

文章编号 1006-8147(2020)05-0476-06

论著

牛蒡根氯仿提取物有效组分分离及其抗肿瘤活性的研究

沈洪昇^{1,2}, 何景华¹, 赵秀梅², 顾娜², 史鹏程², 胡人杰²

(1.天津医科大学基础医学院药理学教研室,天津 300070;2.天津市医药科学研究所,天津 300020)

摘要 目的:通过生物活性追踪法对牛蒡根氯仿提取物进行分离提取,研究其抗肿瘤有效组分及可能的作用机制。方法:牛蒡根氯仿提取物经硅胶柱洗脱分离得到不同组分。用 S180 细胞和 K562 细胞经 MTT 法筛选活性组分;流式细胞术检测活性组分对 K562 细胞周期及凋亡的影响;小鼠淋转实验验证活性组分对小鼠免疫功能的影响;MTT 法观察活性组分对耐药细胞 K562/O2 的逆转作用。结果:牛蒡根氯仿提取物分离鉴定后得到甾体类组分(L-1)、三萜类组分(L-2)、L-3 和 L-4 4 个组分。各组分对 S180 细胞均显示很强的细胞毒作用,其 IC₅₀ 值均在 10 μg/mL 以下。而 K562 细胞对甾体类组分和三萜类组分敏感度较高,IC₅₀ 值分别为 204.50 μg/mL 和 117.56 μg/mL;三萜类组分可使 K562 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例较对照组的 45.52% 增加至 53.82%,S 期细胞比例由对照组的 45.68% 减少到 37.11%(均 P<0.05);甾体类组分和三萜类组分分别将 K562 细胞凋亡率由 5.1% 增加至 21.8% 和 38.0%(均 P<0.01)。三萜类组分对小鼠淋巴细胞存在一定促进增殖作用,而甾体类组分与阿霉素合用后 K562/O2 细胞耐药指数由 1 165 降低至 468(P<0.01)。结论:牛蒡根氯仿提取物中的甾体类组分和三萜类组分影响细胞周期、诱导细胞凋亡并在免疫调节和肿瘤耐药性方面发挥抗肿瘤作用。

关键词 牛蒡根;细胞增殖;周期;凋亡;免疫;逆转耐药

中图分类号 R963

文献标志码 A

Study on isolation and antitumor activities of chloroform extracts from the roots of *Arctiumlappa*

SHEN Hong-sheng^{1,2}, HE Jing-hua¹, ZHAO Xiu-mei², GU Na², SHI Peng-cheng², HU Ren-jie²

(1. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

Abstract Objective: To explore the extraction and isolation of the roots of *Arctiumlappa* and the research of antitumor activities. **Methods:** Different components of the roots of *Arctiumlappa* chloroform extract were separated by silica gel column elution. MTT assay was applied to determine the antitumor active components in S180 and K562 cells. Flow cytometry was used to detect the effects of antitumor active components on cell cycle and apoptosis of K562 cells. And lymphocyte transformation was applied to explore the effect of active components on immune function in mice. MTT assay was used to observe the effect of active components on reversing drug resistance of K562/O2 cells. **Results:** Four components including Steroidal components (L-1), Triperpenoids components (L-2), L-3 and L-4 were separated by column chromatography of the roots of *Arctiumlappa* chloroform extract. Four components showed strong inhibitory effect on cell proliferation of S180 cell, and the IC₅₀ value were below 10 μg/mL. Steroidal components and Triperpenoids components were identified to have stronger inhibition effect on K562 cell by MTT assay, the IC₅₀ value were 204.50 μg/mL and 117.56 μg/mL. Triperpenoids components significantly increased the proportion of G₀/G₁ phase cells from 45.52% to 53.82% and decreased the proportion of S phase cells from 45.68% to 37.11% in K562 cells (both P<0.05). Steroidal components and Triperpenoids components could significantly increase the apoptotic rate of K562 cells from 5.1% to 21.8% and 38.0%, respectively. Triperpenoids components promoted lymphocyte proliferation of mice. Steroidal components reversed the drug resistance of K562/O2 cells, and the resistance index decreased from *Arctiumlappa* 1 165 to 468 (P<0.01). **Conclusion:** Steroidal components and Triperpenoids components of chloroform extracts from the roots of *Arctiumlappa* exert antitumor effect by blocking cycle arrest, inducing apoptosis, regulating immunity and reversing multidrug resistance.

