

## · 研究简报 ·

## 藤苦参素的体外抗肿瘤活性及其对癌细胞凋亡的作用

栾连军, 王叶飞, 张琳, 吴永江\*

(浙江大学 现代中药研究所, 浙江 杭州 310058)

关键词: 藤苦参; 藤苦参素; 人前列腺癌; PC-3 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)01 - 0104 - 04

Effect of griffithin on anticancer activity and apoptosis of cancer cells *in vitro*

LUAN Lian-jun, WANG Ye-fei, ZHANG Lin, WU Yong-jiang\*

(Institute of Modern Chinese Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** To study the anticancer activity of griffithin from *Streptocaulon griffithii* Hook. f. and its effect on apoptosis of cancer cells *in vitro*, the inhibitory effect of griffithin on cell proliferation was studied by MTT assay, the cell apoptosis was observed by AO/EB double decoration assay and flow cytometry. Griffithin exhibited high anticancer activity on four human cancer cell lines, with  $IC_{50}$  ranged from 0.17 - 0.43  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Griffithin also induced apoptosis of PC-3 cells. Griffithin had anticancer activity and induced apoptosis of cancer cells.

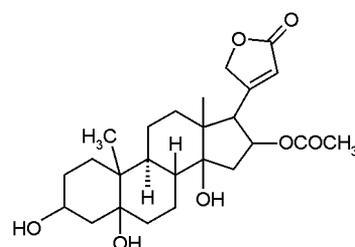
**Key words:** *Streptocaulon griffithii*; griffithin; human androgen-independent prostate tumor; PC-3 cell; apoptosis

藤苦参 (*Streptocaulon griffithii* Hook. f.) 系萝藦科 (Asclepiadaceae) 马连鞍属 (*Streptocaulon* Wight et Am.) 植物马连鞍的干燥根, 又名古羊藤、南苦参、有毛老鸦嘴、虎阴藤、红藤、地苦参、小暗消、哈骂醒合 (傣语)、哈骂不果 (哈语) 等, 产于我国广西、贵州、云南等地<sup>[1]</sup>。藤苦参为傣药经方雅叫哈顿散中的主治药之一, 雅叫哈顿散已被中国药典 2005 版 (一部) 记载。张琳等<sup>[2]</sup>研究了藤苦参的化学成分, 未见有关藤苦参药理作用的研究报道。文献资料表明, 藤苦参的同属植物多具有抗肿瘤作用<sup>[3-5]</sup>。本实验对从藤苦参中分离得到的藤苦参素的体外抗肿瘤活性及其对癌细胞凋亡的作用进行研究。

## 材料和方法

**细胞系** HL-60 人白血病细胞、PC-3 人前列腺癌细胞、Bel-7402 人肝癌细胞及 Eca-109 人食道癌细胞均购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

**药物及试剂** 藤苦参素 (griffithin), 结构见图 1, 由本实验室分离纯化得到, 纯度 98% 以上, 溶于少量二甲基亚砜 (DMSO), 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RPMI 1640 为 Gibco 公司产品; 新生牛血清为杭州四季青



**Figure 1** Chemical structure of griffithin (16-O-acetyl-3 $\beta$ , 5 $\beta$ , 14 $\beta$ -trihydroxy-card-20(22)-enolide)

收稿日期: 2006-04-24.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 571 - 88208455, Fax: 86 - 571 - 88208457, E-mail: yjwu@zju.edu.cn

生物工程材料有限公司产品; MTT为 Amesco分装产品; DMSO为 Sigma公司产品。

肿瘤细胞离体培养<sup>[6]</sup> 人肿瘤细胞以含 10% 新生牛血清的 RPMI1640(含青霉素 100 μg· mL<sup>-1</sup> 和链霉素 100 μg· mL<sup>-1</sup>) 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育, 取对数生长期的细胞进行实验。

肿瘤细胞的体外抑制作用<sup>[7]</sup> 取对数生长期的细胞, 以细胞数 2 × 10<sup>4</sup> · mL<sup>-1</sup> 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL。细胞培养过夜后加入药液, 试验组分别加入不同浓度的藤苦参素, 对照组加入 0.1% DMSO, 每组重复 4 孔, 继续培养 72 h, 实验终止前 4 h, 加入终质量浓度为 25 μg· mL<sup>-1</sup> 的 MTT, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 中培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 DMSO 100 μL/孔, 用酶联免疫仪于 570 nm 处测定吸收度 (A) 值, 所得数据计算 IC<sub>50</sub>。细胞生长抑制率 = (1 - 试验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%。实验重复 3 次。

