

- 1006.
- [9] 邓柏杨. 中医药防治血管 PTA 术后再狭窄研究概况[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(9): 795-796.
- [10] 邓柏杨. 中西医结合非手术治疗急性下肢深静脉血栓形成[J]. 四川中医, 2005, 23(8): 69-70.
- [11] 康一. 中药当归的药效物质基础研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [12] 王迎超. 川芎内酯及其主要成分 Z- 藁本内酯抗动脉粥样硬化作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [13] 蒋苏贞, 宓穗卿, 王宁生. 姜酚心血管药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 219-221.
- [14] 于宁, 曾虹燕, 邓欣. 姜酚的提取、鉴定及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 201-204.
- [15] 黄卫东, 吕武清. 冰片的研究进展[J]. 中国药业, 2008, 17(4): 64-66.
- [16] Wang R, Paul VJ, Luesch H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2-ARE pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 57: 141-153.
- [17] 赵保胜, 宓穗卿, 张银卿. 冰片对大鼠脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达量的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(2): 88-90.
- [18] Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8384-8389.
- [19] Marani M, Tenev T, Hancock D, et al. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(11): 3577-3589.
- [20] 秦正红, 乐卫东. 自噬—生物学与疾病[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 60-61.
- [21] Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy[J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(4): 431-436.
- [22] 王红. 转录因子 ID1 对内皮祖细胞增殖、迁移的影响及在损伤血管修复中作用的研究[D]. 重庆: 中国第三军医大学, 2010.
- [23] 贾思远. 分化抑制因子 Id1 相互作用蛋白的研究[D]. 重庆: 中国第三军医大学, 2003.
- [24] 徐海东. 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在自噬调控以及细胞生存中的机制研究[D]. 重庆: 中国第三军医大学, 2012.

(编辑: 梁进权)

白头翁总皂苷碱水解产物的抗胶质瘤作用及机制研究

彭翠平^{1,2}, 许琼明², 张 天², 李笑然², 杨世林^{1,2}, 周 英¹, 刘艳丽²(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: **目的** 探讨白头翁总皂苷碱水解产物(PAHS)的抗胶质瘤作用及机制。**方法** 采用 MTT 法、集落形成实验分别检测细胞存活率和集落形成率, 同时采用 Giemsa 染色观察 PAHS 对肿瘤细胞形态学变化; 采用 hoechst33342 染色观察人脑胶质母细胞瘤细胞株 U251 凋亡细胞形态变化; 用流式细胞仪检测细胞的凋亡; 用 Western Blot 法检测 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达变化。**结果** PAHS 可以剂量依赖性的抑制 U251 细胞的增殖, 抑制 U251 细胞集落的形成; PAHS(6.25, 9.375, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)可以诱导 U251 细胞凋亡, 抑制率分别为 (6.00 $\pm$ 2.05)%、(46.19 $\pm$ 0.24)%、(78.26 $\pm$ 2.10)%。PAHS 可以上调 Caspase-3、Bcl-2 等蛋白的表达。**结论** PAHS 具有良好的抗胶质瘤作用, 其机制可能与调节 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达有关。

关键词: 白头翁总皂苷碱水解产物; 胶质瘤; 抗肿瘤; 凋亡; 机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0254-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.004

Anti-glioma Effect and Mechanism of Alkali Hydrolysate of Total Saponins from *Pulsatilla chinensis* on Human Glioma U251 Cells

PENG Cuiping^{1,2}, XU Qiongmeng², ZHANG Tian², LI Xiaoran², YANG Shilin^{1,2}, ZHOU Ying¹, LIU Yanli²(1. College of Pharmaceutical Science, Guizhou University, Guiyang 550025 Guizhou, China; 2. College of Pharmaceutical

收稿日期: 2013-12-23

作者简介: 彭翠平, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物活性成分及其作用机制研究。Email: pengting2011@163.com。通讯作者: 刘艳丽, 副教授。研究方向: 中药药理与抗肿瘤药理研究。Email: liuyanli@suda.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273402); 重大新药创制国家科技重大专项(2011ZX11102-001-19); 江苏省自然科学基金(BK2012620); 2013 年苏州大学大学生创新创业训练计划(2013xj060)。