Key words roots of *Arctiumlappa*; proliferation; cell cycle; apoptosis; immunity; multidrug resistance

恶性肿瘤是危害人类健康的主要疾病之一。肿瘤的三大疗法中,药物治疗占有重要的地位。很多来源于天然产物的单体或有效组分的抗肿瘤作用

及其机制已经得到公认,不仅为癌症治疗提供了新的理论及依据,也为抗肿瘤药物的筛选提供了广阔的空间。牛蒡(*Arctiumlappa* L.)是菊科牛蒡属草本植物,其根、茎、叶、果实均可作为草药使用^[1]。目前研究主要集中于法定的药用部位牛蒡子,其有效成分牛蒡子苷具有明确的抗肿瘤活性^[2]。牛蒡根尚未

基金项目 天津市卫生计生委中医中西医结合课题(13114)

作者简介 沈洪昇(1982-),男,助理研究员,硕士在读,研究方向:肿瘤药理;通信作者:何景华, E-mail: hejinghuacn@163.com。

列为药用部位,但所含的营养成分较丰富,已作为蔬菜及保健食品广为食用^[3]。牛蒡根具有抗细菌和真菌作用,也可降血脂、保护肝脏^[4-6]。笔者的前期研究发现,牛蒡根提取物对某些肿瘤细胞存在一定的抑制作用,并对化疗药物有减毒增效的作用^[7]。进一步的成分分析发现,牛蒡根中仅含有极少量的牛蒡子苷,表明还有其他有效成分发挥了抗肿瘤作用。为此,笔者对牛蒡根中抗肿瘤活性较强的氯仿提取物进行分离提取,采用体外筛选的方法明确其活性组分,进一步从细胞周期、凋亡、免疫功能和逆转耐药等方面探讨其可能的抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器 CO₂ 孵育箱(美国 Revco 公司); Infinite M200 PRO 型全波长多功能酶标仪(奥地利 Tecan 公司); CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 96 孔板(德国 Greinerbio 公司); 流式细胞分选仪 S3e(Bio-Rad Laboratories 公司); 流式细胞仪(FACSCanto II)。

1.1.2 试剂 牛蒡根为市售品; RPMI1640 培养液(GIBCO 公司); 小牛血清(CORNING 公司); MTT、刀豆蛋白(北京欣经科生物技术有限公司); 石油醚、乙醚(天津市化学试剂三厂); 碘化丙啶 PI(索莱宝科技有限公司); RNase A(索莱宝科技有限公司)。

1.1.3 细胞株 小鼠骨肉瘤细胞 S180、人白血病细胞 K562、耐阿霉素人白血病细胞 K562/O2 均由天津市医药科学研究所肿瘤药理室传代保存。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 溶剂提取法制备氯仿提取物: 取市购新鲜牛蒡根(*Arctiumlappa L.*)(经天津中医药大学马琳教授鉴定为真品), 切制成片, 干燥后粉碎。用 8 倍量的乙醇渗漉法提取, 过滤。滤液减压浓缩后的醇浸膏, 加水使混悬。用氯仿萃取后, 减压回收溶剂, 得氯仿层提取物。

1.2.1.2 硅胶柱层析法分离不同组分: 取 100~200 目硅胶, 玻璃管柱干法装柱, 敲打均匀, 静置过夜。氯仿层提取物浸膏 3 g 用氯仿溶解后加入硅胶搅拌均匀, 放置过夜, 氯仿自然挥干。次日装柱, 将搅拌均匀的样品铺于玻璃柱硅胶表面上端平面。加注洗脱液, 依次为石油醚-乙醚(40:1)、(25:1)、(8:1)和(3:1), 每种比例洗脱液 500 mL。洗脱液沿柱内壁缓慢加入, 经柱分离后的洗脱液依次用 10 mL 试管盛装。取各试管样品 10 μ L, 点样于活化后的硅胶薄层板底边 8 mm 处, 以氯仿-甲醇(9:1)展开。待展开 8 cm

后取出, 挥干溶剂, 喷以磷钼酸显色剂, 105 $^{\circ}$ C 加热至显色清晰。选取斑点集中的合并, 减压回收溶剂, 将浓缩物再低温真空干燥后, 称重计算收率。

