

白藜甲醇提取物对骨髓瘤细胞 SP20 增殖及凋亡的影响

张 寒¹, 梁晓莉², 贾 敏¹, 孙艳平¹, 汪兴军¹(1. 西安医学院, 陕西 西安 710021; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 咸阳 712000)

摘要: **目的** 研究白藜甲醇提取物不同极性萃取部位对骨髓瘤细胞 SP20 增殖及凋亡的影响。**方法** 体外培养骨髓瘤 SP20 细胞, 光学显微镜观察加入白藜甲醇提取物不同萃取部位后的细胞形态的变化; MTT 法检测白藜甲醇提取物不同极性萃取部位对骨髓瘤细胞增殖的影响。**结果** 光学显微镜观察到给药后骨髓瘤 SP20 细胞出现典型的细胞凋亡形态改变。药物作用 48 h 后, 5-氟尿嘧啶组、氯仿组、乙醚组、乙酸乙酯组对细胞增殖均有抑制作用, 与溶剂空白组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 正丁醇组抑制率最小, 与溶剂空白组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。白藜甲醇提取物不同极性萃取部位对骨髓瘤细胞存活的抑制率, 从大到小依次是: 乙酸乙酯组 > 乙醚组 > 氯仿组。**结论** 白藜甲醇提取物对体外培养的骨髓瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 并促其凋亡。

关键词: 白藜甲醇提取物; 骨髓瘤细胞; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0239-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.007

Influence of Methanol Extract of Radix Ampelopsis on Proliferation of Myeloma Cell Line SP20

ZHANG Han¹, LIANG Xiaoli², JIA Min¹, SUN Yanping¹, WANG Xingjun¹(1. Xi'an Medical College, Xi'an 710021 Shaanxi, China; 2. Buchang Pharmaceutical Co. Ltd. of Shaanxi, Xianyang 712000 Shaanxi, China)

Abstract: **Objective** To study the influence of methanol extract of Radix Ampelopsis with different polarity on myeloma cell line SP20. **Methods** After culturing myeloma cells SP20 in vitro, the cell morphological changes were observed under optical microscope, and influence of methanol extraction parts of Radix Ampelopsis with different polarity on SP20 myeloma cells proliferation was detected by MTT assay. **Results** After co-cultured with the different polar extraction parts of Radix Ampelopsis for 48 hours, SP20 cells showed apoptotic morphological changes under optical microscope. Chloroform, 5-fluorouracil, ethyl ether and ethyl acetate part had inhibition on the proliferation of SP20 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and normal butanol part had the lowest inhibition ratio ($P > 0.05$) compared with the solvent blank group. Inhibition ratio of ethyl acetate, ethyl ether and chloroform parts of Radix Ampelopsis was in decreasing sequence on the survival of SP20. **Conclusion** Radix Ampelopsis methanol extract can significantly inhibit the growth of SP20 myeloma cells and promote the apoptosis of SP20.

Keywords: Methanol extract of Radix Ampelopsis; Myeloma cells; Anti-tumor

白藜为葡萄科蛇葡萄属植物白藜(*Ampelopsis japonica*(Thumb.) Makino)的干燥块根, 有清热解毒、消痈散结、敛疮生肌等功效, 在临床上用于痈疽发背、疔疮、瘰疬、烧烫伤等症的治疗。现代药理研究表明该药具有抗菌、免疫调节、抑制毛发生长及

抗肿瘤等作用^[1]。目前有关白藜的研究多集中在化学成分、抗菌及抗溃疡等方面^[3-6], 而其在抗肿瘤活性方面的相关研究很少。Lee 等^[2-3]发现白藜的甲醇提取物及从中提取纯化的地肤子皂苷(momordin)对激活蛋白(AP-1)活性及肿瘤细胞的增生有抑制作用, 白

收稿日期: 2012-10-24

作者简介: 张寒, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药有效成分提取分离及药理药效的研究。Email: zhanghan11nini@163.com。