Science, Soochow University, Suzhou 215123 Jiangsu, China)

Abstract: To investigate antitumor effect and mechanism of alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* on human glioma U251 cells. **Methods** MTT assay and colony formation test were used to examine the growth of human glioma cells and colony formation rate. Meanwhile, Giemsa staining was used to observe the morphology of tumor cells, flow cytometry was used to detect the apoptosis of tumor cells, Hoechst 33342 assay kits were adopted to observe the morphology of apoptotic cells, and the expression levels of Caspase-3 and Bcl-2 protein were evaluated by Western blot assay. **Results** Alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* exhibited an inhibition effect on the proliferation and colony formation of U251 cells in dose-dependent manner. The alkali hydrolysate at the dosage of 6.25, 9.375, 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could induce apoptosis of U251 cells, and the apoptotic rates were $(6.00 \pm 2.05)\%$, $(46.19 \pm 0.24)\%$ and $(78.26 \pm 2.10)\%$, respectively. Western blotting results showed that the alkali hydrolysate could up-regulate the expression levels of Caspase-3 and Bcl-2. **Conclusions** Alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis* exerts satisfactory anti-glioma action, and the mechanism might be related with the regulation of Bcl-2 and Caspase-3 protein expression.

Keywords: Alkali hydrolysate of total saponins from *Pulsatilla chinensis*; Glioma; Antitumor; Apoptosis; Mechanism

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel. 的干燥根, 别名毛姑杂花、老公花、大将军草、大碗花、老冠花(山东)等^[1], 生于山野、荒坡及田野间, 喜生向阳处^[2]。白头翁属植物全世界共有 60 多种, 主要分布于亚洲、欧洲、北美洲, 我国约有 11 种, 其中包括 1 个变种, 主要分布于东北、华北、西北、华东等地^[3-4]。白头翁是常用的传统中药, 始载于《神农本草经》, 列为下品, 性寒、味苦, 具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫等功效, 临床上常用于治疗热毒血痢、细菌性痢疾、阿米巴痢疾、妇科阴道炎等^[2-5]。早期文献^[6]报道白头翁含有白头翁素(Anemonin)、白头翁灵(Okinalin)、白头翁英(Okinalin)等。近年来随着对白头翁提取物化学成分和药理作用研究的不断深入, 发现其具有抗肿瘤、抗菌和抗血吸虫等作用^[7-9]。

神经胶质瘤是一种较高致死率的恶性肿瘤, 国内外研究^[10-11]显示, 其发病率约占颅内各类型肿瘤发生率的 40%~60%。胶质瘤具有发病率高、复发率高、死亡率高和治愈率低的特点。目前胶质瘤的主要治疗方法是手术治疗, 术后辅以放射治疗和化学药物治疗, 但这些手段并没有取得切实有效的效果, 因此探讨胶质瘤新的治疗方法, 具有重要的理论及临床意义。

