

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.012

曹威,李娟,程伟,等. 铁筷子提取物对肿瘤细胞增殖及 COX-2 mRNA 表达的抑制作用[J]. 广西植物,2014,34(2):189–193

Cao W, Li J, Cheng W, et al. Inhibitory effect of *Helleborus thibetanus* extracts on the proliferation of tumor cells and expression of COX-2 mRNA[J].*Guihaia*, 2014, 34(2):189–193

铁筷子提取物对肿瘤细胞增殖及 COX-2 mRNA 表达的抑制作用

曹 威¹, 李 娟^{2,3}, 程 伟³, 江仁望^{1,2*}

(1. 暨南大学 药学院 中药及天然药物研究所, 广州 510632; 2. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 3. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065)

摘 要: 研究不同铁筷子提取物对肿瘤细胞增殖及 COX-2 mRNA 表达的抑制作用。以铁筷子醇总提取物(TKZ1)、正丁醇萃取部位(TKZ2)、乙酸乙酯萃取部位(TKZ3)分别作用于 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 等肿瘤细胞,应用噻唑蓝实验(MTT 法)计算其对细胞增殖的抑制作用,应用荧光定量 PCR 技术检测 TKZ1、TKZ2、TKZ3 处理后的各肿瘤细胞中 COX-2 mRNA 的表达情况。结果表明:TKZ1、TKZ2、TKZ3 均能显著抑制多种肿瘤细胞的增殖,与阴性对照组比较,其可以在 mRNA 水平上抑制 COX-2 的表达,且呈明显的量效关系。说明铁筷子提取物对体外肿瘤细胞的增殖具有显著的抑制作用,其抗癌机制可能与抑制肿瘤细胞中 COX-2 mRNA 的表达有关。

关键词: 铁筷子; 抗肿瘤; 细胞增殖; COX-2

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0189-05

Inhibitory effect of *Helleborus thibetanus* extracts on the proliferation of tumor cells and expression of COX-2 mRNA

CAO Wei¹, LI Juan^{2,3}, CHENG Wei³, JIANG Ren-Wang^{1,2*}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China; 3. College of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effect of extracts from *Helleborus thibetanus* on cell proliferation and expression of COX-2 mRNA, the inhibitory effects of the total ethanol extract (TKZ1), *n*-butanol fraction (TKZ2), and ethyl acetate fraction (TKZ3) on DU145, PC3, HeLa, HT-29 and HepG2 tumor cell lines were examined by MTT assay, and the COX-2 mRNA expression levels were analyzed by quantitative PCR. The results showed that TKZ1, TKZ2 and TKZ3 could significantly inhibit the proliferation of tumor cell lines and suppress the expression of COX-2 on the mRNA level in a dose-dependent manner compared with the control. All three samples from *Helleborus thibetanus* (TKZ) could significantly inhibit the proliferation of tumor cells in vitro, and the mechanism might be related

收稿日期: 2013-11-26 **修回日期:** 2014-02-26

基金项目: 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金(ZRJ2013-4); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金(FPRU2013-4); 广东省高层次人才项目(JN2010)。

作者简介: 曹威(1988-), 女, 湖北武汉人, 在读硕士, 从事中药与天然药物抗肿瘤活性研究, (E-mail)ttkx6jycw@126.com。

通讯作者: 江仁望, 教授, 从事中药与天然药物活性成分研究, (E-mail)trwjjiang@jnu.edu.cn。

to the inhibition of the COX-2 mRNA expression in tumor cells.

Key words: *Helleborus thibetanus*; antitumor; cell proliferation; COX-2

铁筷子(*Helleborus thibetanus*)又名黑毛七、小桃儿七、九龙丹等,为毛茛科铁筷子属多年生草本植物,主要分布于湖北西北部、陕西南部、甘肃南部和四川西北部等,药用其根及根茎,其性凉味苦、具有清热解毒、消肿止痛、活血散瘀等功效,主治膀胱炎、尿道炎、跌打损伤及疮疖肿毒等症(彭强,1991)。铁筷子中的噁根草甙元在体外对人体上皮癌 KB 细胞有抑制效应(郭晓庄,1992);铁筷子水提取物对人胃癌细胞及人白血病 K562 细胞的集落形成均有明显抑制作用(杨永健等,2001);铁筷子多糖可以抑制体内、体外肿瘤细胞生长,促进细胞凋亡(刘维英等,2005),将细胞周期阻滞在 G0-G1 期(张勇等,2004),改善动物免疫机能(刘昕等,2000;王振军等,2008),影响腹水瘤细胞膜的磷脂、胆固醇成分含量变化而降低细胞膜的流动性(刘维英等,2004)。

