

## 汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响

孙健<sup>1,2</sup>, 张扬<sup>1</sup>, 温庆辉<sup>3</sup>, 张郑瑶<sup>1</sup>, 周秋丽<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;  
3. 国家食品药品监督管理局药品评价中心, 北京 100045)

[摘要] 目的: 研究汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响。方法: 以不同浓度的汉黄芩素作用于 SPC-A-1 细胞, 检测细胞抑制率、凋亡及细胞周期。结果: MTT 法测得汉黄芩素的 IC<sub>50</sub> 为 24.7 mg·L<sup>-1</sup>, 能够明显抑制 SPC-A-1 细胞的集落形成能力。汉黄芩素作用于 SPC-A-1 细胞后, 荧光倒置显微镜下观察到细胞凋亡的形态学改变。Annexin V-FITC/PI 双标法证实汉黄芩素可以诱导 SPC-A-1 细胞凋亡, 并具有剂量依赖性。流式细胞仪结果显示, 不同浓度汉黄芩素使 SPC-A-1 细胞周期出现显著的变化, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup> 汉黄芩素可将周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 30, 40 mg·L<sup>-1</sup> 汉黄芩素则使细胞周期堆积在 S 期, 并且随着给药剂量的增加, 凋亡峰显著升高。结论: 汉黄芩素能明显抑制 SPC-A-1 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并对细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 和 S 期具有阻滞效应, 具有抗肿瘤作用。

[关键词] 汉黄芩素; SPC-A-1 细胞; 增殖; 周期

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0169-05

## Effects of Wogonin on Proliferation and Cell Cycle of SPC-A-1 Cells

SUN Jian<sup>1,2</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, WEN Qing-hui<sup>3</sup>, ZHANG Zheng-yao<sup>1</sup>, ZHOU Qiu-li<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Center for Drug Reevaluation, SFDA, Beijing 100045, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of wogonin on the proliferation and cell cycle of the SPC-A-1 cell line. **Method:** The cultured SPC-A-1 cells were treated with different concentrations of wogonin. The proliferation of SPC-A-1 cells was detected by MTT method. Cell apoptosis and cell cycle were detected by AO + EB staining and flow cytometry. **Result:** After wogonin administration, SPC-A-1 cells proliferation inhibition ratio and apoptosis ratio increased significantly in a dose-dependent manner. AO + EB staining showed partial cells presented characteristic morphological changes of apoptosis. SPC-A-1 cells showed G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase blockage when the concentration of wogonin was 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>, and S phase blockage appeared when the concentration of wogonin was 30, 40 mg·L<sup>-1</sup>. **Conclusion:** Wogonin can inhibit the proliferation of SPC-A-1 cells and induce apoptosis, also possess the effect of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S phase blockage and potential antitumor effect.

[Key words] wogonin; SPC-A-1 cells; proliferation; cell cycle

[收稿日期] 2010-08-20

[基金项目] 吉林省科技发展规划青年基金项目(2008140)

[第一作者] 孙健, 助理研究员, 博士, 研究方向: 药物分析与肿瘤药理学研究, Tel: 010-64014411-3327, E-mail: sunjiankw@163.com

[通讯作者] \* 周秋丽, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药复方药效物质基础, Tel: 0431-85619716, E-mail: qiulizhoujl@yahoo.com.cn

随着中药抗肿瘤作用的实验和临床研究的深入开展, 中药复方及天然单体成分的抗肿瘤作用日益被肯定。笔者前期实验证实黄连解毒汤具有抗多种肿瘤的作用<sup>[1-2]</sup>, 经细胞水平活性追踪, 发现其中的汉黄芩素是发挥抗肿瘤作用的主要药效成分之一。本研究以人肺腺癌 SPC-A-1 细胞为模型, 研究汉黄芩素对 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响。以期为汉

黄芩素抗肿瘤的研发应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 仪器与试剂** CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 HERA 公司);酶标仪(TECAN 奥地利);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。RPMI1640、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(美国 Bipecc 公司);MTT、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙(PI, Sigma 公司)。汉黄芩素购于上海友思生物技术有限公司;SPC-A-1 细胞由天药科技有限公司提供。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将 SPC-A-1 肿瘤细胞接种在含 10% 胎牛血清、2 mmol·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素 G 钾盐及 100 μg·mL<sup>-1</sup> 硫酸链霉素的 RPMI-1640 培养液中,于 37 ℃,5% 二氧化碳培养箱中饱和湿度下培养,取对数生长期细胞用于实验。