本研究观察了白头翁总皂苷碱水解产物的体外抗胶质瘤作用, 通过检测其对凋亡通路相关基因蛋白表达的影响, 探讨其凋亡机制, 旨在为开发利用

白头翁提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 白头翁总皂苷碱水解产物(PAHS), 苏州大学天然药物化学教研室, 纯度 >85%; 人脑胶质母细胞瘤细胞株 U251, 中国科学院上海细胞库; RPMI1640 培养液、小牛血清, 美国 Gibco 公司; 注射用硫酸链霉素, 大连美罗大药厂; 注射用青霉素钠, 华北制药股份有限公司; 胰蛋白酶, Amersco 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT), 美国 Biosharp 公司; 二甲基亚砜(DMSO), 美国 Amersco 公司; 氟尿嘧啶(5-FU), 上海旭东海普药业有限公司; Gimesa 染液, 南京建成科技有限公司; Hoechst 33342 染色试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司; BB-15 型二氧化碳培养箱, 德国 Thermo Scientific 公司; KA-1000 型飞鸽牌台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; X85-2 恒温磁力搅拌器, 上海梅颖浦仪器有限公司; SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; XDS-1A 型倒置式生物显微镜, 重庆光电仪器总公司; eclipse TE2000-U 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; Thermo MULTISKAN FC 型酶标仪, 德国 Thermo Scientific 公司; WD-9405B 型水平摇床, 北京沃德生物医学仪器公司; 电热恒温水槽(THS-10), 宁波天恒仪器厂; 低温高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; BSA223S 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用贴壁细胞培养法, 将 U251 细胞培养于含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37 ℃、5 % CO₂ 的培养箱培养。细胞用 0.25 % 胰蛋白酶消化传代, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 MTT 法检测 PAHS 对 U251 细胞的增殖抑制作用 收集对数生长期人胶质瘤细胞, 用含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 5 % CO₂、37 ℃ 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁完全。次日分组给药, PAHS 终浓度分别为 3.125, 6.250, 9.375, 12.50, 25.0, 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个浓度均设 3 个复孔, 药物分别与细胞作用 6, 12, 24 h, 终止培养前 4 h 加入 MTT (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每孔 10 μL , 培养结束后弃去上层液体, 每个复孔加入 100 μL DMSO 溶液, 于摇床上振摇 10 min 使结晶充分溶解, 采用酶标仪检测 490 nm 处各孔吸光度 A 值。取其均值计算药物对细胞增殖抑制率(%), 并求其半数抑制浓度(IC₅₀)值, 重复 3 次实验。

细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100 \%$

1.2.3 Gimesa 染色法观察细胞形态 取对数生长期细胞, 用含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 于 6 孔板中, 每组均设 3 复孔, 37 ℃、5 % CO₂ 条件下培养过夜, 次日进行分组: 给药组加入 PAHS (终浓度为 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 阳性对照组加入 5-FU (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 空白对照组加入同等体积的培养基。药物作用 24 h 后, 去掉上清液, 并按照 Gimesa 试剂盒操作说明书进行处理, 干燥后置于显微镜下进行观察。

1.2.4 细胞集落形成实验 取对数生长期细胞, 用含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为 $2.5 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$, 混匀后吸取 2 mL 细胞悬液于 35 mm 无菌培养皿中, 每组均设 3 个复孔, 于 37 ℃、5 % CO₂ 条件下培养过夜, 次日分组给药, 给药组加入 PAHS (终浓度为 0.781, 1.562, 3.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 阳性组加入 5-FU (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每孔 200 μL , 空白对照组加入等体积 PBS, 在 37 ℃、5 % CO₂ 培养箱中静置 10 d, 之后弃去培养基, 用 Gimesa 染色后镜下记录含 50 个细胞以上的细胞集落数, 计算集落形成率和集落抑制率, 并拍照。

集落形成率 (%) = 集落数 / 接种细胞数 $\times 100 \%$

集落抑制率 (%) = $(1 - \text{给药组集落数} / \text{对照组集落数}) \times 100 \%$

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的 U251 细胞, 用含 10 % 小牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 每组均设 3 个复孔, 在 37 ℃、5 % CO₂ 条件下培养过夜, 次日进行分组: 给药组加入 PAHS (终浓度为 6.25, 9.375, 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续培养 24 h, 每孔 200 μL , 空白对照组加入等体积 PBS, 在 37 ℃、5 % CO₂ 的培养箱中培养后, 收集板孔里的培养基吸出至离心管中, PBS 洗涤贴壁细胞 1 次, 用胰酶细胞消化液消化细胞并收集, PBS 液再洗 1 遍, 1200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 再用 PBS 液洗涤细胞 2 次, 加入 500 μL 的 Binding Bufer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL 碘化丙啶(PI), 混匀, 室温避光反应 5~15 min, 上流式细胞仪进行检测。