基金项目: 陕西省教育厅自然科学基金(2010JK814)。

莰的甲醇提取物和 momordin 对人肿瘤细胞有细胞毒作用。但是白莰甲醇提取物对骨髓瘤细胞的抑制作用, 尚未见相关报道。因此, 本文观察白莰甲醇提取物各部位对骨髓瘤细胞 SP20 细胞株生长及其抑制作用的影响, 筛选白莰抗骨髓瘤细胞的活性部位, 以期为进一步开发和拓宽白莰的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 骨髓瘤细胞株 SP20 由第四军医大学动物中心提供, 37 ℃, 5 %CO₂ 培养箱培养。

1.2 药品及试剂 白莰, 购自西安万寿路药材市场, 经鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物白莰 (*Ampelopsis japonica*(Thumb.) Makino) 的干燥块根。5- 氟尿嘧啶, 批号: 20120617, 上海瀚鸿化工科技有限公司, 4 ℃冷藏备用; RPMI-1640 培养粉, GIBCO 公司, 使用时加入 2 g NaHCO₃、1 × 10⁵ U·L⁻¹ 青霉素、1 × 10⁵ U·L⁻¹ 链霉素、三蒸水配成体积为 1 L 的溶液, 调 pH=7.2, 用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌, 临用前加入 5 %小牛血清; 小牛血清, 杭州四季青生物材料研究所, 56 ℃水浴 30 min 灭活, 于 20 ℃保存备用; 噻唑蓝(MTT), 美国 Sigma 公司, 临用前用 PBS 平衡盐溶液配成 5 g·L⁻¹ 溶液, 用 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌, 于 4 ℃避光保存。

1.3 仪器 301 型 CO₂ 培养箱, Thermo electron 公司; 超净工作台, 苏州净化设备; 全自动高压灭菌锅, 日本 SANYO 公司; 96 孔培养板, 美国康宁 Costar 公司; 精密移液器, 吉尔森公司; IX71 倒置荧光显微镜, 奥林巴斯公司; DG3022A 型酶联免疫检测仪, 国营华东电子管厂; TGL-16GA 型台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.4 实验方法

1.4.1 白莰提取物的制备 称取 1736.0 g 干燥白莰饮片, 研磨成粗颗粒, 加入 8 倍量的甲醇进行加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 过滤并合并 2 次提取液, 浓缩得浸膏。将浸膏悬浮于水中, 根据极性依次用氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到以上 4 个部位, 将各部位溶剂挥干后称重, 正丁醇部位 10.8 g(得率 0.6 %), 乙酸乙酯部位 3.6 g(得率 0.21 %), 乙醚部位 2.1 g(得率 0.12 %), 氯仿部位 1.8 g(得率 0.11 %)。将各部位提取物混悬于蒸馏水中, 加吐温 80 助溶后, 定容于 500 mL 的容量瓶中。精密量取 5 mL 上述各部位提取液, 临用前用蒸馏水稀释到 100 mL 备用。

1.4.2 骨髓瘤细胞培养 将骨髓瘤细胞培养在含 10 %小牛血清、青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 120 U·mL⁻¹ 的 RPMI-1640 中。放入 37 ℃、5 %CO₂ 培养箱常规培养。1~2 d 传代 1 次。轻轻倒掉废液, 直接加培养液两滴管, 进行反复多次吹打。分装在每个无菌培养瓶中进行常规培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。