**2.2 MTT 法测定细胞增殖** 5 × 10<sup>3</sup> 个/孔的 SPC-A-1 相对细胞密度接种于 96 孔培养板中,培养 24 h,细胞贴壁后,加入不同质量浓度(2.5, 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup>) 的汉黄芩素;同时设阴性对照组,空白对照组(只加入培养液,不加细胞),每组均设 3 个平行孔。共同培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT,再培养 4 h,弃上清、加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,用酶标仪于 570 nm 处测吸光度(A)。采用最小二乘法求回归方程,根据回归方程求 IC<sub>50</sub>,计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{溶剂对照 } A - \text{样品 } A) / \text{溶剂对照 } A \times 100\%$$

**2.3 集落形成试验** 按 1000 个/皿细胞接种到含 3mL 预温 37 ℃ 培养液的培养皿中,摇匀,置 CO<sub>2</sub> 孵箱中,37 ℃ 孵育 24 h,贴壁后弃培养液,加入样品汉黄芩素,终质量浓度为 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg·L<sup>-1</sup>,同时设阴性对照组。摇匀后置 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h,去掉药液,换以新鲜温浴培养液,继续培养 14 d。弃去培养液,用磷酸缓冲液(0.01 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)洗涤 2 次,加甲醇 2 mL 固定 15 min,弃去固定液,加 Giemsa 液染色 30 min,自来水冲洗,计数 50 个细胞以上的集落,以阴性对照为 100% 计算各药物作用组集落形成抑制率。

**2.4 AO/EB 染色法观测细胞形态学变化** 以 5 000 个/孔细胞密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,加入 0, 20 mg·L<sup>-1</sup> 的汉黄芩素,分别于 24, 48, 72 h 加入荧光染料 AO(吖啶橙) EB(溴化乙锭) 质量浓度各

为 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, 置 37 ℃ 20 min, 荧光显微镜下观察细胞形态。

**2.5 Annexin V-FITC 检测细胞早期凋亡** SPC-A-1 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> 个/瓶的密度接种于 50 mL 培养瓶中,培养 24 h 后,加入 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> 汉黄芩素,分别培养 24 h,检测细胞早期凋亡,按照凋亡检测试剂盒说明书操作。即收集贴壁及已悬浮的细胞,冷 PBS 洗 2 次,计数约 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞,重悬于 200 μL binding Buffer,加入 5 μL Annexin V-FITC(20 mg·L<sup>-1</sup>) 和 10 μL PI(50 mg·L<sup>-1</sup>) 双标,轻轻混匀,室温避光处放置 15 min,流式细胞仪检测。

**2.6 流式细胞仪测定细胞周期分布** SPC-A-1 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> /瓶接种于培养瓶,培养 24 h 后,加入 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> 汉黄芩素分别培养 48 h,收集贴壁及已悬浮的细胞,1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, PBS 洗 2 次,70% 冰乙醇 - 20 ℃ 固定 18 h, PBS 洗 2 次,加入 PI 溶液(含 PI 50 mg·L<sup>-1</sup>, RNase 1g·L<sup>-1</sup>, 0.1% TritonX-100),调整细胞为 1 × 10<sup>6</sup> 个,4 ℃ 避光染色 30 min,用流式细胞仪检测。采用软件 ModFit LT<sup>TM</sup> 3.0 (美国 Becton Dickinson 公司) 处理,得出各细胞周期及凋亡细胞比率。

## 3 结果

**3.1 汉黄芩素不同浓度对 SPC-A-1 细胞的增殖抑制作用** 结果显示经汉黄芩素作用后,SPC-A-1 细胞生长有明显的抑制,呈剂量依赖性。不同质量浓度汉黄芩素(2.5, 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup>) 抑制率分别为(9.2%, 15.7%, 27.1%, 42.6%, 65.7%)。经一元线性回归方法计算出半数抑制有效浓度(IC<sub>50</sub>)为 24.7 mg·L<sup>-1</sup>。

**3.2 汉黄芩素对 SPC-A-1 细胞集落形成能力的影响** 汉黄芩素明显抑制 SPC-A-1 细胞分裂和集落的形成,半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 7.04 mg·L<sup>-1</sup>(表 1)。