1.2.6 细胞凋亡的形态学观察 如 1.2.5 项下分组给药, 培养。培养结束后小心吸去上层液体, 用 PBS 液轻洗 1 次, 每孔加入 Binding Bufer 液 500 μL 使浸满底层细胞, 然后每孔加入 Hoechst 33342 染液 5 μL , 避光反应 15 min, 选取细胞密度一致的位置, 于荧光显微镜下观察并拍照、计数(拍照前先将板内的液体吸尽)。

凋亡率 (%) = 给药凋亡细胞数 / 对照组细胞数 $\times 100 \%$

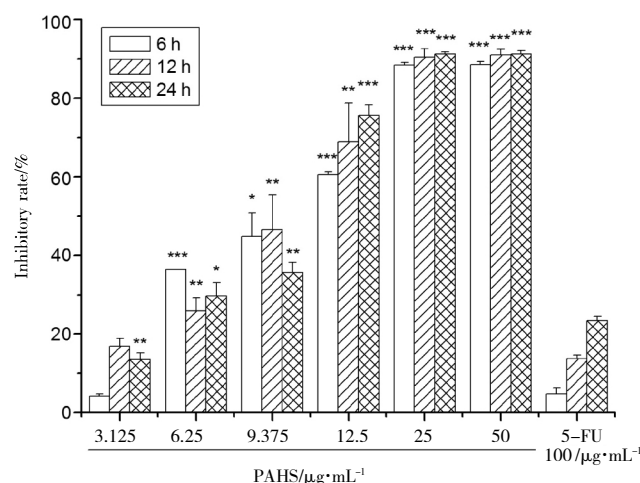
1.2.7 Western blot 检测细胞 caspase-3 和凋亡相关蛋白表达 取对数生长期的细胞, 经胰酶消化后, 以 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 浓度接种入细胞培养瓶内。待细胞长满 80 %~90 %, 分别加入 6.25、9.375 和 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 PAHS 作用 24 h 后, 提取各处理组及对照组蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品 (每孔 40 μg) 加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 经电泳、转膜、5 % 脱脂奶粉封闭, 封闭结束后, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加一抗溶液, 4 ℃ 孵育过夜, 第 2 天 37 ℃ 恒温热孵 1 h, 用 TBST 液洗 3 次, 每次 15 min; 加入对应的荧光二抗, 37 ℃ 避光孵育 2 h, 用 TBST 液避光洗 3 次, 每次 15 min, 于荧光扫描仪中扫描。条带光密度值由 SigmaScan Pro 5 软件测定。

1.2.8 统计学处理方法 全部数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计学软件对各组间变量的差异性用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为非常显著差异。

2 结果

2.1 PAHS 对 U251 细胞的增殖抑制作用 见图 1。

实验中观察了 6 个浓度的 PAHS 在 3 个不同时间点对 U251 细胞的增殖抑制的量效和时效关系, PAHS 在 $3.125 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内对 U251 细胞的增殖有不同程度的抑制作用, 6, 12, 24 h 的抑制率分别为 4.17 % ~ 88.59 %、16.95 % ~ 91.01 % 及 13.47 % ~ 91.26 %, 呈明显量效关系, 其 IC_{50} 值分别为 (10.39 ± 0.35) 、 (9.30 ± 1.19) 和 $(9.51 \pm 0.32) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提示 PAHS 对 U251 细胞的增殖有明显的抑制作用。

