

蓖麻根提取物对 HepG2、NCI-H460 和 SGC-7901 细胞增殖及凋亡作用的影响

唐祖年, 韦京辰

(桂林医学院 药理教研室, 广西 桂林 541004)

摘要: 探讨蓖麻根不同提取物对肝癌 HepG2 细胞株、肺癌 NCI-H460 细胞株和胃癌 SGC-7901 细胞株增殖及其凋亡的影响。采用 MTT 法检测蓖麻根不同提取物处理 48h、72h 对 HepG2 细胞、NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的抑制率; Hoechst 33258 荧光染料染色法观察 HepG2 细胞凋亡, 流式细胞术检测 HepG2 细胞周期。结果表明: 蓖麻根石油醚提取物对 HepG2 细胞、NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖有较强抑制作用, 48 h 的 IC_{50} 分别为 88.6、134.3、138.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 72 h 的 IC_{50} 分别为 65.6、133.3、136.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 乙酸乙酯提取物对 HepG2 细胞、NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖在 72h 有中等强度抑制作用, IC_{50} 分别为 90.2、138.5、188.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氯仿提取物对 NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖抑制作用弱, 对 HepG2 细胞增殖基本无抑制作用; Hoechst 33258 荧光染色显示石油醚提取物 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可使 HepG2 细胞出现凋亡细胞, 流式细胞术检测显示石油醚提取物 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可将 HepG2 细胞阻滞于 S 期(与对照组比较 $P < 0.05$)。

关键词: 蓖麻根提取物; MTT; 肿瘤细胞株; 细胞凋亡

中图分类号: R285.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)04-0564-05

Effects of *Ricinus communis* Root Extract on proliferation and Apoptosis of HepG2, NCI-H460 and SGC-7901 cell

TANG Zu-Nian, WEI Jing-Chen

(Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

Abstract: Effects of *Ricinus communis* root extracts on proliferation and apoptosis in human hepatoma cell lines HepG2, lung cancer cell lines NCI-H460 and gastric cancer cell lines SGC-7901 were investigated. Cell proliferation rate of different root extracts on HepG2 cells, NCI-H460 cells and SGC-7901 cells was determined by MTT assay. The apoptosis of HepG2 cells was observed by fluorescent dye staining with Hoechst 33258. HepG2 cell cycle was measured by flow cytometry. The results showed that petroleum ether extract of *R. communis* root had a strong inhibitory effect on proliferation of HepG2 cells, NCI-H460 cells and SGC-7901 cells, the IC_{50} respectively were 88.6, 134.3 and 138.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 48h, the IC_{50} were respectively 65.6, 133.3 and 136.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 72h. Ethyl acetate extract also had a moderate inhibitory effect on proliferation of HepG2 cells, NCI-H460 cells and SGC-7901 cells in 72 h, the IC_{50} respectively were 90.2, 138.5 and 188.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Chloroform extract had mild intensity to the proliferation of NCI-H460 cells and SGC-7901 cells in the 72 h, but chloroform extract had no inhibition to HepG2 cell proliferation. The Hoechst 33258 fluorescence dyeing demonstrated that petroleum ether extract (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could make the HepG2 cell appears apoptosis. Flow cytometry analysis showed that petroleum ether extract (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could

收稿日期: 2011-03-03 修回日期: 2011-05-27

基金项目: 广西教育厅科研基金(200710MSI3)[Supported by Education Department of Guangxi(200710MSI3)]

作者简介: 唐祖年(1952-),男,副教授,研究方向为中药药效学和毒理学研究,(E-mail)tangzunian@yahoo.com.cn.

arrest HepG2 cells in S phase(compared with control group, $P < 0.05$).