细胞荧光染色观察凋亡细胞<sup>[8]</sup> 取 PC-3 人前列腺癌细胞, 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 细胞数 3 × 10<sup>4</sup> · mL<sup>-1</sup>, 培养 24 h 后加入不同浓度的藤苦参素 (终质量浓度为 0.05, 0.2 和 0.8 μg· mL<sup>-1</sup>), 另设对照组 (加入等体积的 DMSO)。分别在此后 24, 48 及 72 h 取对照组和试验组, 加入荧光染色液 (吖啶橙 AO: 溴乙啶 EB = 1:1, 100 μg· mL<sup>-1</sup>) 100 μL, 染色 1 min, 弃上清液, 在荧光显微镜下观察拍照。

流式细胞仪 (FCM) 检测<sup>[9]</sup> 分别收集溶剂对照组和经不同浓度藤苦参素 (0.05, 0.2 和 0.8 μg· mL<sup>-1</sup>) 处理 72 h 的 PC-3 人前列腺癌细胞, 用 1 × PBS 清洗 2 遍, 用 70% 乙醇在 -20 °C 条件下固定保存, 加入 RNase (5 μg· mL<sup>-1</sup>), 37 °C 处理 1 h, 用碘化丙啶 (PI) 对样本荧光染色, 流式细胞仪定量检测凋亡细胞百分率和细胞周期变化。

数据统计 用 GWBASIC 软件计算 IC<sub>50</sub>; 数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结果

### 1 藤苦参素体外细胞抑制作用

不同浓度的藤苦参素作用于人肿瘤细胞 72 h 后, 随着浓度增加, 细胞存活率显著下降, 对肿瘤细胞生长抑制率显著上升 (图 2); 对各类肿瘤细胞的半数细胞抑制量 (IC<sub>50</sub> 值) 见表 1。

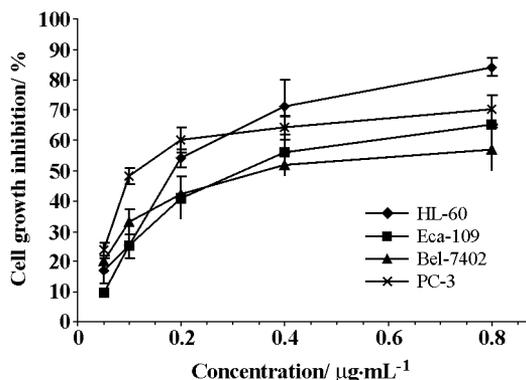


Figure 2 Dose-dependent inhibitory effect of griffithin on viability of tumor cell lines

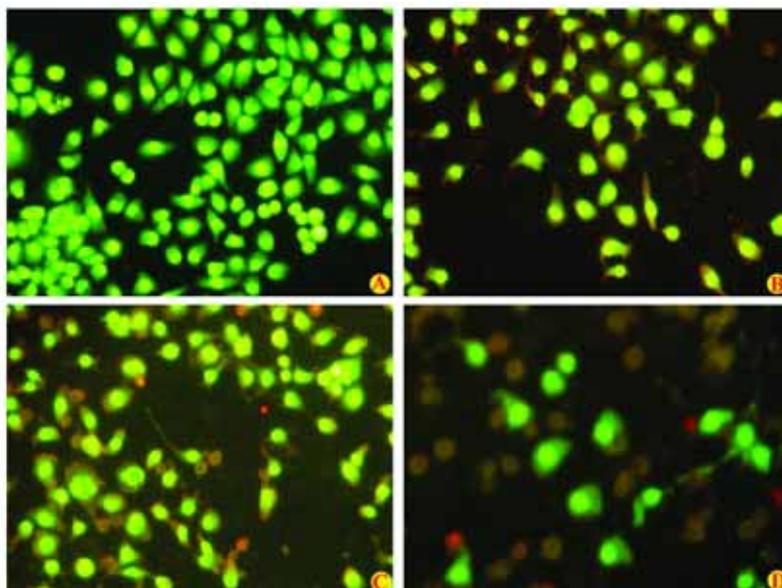
### 2 藤苦参素对 PC-3 细胞凋亡的影响

AO/EB 双染法在荧光显微镜下观察到, 随着藤苦参素浓度增加, 细胞增殖明显受到抑制, 具有明显的浓度依赖性。0.2 μg· mL<sup>-1</sup> 藤苦参素作用 24 h 后, 即可见早期凋亡细胞, 表现为细胞形状不规则, 细胞核为 AO 染色呈黄绿色荧光, 并出现细胞核固缩和凋亡小体。随着作用浓度和时间的增加, 凋亡现象更为明显, 细胞质呈橘红色, 固缩, 而晚期凋亡细胞为致密浓染或碎片状, 黄色, 细胞质空泡化 (图 3, 图 4)。

