

基于灰色关联法研究胆矾中元素对 A549 细胞的体外抑制作用

王鹤辰¹, 樊佳新¹, 包永睿^{1,2,3}, 王帅^{1,2,3}, 李天娇^{1,2,3}, 孟宪生^{1,2,3*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600; 3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 探讨胆矾水煎液的元素组成, 及其中与体外 A549 细胞抑制率关联度最大的元素。方法 通过 ICP-MS 对胆矾水煎液中的元素组成进行分析; 用 MTT 法测得不同浓度下胆矾水煎液对 A549 细胞的抑制率; 通过灰色关联度软件分析与抑制率关联系数最大的元素; 用流式细胞术验证促进肺肿瘤细胞凋亡的元素种类。结果 胆矾水煎液的主要元素组成为 Cu、Zn、Fe、Cd、Mn、Al、Na、Ca 等, 其中 Cu 与 A549 细胞的抑制率关联系数最大, 流式细胞研究进一步验证了促进肺癌细胞凋亡的元素种类。结论 胆矾水煎液中铜离子与抑制肿瘤生长的关系较大。

关键词: 矿物药; 灰色关联; 肿瘤; ICP-MS; 流式细胞术

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)11-1522-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.004

引用本文: 王鹤辰, 樊佳新, 包永睿, 等. 基于灰色关联法研究胆矾中元素对 A549 细胞的体外抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1522-1525.

Study on the Inhibition Lung Cancer Cell A549 with Traditional Chinese Mineral Drugs Danfan *in Vitro* Basing on the Grey Correlation Method

WANG Hechen¹, FAN Jiaxin¹, BAO Yongrui^{1,2,3}, WANG Shuai^{1,2,3}, LI Tianjiao^{1,2,3}, MENG Xiansheng^{1,2,3*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Liaoning Province Component of Traditional Chinese Medicine and Engineering Research Center, Dalian 116600, China; 3. Liaoning Province Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the component elements in the water decoction of traditional Chinese mineral drugs Danfan, and the most important element associated with the inhibition rate of A549 cells *in vitro*. **METHODS** The total elements in the water decoction of traditional Chinese mineral drugs Danfan were analyzed by ICP-MS. The inhibition ratio of different elements of water decoction of Danfan to the A549 cell were detected by MTT assay. Then the Grey relational grade between the inhibition ratio and elements was analyzed, and flow cytometry was used to verify the results that which element was promoting apoptosis of lung tumor cells. **RESULTS** The main elements of the water decoction of Danfan were Cu, Zn, Fe, Cd, Mn, Al, Na, Ca and so on. The correlation coefficient between Cu and A549 cell inhibition rate was the largest. The flow cytometry research further validated that which elements promoting apoptosis of lung cancer cells. **CONCLUSION** The copper element in Danfan is an important element in the tumor cell apoptosis activity.

KEY WORDS: traditional Chinese mineral drugs; grey correlation degree; cancer; ICP-MS; flow cytometry

矿物类药物在我国有着上千年的应用历史, 在传统中医药中占有重要的一席之地。在《山海经》中, 已经有将矿物入药的记载。随着南北朝时期炼丹术的盛行, 矿物药一度成为帝王们追求“长生不老”的秘方, 赤石脂、雄黄、硝石、矾石、磁石、云母等矿物药在中药的历史舞台上成为主角^[1]。经过时间的推移, 后世对矿物药的认识逐步完善, 各医家对矿物药的使用方法也有着自己独到的见解^[2]。虽然对炼丹术本身的评价毁誉参半, 但不可否认的是, 矿物药用法得当, 可以产