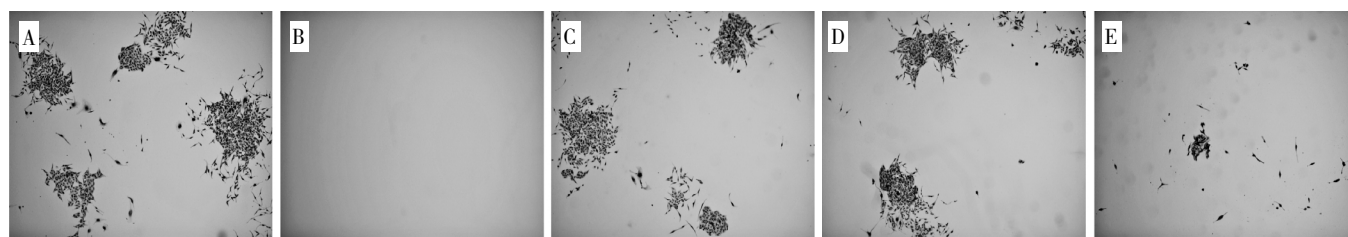


注: 与 5-FU 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 PAHS 对 U251 细胞的增殖抑制作用($n=3$)

Figure 1 Inhibitive effect of PAHS on human glioma U251 cells

2.2 PAHS 对 U251 细胞形态的影响 见图 2。空白



A. 空白对照组; B. 5-FU 组; C. $0.781 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; D. $1.562 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; E. $3.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

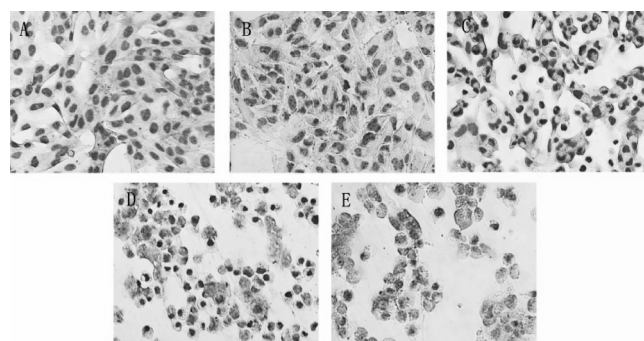
图 3 PAHS 对 U251 细胞集落形成的影响($100 \times$)

Figure 3 Effect of PAHS on colony forming of U251 cells($100 \times$)

2.4 PAHS 对 U251 细胞的凋亡作用 见图 4。剂量分别为 6.25, 9.375, $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 PAHS 作用 U251 细胞 24 h 后, 细胞可见凋亡, 凋亡率分别为 $(6.00 \pm 2.05)\%$ 、 $(46.19 \pm 0.24)\%$ 、 $(78.26 \pm 2.10)\%$, 空白对照组凋亡率为 $(5.54 \pm 0.96)\%$ 。PAHS 剂量分别为 9.375, $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组与空白组比较, 差异有显著性意义($P < 0.001$)。

2.5 细胞凋亡的形态学观察 见图 5。剂量分别为 6.25, 9.375, $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的 PAHS 作用 U251 细胞 24 h 后, Hoechst 33342 染色, 荧光显微镜观

对照组细胞呈不规则贴壁, 集群生长, 排列紧密, 细胞生长正常。经不同浓度 PAHS 作用细胞 24 h 后, 贴壁细胞数减少, 皱缩变圆, 死亡细胞数明显增加。



A. 空白对照组; B. 5-FU 组; C. $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; D. $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

E. $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 2 PAHS 对 U251 细胞形态的影响($400 \times$)

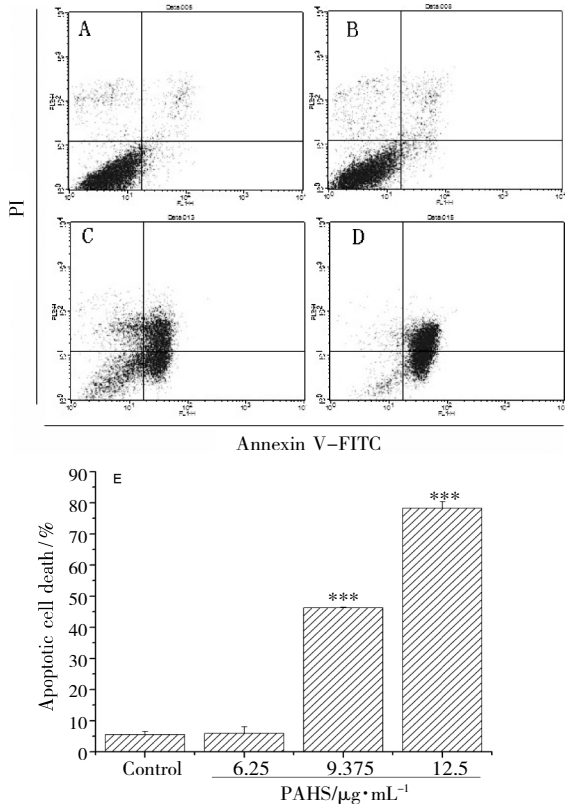
Figure 2 Effect of PAHS on morphological features of U251 cells ($400 \times$)