Key words: *Ricinus communis*; MTT; tumor cell; apoptosis

蓖麻(*Ricinus communis*)为大戟科植物,又名牛蓖子草、红蓖麻、勒菜、草麻。据《本草纲目》记载蓖麻子,气味甘、辛、平,有小毒。主治水瘕。以水研二十枚服之,吐恶沫,加至三十枚,三日一服,瘥则止。蓖麻叶,有毒,主治脚气不仁,蒸捣裹之,日二三易即消。《中药大辞典》记载蓖麻子主治:消肿拔毒,泻下通滞,治痈疽肿毒,瘰疬、喉痹,疥癬癬疮,水肿腹满,大便燥结;蓖麻根主治:镇静解痉,祛风散瘀,治破伤风,癫痫,风湿疼痛,跌打疼痛,瘰疬。现代医学研究证明蓖麻子含蓖麻碱(ricinine)、蓖麻毒蛋白(ricinin)及脂肪酶。其中蓖麻毒蛋白近年文献报道对小鼠艾氏腹水瘤细胞、L1210 白血病、B16 黑色素瘤、Lewis 肺癌、大肠癌、结肠癌等多种癌细胞有明显作用(Chakravartula & Guttaria, 2008; 邹立波, 2001)。抗癌机制是经受体介导的内吞方式进入细胞,在细胞内通过逆分泌途径转运至内质网,在胞浆内催化核糖体 60S 亚基失活,从而抑制蛋白质合成(邹立波等, 2005)。另有研究表明蓖麻子提取物(蓖麻油和蓖麻蛋白)对小鼠有明显的抗生育作用(秦小娜等, 2006)。目前研究仅限于蓖麻子,对蓖麻根的研究近年少有报道,为进一步了解蓖麻根的药理作用,本研究对蓖麻根用系统溶剂提取,MTT 法观察蓖麻根不同提取物对 3 种肿瘤细胞增殖的影响,荧光染色观察细胞凋亡,流式细胞检测细胞周期变化。

1 材料与方 法

1.1 材料

蓖麻根于 2010 年 9 月采自桂林市郊区,由桂林医学院药学院杜泽香副教授鉴定为蓖麻(*Ricinus communis*)。

1.2 仪器与试剂

倒置显微镜(XSB3/IA, 上海);二氧化碳培养箱(MCO3/15AC, 日本三洋公司);酶标仪 ELX-800; 96 孔细胞培养板(Gorning 美国);胰蛋白酶(Amresco 公司分装);新生牛血清(GIBCO 公司,批号 LOT71703680);培养基 DMEM (HIGH GLUCOSE, Hyclone 公司,批号 NVE0272);PBS(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 10032901);Hoechst 33258(南京凯基生物科技发展有限分司);

MTT(Amresco 公司分装);HepG2 细胞株、NCI-H460 细胞株和 SGC-7901 细胞株来源于武汉大学中国典型培养物保藏中心,并由本教研室自行传代培养。

1.3 样品处理

蓖麻根 2 kg,粉碎后置 5 000 mL 圆底烧瓶中加入 95%乙醇浸没,加热冷凝回流 1.5 h,抽滤,重复上述操作 3 次,合并滤液,用旋转蒸发仪浓缩。浓缩物加适量蒸馏水溶解,置锥形瓶中,分别加石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取 3 次,旋转蒸发仪浓缩,真空隔氧(加热 45 ℃)干燥置 4 ℃冰箱备用。实验前用无血清培养基配成 4 000、800、160 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物原液,并用 0.22 μm 微孔过滤器过滤,置 4 ℃冰箱备用。

1.4 MTT 法检测蓖麻根提取物对 HepG2、NCI-H460 和 SGC-7901 细胞增殖的影响

参照唐祖年等(2008)和李娟等(2008)的方法,将对数生长期的 HepG2、NCI-H460 和 SGC-7901 细胞接种于培养瓶,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养,待细胞融合约 80%时,进行传代培养。将对数生长期细胞稀释为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,180 $\mu\text{L}/$ 孔。细胞贴壁后,加入含有不同浓度的蓖麻根提取物样品 20 $\mu\text{L}/$ 孔(终浓度 400、80、16 和 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、不同浓度的阳性对照药 5-FU 20 $\mu\text{L}/$ 孔(终浓度 100、20、4 和 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和无血清培养基阴性对照,各浓度重复 3 孔。培养结束(48、72 h)前 4 h,加入 MTT(5 mg/mL)20 $\mu\text{L}/$ 孔,37 ℃培养 4 h。培养结束后,去上清液,加入 DMSO 150 $\mu\text{L}/$ 孔,于酶标仪 490 nm 测定吸光度值,并计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{实验孔 OD 值} / \text{对照孔 OD 值}) \times 100\%$ 。采用 Origin 9.0 软件进行数据统计分析,并计算 IC_{50} 。