1.4.3 MTT 法测定骨髓瘤细胞 SP20 的增殖 无菌条件下收集处于对数生长期的骨髓瘤 SP20 细胞, 于 1000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集沉淀细胞, 用 1640 培养液配制成 1 × 10⁵ 个·mL⁻¹ 细胞浓度, 直接接种于 96 孔培养板中, 每孔 50 μL。氯仿组加入 1.4.1 项下的终浓度为 0.18 mg·mL⁻¹ 的氯仿萃取药液, 乙醚组加入终浓度为 0.21 mg·mL⁻¹ 的乙醚萃取药液, 乙酸乙酯组加入终浓度为 0.36 mg·mL⁻¹ 的乙酸乙酯萃取药液, 正丁醇组加入终浓度为 1.08 mg·mL⁻¹ 的正丁醇萃取药液, 以上 4 组中加入的萃取部位的浓度相当于原药材 0.1736 g·mL⁻¹ 的浓度; 溶剂空白组加入与 4 种药液等浓度的助溶剂吐温-80(终浓度为 0.02 %); 正常对照组加入 1640 培养液, 阳性对照组加入终浓度为 250 μg·mL⁻¹ 的 5- 氟尿嘧啶。以上各组药物每孔各加入 100 μL, 每组 8 复孔; 37 ℃、5 %CO₂ 培养箱培养。分别作用 24, 48 h, 于每次结束实验前 4 h 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT, 37 ℃孵育 4 h 后, 取出吸弃上清液后, 加入 DMSO 150 μL, 轻微震荡使结晶溶解后, 以酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值, 实验重复 3 次, 按下列公式计算细胞生长抑制率^[7]。抑制率=(溶剂空白组 A 值-实验组 A 值)/溶剂空白组 A 值 × 100 %。

1.5 统计学处理方法 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析法。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察骨髓瘤 SP20 细胞生长情况 结果见图 1。正常对照组骨髓瘤 SP20 细胞形态规则, 排列紧密, 细胞核完好清晰, 染色质均匀分布于细胞核内。而 5- 氟尿嘧啶组、乙醚组、乙酸乙酯组骨髓瘤 SP20 细胞间隙增大, 出现凋亡的典型形态改变, 核固缩, 染色质边集于核膜下, 形成新月形小体, 核膜消失或突起呈小泡样, 核质浓缩, 发生碎裂。

2.2 MTT 法测定骨髓瘤细胞增殖的变化 见表 1。药物作用 24 h 后, 5- 氟尿嘧啶组对细胞增殖已产生抑制作用, 抑制率达 25.5 %, 与溶剂空白组比较, 差

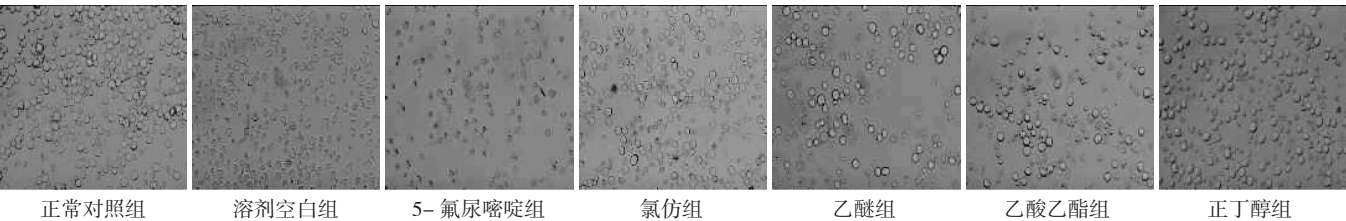


图 1 48 h 各组骨髓瘤 SP20 细胞生长形态(×400)

Figure 1 The cell morphology in all groups after culturing for 48 h

异有统计学意义($P < 0.01$)。随着作用时间延长, 各组增殖抑制率升高。48 h 后, 5- 氟尿嘧啶组、氯仿组、乙醚组、乙酸乙酯组对细胞增殖均有抑制, 其中 5- 氟尿嘧啶组、乙醚组和乙酸乙酯组与溶剂空白组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 氯仿组与溶剂空白组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。正丁醇组抑制率最小, 与溶剂空白组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。白藜甲醇提取物的不同极性萃取部位的抑制率从大到小依次是: 乙酸乙酯组 > 乙醚组 > 氯仿组。

表 1 白藜不同极性部位对骨髓瘤细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The inhibition of different polarity fraction of extract from Ampelopsis on myeloma cell proliferation