2.3 PAHS 对 U251 细胞集落形成的影响 见图 3。PAHS 给药组在 6.25, 12.5, 25, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 5-FU 组均无集落形成; 空白对照组集落形成率为 77 %, PAHS 给药组在 0.781, 1.562, $3.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量时, 集落形成率分别为 45.73 %、43.07 %和 3.20 %, 细胞集落形成的抑制率分别为 40.61 %、44.07 %和 95.84 %, 其他剂量组抑制率均为 100 %。

察表明, 凋亡细胞多表现为胞体缩小、变圆, 核浓缩; 并且随着浓度的增加, 发出强烈蓝色荧光的细胞越来越多, 表明细胞大量凋亡。凋亡率分别为 $(9.47 \pm 3.21)\%$ 、 $(23.68 \pm 8.96)\%$ 、 $(62.40 \pm 10.44)\%$ 。Hoechst 33342 染色结果与流式细胞检测凋亡的结果趋势基本保持一致。

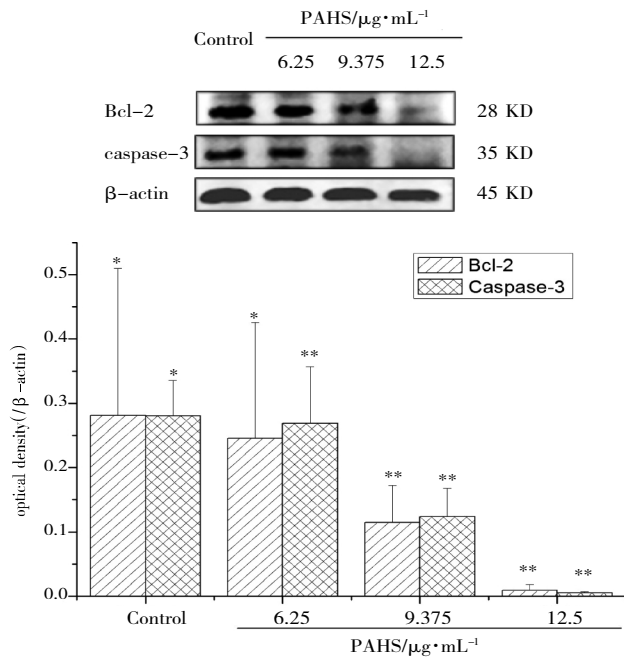
2.6 PAHS 对 U251 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

见图 6。PAHS 可降低 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其作用强度随剂量的增加而增加。