1.5 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡

按尹俊凯等(2010)和鲍英等(2005)的方法,根据 MTT 实验结果,选择终浓度 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蓖麻根石油醚提取物作为后续实验药物浓度。将 HepG2 细胞接种于六孔板内过夜。当 50%~80%满时,加入蓖麻根石油醚提取物作用 48 h 后,吸尽培养液,加入 0.5 mL 的固定液(甲醇:冰醋酸为 3:1),固定 10 min。然后去固定液,用 PBS 冲洗 3 次,3 min/次,吸尽液体,加入 0.5 mL Hoechst 33258 染

色液(1 mg/mL),晃动数次,避光染色 10 min,用 PBS 冲洗 3 次,荧光显微镜下观察并摄影。

1.6 流式细胞仪分析细胞周期

参照方丽等(2009)和王秀莉等(2010)的方法,将 HepG2 细胞接种于六孔板,待细胞生长至 80% 融合时,对照组加入无血清培养基,实验组加入蓖麻根石油醚提取物(终浓度 30、60、120 $\mu\text{g/mL}$),作用

48 h 后,胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗涤后,70% 冰乙醇固定,-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。检测前 PBS 冲洗细胞 1 次,调整细胞浓度为 $10^6/\text{mL}$,加入含 RnaseA(终浓度为 0.25 mg/mL)的碘化丙啶(PI)染色液(终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$),室温避光染色 30 min,流式细胞仪(Bechman Dickson 公司)检测,每组重复 3 次,分析细胞周期变化。

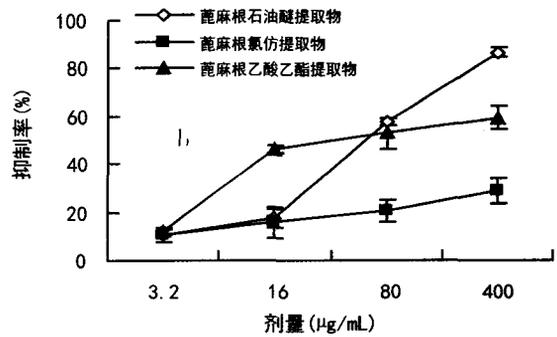
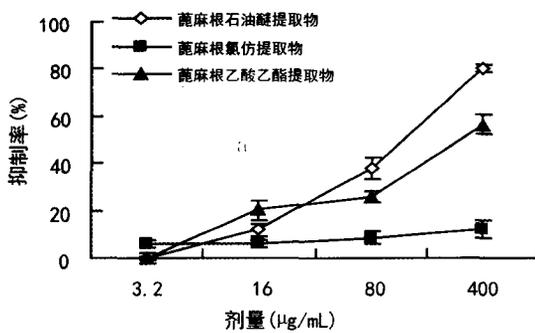


图 1 蓖麻根不同提取物处理 48 h(a)和 72 h(b)后对 HepG2 细胞株增殖的抑制作用

Fig. 1 Effects of *Ricinus communis* root extracts in HepG2 cells (48 h(a) and 72 h(b), mean \pm SD, $n=3$)

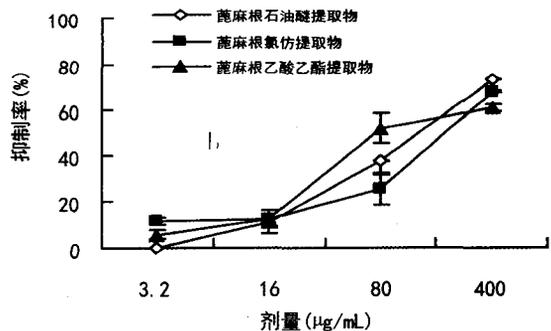
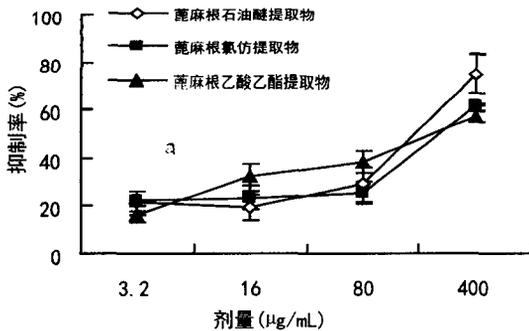