1.2.2 各组分成分初步鉴定

1.2.2.1 化学法鉴定组分成分: 取 4 个组分样品, 用适量醋酐溶解, 沿试管壁加入浓硫酸数滴, 观察在两液交界处显色反应(Liebermann-Burchard 实验)或滴入碘化铋钾沉淀试剂, 观察试管内是否有橘红色沉淀产生(碘化铋钾沉淀实验)。

1.2.2.2 TLC 法鉴定组分成分: 取活化后的硅胶薄层板, 将待鉴定的 L-1、L-2、 β -谷甾醇和齐墩果酸标准品分别用氯仿溶解, 各取 10 μ L, 点样于距薄层板底边 8 mm 处。以石油醚-乙酸乙酯(1:1)展开。待展开 8 cm 后取出, 挥干溶剂, 喷以磷钼酸显色剂, 105 $^{\circ}$ C 加热至显色清晰。

1.2.3 样品对体外培养肿瘤细胞生长的影响 取接种肿瘤细胞 6~8 d 生长良好的 S180 荷瘤小鼠, 无菌条件下抽取腹水, PBS 洗涤 2 次。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 液调整细胞浓度至 1×10^6 /mL 单细胞悬液。另取对数生长期 K562 细胞, 用 10% 小牛血清的 RPMI1640 液调整细胞浓度 1×10^5 /mL。两种细胞分别以每孔 100 μ L 分别接种于 96 孔板中。空白对照组加常规培养液, 待测样品组加入含相应浓度的有效组分溶液, 使反应体系为 200 μ L。每组平行 4 孔。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 72 h 后, 离心, 小心弃去上清, 每孔加入 MTT(0.5 g/L)100 μ L, 继续培养 4 h 弃去上清, 每孔再加入二甲亚砜(DMSO)150 μ L, 用微量振荡器振荡 10 min 使结晶物充分溶解。以酶标仪于 570 nm 波长下检测每孔的光密度(OD)值, 按下式计算细胞生长抑制率。生长抑制率(IR, %)=(1-实验组 OD/空白对照组 OD) \times 100%。细胞抑制率对剂量对数做线性回归方程计算 IC₅₀ 值。

1.2.4 流式细胞术测定有效组分对 K562 细胞周期及凋亡的影响 取对数生长期 K562 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 液调整细胞接种于 25 cm² 培养瓶中。空白对照组加常规培养液, 待测样品组加含有一定浓度有效组分溶液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。取各组细胞用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心, 用 70% 的乙醇溶液, 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h, PBS 洗涤 2 次后, 加 RNaseA, 终浓度为 50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入 PI, 终浓度为 20 μ g/mL, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 流式细胞仪分析细胞周期。另取对照组和待测样品组细胞, 分别加 PBS 缓冲液将细胞吹悬, 加入试剂盒配套的 1 \times binding buffer 缓冲液中, 用膜联蛋白 V(Annexin V)与 PI 染料避光孵育 15 min, 上

流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 样品对淋巴细胞增殖的影响 昆明种小鼠颈椎脱臼处死,无菌条件下取出脾脏。用1 mL注射器吸取冷 RPMI1640 液,将小鼠脾淋巴细胞透过脾脏包膜冲出。收集脾淋巴细胞,调整细胞浓度至 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 。以每孔 75 μL 加于 96 孔板中,再加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ConA 溶液 25 μL 。设置空白对照组、ConA 对照组和待测样品组,每组平行 4 孔。空白对照组和 ConA 对照组加常规培养液,待测样品组加入含相应浓度的有效组分溶液,使反应体系为 200 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h。用 MTT 法(1.2.3 项下步骤)在 570 nm 检测 OD 值。

1.2.6 MTT 法检测样品对 K562/O2 细胞耐药性的影响

1.2.6.1 样品对 K562/O2 细胞增殖能力的影响:取对数生长期 K562/O2 细胞,用 10% 小牛血清的 RPMI1640 液调整细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{mL}$,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。空白对照组加常规培养液,待测样品组加入含相应浓度的有效组分溶液 100 μL ,每组平行 4 孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后,用 MTT 法(1.2.3 项下步骤)在 570 nm 检测 OD 值。