表 1 汉黄芩素对 SPC-A-1 细胞集落形成的作用

汉黄芩素/mg·L <sup>-1</sup>	集落形成抑制率/%
5	48.11
10	59.45
15	62.54
20	91.41
25	94.50
30	98.28

**3.3 汉黄芩素对 SPC-A-1 肿瘤细胞形态的影响** 细胞存活状态是通过和两种不同荧光染料结合状态

决定的<sup>[3]</sup>, AO/EB 双荧光染色可用于观察受检细胞群体中细胞的凋亡发生。活细胞: 细胞被染成均匀绿色; 坏死细胞: 细胞被染成均匀红色; 早期

凋亡细胞: 细胞被染成亮绿色或黄色。晚期凋亡细胞: 呈亮黄色或橘红色荧光。

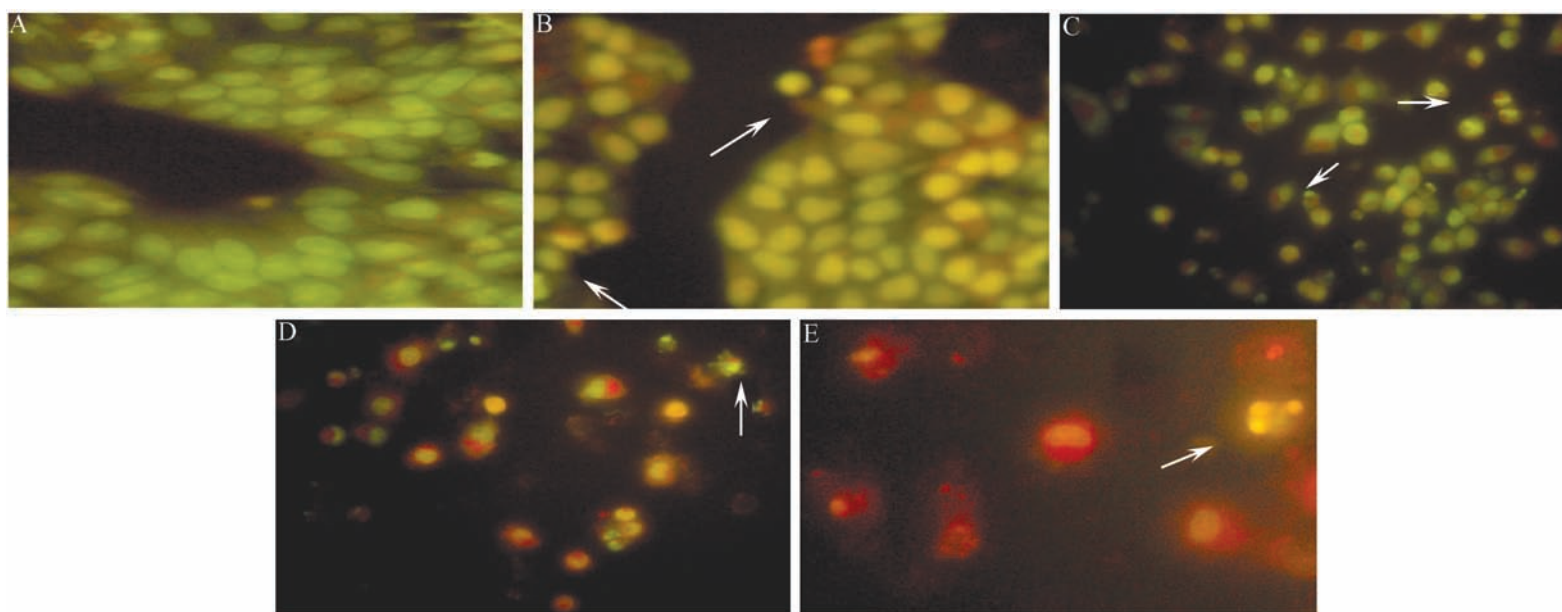


图 1 观测汉黄芩素不同作用时间细胞的形态学变化(AO/EB 染色, ×200)

