

• 专 栏 •

• 中药与天然药 •

体外人胃癌细胞凋亡试验优选黄参膏提取工艺

扶玲¹, 高燕灵¹, 吴海新¹, 黄建梅² (1.广东省惠州市中心人民医院, 广东 惠州 516000; 2.北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 目的 优选黄参膏的最佳提取工艺。方法 选择提取次数、提取时间、溶剂倍数为考察因素, 各因素均选 3 个水平, 以 $L_9(3^4)$ 正交试验法制备黄参膏, 以体外人胃癌细胞凋亡指数作为工艺考察指标, 优选黄参膏的最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺为加 8 倍药材量水, 煮提 2 次, 每次煎煮 1 h。结论 优选得到的提取工艺稳定、可行, 进一步验证诱导胃癌细胞凋亡是黄参膏抗癌作用的机制之一。

关键词: 胃癌细胞凋亡; 黄参膏; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0372-04

Optimization of the Extraction Process of Huangshen Electuary by Apoptosis of Human Gastric Cancer Cells *in Vitro*

FU Ling¹, GAO Yanling¹, WU Haixin², HUANG Jianmei² (1. Huizhou Central Hospital, Huizhou 516000, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction technology for Huangshen Electuary. **METHODS** The effects of three factors including the times of extraction, time length of extraction and solvent ratio were investigated, and each factor was chosen three levels. Optimize extraction of Huangshen Electuary in the $L_9(3^4)$ orthogonal test, as apoptosis of human gastric cancer cells *in vitro* as an index. **RESULTS** The best extraction technology is: adopt 8 times quantities of water to boil for 2 times, 1 hours for each time. **CONCLUSION** The optimum extraction technology for Huangshen Electuary is feasible. The induction of human gastric cancer cells apoptosis is one of Huangshen Electuary effect mechanism.

KEY WORDS: apoptosis of human gastric cancer cells; Huangshen Electuary; extraction technology

黄参膏为我院研制开发的纯中药制剂, 临床用于抗胃癌治疗。该药能诱导胃癌细胞凋亡, 配合化疗治疗晚期胃癌患者, 能提高患者的总缓解率和一年生存率, 并能减轻化疗的副作用^[1]。黄参膏与经导管动脉栓塞化疗术联合治疗晚期肝癌, 取得较好的疗效, 患者生活质量得到明显提高^[2]。

本课题组曾以黄芪甲苷含量为提取工艺的考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选黄参膏的提取工艺, 得出最佳提取工艺为加 10 倍药材量水提取 3 次, 每次 2 h。《中国药典》明确指出, 药理活性成分和总体提取物二者对最终产品药效的影响孰大孰小不能一概而论, 因此, 在本次试验中拟采用体外胃癌细胞凋亡指数为另一考察指标, 对制剂工艺进行进一步的优选, 为批量生产提供科学合理的依据, 并进一步探求黄参膏的抗癌作用机制。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

人胃癌细胞株 BGC-823 (北京中医药大学生物制药系惠赠, 引自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库)。

1.2 试剂

RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (均为南京凯基生物科技发展有限公司产品), 优级胎牛血清 (江滨, 杭州四季青公司)。

1.3 药材

实验用药材均购买于同仁堂药店望京分店, 经北京中医药大学黄建梅副教授鉴定为真品。

1.4 主要仪器

基金项目: 2006 年度广东省中医药局建设中医药强省科研课题 (2060109)

作者简介: 扶玲, 女, 副主任中药师 Tel: (0752) 2288236 E-mail: fuling9@163.com

5%CO₂ 恒温培养箱 (Heraeus BB 5060); 酶联免疫仪 (Model 550, Microplate Reader, Bio Rad); 流式细胞仪 (美国 BD, Facsclibur); 荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 公司产品); 离心机及真空干燥箱 (德国 Heraeus 公司产品)。

2 实验方法

2.1 正交试验因素水平的确定

根据预试验及相关文献报道, 选择提取次数 (A)、提取时间 (B)、溶剂倍数 (C) 作为考察因素, 每个因素选用 3 个水平, 采用 L₉ (3⁴) 正交表进行试验, 以体外人胃癌细胞凋亡指数作为工艺考察指标, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Tab 1 Levels of factors

