

是通过抑制哮喘大鼠肺组织内炎性介质及因子的释放,从而减轻炎性细胞的浸润,减少气道炎症而具平喘效果。

综上所述,翘芩清肺剂可有效预防及治疗哮喘,其作用可能是通过抑制调整哮喘时失衡的Th1/Th2及其引起的一系列生物学效应,调节紊乱的机体免疫功能等途径来实现的。由于哮喘发病的复杂性,翘芩清肺剂具体的作用机制有待进一步深入探讨。

REFERENCES

- [1] HARADA M, NAKASHIMA K, HIROTA T, et al. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4): 491-496.
- [2] LEE M, KIM S, KWON O K, et al. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(4): 418-424.
- [3] SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic selftolerance [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 455-458.
- [4] LIU G T, WU Y P. Observation of salmeterol and fluticasone propionate inhalation on the treatment of bronchial asthma to lead to the change of methacholine challenge test [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2011, 28(13): 1360-1362.

- [5] LUCEY D R, CLERICI M, SHEARER G M. Type 1 and type2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9(4): 532-562.
- [6] JAMES A, MACLEAN. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen induced pulmonary eosinophilia [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(4): 1461-1469.
- [7] HAN S M, CUI Y H. Th1-and Th2-type cytokine levels from peripheral blood mononuclear cells in patients with asthma [J]. *Chin J Prim Med Pharm*(中国基层医药), 2007, 14(3): 439-440.
- [8] LU Y P. The adjustment and clinical observation on Th1/Th2 cells in peripheral blood by aminophylline in asthma patients [J]. *Strait Pharm J*(海峡药理学), 2009, 21(2): 85-87.
- [9] JIAO G W, LIU X M, MA Y X. Association between bronchial asthma and the interferon gamma +874(A/T) gene polymorphism [J]. *J Haerbin Med Univ*(哈尔滨医科大学学报), 2011, 45(3): 243-245.
- [10] FENG X Y, ZHAO L L, GUAN W, et al. Simvastatin asthma model of rats IL-4、IFN- γ influence of experiments [J]. *Chinese Journal of Asthma*(Electronic Edition)(中华哮喘杂志电子版), 2012, 6(5): 334-337.
- [11] BISSET L R, SCHMID-GRENDELMEIER P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: Progress and perspective [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2005, 11(1): 35-42.
- [12] GIBBONS F K, ISRAEL E, DEYKIN A, et al. The combined effects of zafirlukast, prednisone, and inhaled budesonide on IL-13 and IFN γ secretion [J]. *J Clin Immunol*, 2005, 25(5): 437-444.

收稿日期: 2013-03-23

猫爪草总皂苷体外抗人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞活性研究

童晔玲, 杨锋*, 戴关海, 任泽明, 王波波(浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要:目的 观察猫爪草总皂苷体外对人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞活性的影响。方法 采用系统溶剂法提取猫爪草总皂苷, $^3\text{H-TdR}$ 掺入法观察猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测其对 NCI-H460 细胞凋亡和周期的影响。结果 猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞增殖有较好的抑制作用, 呈现较好的量效关系, 可促进 NCI-H460 细胞的早期凋亡, 细胞周期出现 G_0/G_1 期的阻滞。结论 猫爪草总皂苷能较好的抑制 NCI-H460 细胞增殖, 其机制可能与诱导凋亡、 G_0/G_1 期阻滞有关。

关键词: 猫爪草总皂苷; 人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)11-1182-05

Study on the *in Vitro* Activity of *Ranunculus Ternati Radix* Saponins on Non-Small Cell Lung Cancer Cell of NCI-H460

TONG Yeling, YANG Feng*, DAI Guanhai, REN Zeming, WANG Bobo(*Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China*)

基金项目: 浙江省中医药管理局资助项目(2011ZB010)