图 2 蓖麻根不同提取物处理 48 h(a)和 72 h(b)后对 NCI-H460 细胞株增殖的抑制作用

Fig. 2 Effects of *Ricinus communis* root extracts in NCI-H460 cells (48 h(a) and 72 h(b), mean \pm SD, $n=3$)

2 结果

2.1 蓖麻根提取物对 HepG2、NCI-H460 和 SGC7901 细胞增殖的抑制作用

由图 1~3 和表 1 可见,蓖麻根石油醚提取物对 HepG2 细胞增殖的抑制作用较强,处理 48 h 和 72 h 后的 IC_{50} 分别为 88.6 $\mu\text{g/mL}$ 和 65.6 $\mu\text{g/mL}$,对 NCI-H460 和 SGC-7901 细胞增殖有中等强度抑制作用,处理 48 h 和 72 h 后的 IC_{50} 在 133.3~138.1 $\mu\text{g/mL}$ 之间;乙酸乙酯提取物对三种肿瘤细胞增殖的抑制作用其次,处理 48 h 和 72 h 后的 IC_{50} 在 90.2~501.6 $\mu\text{g/mL}$ 之间;氯仿提取物对 NCI-

H460 和 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用较弱,处理 48 h 和 72 h 后的 IC_{50} 在 230.6~1 801.1 $\mu\text{g/mL}$ 之间,对 HepG2 细胞增殖基本无抑制作用。

2.2 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡

蓖麻根石油醚提取物 60 $\mu\text{g/mL}$ 处理 HepG2 细胞 48 h,在荧光显微镜下,经紫外光激发,可见典型的凋亡形态学改变(图 4:b),即核染色质聚集、核固缩、部分核呈新月形,而生理盐水对照组细胞核(图 7:a)成均匀的蓝色荧光。

2.3 蓖麻提取物对细胞周期的影响

由表 2 可见,蓖麻根石油醚提取物 60 $\mu\text{g/mL}$ 处理 48 h 可使 HepG2 细胞停滞于 S 期($P<0.05$),30 $\mu\text{g/mL}$ 和 120 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞周期无明显影响。

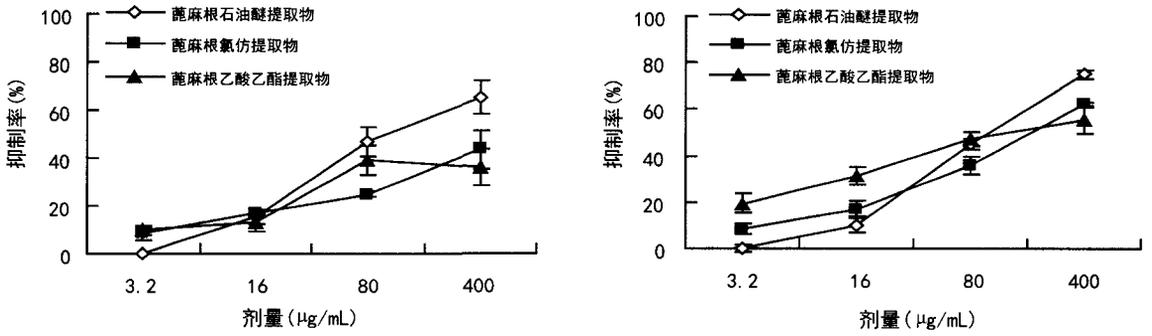


图 3 蓖麻根不同提取物处理 48 h(a)和 72 h(b)后对 SGC-7901 细胞株增殖的抑制作用

Fig. 3 Effects of *Ricinus communis* root extracts in SGC-7901 cells (48 h(a)and 72 h(b), mean±SD, n=3)

表 1 蓖麻根不同提取物对 HepG2、NCI-H460 和 SGC-7901 细胞增殖抑制的 IC₅₀

Table 1 IC₅₀ values of *Ricinus communis* root extracts in HepG2, NCI-H460 and SGC-7901 cells (µg/mL)

| 项目 Item | HepG2 细胞 | | NCI-H460 细胞 | | SGC-7901 细胞 | |
|------------|-------------|------|----------------|-------|----------------|-------|
| | 48 h | 72h | 48 h | 72h | 48 h | 72h |
| 石油醚提取物 | 88.6 | 65.6 | 134.3 | 133.3 | 138.1 | 136.6 |
| 乙酸乙酯提取物 | 364.9 | 90.2 | 231.5 | 138.5 | 501.6 | 188.2 |
| 氯仿提取物 | — | — | 304.4 | 188.8 | 1801.1 | 230.6 |
| 5-FU | 41.8 | 7.5 | 20.4 | 6.7 | 61.1 | 11.2 |