1.2.6.2 样品对 K562/O2 细胞耐药性的影响:取对数生长期 K562/O2 细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,再加入不同浓度的阿霉素溶液及一定浓度的样品溶液各 50 μL 。平行设 4 个复孔,培养板 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h。用 MTT 法(1.2.3 项下步骤)在 570 nm 检测 OD 值,计算细胞抑制率及 IC_{50} 。同时,测定阿霉素对 K562 细胞的 IC_{50} ,用于计算耐药倍数(耐药指数=耐药细胞 IC_{50} /敏感细胞 IC_{50})。

2 结果

2.1 样品的制备 800 g 牛蒡根粉末,经乙醇渗漉提取的浸膏,用氯仿萃取得提取物 17.6 g。取 3 g 浸膏经硅胶柱洗脱分离后得到 L-1、L-2、L-3 和 L-4,分别为 75.624、64.134、97.064 和 310.661 mg。各部

表 1 牛蒡根分离物对 S180 细胞毒作用结果

Tab 1 Cytotoxicity of chloroform extract from the roots of *Arctiumlappa* in S180 cells

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	L-1 OD值	L-2 OD值	L-3 OD值	L-4 OD值
对照组		1.218 \pm 0.080	1.281 \pm 0.157	1.281 \pm 0.157	1.218 \pm 0.080
	1.95	0.686 \pm 0.610*	0.671 \pm 0.013*	0.683 \pm 0.023*	0.873 \pm 0.054*
	3.91	0.645 \pm 0.108*	0.479 \pm 0.011*	0.569 \pm 0.013*	0.747 \pm 0.180*
实验组	7.81	0.630 \pm 0.067*	0.385 \pm 0.020*	0.398 \pm 0.017*	0.671 \pm 0.142*
	15.63	0.552 \pm 0.041*	0.190 \pm 0.018*	0.507 \pm 0.027*	0.513 \pm 0.081*
	31.25	0.472 \pm 0.024*	0.130 \pm 0.010*	0.286 \pm 0.008*	0.410 \pm 0.042*
IC_{50}		5.780 \pm 2.460	1.990 \pm 0.130	2.280 \pm 0.280	9.630 \pm 1.440

注:与对照组相比,* $P < 0.01$

分收率分别为 0.055%、0.047%、0.007% 和 0.228%。其中组分 L-1 为淡黄色黏稠液体、组分 L-2 为白色固体、组分 L-3 和 L-4 均为褐色固体。

2.2 各组分成分初步鉴定

2.2.1 化学法鉴定组分成分 Liebermann-Burchard 反应中,在两液交界处,L-1 最终显暗绿色,L-2 显紫红色环,组分 L-3 和 L-4 显色不明显。表明 L-1 主要成分可能含有甾体类成分,而 L-2 显紫红色环则可能含有三萜类成分。各组分的碘化铋钾沉淀反应实验未见明显的橘红色沉淀,初步判定各组分中不含生物碱成分。

2.2.2 TLC 法鉴定组分成分 在 L-1 和 L-2 色谱中,分别与 β -谷甾醇和齐墩果酸对照品色谱相应位置上显示相同的斑点,表明 L-1 组分中可能含有 β -谷甾醇成分,而 L-2 组分中可能有齐墩果酸成分,见图 1。

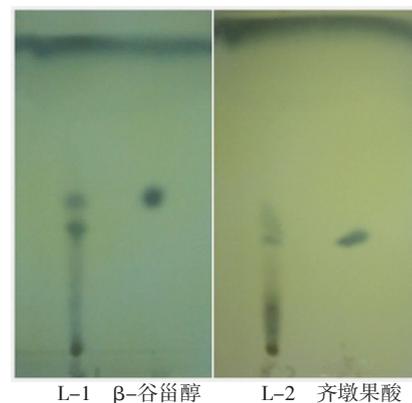


图 1 牛蒡根氯仿提取物组分 TLC 及成分鉴定结果

Fig 1 TLC chromatogram and identification results of chloroform extract from the roots of *Arctiumlappa*

2.3 样品对体外培养肿瘤细胞生长的影响 与细胞对照组相比,牛蒡根提取物甾体类组分(L-1)、三萜类组分(L-2)、L-3 和 L-4 对小鼠 S180 细胞抑制活性都较强,在一定浓度范围内基本上保持明确的量效关系,见表 1。表 2 结果显示,在 19.53~625.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内 4 个组分对 K562 细胞增