水平	因素		
	A/次	B/h	C/倍
1	1	1	6
2	2	1.5	8
3	3	2	10

2.2 供试品的制备

按处方量称取黄芪、党参、白术、大黄等药材, 按正交表所列条件进行试验。煎煮、滤过、合并滤液并浓缩至一定的量, 定容至 250 mL 量瓶中, 得到 1~9 号与黄参膏同组分的药材提取液^[3]。

2.3 细胞培养

人胃癌细胞株 BGC-823 的培养基为经 56 °C、30 min 灭活的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于含 5% CO₂, 饱和湿度的 37 °C 培养箱内传代培养。

2.4 MTT 比色实验

取对数生长期细胞, 常规 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液, 调整浓度至 5×10⁴ 个·mL⁻¹, 接种于 96 孔平底培养板, 每孔 100 μL, 待培养 24 h 后给药, 对照组加入不含药物的培养液, 给药组分别加入 1~9 号药, 每药设 6 个浓度, 分别为 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mg·mL⁻¹, 每组设 3 个复孔, 继续培养 48 h。然后每孔加入 10 μL 的 5 mg·mL⁻¹ 的噻唑蓝 (MTT) / PBS 溶液, 再培养 4 h 后小心吸去全部的上清液, 每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷 (DMSO), 振荡摇匀, 使结晶充分溶解。置酶联免疫仪上测各孔吸光值 (A), 检测波长为 492 nm, 按下列公式计算抑制率:

肿瘤细胞抑制率 (%) = (1 - 给药组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%

用不同浓度药物的抑制率作标准曲线, 并计算抑制率为 50% 的药物浓度 IC₅₀。

2.5 细胞凋亡检测

2.5.1 流式细胞仪检测 将 BGC-823 细胞调整浓度至 1×10⁵ 个·mL⁻¹, 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。待培养 24 h 后给药, 对照组加入不含药物的培养液, 给药组分别加入 1~9 号药, 每药设 2 个浓度, 分别为 3, 4 mg·mL⁻¹, 于 48 h 收集细胞, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化收集; 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 2 000 r·min⁻¹, 5 min 离心, 每个样品加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide (PI) 混匀; 室温、避光反应 5~15 min; 用流式细胞仪进行检测, 激发波长 Ex=488 nm, 发射波长 Em=530 nm; Annexin V-FITC 的绿色荧光能过 FITC 通道检测, PI 红色荧光通过 PI 通道检测。

2.5.2 荧光显微镜观察细胞凋亡 将盖玻片置于 6 孔板中, 将细胞接种于盖玻片上生长, 待培养 24 h 后给药, 对照组加入不含药物的培养液, 药物设 2 个浓度, 分别为 3, 4 mg·mL⁻¹, 继续培养 48 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次; 在 500 μL 的 Binding Buffer 中加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL Propidium Iodide (PI) 混匀; 将上述溶液滴加于盖玻片表面, 使长有细胞的盖玻片表面均匀覆盖, 室温、避光反应 5~15 min; 将盖玻片倒置于载玻片上, 于荧光显微镜下观察, 用 FITC 及罗丹明滤光片分别观察, Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色, PI 荧光信号呈红色。

3 结果

3.1 药品 1~9 号对 BGC-823 细胞的生长抑制作用

测定各组药物对 BGC-823 细胞生长抑制作用, 并绘制量效依赖曲线。1~9 号药物对胃癌细胞 BGC-823 的作用具有剂量依赖性, 随着药物浓度增大, 吸光值减少, 表明活细胞数减少, 细胞生长受抑制。用 6 个浓度的细胞抑制率作回归曲线, 得出回归方程, R²>0.9, 线性良好, 说明 9 种工艺的药物对胃癌细胞的生长抑制都有确切作用。比较各药品的 IC₅₀ 发现, 除药品 1、药品 3 的抑制率较低, 其它各个药组间无明显差异。

各样品回归方程如下:

药品 1: Y=0.083 1 X+0.154 5, R²=0.929 1, IC₅₀=4.16 mg·mL⁻¹

药品 2: Y=0.215 7 X-0.262 3, R²=0.964 8, IC₅₀=3.53 mg·mL⁻¹

药品 3: Y=0.201 0 X-0.294 9, R²=0.925 3, IC₅₀=3.95 mg·mL⁻¹

药品 4: Y=0.202 1 X-0.195 8, R²=0.958 7, IC₅₀=3.44 mg·mL⁻¹

药品 5: $Y=0.2129X-0.2354$, $R^2=0.9411$, $IC_{50}=3.45\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 药品 6: $Y=0.2149X-0.2099$, $R^2=0.9415$, $IC_{50}=3.46\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 药品 7: $Y=0.1581X-0.0514$, $R^2=0.9357$, $IC_{50}=3.49\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 药品 8: $Y=0.1806X-0.1277$, $R^2=0.8960$, $IC_{50}=3.48\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 药品 9: $Y=0.1644X-0.1054$, $R^2=0.9556$, $IC_{50}=3.64\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

3.2 药品1~9号对BGC-823细胞凋亡的影响

从表 2 观察药品 1~9 号对 BGC-823 细胞凋亡的影响, 其中 UL 为 PI 高染, FITC 低染, 表示坏死细胞; UR 为 PI 高染, FITC 高染, 表示凋亡后坏死及部分坏死细胞; LL 为 PI 低染, FITC 低染, 表示正常细胞; LR 为 PI 高染, FITC 高染, 表示早期凋亡细胞。如表 2 所示, 比较各个药品的早期凋亡率, 药物浓度为 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 药品 4、药品 6 的早期凋亡细胞较多; 而药物浓度为 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 药品 4、药品 8、药品 9 的早期凋亡细胞较多, 综合两个浓度的细胞凋亡率考虑, 药品 4 的作用较稳定。

3.3 荧光显微镜观察结果

应用 Annexin V 联合 PI 双染色法染色, 荧光显微镜观察, 正常活细胞 Annexin V 和 PI 均为低染; 细胞凋亡早期的细胞膜完整, Annexin V 高染, 细胞膜呈绿色荧光, PI 低染, 细胞核不着色; 凋亡中, 晚期细胞则 Annexin V 和 PI 均高染, 细胞膜呈绿色荧光, 细胞核呈红色荧光。实验结果可见: 经过药物作用 48h 的 BGC-823 细胞中, 出现凋亡早、中、晚期的 BGC-823 细胞, 部分细胞的细胞核呈大小不等、形态不规则的碎片状或梅花状, 为典型的细胞凋亡形态, 结果见图 1。

表 2 药品 1~9 号对 BGC-823 细胞凋亡的影响(n=3)

项目名称	浓度 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$				浓度 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	UL/%	UR/%	LL/%	LR/%	UL/%	UR/%	LL/%	LR/%
对照品	1.76	12.69	69.76	15.80	2.22	9.83	80.54	7.42
药品 1	1.51	13.19	49.56	35.74	2.19	10.44	62.44	24.93
药品 2	1.03	14.44	56.31	28.22	1.07	7.44	44.10	47.40
药品 3	1.16	16.70	45.30	36.84	1.89	8.69	35.03	54.39
药品 4	3.22	9.20	31.45	56.13	1.33	4.95	12.46	81.25
药品 5	3.44	9.49	43.84	43.23	2.10	7.45	37.69	52.76
药品 6	0.18	8.77	32.87	58.18	7.06	8.17	39.49	45.28
药品 7	3.19	12.07	58.93	25.82	7.61	6.90	24.37	61.12
药品 8	0.55	8.90	61.21	29.33	0.21	6.41	13.31	80.08
药品 9	0.96	10.18	58.54	30.32	0.45	3.93	6.54	89.08