作者简介: 童晔玲, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (0571)88849082 E-mail: tongyeling@sina.com *通信作者: 杨锋, 男, 硕士, 研究员 Tel: (0571)88849081 E-mail: 88082214@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the *in vitro* activity of Ranunculus Ternati Radix saponins(RRTS) on non-small cell lung cancer(NSCLC) cell of NCI-H460. **METHODS** Ranunculus Ternati Radix saponins was extracted by the technique of solvent-refining. Effect of different concentrations of Ranunculus Ternati Radix saponins on cell NCI-H460 were tested by ³H-TdR incorporation method. The cell cycle phase and apoptosis were inspected by flow cytometry. **RESULTS** The results showed that RRTS could inhibit the growth of NCI-H460 cell, showing a dose-effect curve. It could also promote the early apoptosis of cell NCI-H460 and arrest the cell cycle in G₀/G₁ phase. **CONCLUSION** Ranunculus Ternati Radix saponins can inhibit the proliferation of cell NCI-H460, its mechanism is probably related to apoptosis induction and blockage of cell cycle in G₀/G₁ phase.

KEY WORDS: Ranunculus Ternati Radix saponins; NCI-H460; apoptosis; cell cycle

中药猫爪草系毛茛科植物小毛茛(*Ranunculus ternatus* Thunb)的干燥块根,性温,味甘、辛,入肝、肺经,具有清热解毒、消肿散结、止咳祛痰等功效,临床用于治疗肺结核、淋巴结核、咽喉炎、疟疾等症^[1]。近年来,猫爪草在中医临床上用于治疗癌肿,对肺癌、淋巴瘤、甲状腺瘤、乳腺肿瘤等疾病已显示出较好的治疗效果,但其有效成分及作用机制尚不明确。本研究采用系统溶剂法提取猫爪草总皂苷,观察其对体外培养的人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞活性的影响,为猫爪草临床治疗肺癌和开发抗肺癌药物提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验材料 猫爪草(杭州华东中药饮片有限公司),经浙江省中医药研究院蔡钟钦副主任药师鉴定为毛茛科植物小毛茛 *Ranunculus ternatus* Thunb 的干燥块根。5-氟尿嘧啶(5-Fu,天津金耀氨基酸有限公司,批号:1105131)。

1.1.2 细胞株 人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞(中国科学院上海细胞库),本实验室液氮保存。

1.1.3 试剂 RPMI-1640(吉诺生物医药技术有限公司,批号:20110720);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所,批号:110304);0.25%胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司,批号:11090901);氚-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)(中国科学院上海应用物理研究所,浓度 1 mCi·mL⁻¹,比度 4 Ci·mM⁻¹,批号:100430);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司,批号:20110608);细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:111228);二甲基亚砷(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:20110310,分析纯)。石油醚、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯。

1.1.4 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Forma);2450 型液闪仪(PerkinElmer 公司);细胞收集仪

(PerkinElmer 公司);GS-6R 型离心机(Beckman 公司);HR40-II-A2 型医用净化工作台(青岛海尔特种电器有限公司);CK40-F200 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);XL-4 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);细胞培养板(美国 Costar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 猫爪草总皂苷的制备^[2] 精密称取干燥的猫爪草 600 g,粉碎成粗颗粒,用 6 倍量 85%乙醇加热回流提取 3 次,每次 3 h,醇提液回收乙醇,用石油醚萃取 3 次,再以水饱和的正丁醇萃取 3 次,正丁醇萃取液用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 萃取 2 次,正丁醇液回收,浓缩至浸膏,置真空干燥箱干燥至无溶剂残留,得总皂苷。以人参皂苷 Rg1 为对照品,采用比色法,测定 560 nm 处的吸光度值,测定总皂苷含量为 52%。临用时用 RPMI-1640 培养液溶解,过滤除菌,4 °C 冰箱内保存备用。

1.2.2 细胞形态学观察 取对数生长期 NCI-H460 细胞配制成 5×10⁴·mL⁻¹ 细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,培养 24 h 后,分别加入不同浓度的猫爪草总皂苷 100 μL,使终浓度为 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg·mL⁻¹,每一药物浓度做 3 个复孔,同时设 25 μg·mL⁻¹ 的 5-FU 对照和 10%FCS 的 RPMI-1640 培养液对照,37 °C、5%CO₂ 培养箱培养,倒置显微镜观察经猫爪草总皂苷 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg·mL⁻¹ 作用 48 h 后的细胞形态学改变。