为系统研究铁筷子的抗肿瘤活性成分,本研究制备铁筷子醇总提物,经过萃取,获得正丁醇及乙酸乙酯萃取部位。综合分析了三种提取物对五种肿瘤细胞(DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2)增殖的抑制活性,并研究其可能的作用机制,为下一步活性成分的提取和分离提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人前列腺癌细胞株 DU145、PC3,人宫颈癌细胞株 HeLa、人结肠癌细胞株 HT-29、人肝癌细胞株 HepG2,购自中国典型培养物保藏中心。

噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide, MTT]、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;细胞总 RNA 提取试剂盒、逆转录和实时定量 PCR 试剂盒、青霉素、链霉素购自 Invitrogen 公司,cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,培养瓶和培养板购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞株用含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂培养箱中培养,2~3 d 换一次液,用 0.25%

胰蛋白酶消化传代。并在 Olympus 显微镜下观察加药前后细胞形态学变化。

1.2.2 铁筷子提取物的制备 药材铁筷子购自陕西省宝鸡市太白县,经暨南大学药学院周光雄教授鉴定为毛茛科铁筷子属铁筷子的根。干燥的根分别用 95%和 60%的乙醇提取 2 次,回收溶剂得到总浸膏(TKZ1),然后将醇提物总浸膏混悬于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取分别得到石油醚提取物(极少)、乙酸乙酯萃取物(TKZ3)和正丁醇萃取物(TKZ2)。取 TKZ1、TKZ2、和 TKZ3 适量,用 DMSO 溶解,4℃保存备用。使用前,用细胞培养液稀释到需要浓度。

1.2.3 MTT 实验 取对数生长期的肿瘤细胞,制成 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个·mL⁻¹单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,每组设 3 个平行孔,37℃、5% CO₂培养箱培养,培养 24 h 后分别加入铁筷子提取物 TKZ1、TKZ2、TKZ3,使终浓度为 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 μg·mL⁻¹。另设阴性对照组,继续培养 72 h。实验终止前 4 h,每孔加入浓度为 1 mg·mL⁻¹的 MTT 50 μL,4~6 h 后,弃去培养液,加 DMSO 100 μL/孔,震荡 5 min,待结晶溶解后用酶标仪于 570 nm 波长测定 OD 值。按以下公式计算肿瘤细胞抑制率:抑制率(Inhibitory rate, IR%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%,用 SPSS 18.0,计算抑制 50%细胞生长的铁筷子提取物浓度,以 IC₅₀表示。

1.2.4 铁筷子提取物对肿瘤细胞 DU145 中 COX-2 的 mRNA 表达的影响 取对数生长期的前列腺癌细胞 DU145,制成浓度每皿为 10⁶个细胞的单细胞悬液,接种于细胞培养皿中,常规培养 24 h 后,加入铁筷子提取物使终浓度为 0.5 μg·mL⁻¹,培养 0、0.75、1.5、3、6、12、24 h。药物作用后,用 Trizol 裂解提取 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的完整性,用微量比色皿在紫外下检测 RNA 的浓度和纯度,并将各组总 RNA 浓度调整至同一水平。各组取等量 RNA 加入 2 μL oligo(dT)₁₅、2 μL 超纯 dNTP(2.5 mol·L⁻¹)和适量 RNase-free ddH₂O,70℃ 5 min,迅速放冰上冷却 2 min 后,再加入 4 μL 5×First-Strand Buffer(含 DTT)、0.5 μL RNasin、1 μL M-MLV,用枪轻轻混匀,于扩增仪上 42