表 2 牛蒡根分离物对 K562 细胞毒作用的结果

Tab 2 Cytotoxicity of chloroform extract from the root of *Arctiumlappa* in K562 cells

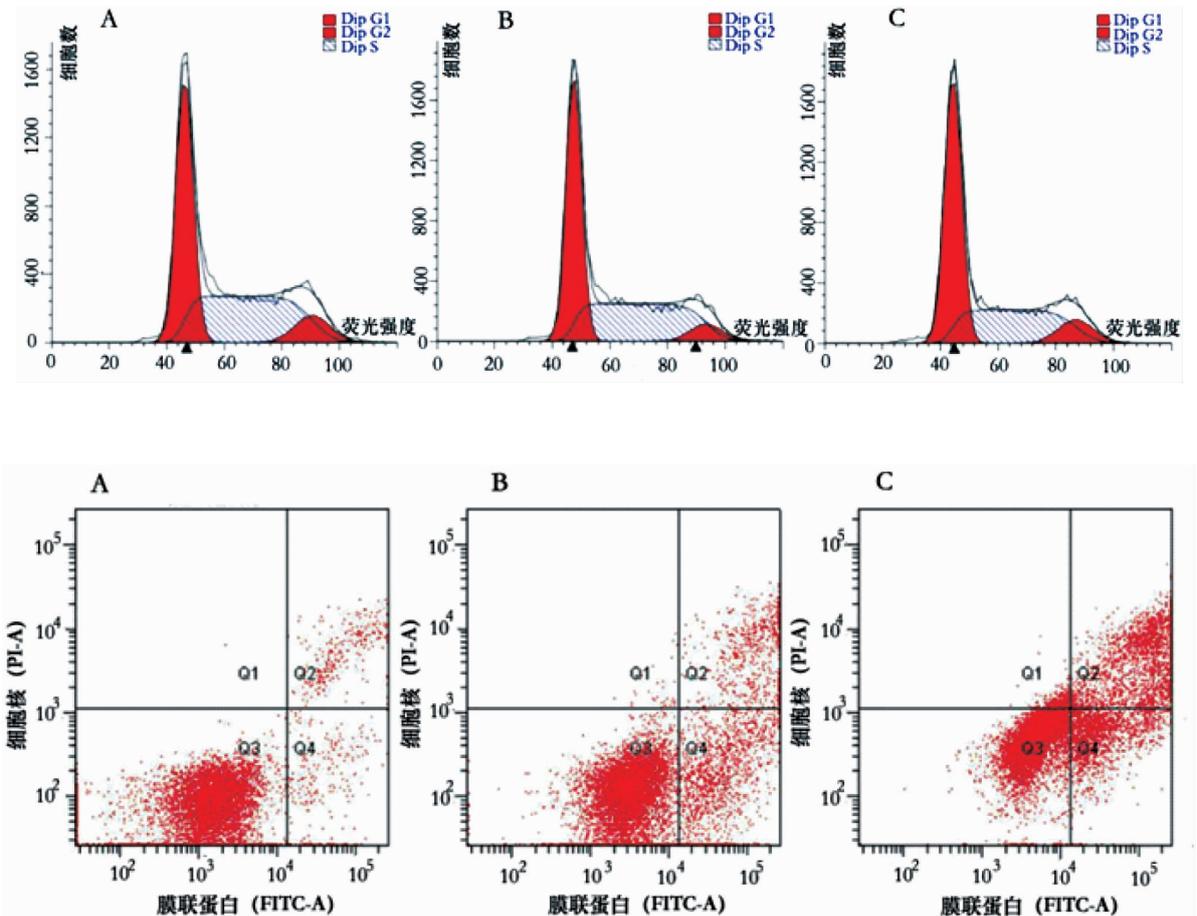
组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	L-1 OD 值	L-2 OD 值	L-3 OD 值	L-4 OD 值
对照组		0.341 \pm 0.021	0.341 \pm 0.021	0.373 \pm 0.019	0.373 \pm 0.019
实验组	19.53	0.234 \pm 0.015*	0.290 \pm 0.032	0.285 \pm 0.008	0.292 \pm 0.027
	39.06	0.243 \pm 0.021*	0.235 \pm 0.014*	0.274 \pm 0.012*	0.266 \pm 0.020*
	78.13	0.217 \pm 0.019*	0.191 \pm 0.018*	0.258 \pm 0.019*	0.249 \pm 0.031*
	156.25	0.178 \pm 0.013*	0.132 \pm 0.019*	0.211 \pm 0.026*	0.209 \pm 0.016*
	312.50	0.148 \pm 0.009*	0.106 \pm 0.032*	0.191 \pm 0.019*	0.207 \pm 0.015*
	625.00	0.130 \pm 0.005*	0.081 \pm 0.001*	0.154 \pm 0.012*	0.185 \pm 0.008*
IC ₅₀		204.500 \pm 2.460	117.560 \pm 22.970	328.250 \pm 34.250	530.310 \pm 80.240