3 讨论

本研究表明, 蓖麻根三种不同溶媒提取物对 3 种肿瘤细胞株的增殖有不同程度抑制作用, 且具有一定的量-效关系。其中石油醚提取物对 HepG2 细胞增殖的抑制作用较强, 处理 48 h 和 72 h 后的 IC₅₀ 分别为 88.6 µg/mL 和 65.6 µg/mL, 对 NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖亦有中等强度抑制作用, 处理 48 h 和 72 h 后的 IC₅₀ 在 133.3~138.1

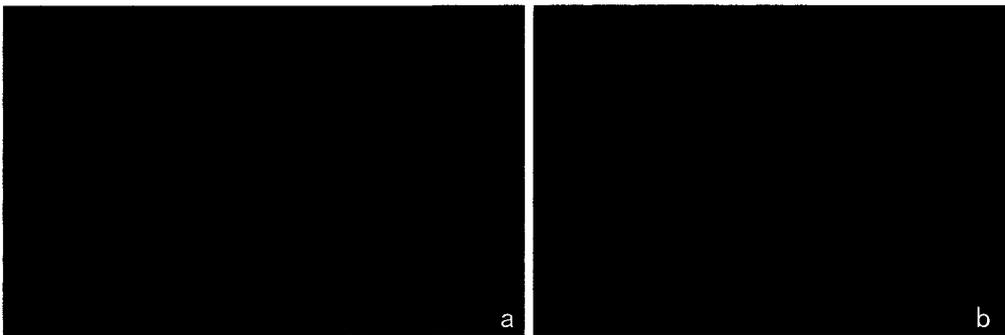


图 4 蓖麻根石油醚提取物 60 µg/mL 处理 HepG2 细胞 48 h, Hoechst 33258 染色结果 (×200)

Fig. 4 Effects of petroleum ether extracts of *Ricinus communis* root in HepG2 cells by Hoechst 33258 fluorescence dyeing (48 h, 60 µg/mL)

a. 阴性对照组; b. 蓖麻根石油醚提取物组
a. Control group; b. Petroleum ether extracts of *Ricinus communis* root group

表 2 不同浓度蓖麻根石油醚提取物对 HepG2 细胞株细胞周期的变化
Table 2 HepG2 cell cycle in petroleum ether extracts of *Ricinus communis* root at different concentrations (% , mean±SD, n=3)

| | 浓度 | G1 | G2 | S | G1/G2 |
|------------|-----------|------------|-----------|--------------|-------------|
| 对照 | — | 59.28±1.63 | 3.96±1.84 | 36.75±0.54 | 1:1.87±0.01 |
| 蓖麻根石油醚提取物组 | 30 µg/mL | 60.54±1.35 | 4.64±2.20 | 34.81±1.80 | 1:1.81±0.06 |
| | 60 µg/mL | 45.54±3.83 | 0.00±0.00 | 54.45±3.83 * | 1:1.94±0.02 |
| | 120 µg/mL | 55.14±3.08 | 3.70±3.23 | 41.15±5.48 | 1:1.88±0.09 |

与对照组比较 Compared with control, * P<0.05.

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间;乙酸乙酯提取物对 3 种肿瘤细胞增殖的抑制作用其次,处理 48 h 和 72 h 后的 IC_{50} 在 90.2~501.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间;氯仿提取物对 NCI-H460 细胞和 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用较差,对 HepG2 细胞增殖基本无抑制作用。Hoechst 33258 染色表明,石油醚提取物 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对 HepG2 细胞具有明显诱导细胞凋亡作用,出现细胞凋亡特征。流式细胞仪检测细胞周期表明,石油醚提取物 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可使 HepG2 细胞停滞于 S 期,与对照组比较 $P < 0.05$ 。细胞凋亡是一种非常复杂的生理和病理过程,是受控于基因指导的主动性细胞自我消亡过程,是细胞固有的功能。其形态特征包括细胞固缩、染色质凝聚、边集至核膜下以及凋亡小体形成(Tamm 等,2001)。现在普遍认为,无论药物的靶点何在,多种化疗药物最终主要通过诱导肿瘤细胞凋亡或坏死而达到治疗目的。蓖麻根提取物体外抗肿瘤作用可能是通过诱导细胞凋亡和使细胞停滞于 S 期而实现,为蓖麻的进一步研究与开发利用提供了实验基础。