A. 给药后 0 h; B. 给药后 12 h; C. 给药后 24 h; D. 给药后 48 h; E. 给药后 72 h

阴性对照细胞呈多角形亮绿色贴壁生长, 状态良好(图 1A); 汉黄芩素作用 12 h 后, 显示少量细胞呈月牙状趋边浓染, 轮廓变圆, 部分细胞转为浅黄色(早期凋亡)(图 1B); 24 h 后多数细胞变圆缩小, 早期凋亡细胞大量增加(图 1C 白色箭头所指); 48 h 凋亡细胞发展为晚期(细胞被染成亮黄色), 出现卫星状小球状物, 即为凋亡小体(图 1D); 72 h 后主要为晚期凋亡细胞, 凋亡小体增多, 同时有不同程度的晚期凋亡细胞被染成红色(图 1E)。

胞浆膜不对称性丧失导致磷脂酰丝氨酸(PS)外翻是细胞凋亡的早期过程, Annexin V 可与 PS 特异性强烈结合, 被用来检测早期细胞凋亡。Annexin V-FITC/PI 双标检测可见(图 2), 与阴性对照组比, 汉黄芩素作用的凋亡细胞率明显增高。汉黄芩素干预 24 h 后, 5, 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> 等各剂量组的细胞早期凋亡率分别为 11.33%, 16.63%, 25.58%, 25.71%, 即 Annexin V-FITC/PI 显示出明显的剂量依赖关系, 随着剂量的增加, 其发生凋亡细胞率也逐渐增高。