注:与对照组相比,* $P < 0.01$

殖的抑制率有明显不同,其中三萜类组分 IC₅₀ 最低,在此浓度范围内存在明确的量效关系,较其他样品效果最好。

2.4 流式细胞术测定有效组分对 K562 细胞周期及凋亡的影响 与正常对照组相比,牛蒡根甾体类组分(250 $\mu\text{g/mL}$)并没有对 K562 细胞周期产生明显影

响。而三萜类组分(100 $\mu\text{g/mL}$)可使 K562 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例显著增加,S 期细胞比例显著减少($P < 0.05$)。对照组、甾体类组分及三萜类组分凋亡率分别为:(5.1 \pm 0.3)%、(21.8 \pm 2.4)%和(38.0 \pm 2.8)%。与对照组相比,两组均明显诱导 K562 细胞凋亡(均 $P < 0.05$),见图 2 和表 3。



注:A:对照组;B:甾体类组分;C:三萜类组分

图 2 牛蒡根甾体类组分及三萜类组分对 K562 细胞周期和凋亡的影响

Fig 2 The effect of Steroidal components and Triperpenoids components on cells cycle and apoptosis of K562 cells

表 3 牛蒡根提取物有效组分对 K562 细胞周期及凋亡的影响

Tab 3 The effect of Steroidal components and Triperpenoids components on cells cycle and apoptosis of K562 cells

组别	细胞周期(%)			凋亡率(%)
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照组	45.52±0.63	45.68±0.35	8.80±0.50	5.1±0.3
甾体类组分	48.00±0.24	45.24±0.25	6.75±0.38	21.8±2.4*
三萜类组分	53.82±0.43*	37.11±0.24*	9.07±0.24	38.0±2.8*

注:与对照组相比,*P<0.05

2.5 样品对淋巴细胞增殖的影响 从表 4 来看, ConA 在体外能明显促进小鼠脾淋巴细胞的增殖。牛蒡根三萜类组分在 6.25~200 μg/mL 时有促进细胞增殖的趋势,但总体均没有剂量依赖关系。甾体类组分在所测试的浓度范围内对小鼠脾淋巴细胞大多表现出抑制增殖的作用。

2.6 MTT 法检测样品对 K562/O2 细胞耐药性的影响

2.6.1 样品对 K562/O2 细胞增殖能力的影响 由

表 5 牛蒡根有效组分对 K562/O2 细胞毒作用结果

Tab 5 Cytotoxicity of Steroidal components and Triperpenoids components in K562/O2 cells

组别	剂量(μg/mL)	甾体类组分		三萜类组分	
		OD 值	IR(%)	OD 值	IR(%)
对照组	-	0.782±0.042	-	0.782±0.042	-
	31.25	0.766±0.008	2.03±1.05	0.695±0.024	11.13±3.08
样品组	62.5	0.725±0.048	7.18±6.14	0.718±0.042	8.14±5.36
	125	0.662±0.025	15.25±3.17	0.677±0.051	13.37±6.56
	250	0.573±0.029	26.75±3.65	0.545±0.026*	30.29±3.35
	500	0.501±0.019*	35.88±2.42	0.478±0.006*	38.88±0.78
	1 000	0.493±0.011*	36.96±1.35	0.487±0.006*	37.72±0.73
IC ₅₀ (μg/mL)		>1 000		>1 000	