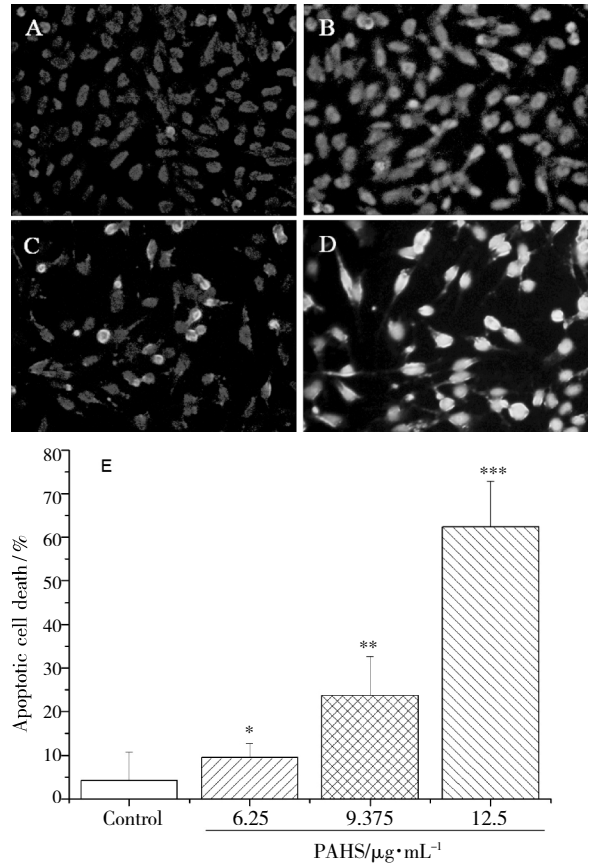
A. 空白对照组; B. $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; C. $9.375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D. $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
注: 与空白对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图4 PAHS对U251细胞凋亡影响的流式细胞仪分析($n=3$)
Figure 4 Effect of PAHS on the apoptosis of U251 cells shown by flow cytometry analysis



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图6 PAHS对U251细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达的影响($n=3$)

Figure 6 Effect of PAHS on protein expression of Bcl-2 and Caspase-3 in U251 cells



A. 空白对照组; B. $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; C. $9.375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D. $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 Hoechst33342染色观察PAHS对U251细胞形态的影响($n=3$)

Figure 5 Effect of PAHS on morphological features of U251 cells was observed by Hoechst33342 staining

3 讨论

本文研究了PAHS对人脑胶质瘤U251细胞的增殖抑制作用,通过MTT实验、集落形成实验、细胞形态观察,发现PAHS能明显抑制U251细胞增殖。前期研究表明^[15],PAHS在体外能抑制肝癌SMMC-7721细胞及肺癌A549细胞的增殖,并且呈现一定的时间剂量依赖性,SMMC-7721及A549的 IC_{50} 值分别为 $(5.67 \pm 0.82) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(11.45 \pm 2.18) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。体内研究表明,在给药剂量 $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,PAHS对S180, H₂₂, Lewis肿瘤的抑瘤率分别达到49.8%、43.7%、70.6%,实验结果提示,PAHS在小鼠体内同样具有较好的抗肿瘤活性,且对Lewis肺癌的作用较好。而在本实验中PAHS作用24 h后的 IC_{50} 为 $(9.51 \pm 0.32) \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,PAHS具有较好的抗胶质瘤作用。

Hoechst33342染色后荧光显微镜下观察到U251细胞发生了凋亡。AnnexinV-FITC和PI双染流式细

胞术检测凋亡,浓度为 $9.375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PAHS 组的凋亡率分别为 $(46.19 \pm 0.24)\%$ 、 $(78.26 \pm 2.10)\%$, 浓度越高, 凋亡越明显, 与空白对照组比较差异有显著性意义($P < 0.001$), 提示 PAHS 能诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是指由基因控制的细胞自主有序的死亡, 与细胞坏死相比, 细胞凋亡是涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的主动过程, 是为更好地适应生存环境而主动采取的一种死亡过程。目前已发现大多数抗癌药发挥其抗癌效应是通过诱导肿瘤细胞凋亡而实现的^[12-13]。而 Bcl-2 家族在凋亡过程中也起着重要作用, 根据其功能和结构可将 Bcl-2 家族分为两类, 一类是抗凋亡因子, 包括 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w 和 Mcl-1 等; 另一类是促凋亡因子, 包括 Bax、Bad、Bid 和 Bim 等。诱导细胞凋亡时, Bax 表达增多, 由细胞质转移到线粒体外膜, 使线粒体的膜通道开放, 造成线粒体的跨膜电位下降, 释放细胞色素 C 进入胞质内, 从而激活 Caspase 酶并启动 Caspase 级联反应, 造成细胞的凋亡。Caspase-3 是 ICE(Interleukin-1 β -converting enzyme)家族中能够执行细胞凋亡的蛋白酶分子, 其底物是聚合多聚酶(PARP)。PARP 是修复损伤 DNA 的酶, 被 Caspase-3 酶解破坏后, 其修复损伤 DNA 的功能丧失, 从而导致细胞凋亡。Caspase-3 主要在细胞浆表达活化 Caspase 蛋白酶, 引导细胞死亡^[14], 它是 Caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一, 是细胞凋亡过程中的主要效应因子。