1.2.3 ³H-TdR 掺入法观察猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞增殖的影响^[3] 取对数生长期 NCI-H460 细胞,按“1.2.2”项下方法处理培养 48 h 后分别加入含 0.3 μCi ³H-TdR 的 1 640 培养液 50 μL,继续培养 16 h,常规收集细胞,测定每个样品每分钟脉冲数(cpm),用三孔的平均脉冲数计算出猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞的抑制率。按下列公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率=

(1-实验组平均 cpm/对照组平均 cpm)×100%。

1.2.4 流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡的影响 将细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中, 平行 3 复孔, 每孔 4 mL, 24 h 后分别加入 12.5, 25, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的猫爪草总皂苷 4 mL, 同时设 10%FCS 的 1640 培养液对照和 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5-FU 对照, 48 h 后用 0.25%胰蛋白酶消化, 1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, PBS 洗 2 次, 收集 $1 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后弃上清, 加入 500 μL 的 $1 \times$ Binding Buffer, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 10 μL PI, 混匀, 室温下避光反应 15 min, 1 h 内进行流式细胞仪检测, 每个样本测 3 个平行孔。

1.2.5 流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞周期的影响 将细胞以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中, 平行 3 复孔, 每孔 3 mL, 24 h 后分别加入 12.5, 25, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的猫爪草总皂苷 3 mL, 同时设 10% FCS 的 1640 培养液对照和 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5-FU 对照, 48 h 后用 0.25%胰蛋白酶消化, 1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, PBS 洗 2 次, 调整浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 用 1 mL 单细胞悬液离心去上清, 加入体积分数为 70%的冷乙醇 500 μL 固定过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。第 2 天用 PBS 洗去固定液, 加 100 μL RnaseA 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 再加入 400 μL PI 染色混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min, 上机检测, 每个样本测 3 个平行孔。

1.2.6 统计学分析 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 个样本均数方差分析后用 SNK 或 LSD 检验, 多组间均数比较采用方差分析, 所有数据均由 SPSS 17.0 统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

各处理组细胞经猫爪草总皂苷处理 48 h 后, 镜下均可见有贴壁细胞不同程度脱落, 悬浮在培养液中。光镜下见细胞变圆, 体积缩小, 细胞质内可见较多颗粒、空泡颜色加深, 呈深褐色, 并出现片状无细胞生长区。对照组细胞呈多角形, 贴壁生长, 几乎无脱落, 光镜下见细胞完整, 胞质饱满, 相邻细胞生长融合成片, 结果见图 1。

2.2 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法观察猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞增殖的影响

不同剂量组猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞增殖有较好的抑制作用, 呈现较好的量效关系,

结果见表 1。

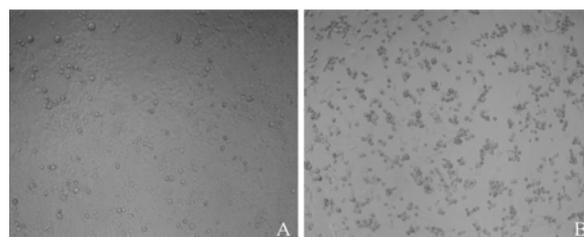


图 1 猫爪草总皂苷对细胞形态学的影响(200×)

A-对照组; B-猫爪草皂苷 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组

Fig 1 Effect of Ranunculus Ternati Radix saponins on cell morphology(200×)

A-control; B-Ranunculus Ternati Radix saponins 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group

表 1 猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞体外增殖的抑制率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 The inhibition rate of Ranunculus Ternati Radix saponins on the proliferation of cell NCI-H460 *in vitro* ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	cpm 值	抑制率/%
对照组	-	21 192±102	-
5-FU	25	416±114 ¹⁾	98.0
猫爪草总皂苷	6.25	21 034±1 202	0.7
	12.5	19 541±685 ¹⁾	7.8
	25	18 304±1534 ¹⁾	13.6
	50	15 409±2 471 ¹⁾	27.3
	100	12 068±654 ¹⁾	43.1
	200	7 619±325 ¹⁾	64.0