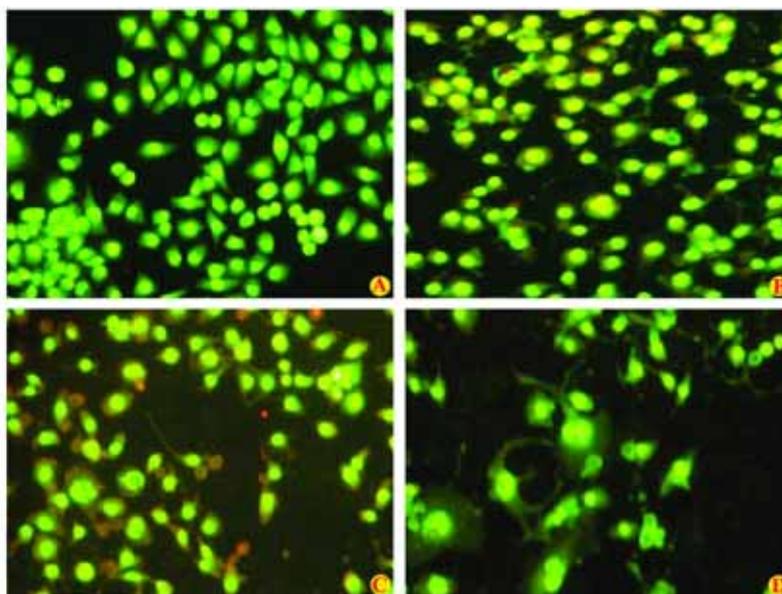
藤苦参素处理组和对照组相比, 随着藤苦参素浓度的增加, G<sub>1</sub> 峰左侧出现明显的亚二倍体峰 (凋亡峰), 见图 5。从表 2 中可看出, 细胞凋亡率逐渐升高。0.05 μg· mL<sup>-1</sup> 藤苦参素作用下, 凋亡率为 1.17%; 0.2 μg· mL<sup>-1</sup> 藤苦参素作用下凋亡率上升

Table 1 IC<sub>50</sub> of griffithin in tumor cell lines (n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

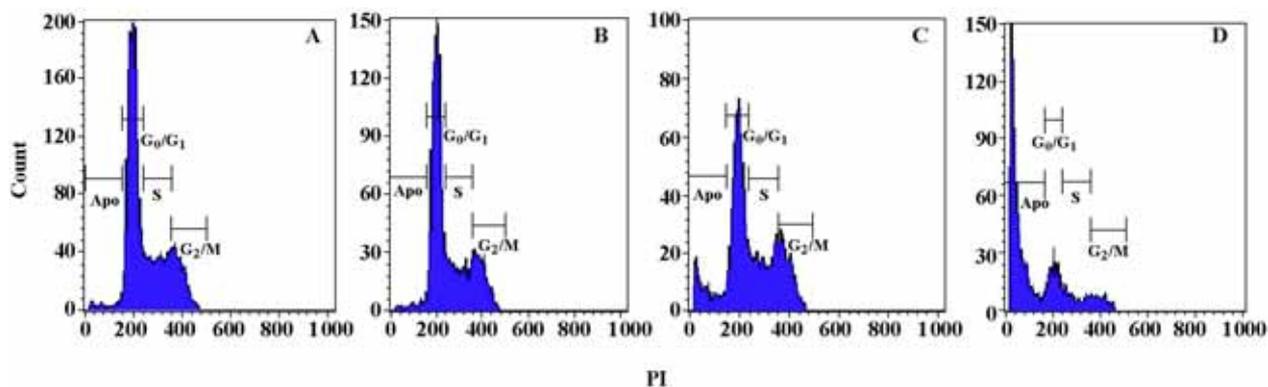
Concentration / μg· mL <sup>-1</sup>	Inhibition rate / %			
	HL-60	Eca-109	Bel-7402	PC-3
0.05	17 ± 4	9.7 ± 1.0	20.2 ± 1.9	23.7 ± 2.6
0.1	25 ± 4	25 ± 4	33 ± 4	48.0 ± 2.8
0.2	54 ± 3	41 ± 7	42 ± 6	60 ± 4
0.4	71 ± 9	56 ± 5	52 ± 4	64 ± 4
0.8	84 ± 3	65 ± 6	57 ± 7	70 ± 5
IC <sub>50</sub> / μg· mL <sup>-1</sup>	0.199 ± 0.013	0.36 ± 0.06	0.43 ± 0.16	0.171 ± 0.028