前期研究发现^[15], PAHS 可以通过线粒体途径诱导肿瘤细胞的凋亡, 经 PAHS 处理后的 SMMC-7721 细胞蛋白与阴性对照组相比, Bcl-2、Caspase-3 的表达减少, Cleaved Caspase-3、cyt-C 的表达增多。在 Lewis 肿瘤组织中, PAHS 可以下调 Bcl-2、Caspase 的表达, 上调 Bax、Cyt-C、Cleaved Caspase-3 的表达。本实验结果表明, 白头翁总皂苷碱水解产物能够明显降低 U251 细胞 Bcl-2 的表达, 同时 Caspase-3 的表达也出现相应的降低。由此推测, 其抗胶质瘤

的机制可能是通过下调 Bcl-2 和 Caspase-3 的基因表达诱导细胞的凋亡。这与本课题组前期研究 PAHS 对其他肿瘤细胞结果一致。

参考文献:

- [1] 杨峰昆, 李成应, 吴连勇. 中药白头翁研究进展[J]. 中兽医医药志, 2011, (2): 23-24.
- [2] 肖培根. 新编中药志(一)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 328.
- [3] 江苏新医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1977: 704.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(上册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 538.
- [5] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 68.
- [6] Bang SC, Lee JH, Song GY, et al. Antitumor activity of pulsatilla koreana saponins and their structure-activity relationship [J]. Chem pharm Bull(Tokyo), 2005, 53: 1451-1454.
- [7] Xu QM, Shu Z, He WJ, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis*(Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3-4): 293-300.
- [8] 时维静, 路振香, 李立顺. 白头翁不同提取物及复方体外抑菌作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 1662-1668.
- [9] 陈岩勤, 许琼明, 诸葛洪祥, 等. 白头翁总皂苷对日本血吸虫虫卵毛蚴尾蚴的作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(1): 24-27.
- [10] 唐容, 蒋丽萍, 洪涛. 缝隙连接蛋白 43 与神经胶质瘤[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1648-1651.
- [11] 周福安. 胶质瘤 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路相关蛋白及基因遗传学研究[D]. 新疆: 新疆医科大学, 2012.
- [12] Hannun Y A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy[J]. Blood, 1997, 89(6): 1845-1853.
- [13] Ellis PA, Smith IE, McCarthy K, et al. Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer [J]. Lancet, 1997, 349(9055): 849.
- [14] Yim W, Deng XK, Yin FZ, et al. The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(9): 1700-1708.
- [15] 季秀美. 白头翁总皂苷碱水解产物的抗肿瘤作用及机制研究[D]. 江苏: 苏州大学, 2013.

(编辑: 修春)

小贴士: 什么是药物相互作用, 哪些药物容易出现相互作用?

药物相互作用是指两种或多种药物合用或先后序贯给药而引起的药物作用和效应的变化。如阿司匹林与氯吡格雷联用可增加出血的风险; 克拉霉素与地高辛合用, 可引起地高辛中毒。治疗窗范围窄的药物(即剂量稍有变化药理作用即有明显改变的)、需要监测血药浓度的药物、酶诱导剂和酶抑制剂都容易发生药物相互作用, 包括口服抗凝药、口服降糖药、抗生素类、抗癫痫药、抗心律失常药、强心苷和抗过敏药等。

(编辑部辑录)