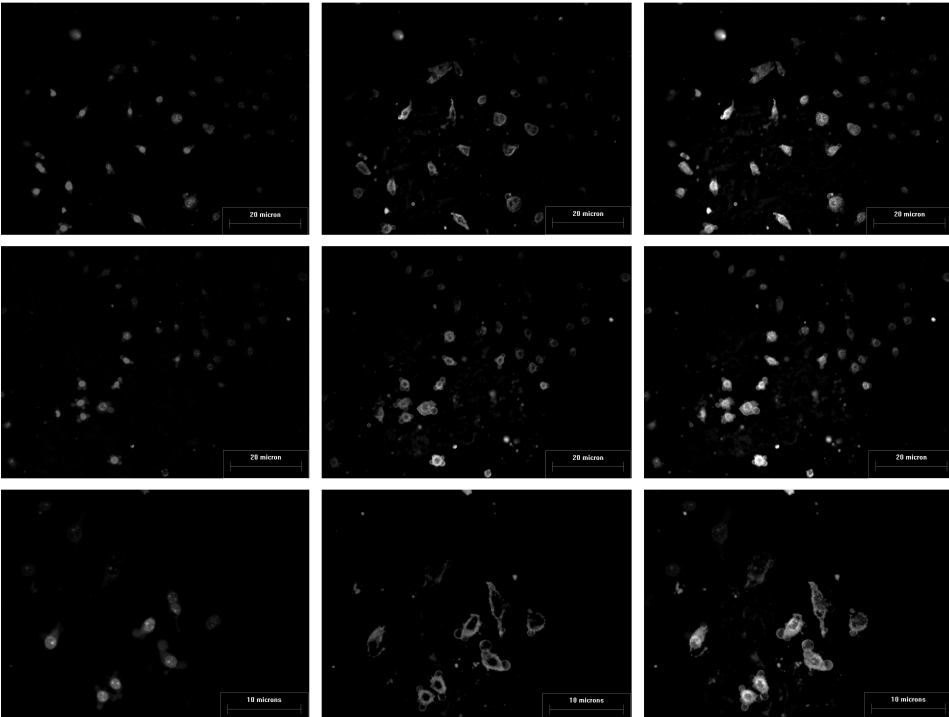


图 1 药品 1~9 号对 BGC-823 细胞凋亡影响的荧光显微图谱

Fig 1 Drugs No.1-No.9 affect to BGC-823 cell apoptosis fluorescence microscopy

4 讨论

MTT 法常应用于体外肿瘤细胞的药敏实验。黄色的噻唑兰,简称 MTT,可透过细胞膜进入细胞内,活细胞线粒体中的琥珀脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶于水的蓝紫色的针状 Formazan 结晶并沉积在细胞中,结晶物能被二甲基亚砷(DMSO)溶解,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映细胞数量。

本实验采用与黄参膏同组分的药材提取液和体外胃癌细胞 BGC-823 一起培养,MTT 法观察到,在 48 h 药材提取液对胃癌细胞抑制作用最为明显,且有显著的剂量—效应关系,这说明 9 种工艺的提取液对胃癌细胞的生长抑制都有确切作用,从而明确了诱导胃癌细胞凋亡是黄参膏抗癌作用的机制之一。

通过显微镜可以观察到:药材提取液浓度为 3 mg·mL⁻¹时,药品 4、药品 6 的早期凋亡细胞较多;而药材提取液浓度为 4 mg·mL⁻¹时,药品 4、药品 8、药品 9 的早期凋亡细胞较多。

综合考虑以黄芪甲苷含量为考察指标的正交试验法结果以及本次试验结果,本课题组认为药品 4 的作用较为稳定,从而优选出黄参膏的最佳提取工艺为 A₂B₁C₂,即加 8 倍药材量水提取 2 次,每次 1 h。经验证,优选出的工艺与原工艺比较,节水节时,操作简便,制备出的黄参膏质量稳定,疗效确切,适合批量生产。

REFERENCES

- [1] XU A G, LIU J H. Huangshen granules associate with chemotherapy treat late gastric cancer [J].Guangdong Med J(广东医学), 1999,20(2):150.
- [2] GAN A H, XU A G, LING H, et al. Effect of Huangshen Electuary on the Living Quality of Advanced Hepatic Cancer Patients[J].Chin J Inter Trad West Med Dig(中国中西医结合消化杂志), 2003,11(6):344.
- [3] FU L, GAO Y L, XUE M, et al. Optimization of extraction process of huangshen electuary by orthogonal test [J].China Pharmacy(中国药房), 2008,19(27):2103.

收稿日期: 2008-12-17