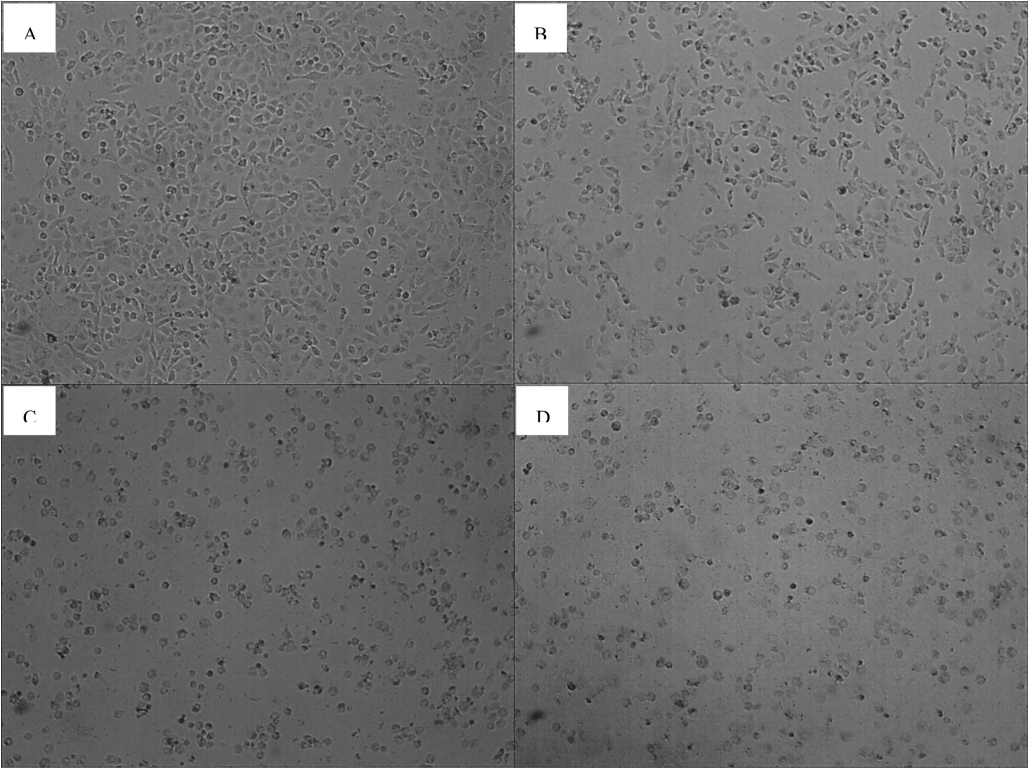


图 1 TKZ2 对 DU145 细胞增殖的影响 A:对照; B:低浓度(0.031 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C:中浓度(0.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); D:高浓度(0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。
Fig. 1 Effect of TKZ2 on the proliferation of DU145 cell A: Control; B: Low concentration(0.031 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C: Medium concentration(0.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); D: High concentration(0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

$^{\circ}\text{C}$ 50 min, 95°C 5 min, 得 cDNA。

完成逆转录后,进行聚合酶链反应。COX-2 的引物序列为上游 5'-ATGAGTGTGGGATTTGAC-CAG -3',下游 5'-TCAGCATTGTAAGTTGGTG-GAC-3',产物理论大小 261 bp。GAPDH 为内参基因,引物序列为上游 5'-AGAAGGCTGGGGCT-CATTTG-3',下游 5'-AGGGGCCATCCACAGTC TTC-3',产物理论大小为 258 bp。荧光定量 PCR (QPCR)反应条件为 95°C 预变性 15 min, 95°C 变性 10 s, 64°C 退火 20 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应体系为 20 μL 体系 (1 μL cDNA、1 μL Primer、7 μL ddH₂ O、10 μL Super Red PreMix Plus)。以上所有 PCR 反应均重复至少 3 次。用相对定量方法分析数据,即 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法,扩增效率为 90%~110%之间。 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}) - (\text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$ 。

1.3 统计学方法

采用统计分析软件 SPSS 18.0, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 几种铁筷子提取物对不同肿瘤细胞增殖的影响

TKZ1、TKZ2、TKZ3 对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 细胞的增殖均有明显的抑制作用,且各组与对照组相比,抑制率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),其对肿瘤细胞抑制率均具有浓度依赖性,如图 2,3,4 所示。铁筷子正丁醇提取物作用前列腺癌 DU145 细胞 48 h 后,于 Olympus 显微镜下观察加药后细胞形态的变化。可以观察到:最高浓度下,细胞体积缩小、变圆、贴壁率降低,且部分呈碎块状;中浓度下,细胞部分贴壁,大部分细胞皱缩变圆;低浓度下的细胞与对照组细胞相比,基本无明显变化,如图 1 所示。表 1 显示,铁筷子正丁醇提取物 TKZ2 对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 细胞的增殖抑制作用均普遍强于铁筷子醇总提物 TKZ1 和乙酸乙酯提取物 TKZ3,其中,TKZ2 对前列腺癌 DU145 细胞的抑制增殖作用要明显强于其它几种细胞株。