生良好的疗效, 有些甚至可以用“神奇”来形容^[3]。李时珍在《本草纲目》中记载, 胆矾“散癥积, 咳逆上气, 及鼠痿恶疮”, 其中癥, 有腹内结块之意。这与现代医学对于肿瘤的描述十分相似。现代化疗方法治疗肿瘤已实践多年, 顺铂等药物对多种癌症均能显示疗效, 但显著的不良反应也是这些药物的明显短板, 在带来疗效的同时, 也会对机体产生伤害。本实验结合体外培养与现代药物分析手段, 将胆矾水煎液中各元素与癌症细胞抑制率指标进行灰色关联, 从中筛选出评分最高

作者简介: 王鹤辰, 男, 硕士生 Tel: 18704047612 E-mail: 77276368@qq.com
(0411)85890185 E-mail: mxsvvv@126.com

*通信作者: 孟宪生, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

的一种元素,笔者期待能在矿物药中找到一种或几种毒性相对较小^[4],又促进肿瘤细胞凋亡效果较好或者对细胞的凋亡有直接作用的元素,明确中医药治疗肿瘤顽疾的现代医学基础,并为化疗药物的发展提供一个新思路。

1 材料与仪器

1.1 主要仪器与试剂

NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO₂ 培养箱(德国 NUAIRE 公司); ICP-MS Aglient 7500a 型(美国 Agilent); HD2-BCN-1360B 型生物洁净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); SUNRISE 酶标仪(瑞士 TECAN 公司); DW-SGL388A 型超低温冰箱(海尔公司); AE31 型倒置相差显微镜(Motic 公司); C6 Accuri 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

硝酸(优级纯 GR)(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20160920);多元素混合标准溶液(国家标准物质研究中心,Fe、K、Ca、Na、Mg 浓度均为 1 mg·mL⁻¹,Ag、Al、As、Ba、Be、Cd、Co、Cr、Cu、Mn、Mo、Ni、Pb、Sb、Se、Tl、V、Zn、Th、U 浓度均为 0.01 mg·mL⁻¹);Hg 单元素标准溶液(100 μg·mL⁻¹,美国 Accustandard Inc.公司);调谐液(Li、Y、Ce、Ti、Co 质量浓度为 10 μg·L⁻¹,美国 Agilent);内标液(Li、Sc、Ge、Y、In、Tb、Bi 质量浓度为 10 μg·mL⁻¹,美国 Agilent);氩气[高纯氩气 φ(Ar)>99.99%];水为超纯水。

人肺癌 A549 细胞株(中国科学院上海细胞库);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,编号:00916);胎牛血清(四季青公司,编号:02427001826544209);双抗(北京全式金生物,编号:FG101-01L40523Y028);顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司,批号:20170311)。

1.2 药材

矿物药材胆矾来源于大连民大饮片有限公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定本品为胆矾。

2 方法

2.1 胆矾水煎液中无机元素含量的测定

2.1.1 供试品的制备 取胆矾 5 g,粉碎,过 120 目筛。置于圆底烧瓶中并加 100 mL 超纯水进行回流提取 1 h,抽滤。取水煎液 5 mL,用超纯水定容至 100 mL。

2.1.2 测定方法和结果 调节仪器参数,等离子体流量 15 L·min⁻¹,RF 功率 1.35 kW,载气流量 1.16 L·min⁻¹,采样深度 7.8 mm,雾室温度 2 ℃,

分析时间 30 s,平行测定 3 次。结果显示,铜元素的量占总元素量的比例最大。测定结果见表 1。

表 1 胆矾水煎液的各元素含量

Tab. 1 The elements valum of the water decoction of traditional chinese mineral drugs Danfan μg·mL⁻¹

Na	Mg	Al	K	Ca
990.47	168.83	1 029.33	123.67	890.93
V	Cr	Mn	Fe56	Fe57
3.86	69.58	2 168.67	3 035	294.37
Co	Ni	Cu63	Cu64	Zn
26.13	326.97	4 586 000	17 700	20 076.67
As	Se	Ag	Cd	Sb
365.87	16.11	19.81	2 371.33	23.26
Ba	Tl	Pb	U	
20.38	7.61	594.43	3.99	