组别	药物浓度 /mg·mL ⁻¹	24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
正常对照组	-	0.154 ± 0.025	-	0.189 ± 0.013	-
溶剂空白组	-	0.151 ± 0.028	-	0.175 ± 0.016	-
5- 氟尿嘧啶组	0.25	0.115 ± 0.020	25.5 ^{△△}	0.117 ± 0.026 ^{△△}	38.1
白藜的氯仿提取部位组	0.18	0.141 ± 0.037	-	0.143 ± 0.029 [△]	18.3
白藜的乙醚提取部位组	0.21	0.157 ± 0.030	-	0.137 ± 0.030 ^{△△}	21.7
白藜的乙酸乙酯提取部位组	0.36	0.153 ± 0.023	-	0.135 ± 0.030 ^{△△}	22.6
白藜的正丁醇提取部位组	1.08	0.157 ± 0.027	-	0.147 ± 0.038	-

注: 与溶剂空白组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

3 讨论

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是骨髓内浆细胞异常增生的一种血液系统恶性肿瘤。随着人口的老齡化, MM 的发病有逐年递增的趋势, 由于其发病机制还不清楚且缺乏有效的治疗手段, MM 的治疗反应较差。迄今为止, 该病仍被视为不可治愈的疾病。故寻找新的药物和治疗方法就显得尤为必要^[8]。中药应用于治疗肿瘤, 无论是在减轻临床症状, 提高生存质量, 防止复发转移, 延长生存期, 还是在与放化疗配合, 增效减毒等方面都显示出很好的治疗效果和应用前景^[9-10]。

现代研究发现白藜有抗肿瘤作用^[9], 但其作用的物质基础尚不明确。为了进一步确定其抗肿瘤的有部位及物质基础, 本文研究了白藜甲醇提取物不

同极性萃取部位对骨髓瘤 SP20 细胞株生长及其抑制作用的影响。在本研究中, 白藜甲醇提取物的乙醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对体外培养的 SP20 骨髓瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 这与文献^[11-9]记载的白藜抗肿瘤的活性部位结果一致。通过显微镜观察发现, 骨髓瘤细胞 SP20 出现凋亡的典型形态改变, 核固缩, 染色质边集于核膜下, 形成新月形小体, 核膜消失或突起呈小泡样, 核质浓缩, 发生碎裂。通过 MTT 实验结果发现, 白藜 4 种有机溶剂萃取物中的乙醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对 SP20 骨髓瘤细胞增殖有显著的抑制作用, 其对骨髓瘤细胞存活的抑制率, 从大到小依次是: 乙酸乙酯组 > 乙醚组 > 氯仿组, 提示白藜甲醇提取物对体外培养的骨髓瘤细胞的生长有明显的抑制作用, 并促其凋亡, 值得进一步研究。

参考文献:

[1] 张梦美, 叶晓川, 黄必胜, 等. 白藜抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(2): 40-42.
[2] Lee DK, Kim B, Lee SG, et al. Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation[J]. Anticancer Res, 1998, 18 (1A): 119-124.
[3] 李洪娟, 张蕾, 王术光. 白藜的药理作用及临床应用[J]. 食品与药品, 2007, (10): 60-62.
[4] 俞琦, 蔡琨, 田维毅. 白藜醇提物免疫活性的初步研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2005, 27(2): 20-21.
[5] 俞文胜, 陈新民, 杨磊, 等. 白藜多酚类化学成分的研究(Ⅱ)[J]. 中药材, 1995, 18 (6): 297-301.
[6] 郭丽冰, 卢雁, 陈水平. 白藜化学成分的研究[J]. 广东药学院学报, 1996, 12(3): 145-147.
[7] 陈浩, 师亮, 王素云, 等. β - 榄香烯抑制人骨髓瘤细胞 RPM-8226 增殖的实验研究[J]. 重庆医学, 2005, 39(9): 1048-1050.
[8] 王梦昌, 张斌. Flavopiridol 诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的分子机制[J]. 西安交通大学学报, 2011, 32(3): 201-203.
[9] 张梦美. 白藜体外抗肿瘤活性成分筛选及作用机制研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2012.
[10] 杨君, 舒敬德, 方庆丰, 等. 川芎嗪对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 侵袭黏附能力的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(5): 352-354.

(编辑: 邓响潮)