 离心,需重复 2 次。用染色缓冲液 400 μL 调成细胞悬液。

2.3.3 细胞荧光染色 在细胞悬液加入荧光 Annexin V-FITC 5 μL 溶液混匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 20 min, 在加入 PI 染料 10 μL 溶液混匀 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 5 min。

2.3.4 细胞凋亡率检测 调试流式细胞仪工作站软件,在机器中弹出的 96 孔板中,每孔加入 200 μL 处理好的细胞悬液,上机检测。实验完毕后图示 4

个象限所代表为左下象限:无凋亡的细胞;右下象限:处于早期凋亡的细胞;右上象限:处于晚期凋亡细胞;左上象限:细胞碎片。重复 3 次测量,并计算总凋亡率(早期凋亡率 + 晚期凋亡率),以平均值作为结果。

2.4 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。 IC_{50} 采用 Graphpad Prism 5 软件提供 IC_{50} 计算模型计算。

3 结果

3.1 对 HCT116 细胞增殖的影响 新疆阿魏树脂各分离部位在浓度范围内都对肿瘤细胞有一定的增殖抑制作用,抑制率同药物浓度成依赖关系,3 个部位中乙酸乙酯部抑制活性较强 $\text{IC}_{50} 43.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其次甲醇部 $\text{IC}_{50} 59.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,石油醚部最弱 $\text{IC}_{50} 68.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 新疆阿魏树脂各极性部位对 HCT116 细胞增殖抑制率及 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

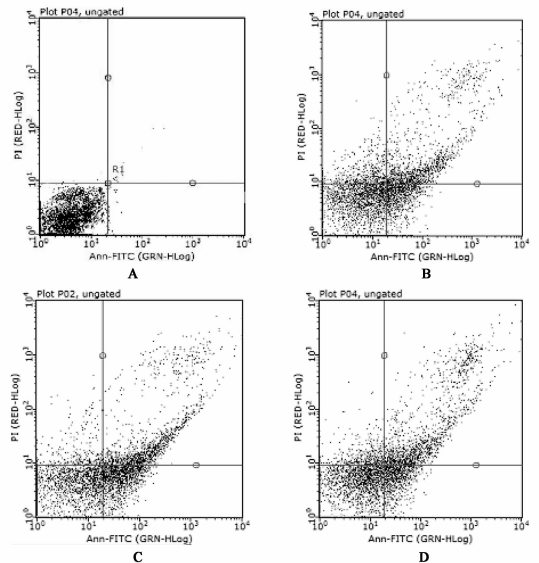
极性部位	不同药物浓度对 HCT116 细胞增殖抑制率/%						IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
	$250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$31.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$15.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	
石油醚部位	$92.2 \pm 1.4^{1)}$	$69.4 \pm 5.5^{1)}$	$37.3 \pm 2.5^{1)}$	$21.7 \pm 0.4^{1)}$	$12.3 \pm 0.1^{1)}$	0 ± 1.1	68.7
乙酸乙酯部位	$82.8 \pm 1.3^{1)}$	$79.2 \pm 0.7^{1)}$	$57.9 \pm 1.0^{1)}$	$35.3 \pm 2.9^{1)}$	$29.1 \pm 0.7^{1)}$	0 ± 1.2	43.7
甲醇部位	$81.3 \pm 1.4^{1)}$	$73.0 \pm 5.0^{1)}$	$45.2 \pm 1.5^{1)}$	$34.9 \pm 1.3^{1)}$	$19.9 \pm 1.4^{1)}$	0 ± 2.4	59.6

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对结肠癌 HCT116 的凋亡作用 在 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 药物浓度下,新疆阿魏分离的 3 个部位均有促进结肠癌细胞 HCT116 凋亡作用(图 1)石油部位总凋亡率 $(43.4 \pm 1.1)\%$;乙酸乙酯部位总凋亡率 $(56.2 \pm 0.9)\%$;甲醇部 $(46.7 \pm 3.1)\%$ 且与对照组 $(1.2 \pm 0.2)\%$ 相比具有统计学意义($P < 0.05$)。

4 讨论

肿瘤细胞体外筛选法是在细胞水平的药物筛选模型,具有材料用量少、药物作用机制比较明确和大规模筛选等优点。目前,在细胞水平上对抗肿瘤天然药物的筛选主要是采用结晶紫染色测定法、噻唑蓝(MTT)法、磺酰罗丹明 B(SRB)法等^[6-7]。本研究并未采用传统的 MTT 法,原因是 MTT 与新疆阿魏各极性部位反应,需要在药物处理结束后进行换液和 PBS 洗板,会造成较大的假阳性。因此选用 SRB 法经预实验能与本研究试药反应。其原理是在酸性条件下可特异性地与细胞内组成蛋白质的碱性氨基酸结合,在溶解后 515 nm 有吸收。SRB 染色后不会像 MTT 法那样很容易变色,细胞固定染色