2.2 胆矾体外药效学研究

将人肺癌 A549 细胞株按常规贴壁细胞培养法接种于培养基中,在温度、湿度、CO₂ 浓度适宜的条件下常规培养。长满后用移酶消下,铺入 96 孔板中。分别取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 定容好的胆矾水煎液与 3 mL 体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM 培养液混合,铺入 96 孔板。培养 48 h 后,加入 MTT 染料,继续培养 4 h 后,加入 DMSO,使用酶标仪测定吸光度值。结果显示,随着给药量的增加,抑制率逐渐上升,结果见表 2。

表 2 胆矾水煎液的体外抑制率

Tab. 2 The *in vitro* inhibition ratio of the water decoction of traditional Chinese mineral drugs Danfan

药量/mL	平均 OD 值	$\bar{x} \pm s$	抑制率/%
0(空白)	1.426 2	1.426 2±0.136 3	0
0.1	1.339 1	1.339 1±0.169 1	6.10
0.2	0.561 8	0.561 8±0.054 0	60.60
0.3	0.309 9	0.309 9±0.044 3	78.26
0.4	0.132 4	0.132 4±0.010 7	90.71
0.5	0.092 9	0.092 9±0.007 4	93.48

2.2.1 各个元素与抑制率的相关性分析 胆矾水煎液由不同种类的元素组成,本试验使用 GreyModeling V3.0 软件将胆矾中各种元素的含量与胆矾水煎液对于肿瘤细胞的抑制率进行灰色关联度分析,将胆矾水煎液中元素组成以及抑制率导入 GreyModeling V3.0 软件中,结果见表 3。结果显示,铜元素与抑制率的关联系数最大,即胆矾水煎液中的铜元素对于 A549 细胞体外抑制率有直接影响。

表 3 GreyModeling V3.0 软件测得的关联系数值
Tab. 3 The result of correlation coefficient by GreyModeling V3.0 software

Na	Mg	Al	K	Ca
0.504 0	0.513 5	0.506 1	0.527 9	0.500 7
V	Cr	Mn	Fe56	Fe57
0.501 0	0.501 2	0.519 6	0.502 9	0.501 8
Co	Ni	Cu63	Cu64	Zn
0.504 2	0.502 7	0.868 9	0.641 8	0.507 9
As	Se	Ag	Cd	Sb
0.502 4	0.501 3	0.540 5	0.500 7	0.501 0
Ba	Tl	Pb	U	
0.501 6	0.528 6	0.500 7	0.5015	

2.2.2 细胞凋亡的检测 取浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对数生长期细胞悬液 1 mL 接种于 6 孔培养板中培养, 待细胞长至 80% 时, 分别加入空白、顺铂、胆矾水煎液培养液, 顺铂浓度为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胆矾水煎液浓度为 $0.05 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 相应培养液收集细胞于离心管中, 备用。2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃上清, 预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次, 重悬细胞, 过 300

目细胞筛, 离心, 弃去上清, 加入 Binding Buffer 500 μL 重悬细胞, 分别加入 5 μL Annexin V 及 5 μL Propidium Iodide, 混合均匀, 室温下避光反应 15 min 后, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

3 组实验的细胞数量显示, 胆矾组的凋亡坏死率比空白组有所增加, 结果见图 1。

2.2.3 细胞周期的检测 同上文细胞培养的步骤一致, 将细胞接种于 6 孔板中培养。依次加入空白、顺铂、胆矾培养液, 培养 48 h 后, 胰蛋白酶消化后分别收集细胞悬液于标号的离心管中。离心弃上清, 使用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次, 再次离心, 弃上清, 向沉淀中加入 1 mL 预冷的 70 % 乙醇并轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。次日以 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转离心 5 min, 并在预冷的 PBS 溶液中洗涤 2 次, 过 300 目细胞筛, 离心, 弃去上清液。向每个细胞样品中加入配好的碘化丙啶染色液 500 μL , 轻揉吹打使细胞重悬, 加入预冷的 PBS 缓冲液 500 μL , 避光冰浴 30 min。使用流式细胞仪在激发波长 488 nm 下进行检测。