### 3.4 汉黄芩素对 SPC-A1 细胞早期凋亡的影响 细

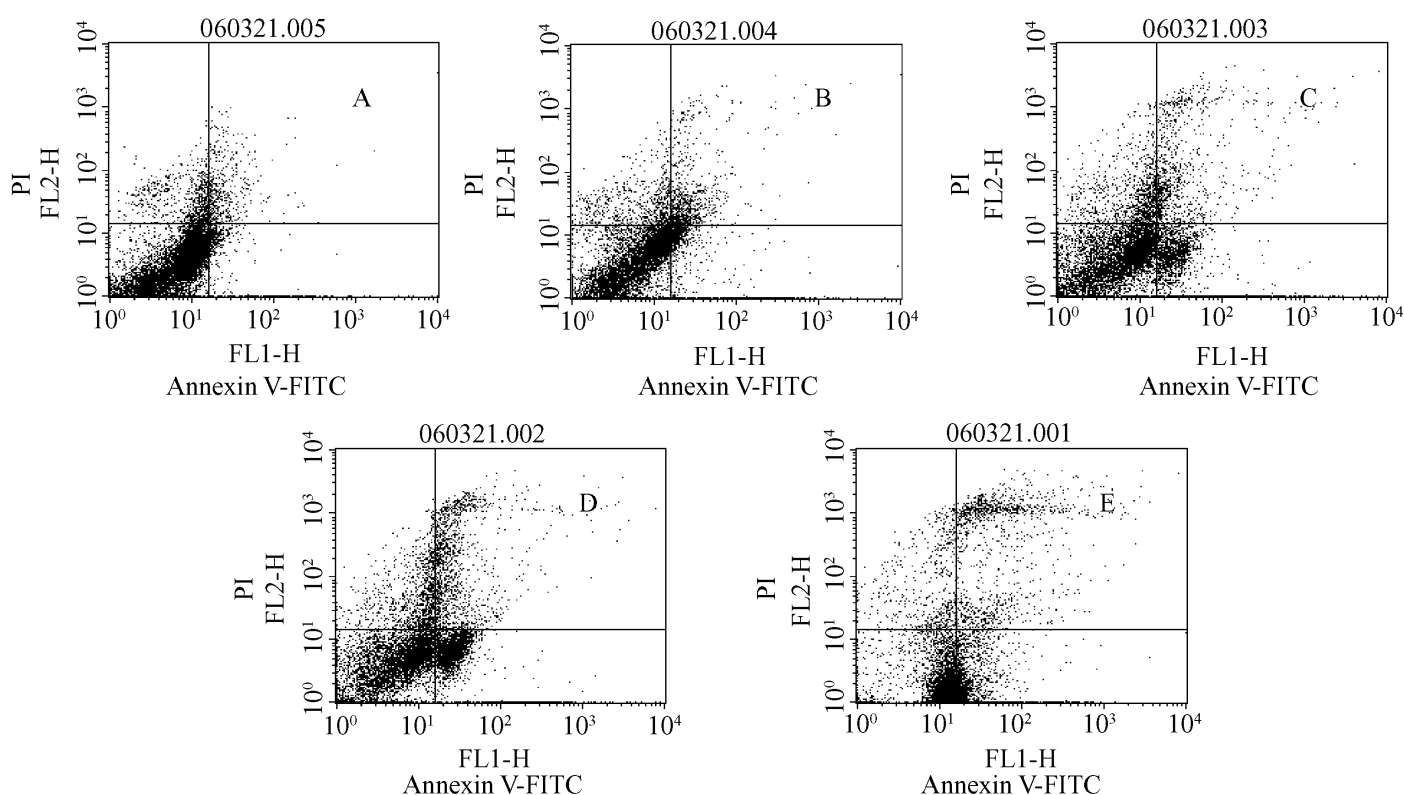


图 2 不同质量浓度汉黄芩素作用 24 h 的早期凋亡分析(Annexin V-FITC/PI 双染)

A. 0; B. 汉黄芩素 5 mg·L<sup>-1</sup>; C. 汉黄芩素 10 mg·L<sup>-1</sup>; D. 汉黄芩素 20 mg·L<sup>-1</sup>; E. 汉黄芩素 40 mg·L<sup>-1</sup>

**3.5 汉黄芩素对肿瘤细胞周期分布和凋亡率的影响** 以流式细胞分析术分析汉黄芩素对 SPC-A-1 肿瘤细胞周期影响时,我们发现不同质量浓度汉黄芩素可促进细胞堆积在不同周期(表 2,图 3)。10, 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  汉黄芩素可将周期阻滞在  $G_0/G_1$  期,并产生 16 ~20.59% 的亚二倍体峰,30, 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  汉黄芩素则使细胞周期堆积在 S 期,并伴随出现大量的亚二倍体峰。

表 2 汉黄芩素对 SPC-A-1 细胞周期分布比率和凋亡率的影响

汉黄芩素 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$	亚二倍体
0	69.75	20.41	9.84	0.59
10	73.44	17.30	9.26	16.31
20	78.16	14.80	7.05	20.59
30	57.63	30.63	11.74	41.63
40	55.89	30.07	14.04	46.09

#### 4 讨论

汉黄芩素属黄酮类化合物,体外研究发现汉黄芩素能抑制多种肿瘤细胞的增殖。本研究证实汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞有明显的生长抑制作用,且对 SPC-A-1 的抑制作用呈剂量依赖性。汉黄芩素明显抑制了 SPC-A-1 集落形成能力,并具有一定的剂量依赖性,提示汉黄芩素能抑制 SPC-A-1 细胞的持续分裂能力。

由于细胞的凋亡在不同时期的表现有差异,故凋亡的检测需要结合多种方法来综合确认。在 AO/EB 双染荧光染色可见早期凋亡细胞表现为细胞核为 AO 染色呈浅黄色荧光。随着作用时间延长,早期凋亡细胞数量增加,黄色荧光凝聚并趋近边缘。随后晚期凋亡细胞也增多,后者表现为亮黄色的细

胞核浓聚和偏移,并且可见凋亡小体。Annexin V-FITC/PI 双标检测也印证,随着汉黄芩素剂量的增加,SPC-A-1 凋亡率也逐渐增加。两者均提示汉黄芩素对 SPC-A-1 细胞起抑制作用的主要方式是诱导并促进其凋亡。

近年的研究发现,细胞周期调控异常与肿瘤密切相关,有学者认为肿瘤是一类细胞周期疾病<sup>[4]</sup>。流式细胞术对 SPC-A-1 细胞周期分析表明,汉黄芩素作用于 SPC-A-1 细胞 48 h 后,不同浓度汉黄芩素可促进细胞堆积在不同周期。10, 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  汉黄芩素可将周期阻滞在  $G_0/G_1$  期,30, 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  汉黄芩素则使细胞周期堆积在 S 期及  $G_2/M$  期,同时亚二倍体凋亡峰剂量依赖性增大,提示不同剂量的汉黄芩素可以作用于细胞周期的不同环节,即不同靶点,从而提升凋亡率。汉黄芩素的抗癌作用与细胞周期调控因子 Cyclins, CDKs, CDIs 的关系,及其如何调控细胞周期的进程,有进一步研究的价值,有待后续探讨。

#### [参考文献]

- [1] 孙健,温庆辉,李夏,等. 黄连解毒汤及其含药血清化学成分变化及抗肿瘤作用的对比研究[J]. 中国中药杂志. 2006, 31(18): 1526.
- [2] 孙健,温庆辉,宋宇,等. 黄连解毒汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志. 2006, 31(17): 1461.
- [3] Lee A W, Li J H, Shi W, et al. P16 Gene therapy: a potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2: 961.
- [4] 韦伟,龚建平,裘法祖. 细胞周期调控与肿瘤的发生发展[J]. 癌症. 1999, 18(1): 95.