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$

2.3 流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 5-Fu 和各剂量组猫爪草总皂苷组细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$), 说明猫爪草总皂苷能够诱导 NCI-H460 细胞凋亡, 结果见表 2 和图 2。

表 2 猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞凋亡的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Ranunculus Ternati Radix saponins on apoptosis of NCI-H460 cell($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞凋亡率/%
对照组	-	4.13±0.07
5-FU	5	26.79±0.12 ¹⁾
猫爪草总皂苷	12.5	22.04±0.14 ¹⁾
	25	24.28±0.16 ¹⁾
	50	34.16±0.12 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$

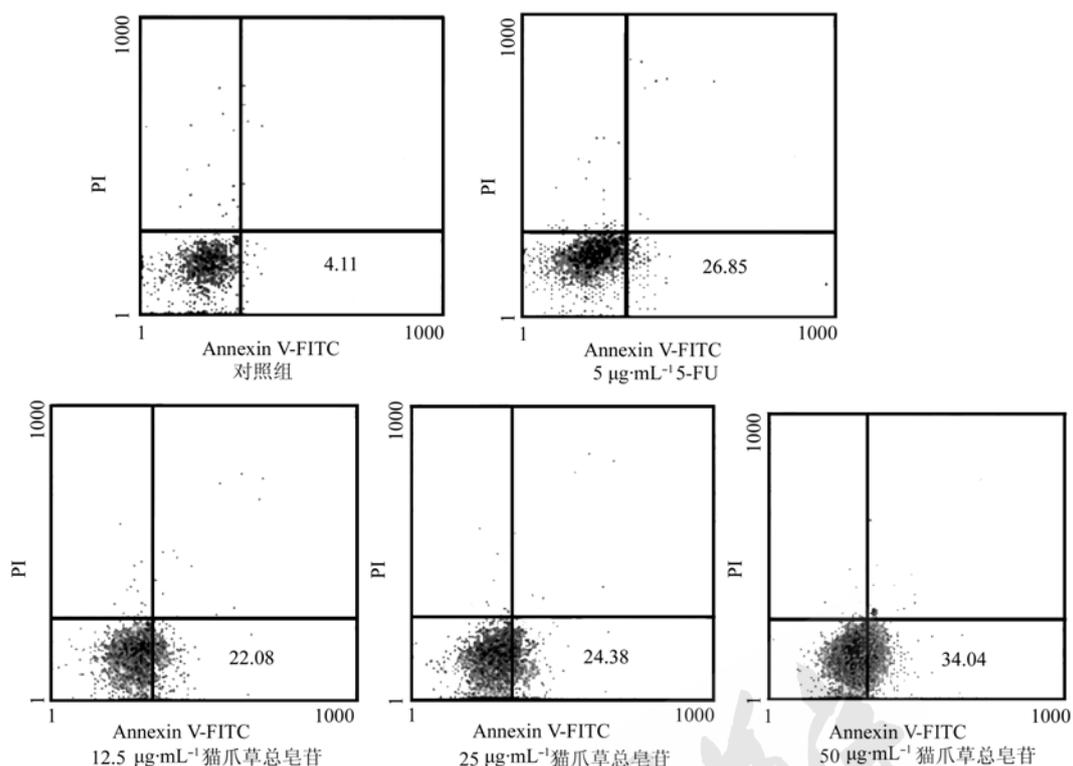


图2 流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对NCI-H460细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of Ranunculus Ternati Radix saponins on apoptosis of NCI-H460 cell

2.4 流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞周期的影响

猫爪草总皂苷 $12.5\sim 50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可使 NCI-H460 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, 表现在 G_0/G_1 期细胞比例增加, 且随着猫爪草总皂苷浓度的增加, G_0/G_1 期的阻滞作用增强, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 结果见表 3 和图 3。