3 组实验的细胞周期结果显示, 胆矾组细胞 S 期比空白组显著增加, 结果见图 2。

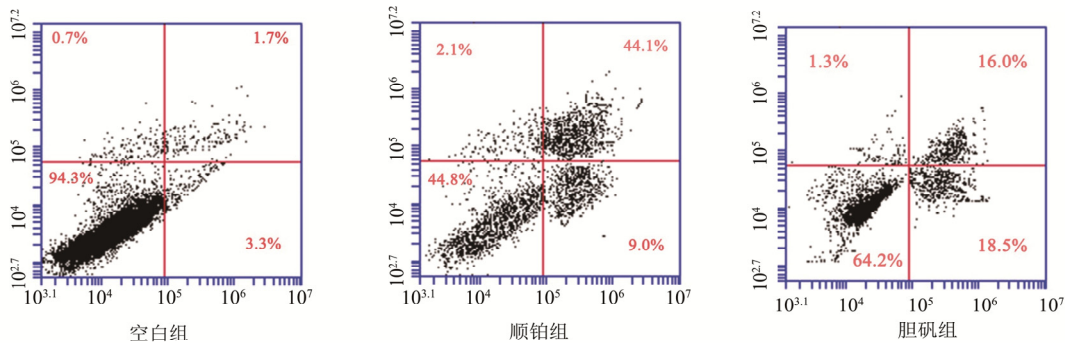


图 1 细胞凋亡试验结果
Fig. 1 The experimental results of apoptosis

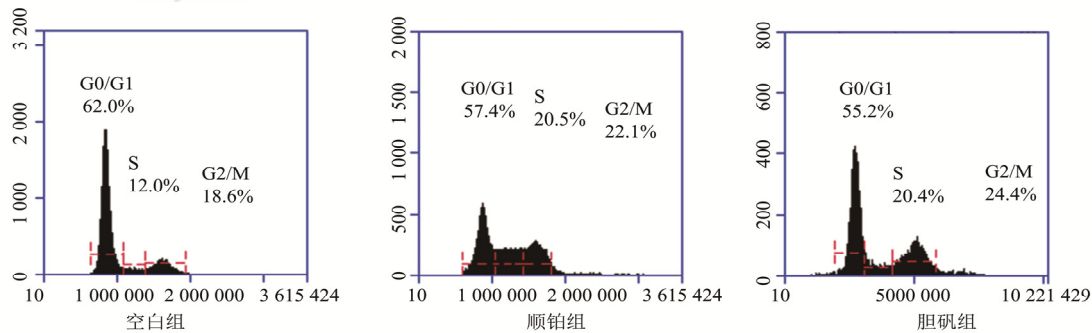


图 2 细胞周期试验结果
Fig. 2 The experimental results of cell cycle

3 讨论与结论

传统中医典籍中对矿物药的记载非常丰富,我国传统矿物药种类繁多,仅在《本草纲目》一书中就记载了 80 余种。其中胆矾被归为上品,本经中关于胆矾治疗疮毒、息肉、肿毒不破均有记载。本实验通过对胆矾水煎液的无机元素进行分析,确定了元素的组成,铜元素占测得元素组成的绝大多数。后又进行了胆矾水煎液的体外药效学研究,MTT 法测得不同药量的胆矾水煎液对肺癌 A549 细胞的抑制作用分别为 6.1%, 60.60%, 78.26%, 90.71%, 93.48%; 通过灰色关联软件进行分析,结果显示铜元素与肿瘤细胞的抑制率关联系数为 0.868 9,即铜元素与抑制率关系最大。该实验结果为有效利用矿物药胆矾作为潜在的抗肿瘤药用资源提供了一定的前期实验基础。