[责任编辑 何伟]

## 苦杏仁、桔梗及二者配伍止咳、祛痰作用的研究

张金艳<sup>\*</sup>, 何萍, 李贻奎

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的: 观察苦杏仁、桔梗及二者配伍对小鼠的镇咳及祛痰作用。方法: 小鼠连续 5 d 灌胃给药, 末次药后 1 h, 采用浓氨水刺激法制造小鼠咳嗽模型, 记录小鼠出现咳嗽潜伏期以及 2 min 内的咳嗽次数; 小鼠连续 5 d 灌胃给药, 末次药后 30 min, 用酚红法检测小鼠的祛痰作用。结果: 苦杏仁高、中剂量组, 桔梗高、中剂量组, 以及二者配伍组的小鼠咳嗽次数与模型组比较均显著减少(均  $P < 0.01$ ), 且二者配伍组的小鼠咳嗽次数显著少于同剂量的桔梗组和苦杏仁组(均  $P < 0.05$ ); 苦杏仁各剂量组、桔梗各剂量组以及二者配伍组小鼠气道酚红的排泌量均显著高于蒸馏水对照组(均  $P < 0.05$ ), 配伍组的气道排泌量与桔梗组和苦杏仁组相当。结论: 苦杏仁、桔梗及二者配伍均有显著的止咳及祛痰作用; 二者配伍在镇咳作用上有增效作用, 在祛痰作用上未见配伍增效作用。

[关键词] 苦杏仁; 桔梗; 配伍; 止咳; 祛痰

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0173-03

## Experimental Study on Effect of Bitter Apricot Seed, Platycodon Root, and Their Compatibility for Relieving Cough and Expelling Phlegm

ZHANG Jin-yan<sup>\*</sup>, HE Ping, LI Yi-kui

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Bitter Apricot Seed, Platycodon Root, and their compatibility for relieving cough and expelling phlegm. **Method:** Cough model was made by ammonia stimulation. Cough latency and cough times of the mice were recorded respectively. A mouse model of phenol red excretion was used to evaluate the phlegm expelling. **Result:** Bitter Apricot Seed, Platycodon Root, and their compatibility all significantly reduced the cough times in the mice. Furthermore, the cough times of the compatibility group were significantly less than that of bitter apricot seed group and platycodon root group in the same dose. The phenol red excretion quantity of all groups of Bitter Apricot Seed, Platycodon Root, and their compatibility were significantly increased than that of control group. And there were no significant differences between the groups of Bitter Apricot Seed, Platycodon Root, and their compatibility. **Conclusion:** Both Bitter Apricot Seed, Platycodon Root and their compatibility have the evident effect of relieving cough and expelling phlegm. Furthermore, the compatibility of Bitter Apricot Seed and Platycodon Root increased the efficacy of relieving cough. However, the efficacy for expelling phlegm did not increased by their compatibility in the experiment. Whether the compatibility of Bitter Apricot Seed and Platycodon Root can increase the efficacy of expelling phlegm should be answered in further studies.

[Key words] Bitter Apricot Seed; Platycodon Root; compatibility; anti-cough; removing the phlegm

[收稿日期] 2010-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目  
(30901994)

[通讯作者] <sup>\*</sup> 张金艳, 博士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, Tel: (010) 62835610, E-mail: jinyanz@163.com

苦杏仁-桔梗是临床上用于止咳、平喘、祛痰的经典药对, 在《景岳全书》、《医学入门》、《温病条辨》、《济生方》等中医药古籍中多有记载; 据统计, 目前市售中成药中同时含苦杏仁和桔梗且用于止咳、祛痰、平喘的有 30 余种, 如川贝止咳糖浆、感冒