注:与对照组相比,*P<0.05;IR:生长抑制率

2.6.2 样品对 K562/O2 细胞耐药性的影响 表 6 结果显示,阿霉素对 K562 细胞的 IC₅₀ 值为 0.052 μg/mL,而阿霉素单独作用于 K562/O2 细胞的 IC₅₀ 值为 60.60 μg/mL,其耐药指数超过 1 000。500 μg/mL 或 1 000 μg/mL 的三萜类组分与阿霉素合用后,其 IC₅₀

表 6 牛蒡根有效组分对 K562/O2 细胞逆转耐药作用结果

Tab 6 The effect of Steroidal components and Triperpenoids components on reversing tumor multidrug resistance

组别	K562		K562/O2			
	阿霉素	阿霉素	阿霉素+甾体类组分 500(μg/mL)	阿霉素+甾体类组分 1 000(μg/mL)	阿霉素+三萜类组分 500(μg/mL)	阿霉素+三萜类组分 1 000(μg/mL)
IC ₅₀ (μg/mL)	0.052±0.045	60.60±8.34	48.79±2.60	24.35±0.85	83.32±4.72	88.57±6.82
耐药指数	-	1 165	938	468*	1 602	1 703

注:与对照组相比,*P<0.01

3 讨论

以往的实验中,通过薄层色谱法对牛蒡根及牛蒡子化学成分进行了一些初步的比较,结果显示,牛蒡根中几乎不含有牛蒡子特有的抗肿瘤活性成

表 5 结果看出,测试的最高浓度基本上未达到 50% 抑制率,说明有效组分对耐阿霉素细胞株 K562/O2 的细胞毒作用较弱。

表 4 牛蒡根有效组分对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的结果

Tab 4 The effect of Steroidal components and Triperpenoids components on the proliferation of spleen lymphocytes in mice

组别	剂量 (μg/mL)	OD 值	
		甾体类组分	三萜类组分
对照组	-	0.669±0.019	0.669±0.019
Con A 组	10	1.170±0.036	1.170±0.036
	6.25	1.123±0.057	1.191±0.030
	12.5	1.166±0.060	1.175±0.049
试验组	25	1.027±0.081*	1.183±0.072
	50	1.081±0.071*	1.173±0.095
	100	1.159±0.040	1.171±0.059
	200	1.031±0.023*	1.205±0.045

注:与对照组相比,*P<0.05

值仍高于阿霉素单独使用时的 IC₅₀ 值。而甾体类组分与阿霉素合用后,在 500 μg/mL 时 IC₅₀ 值为 48.79 μg/mL,在 1 000 μg/mL 时 IC₅₀ 值为 24.35 μg/mL,均比阿霉素单独使用的 IC₅₀ 值低,耐药指数均有降低,证明甾体组分有一定的逆转细胞耐药的趋势。

分——牛蒡子苷。说明牛蒡根存在不同于牛蒡子苷的抗肿瘤活性成分,对其粗提物进一步分离提取,为研究其确切的抗肿瘤活性成分提供了依据。牛蒡作为菊科植物,从宏观上来讲,应该含有本科植物

中普遍含有的聚炔类化合物、倍半萜内酯、三萜、黄酮、甾体、菊淀粉等成分^[8-9]。本研究通过化学鉴定及活性测试,发现牛蒡根中活性物质可能是甾体类和三萜类成分。

选用 S180 细胞和 K562 细胞观察牛蒡根氯仿层提取物进一步分离得到的甾体类组分、三萜类组分、L-3 和 L-4 4 个组分的细胞毒活性。发现甾体类组分和三萜类组分活性较强且存在一定的量效关系。进一步研究发现,三萜类组分能够使 K562 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期而不能进入 DNA 合成期(S 期),抑制了肿瘤细胞 DNA 的合成。甾体类组分和三萜类组分都能明显的引起 K562 细胞的凋亡。而引起细胞凋亡的机制很多,包括死亡受体途径、线粒体途径及交织旁途径等^[10]。磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路是人类癌症中一条重要的信号转导通路,在大多数癌症中都处于激活状态,研究表明三萜类成分会下调 PI3K-Akt 信号通路,诱导细胞凋亡^[11]。这也可能是牛蒡根三萜类组分诱导凋亡的途径之一。另有研究发现, β -谷甾醇和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体结合发挥诱导凋亡作用^[12]。由此推断牛蒡根有效组分的诱导凋亡机制与这两个途径相关。