表 1 铁筷子提取物对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用 (IC₅₀:μg · mL⁻¹)

Table 1 Inhibitory effects of extracts from *Helleborus thibetanus* on the proliferation of various tumor cells

组别 Group	DU145	PC3	HeLa	HT-29	HepG2
TKZ1	0.049±0.003	0.172±0.004	0.229±0.016	0.360±0.005	0.113±0.004
TKZ2	0.036±0.003	0.102±0.008	0.098±0.002	0.220±0.013	0.077±0.008
TKZ3	0.053±0.004	0.136±0.023	0.187±0.001	0.237±0.016	0.187±0.001

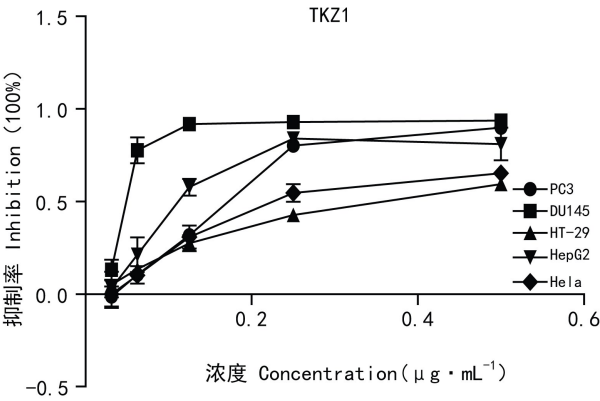


图 2 TKZ1 对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 细胞增殖的抑制作用
Fig.2 Inhibitory effect of TKZ1 on the proliferation of DU145,PC3,HeLa,HT-29 and HepG2 cells

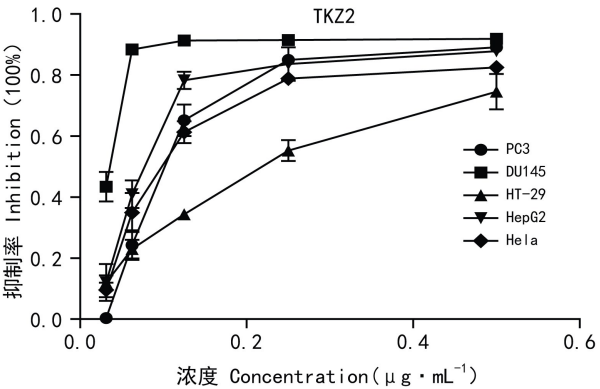


图 3 TKZ2 对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 细胞增殖的抑制作用
Fig. 3 Inhibitory effect of TKZ2 on the proliferation of DU145,PC3,HeLa,HT-29 and HepG2 cells

2.2 铁筷子提取物对肿瘤细胞 DU145 中 COX-2 mRNA 表达的影响

从铁筷子提取物对以上五种肿瘤细胞增殖的抑制情况来看,铁筷子提取物对前列腺癌细胞 DU145 的抑制效果最好,且 TKZ2 的活性最强。因此本文

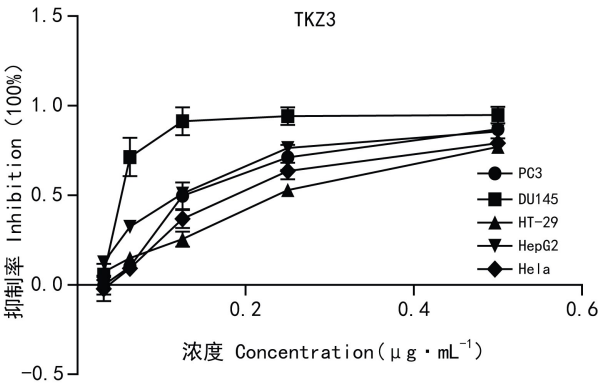


图 4 TKZ3 对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 细胞增殖的抑制作用
Fig.4 Inhibitory effect of TKZ3 on the proliferation of DU145,PC3,HeLa,HT-29 and HepG2 cells