表3 猫爪草总皂苷对 NCI-H460 细胞周期的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)
Tab 3 Effect of Ranunculus Ternati Radix saponins on the cell cycle phase of cell NCI-H460 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	-	49.8 ± 0.05	21.0 ± 0.09	29.2 ± 0.06
5-FU	5	$69.7\pm 0.06^{1)}$	$16.3\pm 0.10^{1)}$	$14.0\pm 0.08^{1)}$
猫爪草 总皂苷	12.5	$65.9\pm 0.03^{1)}$	$17.1\pm 0.05^{1)}$	$17.0\pm 0.04^{1)}$
	25	$69.9\pm 0.03^{1)}$	$16.6\pm 0.08^{1)}$	$13.5\pm 0.03^{1)}$
	50	$72.3\pm 0.06^{1)}$	$14.0\pm 0.07^{1)}$	$13.7\pm 0.04^{1)}$

注: 与对照组比较, $^{1)}P<0.05$

Note: Compared with control group, $^{1)}P<0.05$

3 讨论

肺癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 其中 $80\%\sim 85\%$ 为非小细胞肺癌, 其恶性程度高, 生物学特性复杂, 且预后差, 目前治疗以手术、化疗、放疗为主, 但 5 年生存率不到 15% ^[4-5]。西医治疗

在缩小瘤体方面有一定的优势, 而中医治疗除具有直接抗肿瘤的作用外, 还可以配合放疗和化疗, 起到增效减毒的作用, 增强患者对放疗和化疗的耐受性, 提高生存质量, 对某些晚期肺癌无法手术者, 可服抗癌中药延长生存期, 因此, 综合治疗是首选。

猫爪草在中医临床上具有较好的抗肿瘤活性, 李穗晖等^[6]报道仙鱼汤(由仙鹤草、鱼腥草、猫爪草等药物组成)有良好的抗肺癌效果。柴可群等^[7]将猫爪草与黄芪、党参、沙参、麦冬、生地、山慈菇等中药组合成“抑肺饮”复方, 进行肺癌的治疗和实验研究。

现代药理研究表明, 猫爪草皂苷及多糖对肉瘤 S180、艾氏腹水瘤 EAC 及人乳腺癌细胞株 MCF-7 的 3 种肿瘤细胞株的生长和集落形成均有不同程度的影响, 皂苷比多糖抑瘤效果好^[7]。猫爪草皂苷具有明显抑制人结肠癌 LoVo 细胞增殖和诱导凋亡作用, 下调 Bcl-2、Bcl-2/Bax, 增加 Bax、Caspase-3 蛋白的表达可能是其作用机制之一^[8]。猫爪草皂苷可明显抑制 MCF-7 增殖, 诱导其凋亡^[9]。猫爪草皂苷($100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 MCF-7 细胞 48h 后可明显促进 MFN2 基因表达, 来抑制 MCF-7 细胞增殖及诱导其凋亡^[10]。