参考文献:

- 王秀莉,赵世萍. 2010. 秋水仙素诱导细胞周期停滞[J]. 生物学通报,45(8):51-52
- 邹立波. 2001. 蓖麻毒素与肿瘤治疗[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,26(6):290-291
- Bao Y(鲍英),Xia L(夏璐),Jiang H(姜华),*et al.*. 2005. Effects of coix seed extract on apoptosis and ultrastructure of human pancreatic cancer cells(薏苡仁提取液对人胰腺癌细胞凋亡和超微结构的影响)[J]. *Chin J Gastroentero*(胃肠病学),10(2):75-78
- Chakravartula SV,Guttarla N. 2008. Biochemical properties of ricin in immature castor seed[J]. *Nat Prod Res*,22(7):600
- Fang L(方丽),Zhou J(周进). 2009. Influence of curcumin on the apoptosis and cell cycle distribution of HepG2 cells(姜黄素对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡和细胞周期的影响)[J]. *J Sichuan Med J*(四川医学),30(4):458-459
- Li J(李娟),Chen KL(陈科力),Xu JC(徐嘉成). 2008. Antitumor activities in vitro of extracts from *Selaginella labordei*(细叶卷柏提取物的体外抗肿瘤活性)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(5):690-693
- Qin XN(秦小娜),Gan MZ(甘明哲),Gao P(高平). 2006. Effects of castor bean extract on antifertility in mice(蓖麻提取物对鼠抗生育作用的实验的研究)[J]. *Sichuan J Zool*(四川动物),25(1):176-178
- Tamm I,Schriever F,Dorken B. 2001. Apoptosis; implications of basic re-search for clinical oncology[J]. *Lancet Onco*,1,2(1):33
- Tang ZN(唐祖年),Gong SJ(龚受基),Dai ZK(戴支凯),*et al.*. 2008. Preliminary study on acute toxicity and effects of different extracts of *Pachyrrhizus erosus* Urban seed on KB cell(凉薯种子提取物急性毒性和对 KB 细胞抑制作用的初步研究)[J]. *J Food Sci*(食品科学),29(7):435-437
- Yin JK(尹俊凯),Liao JX(廖建兴). 2010. Effects of *Corydalis saxicola* bunting total alkaloids on Tca8113 cell proliferation and apoptosis(岩黄连总碱对 Tca8113 细胞增殖和凋亡作用的影响)[J]. *J Oral Maxill of Acial Surgery*(口腔颌面外科杂志),20(4):245-248
- Zou LB(邹立波),Zhan JB(詹金彪). 2005. Purification and anticancer activity of ricin(蓖麻毒素的提取及其抗肿瘤作用研究)[J]. *J Zhejiang Univ: Med Sci Edi*(浙江大学学报·医学版),34(3):217-219
- Zhang ZF(张正付),Bian BL(边宝林),Yang J(杨健),*et al.*. 2004. Studies on chemical constituents in roots of *Jasminum sambac*(茉莉根化学成分的研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志),29(3):237-239
- Zhou ZH(周志宏),Yang CR(杨崇仁). 2000. Chemical constituents of crude green tea, the material Pu-er in Yunnan(云南普洱茶原料晒青毛茶的化学成分)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),22(3):343-350
- Zhang J,Wang Y,Zhang XQ,*et al.*. 2009. Chemical constituents from the leaves of *Lophatherum gracile*[J]. *Chin J Nat Med*,7(6):428-431
- Zou JG(邹济高),Jin RL(金蓉鸾),He HX(何宏贤). 2000. Chemical constituents of *Ampelopsis japonica*(白蔹化学成分研究)[J]. *Chin Med Mat*(中药材),23(2):92

(上接第 553 页 Continue from page 553)