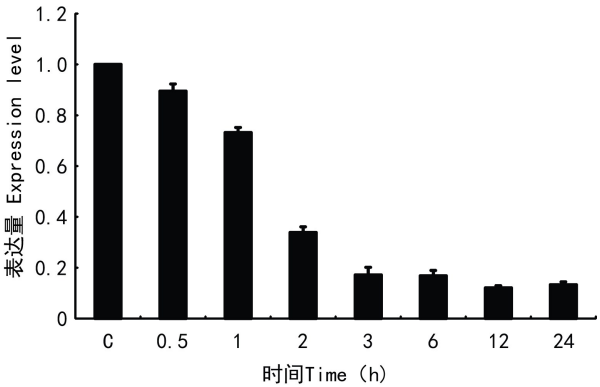


图 5 TKZ2 对 DU145 细胞 mRNA 表达的影响
Fig. 5 Effects of TKZ2 on the expression of mRNA in DU145 cells

重点讨论 TKZ2 对 DU145 细胞中 COX-2 mRNA 的表达情况。将 TKZ2 (0.5 μg · mL⁻¹) 作用于 DU145 细胞,于 0、0.5、1、2、3、6、12、24 h 分别检测 mRNA 的表达情况。结果表明,作用 30 min 时 COX-2 mRNA 的表达量开始减少,到 2 h 时表达量减小到一半及以下,3、6、12 和 24 h 的 COX-2 mRNA 表达量逐渐减小到对照组的 20% 及以下,显示持续抑制作用。可见,TKZ2 抑制 DU145 细胞中 COX-2 mRNA 表达呈明显的时间依赖关系(图 5)。

3 结论与讨论

本研究采用铁筷子的醇总提物、正丁醇提物和乙酸乙酯提物,对 5 种不同肿瘤细胞株进行体外增殖抑制试验,结果显示铁筷子提取物对各种肿瘤细胞

株均具有明显的抑制作用,且呈浓度依赖性。其中,正丁醇提物的抑制作用强于总提物和乙酸乙酯提物,可能与正丁醇萃取物中含有大量的多糖及强心苷类等化学成分有关系。铁筷子多糖可以明显抑制小鼠体内 S180 细胞生长、多种白血病细胞株,如 K562、L1210 和 HL-60 等细胞生长和细胞克隆生成(王振军等,2004;刘昕等,2001)。

COX-2 在肿瘤的发生、发展和转移中扮演着非常重要的角色,其水平的增加可能是肿瘤发生的一个早期事件,而且包括直肠、乳腺、前列腺等多种癌组织都有不同程度的 COX-2 过表达,COX-2 在低分化的肿瘤转移灶中表达率较高(宋轶鹏等,2012)。免疫组化检测发现,COX-2 在前列腺癌细胞中表达显著,而在良性前列腺增生组织中表达很低。杨子红等(2012)的研究表明在肿瘤形成生长过程中,COX-2 可能通过影响癌基因或抑癌基因的表达而起到直接或间接的作用。邱建波(2003)等检测 COX-2 的水平有助于肿瘤的早期诊断,而抑制 COX-2 的表达有助于肿瘤的治疗。因此,检测 COX-2 的水平对肿瘤的治疗至关重要。本研究发现,铁筷子正丁醇萃取物对 DU145、PC3、HeLa、HT-29、HepG2 这五种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 0.036 ± 0.003 、 0.102 ± 0.008 、 0.098 ± 0.002 、 0.220 ± 0.013 、 $0.077 \pm 0.008 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其对前列腺癌 DU145 细胞的选择性最高。因此,我们选择采用 qPCR 技术检测 TKZ2 对人前列腺癌 DU145 细胞 COX-2 mRNA 的表达情况,结果显示,TKZ2 能够抑制 DU145 细胞中 COX-2 mRNA 的表达,并且随着时间的延长,DU145 细胞中 COX-2 mRNA 的表达降低,呈明显的时间依赖性,提示铁筷子提取物的抗肿瘤作用可能与 COX-2 信号通路有关。下一步,我们将继续分离并鉴定铁筷子提取物中的活性成分,并深入阐明其与 COX-2 信号通路的关系,从而为铁筷子的抗肿瘤作用提供理论依据。

参考文献:

- Guo XZ(郭晓庄). 1992. Big Dictionary of Toxic Chinese Medicine System(有毒中草药体系大辞典)[M]. Tianjing(天津): Translation of Science and Technology Publishing Company(科技翻译出版公司):435
- Liu WY(刘维英),Pan XB(潘兴斌),Liu X(刘昕). 2004. Effects on epicyte composition and proliferation capacity of ascites-S180

- by HFPS(铁筷子多糖对腹水型 S180 细胞膜成分及增殖能力的影响)[J]. *Pharm Clin Chin Mat Med*(中药药理与临床), **20**(6):13—14
- Liu WY(刘维英),Pan XB(潘兴斌),Liu X(刘昕). 2005. Effects on cell cycle and multiplication capacity of S180 cell by HFPS(铁筷子多糖对 S180 细胞周期及增殖能力的影响)[J]. *Pharm Clin Chin Mat Med*(中药药理与临床), **21**(4):29—31
- Liu X(刘昕),Yang LX(杨林西),Pan XB(潘兴斌),et al. 2001. Experiment investigation of inhibitory mechanism on growth of S180 in mice by Tiekuaizi polysaccharide(铁筷子多糖抑制小鼠体内 S180 生长作用及其机制的实验研究)[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), **18**(2):94—96
- Liu X(刘昕),Yang YJ(杨永健). 2000. Experiment investigation of effects on anti-tumor and immunomodulatory of HFPS(铁筷子多糖抗肿瘤及免疫调节作用的实验研究)[J]. *Trad Chin Drug Res & Clin Pharm*(中药新药与临床药理), **11**(4):213—215
- Peng Q(彭强). 1991. Pharmacognostic identification of *Helleborus thibetanus*(铁筷子的生药鉴定)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), **14**(3):20—22
- Qian HB(钱海兵),Pu JS(蒲金山),Wang L(王龙),et al. 2012. Research on the effects in naphtha of *Helleborus thibetanus* on anti-inflammatory reactions(苗药铁筷子挥发油抗炎作用研究)[B]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), **23**(8):1 961—1 962
- Qiu JB(邱建波),Long QC(龙启才). 2003. Research advances in cancer prevention and treatment with COX-2 selective inhibitors(COX-2 选择性抑制剂防治肿瘤的研究进展)[J]. *Chin J Oncol*(中国肿瘤), **12**(2):92—96
- Song YP(宋轶鹏),Li MH(李明焕). 2012. COX-2 and tumor development(COX-2 与肿瘤的发生发展)[J]. *Oncol Progr*(癌症进展), **10**(1):57—63
- Wang ZJ(王振军),Liu LW(刘立伟),Miao F(苗芳). 2004. Antineoplastic effect in morphology of by HFPS(铁筷子多糖抑制小鼠 S180 生长的形态学观察)[J]. *J Taishan Med Coll*(泰山医学院学报), **25**(5):431—432
- Wang ZJ(王振军),Liu LW(刘立伟),Yang XY(杨雷英). 2008. Inhibitory effects of immune regulation on growth of bearing sarcoma 180 in mice by HFPS(铁筷子多糖抑制小鼠 S180 肉瘤生长的免疫调节作用)[J]. *Chin West Sci Technol*(中国西部科技), **7**(20):48—49
- Yang YJ(杨永健),Liu X(刘昕),Pan XB(潘兴斌). 2001. Inhibiting effects on the growth of gastric cancer and leukemia K562 cells in vitro by *Helleborus thibetanus*(铁筷子对胃癌及白血病 K562 细胞体外生长的抑制效应)[J]. *Acta Chin Med Pharm*(中医医学报), **29**(6):50—51
- Yang ZH(杨子红),Shi HG(石会刚). 2012. Research on the relations between expression level of COX-2 and prognosis of prostatic carcinoma(环氧合酶-2 表达水平和前列腺癌进展相关关系的研究)[J]. *Chin Med Pharm*(中国医药科学), **2**(15):33—34
- Zhang Y(张勇),Wang JY(王晶宇),Liu X(刘昕). 2004. An experimental study on induced apoptosis of mice S180 cell by HFPS(铁筷子多糖诱导小鼠 S180 细胞凋亡的实验研究)[J]. *Pharm Clin Chin Mat Med*(中药药理与临床), **20**(3):12—14