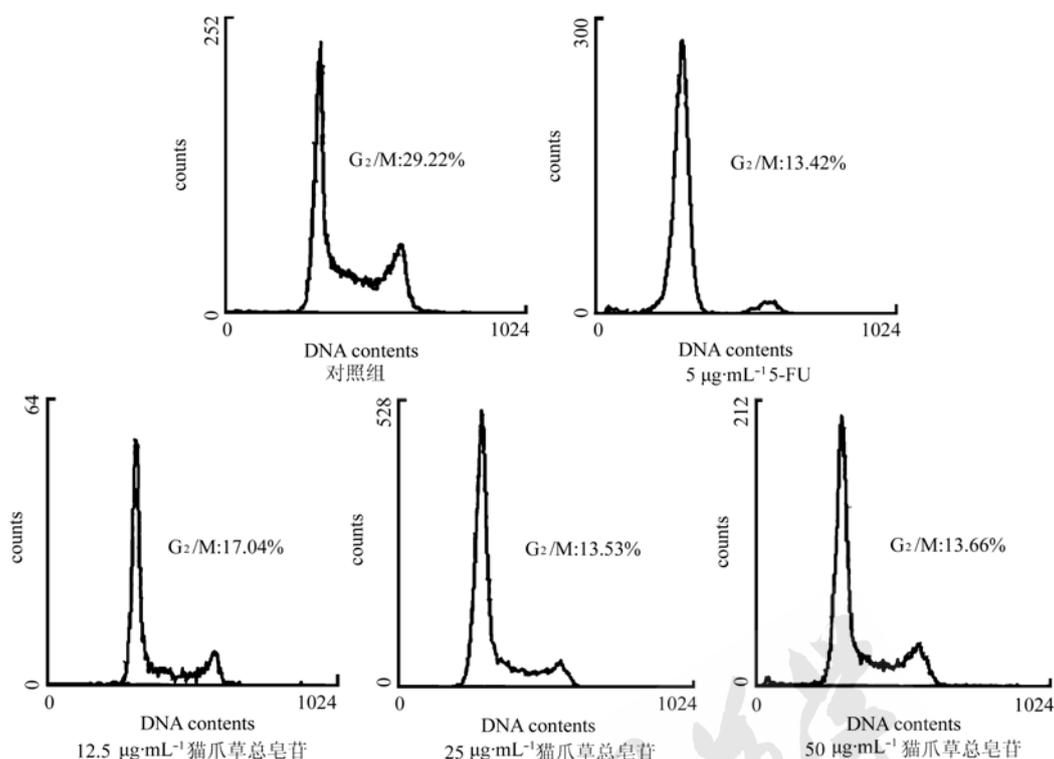


图3 流式细胞仪猫爪草总皂苷对NCI-H460细胞周期的影响

Fig 3 Effect of Ranunculus Ternati Radix saponins on the cell cycle phase of cell NCI-H460

有关猫爪草皂苷抗肺癌方面的实验研究尚未见报道。本实验研究结果显示,猫爪草总皂苷对NCI-H460细胞增殖有较好的抑制作用,呈现较好的量效关系。采用流式细胞仪检测猫爪草总皂苷对NCI-H460细胞早期凋亡和细胞周期的影响时可见,随着药物浓度的增加,细胞早期凋亡率增加,且可引起NCI-H460细胞G₀/G₁期的细胞增多和S期细胞的减少,表明猫爪草总皂苷可能导致NCI-H460细胞的G₀/G₁期阻滞和S期细胞合成减少,抑制其增殖,从而抑制非小细胞肺癌发生和发展。深入研究猫爪草总皂苷抗非小细胞肺癌作用及其机制,将为从猫爪草中开发天然抗肺癌药物提供科学依据,为猫爪草资源的可持续开发利用提供新途径,也为猫爪草的临床应用提供实验依据。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010年版.一部)[S]. 2010: 300.
- [2] WANG A W, WANG M, YUAN J R, et al. Study on the antitumor effect *in vitro* of Radix Ranunculus Ternati [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16(6): 529-531.
- [3] DAI G H, YANG F, TONG Y L. Effect of extracts from *Nidus vespa* on resisting human hepatocarcinoma cell line HepG₂ *in vitro* [J]. J Med Res(医学研究杂志), 2011, 40(11): 149-151.

- [4] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71-96.
- [5] ROSETTI M, ZOLI W, TESEI A, et al. Iressa strengthens the cytotoxic effect of docetaxel in NSCLC models that harbor specific molecular characteristics [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(3): 710-716.
- [6] LI S H, CHEN R S, WU Y S, et al. Treatment of middle-late stage of primary bronchial lung cancer by Xianyu Tang: A clinical observation of 40 [J]. New J Tradit Chin Med(新中医), 2006, 38(9): 261.
- [7] CHAI K Q, ZHAO T W, LU L Q, et al. Investigation of depressant effect of Yifei Yin on transplantation tumor of human lung adenocarcinoma A549 cells in nude mice and its related mechanism [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2010, 25(3): 442-446.
- [8] ZHOU Q A, YU H B. Effect of Radix Ranunculus Ternate saponins on proliferation and apoptosis in human colon carcinoma LoVo cells [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2009, 11(4): 190-192.
- [9] YIN C P, FAN L C, ZHANG L D, et al. The inhibiting effect of extracts in Radix Ranunculi Ternati on the growth of human breast cancer cells *in vitro* [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(2): 93-96.
- [10] MENG X H, LIU B, YIN C P, et al. Mechanism study of mfn2 gene in Radix Ranunculi Ternati saponins and red clover isoflavone-treated breast [J]. China Pharm(中国药师), 2011, 14(9): 1243-1246.

收稿日期: 2013-03-06