肿瘤与免疫有着密不可分的关系,现代免疫学理论认为,肿瘤免疫以细胞免疫为主,机体抗肿瘤免疫反应中的细胞免疫主要依赖 T 淋巴细胞介导^[13]。脾脏属于外周免疫器官,其中存在大量 T 淋巴细胞^[14]。小鼠淋转实验显示,三萜类组分在一些剂量下表现出一定的促进淋巴细胞增长的趋势,能增强机体免疫功能,对抗肿瘤起到积极作用。肿瘤细胞的耐药性是肿瘤化疗失败的主要原因,也是困扰肿瘤治疗的一大难题^[15]。化疗耐药涉及了药物转运蛋白、细胞凋亡抑制、DNA 损伤修复和上皮-间充质转化在内的多种因素^[16]。*MDR1* 基因过度表达产生的 P-gp 增加药物转运和外排是耐药现象产生的最重要原因^[17]。阿霉素可诱导某些细胞过表达 P-gp,同时激活 Wnt/ β -catenin 通路也可过表达 P-gp,从而促进细胞对阿霉素耐药^[18]。甾体类组分表现出一定的逆转 K562/O2 细胞的耐药作用,其机制可能与降低 P-gp 表达相关,这个结果也将成为今后研究的重

点。

牛蒡根是一个具有开发前景和研究价值的保健食品,本研究对牛蒡资源的再利用及天然来源新型抗肿瘤物质的发现具有十分重要的意义。本研究项目的完成将为科学地综合利用牛蒡资源及天然来源新型抗肿瘤物质的发现打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 丁景和. 药用植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:215
- [2] 王哲,王佳贺.牛蒡子昔元药理作用的研究进展[J].中国医药导报,2018,15(32):50
- [3] 谢小花,安晓婷,陈静,等.牛蒡根中的功能成分及多酚类化合物提取方法研究进展[J].湖南文理学院学报,2019,31(3):25
- [4] 弥春霞,姜明,任玉兰.野生牛蒡根提取物的抑菌作用研究[J].安徽农业科学,2010,38(33):18765
- [5] 武世豪,杜金行,努尔比亚·阿布拉,等.牛蒡药理作用研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(7):3093
- [6] 张明月,周露露,徐翔,等.牛蒡中有效成分对肝脏保护作用的研究进展[J].华西药学杂志,2017,32(6):661
- [7] 赵秀梅,张富庚,沈洪昇,等.牛蒡根 4 种提取物体外抗肿瘤活性的比较研究[J].中国药房,2012,23(15):1351
- [8] 杨春澍.药用植物学[M].上海:上海科学技术出版社,1997:298-299
- [9] 于欣源,杨晓虹,周小平.菊科植物化学成分及药理作用的研究进展[J].吉林大学学报,2005,31(1):159
- [10] 高薇,侯微,李伟,等.细胞凋亡机制研究进展[J].中国畜牧兽医,2014,41(10):150
- [11] 李小妹,冯旻璐,张媛媛,等.木瓜总三萜诱导人胃癌细胞 HGC-27 凋亡的作用及机制研究[J].中药材,2019,42(3):661
- [12] 刘威良,姬昱,黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展[J].农产品加工,2019,(1):77
- [13] 杨任华,尹璇.某营养复合物对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[J].预防医学,2019,31(10):1001
- [14] 杨素芳,陈旭丰,杨志叶,等.绞股蓝黄芪保健茶对免疫功能的影响[J].安徽农学通报,2018,24(8):48
- [15] 康意,张静,王晓玲,等.Nrf2-ARE 通路与肿瘤耐药的研究进展[J].肿瘤医学,2019,25(23):4662
- [16] Tomaz Makovec. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy[J]. Radiol Oncol, 2019, 53(2):148
- [17] Nobili S, Landini I, Mazzei T, et al. Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression[J]. Med Res Rev, 2012, 32(6):1220
- [18] 周建军,赵云富,王国栋.维生素 C 逆转口腔鳞状细胞癌顺铂耐药的作用[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2020,127(1):31

(2020-03-23 收稿)