**Figure 3** Fluorescence micrographs of PC-3 cells treated with griffithin for 48 h. A: Control; B:  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin; C:  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin; D:  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin



**Figure 4** Fluorescence micrographs of PC-3 cells treated with  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin for 24, 48 and 72 h, respectively. A: Control (without griffithin, 48 h); B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h



**Figure 5** Apoptosis rate of PC-3 cells analyzed by flow cytometry (FCM). PC-3 cells treated with griffithin for 72 h. A: Control; B:  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin; C:  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin; D:  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  griffithin

**Table 2** Effect of griffithin on the apoptosis and cell cycle of PC-3 cells

Concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Cell cycle /%			
	Apoptosis	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	1.23	62.65	23.37	12.79
0.05	1.17	64.09	20.40	13.96
0.2	8.77	49.86	27.38	16.40
0.8	71.66	16.10	7.70	4.33

至 8.77%;在 0.8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,凋亡率高达 71.66%。随着浓度增加,凋亡率明显升高。

### 讨论

藤苦参素对人的 4 种肿瘤细胞株的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )为 0.17 ~ 0.43  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,体外细胞生长抑制率呈明显剂量依赖性。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡 (programmed cell death),是细胞受到生理或某些病理信号刺激后,通过启动自身机制而发生的细胞死亡过程。许多抗肿瘤药物都能诱导肿瘤细胞凋亡,而形态学特征分析是鉴定细胞凋亡的最基本方法。本文采用 AO/EB 双染法,在荧光显微镜下观察加药组和对照组的 PC-3 细胞形态,发现藤苦参素 (0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )作用后,出现明显的早期细胞凋亡现象,随着浓度和作用时间的增加,凋亡现象更为明显。通过 FACS 对细胞周期进行分析,发现随着藤苦参素浓度的增加,PC-3 细胞凋亡率明显增加。

本研究发现藤苦参所含强心苷类成分如藤苦参素在体外可诱导肿瘤细胞凋亡,具有较好的抗肿瘤活性。藤苦参素的抗肿瘤作用有待整体动物试验证实,其诱导肿瘤细胞凋亡作用亦有待进一步研究。

### References

- [ 1 ] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [ M ]. Tomus 63. Beijing: Science Press, 1977.
- [ 2 ] Zhang L, Xu LZ, Yang SL. Chemical constituents in *Streptocaulon griffithii* Hook. f. ( I ) [ J ]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 669 - 671.
- [ 3 ] Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, et al. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants [ J ]. Biol Pharm Bull, 2002: 753 - 760.
- [ 4 ] Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, et al. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Streptocaulon juventas* and their antiproliferative activity against the Human HT-1080 fibrosarcoma cell line [ J ]. J Nat Prod, 2003, 66: 1427 - 1433.
- [ 5 ] Ueda JY, Tezuka Y, Banskota AH, et al. Antiproliferative activity of cardenolides isolated from *Streptocaulon juventas* [ J ]. Biol Pharm Bull, 2003, 26: 1431 - 1435.
- [ 6 ] Ray S, Almasan A. Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11 [ J ]. Cancer Res, 2003, 63: 4713 - 4723.
- [ 7 ] Li LH, Fraser TJ, Olin EJ, et al. Action of camptothecin on mammalian cells in culture [ J ]. Cancer Res, 1972, 32: 2643 - 2650.
- [ 8 ] Li G, Shan BE, Chen J, et al. Effects of spider *Macrothele mexen* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells [ J ]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26: 369 - 376.
- [ 9 ] Sappal DS, McClendon AK, Fleming JA, et al. Biological characterization of MLN944: a potent DNA binding agent [ J ]. Mol Cancer Ther, 2004, 3: 47 - 58.