A. 正常对照组; B ~ D. $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 新疆阿魏树脂石油醚提取物组、乙酸乙酯提取物组、甲醇提取物组

图 1 新疆阿魏树脂不同极性部位对结肠癌 HCT116 的凋亡作用

后在 96 孔板中可以放置较长时间,因而受测定时间的影响较小。SRB 法也是美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)认证的药物对肿瘤细胞抑制增殖的检测方法,所以此法具有较大权威性^[6-8]。为了研究阿魏不同分离部位的抑制作用的量效关系,给药组设置 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6 mg·L⁻¹ 5 个浓度,检测发现阿魏乙酸乙酯部位、甲醇部位、石油醚部位在浓度范围内均对 HCT116 细胞的增殖有一定抑制作用,并且抑制率随药物浓度加大而升高,表现为浓度依赖的特性。其 IC₅₀ 分别为乙酸乙酯部位 43.7 mg·L⁻¹、甲醇部位 59.6 mg·L⁻¹、石油醚部位 68.7 mg·L⁻¹,以此为衡量指标,则揭示阿魏乙酸乙酯部位抑制 HCT116 细胞增殖的活性最优。

肿瘤是严重威胁人类健康的一类疾病。现代研究表明,许多人类恶性肿瘤的发展是由于肿瘤细胞结构、功能和代谢的异常,使肿瘤细胞在数量上无限制恶性增殖。细胞凋亡在控制细胞异常增殖,防止肿瘤的发生和发展过程中也起着关键作用。检测细胞凋亡的方法有形态学检测、线粒体膜势能的检测、DNA 片断化检测、TUNEL 法、流式细胞术等方法,流式细胞术是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,它可以高速分析上万个细胞,并能同时从一个细胞中测得多个参数,与传统的荧光镜检查相比,具有速度快、精度高、准确性好等优点。本研究采用流式细胞术检测新疆阿魏不同分离部位对结肠癌细胞 HCT116 凋亡的影响。结果表明,在 62.5 mg·L⁻¹ 药物浓度下阿魏乙酸乙酯部位、甲醇部位、石油醚部位的总凋亡率分别为 (56.2 ± 0.9)%, (46.7 ± 3.1)%, (43.4 ± 1.1)%, 均有促进结肠癌细胞 HCT116 凋亡作用,其中以乙酸乙酯部位最强。其作用机制根据现有研究推测可能与增强组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的表达有关^[4],这也可能是其抑制增殖的机制之一,但还需要进一步研究证实。

在本研究中只有乙酸乙酯部位对结肠癌细胞 HCT116 的 IC₅₀ 43.7 mg·L⁻¹ < 50 mg·L⁻¹,并且在中等浓度下(62.5 mg·L⁻¹)的凋亡率超 50%。一般认为植物的粗提物对肿瘤细胞 IC₅₀ < 50 mg·L⁻¹ 可初步认为有一定的抗肿瘤作用,有进一步研究的价值^[9]。因此确定新疆阿魏树脂乙醇提取物乙酸乙酯分离部位为抗肿瘤的有效活性部位。其原因可能是倍半萜香豆素类,7-羟基香豆素的多种衍生物等能对肿瘤细胞有抑制作用的成分在此部位富集,与国外相关研究文献相符^[3-4,10-13]。本研究组将进一

步深入地对该部进行成分分离与抗肿瘤研究,以期阐明新疆阿魏树脂用于抗癌的物质基础,从而能获取来源于中药的高效抗肿瘤药物。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:176.
- [2] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准(上册)[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:133.
- [3] Kim K H, Lee H J, Jeong S J, et al. Galbanic acid isolated from *Ferula assafoetida* exerts *in vivo* anti-tumor activity in association with anti-angiogenesis and anti-proliferation[J]. *Pharm Res*,2011,28(3):597.
- [4] Gamal-Eldeen A M, Hegazy M E. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Nat Prod Res*,2010,24(3):246.
- [5] 杨俊荣,敬松,李志宏,等. 新疆阿魏化学成分研究[J]. *中国中药杂志*,2007,32(22):2382.
- [6] 黄银久,宋宝安,金林红,等. SRB 法和 MTT 法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究[J]. *生物学杂志*,2009,26(04):13.
- [7] 谭卫东,金红. 抗肿瘤药物筛选中 MTT 法和 SRB 法的比较[J]. *天然产物研究与开发*,1999,11(3):17.
- [8] Iranshahy Milad, Iranshahi Mehrdad. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assafoetida* oleogumresin) a review [J]. *J Ethnopharmacol*,2011,134(1):1.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2011:986.
- [10] Iranshahi M, Kalategi F, Rezaee R, et al. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from *Ferula* species[J]. *Planta Med*,2008,74(2):147.
- [11] Alkhatib Racha, Hennebelle, Thierry Joha, et al. Activity of elaeoichytrin A from *Ferula elaeoichytris* on leukemia cell lines[J]. *J Phytochemistry*,2008,69(17):2979.
- [12] Chantal Barthelemy, Suzanne Lim, Mehrdad Iranshahi. Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G₁ and induction of caspase-dependent apoptosis [J]. *J Phytomedicine*,2008,15(1):103.
- [13] Suzuki K, Okasaka M, Kashiwada Y, et al. Sesquiterpene lactones from the roots of *Ferula varia* and their cytotoxic activity[J]. *J Nat Prod*,2007,70(12):1915.

[责任编辑 聂淑琴]