流式细胞仪检测结果显示:各组作用 48 h 后,胆矾组与空白组相比,细胞的凋亡坏死率随着增大。肿瘤细胞的分裂过程分为几个时相,包括 G0/G1 期、S 期、G2/M 期, G0/G1 期。G0/G1 期细胞增大并且制造新的蛋白质为细胞分裂做准备; S 期细胞复制 DNA,细胞有二倍体变成四倍体的过程; G2 期的细胞处于分裂前期, M 期细胞进行有丝分裂。随着给药剂量的增大,不同的时相所占的比例也发生了改变。与空白组相比,给药组 S 期的比例增多较显著。可以得出结论:胆矾水煎液能通过抑制 S 期,阻断细胞由 S 期向 G2/M 期转化,增加 S 期细胞比例,从而抑制肺癌细胞的增殖及其 DNA 的合成。

中药治疗癌症相对海外放疗、化疗实践起步较晚,积累的经验相对较少。天然药物中成分复杂,目前针对黄酮、皂苷、生物碱等复杂的复合化合物的活性筛选手段有一定的提高,分析方法不断丰富,但和社会对维护人民健康药物的需求还有一定差距。客观地决定了目前中草药中有抗肿瘤活性的药物种类较少。其中被开发成为成药的品种更是屈指可数。而矿物药相比于天然药物,组成成分较简单,即由不同种类的无机元素构成,

通过 ICP-MS 即可进行定量分析^[5-6]。其数据结果比传统的天然药物指纹图谱直观,简洁明了^[7],而微量元素在人体内与细胞位点、蛋白的特异性结合、在跨膜运输和引导细胞各种功能方面均起到重要的作用^[8-9]。中药中的微量元素更是其发挥药效的重要物质基础^[10]。如能在癌细胞的特异性位点的相关研究上有所突破,相信矿物药在治疗癌症方面将起到更重要的作用^[11]。

REFERENCES

- [1] WANG H X, HAN X, LUO J Y, et al. Activity and toxicity of realgar and its historical preparations [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2017, 15(4): 467-471.
- [2] 王春丽, 王炎焱, 韩伟, 等. 常用矿物药及其类方药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1343-1345.
- [3] LU W B, ZENG Y E. A summary of research and development of mineral Chinese drug [J]. Guangdong Weiliang Yuansu Kexue(广东微量元素科学), 2001, 8(6): 17-20.
- [4] FAN L B, MENG X S, ZHAO J, et al. Study on primary speciation of mineral elements in ophicalcicum [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(14): 35-37.
- [5] QIAO T T, LIU S J, LIN R C, et al. Differences of inorganic elements between alumen and its counterfeit ammonium alum based on ICP-OES/MS technique [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2016, 39(11): 2462-2468.
- [6] XU J, LIU Z F, WANG Y, et al. Determination of inorganic elements in *Ganoderma lucidum* ganoderma lucidum spore powder with different treatments of wall-broken methods by microwave digestion-ICP-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(7): 813-817.
- [7] 常馨, 包永睿, 孟宪生, 等. ICP-MS 法分析不同批次气滞胃痛颗粒中无机元素的差异[J]. 中成药, 2016, 38(4): 950-954.
- [8] BAO Y R, MENG X S, YANG X X, et al. Analysis of trace elements in medicine to restore vital energy [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2009, 11(6): 220-222.
- [9] 梁永红. 微量元素锌铜铁与心血管病的研究[J]. 广东微量元素科学, 1997(11): 5-8.
- [10] 黄坚, 倪静斌. 中药微量元素锌、铜、铁、锰的研究[J]. 广东微量元素科学, 1997(9): 13-17.
- [11] GE B L, XU X, CHEN X R. The development of copper(II) complexes matter anticancer activity [J]. China Med Pharm(中国医药科学), 2013(16): 30-32.

收稿日期: 2017-05-12

(本文责编: 李艳芳)