

草胡椒属植物对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响

于大永 杨秀秀 卢 轩 史丽颖 冯宝民*

(大连大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622)

摘要:目的 考察三种草胡椒属植物豆瓣绿、石蝉草和草胡椒乙醇提取物及不同极性部位对人黑色素瘤(A375)细胞增殖抑制作用。方法 常规传代培养 A375 细胞,实验处理前后,采用噻唑蓝(MTT)法测定细胞活性。结果 豆瓣绿、石蝉草和草胡椒的乙醇提取物对 A375 细胞增殖均有抑制作用,且细胞存活率随样品质量浓度的加大而降低。其中乙酸乙酯极性部位抑制效果更加明显,水层在高浓度下有一定的抑制作用。结论 该属三种植物石蝉草、豆瓣绿和草胡椒均有抗肿瘤作用。

关键词:草胡椒属; 人黑色素瘤 A375 细胞; 细胞增殖; 豆瓣绿

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.05.009

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2016)05-1048-02

Effect of *Peperomia Ruizet Pav* on Cell Proliferation of Human Malignant Melanoma A375 Cell

YU Da-yong, Yang Xiu-xiu, Lu Xuan, SHI Li-ying, FENG Bao-min*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: Objective Compare the inhibition effect on human melanoma cells(A375) treated with the ethanolic extracts and different polar parts obtained from three different *Peperomia Ruizet Pav* species. **Methods** Human melanoma A375 cells were grown in DMEM medium, MTT assay was used to examine the growth rates inhibition on human melanoma cells. **Results** The ethanolic extracts of three different *Peperomia Ruizet Pav* species has inhibitory effects on A375 cell proliferation, and the survival rate reduced with the increase of sample mass concentration. The effect of the ethyl acetate polar parts is more apparent, water layer does little effect. **Conclusion** The three species of *Peperomia Ruizet Pav* all have antitumor effect.

Key words: *Peperomia Ruizet Pav*; Human malignant melanoma cell A375; Cell proliferation; *Peperomia tetraphylla* (Forst. f.) Hook. et Arn

草胡椒属 *Peperomia Ruizet Pav.* 是胡椒科(Piperaceae)第二 大属,约 1000 种,主要分布在热带和亚热带地区。该属植物为一年或多年生、肉质草本植物。我国有 9 种,分布于东南至西南部^[1],分别为硬毛草胡椒 *Peperomia cavaleriei* C. DC.、石蝉草 *Peperomia dindygulensis* Miq.、短穗草胡椒 *Peperomia duclouxii* C. DC.、蒙自草胡椒 *Peperomia heyneana* Miq.、柬埔寨草胡椒 *Peperomia leptostachya*、山草胡椒 *Peperomia nakaharai* Hayata、草胡椒 *Peperomia pellucida* (L.) Kunth、红脉草胡椒 *Peperomia rubrivenosa* C. DC.、豆瓣绿 *Peperomia tetraphylla* (Forst. f.) Hook. et Arn。中医认为草胡椒属植物性凉、味辛;具有清热解毒、散瘀止痛的功效;主治痈肿疮毒、跌打损伤、外伤出血、烧烫伤等症;适用于内服煎汁和外敷^[2]。《新华本草纲要》亦记载:草胡椒属植物全草有散瘀止痛的功能,用于跌打损伤、烧伤等^[3]。近年来,有报道发现草胡椒属植物的化学成分具有抗炎^[4-6]、抗肿瘤活性^[7-8]、抗肿瘤血管生成^[9,10]等作用。但未发现有报道草胡椒属植物对黑色素瘤细胞增殖抑制作用的研究。本文以草胡椒属的三种植物石蝉草、豆瓣绿和草胡椒的 95% 乙醇提取物及各不同部位为对

象研究其对黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 植物提取及药品配制 草胡椒植物样品采集于云南普洱市,石蝉草采集于贵州安顺。豆瓣绿样购自江苏省花卉市场。三种植物分别用 95% 乙醇超声提取 3 次^[7],30min/次,合并提取液并浓缩,减压浓缩得到石蝉草 95% 乙醇提取物、豆瓣绿 95% 乙醇提取物和草胡椒 95% 乙醇提取物浸膏,浸膏挥至无醇味后以热蒸馏水溶解,后用乙酸乙酯萃取得到乙酸乙酯分层和残余水层,挥干溶剂得到乙酸乙酯层浸膏和水层浸膏。实验前将上述各浸膏用 DMSO 分别配成质量浓度为 60mg/ml 的母液。然后将各个样品用无血清培养基配成 60,600,2400,6000 μ g/ml 的药物原液,并用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2 细胞培养 人黑色素瘤细胞株 A375,常规传代培养。培养液用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,同时加入链霉素和青霉素,使双抗在培养液中的浓度为 100U/ml,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。视具体情况换培养液,每 2~3 天传代培养,使细胞保持在对数生长期。

1.3 体外细胞增殖抑制实验 选择生长状态较好,处于对数期的细胞,用含有 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM 培养液将 A375 细胞制成悬液并调密度至 4×10^4 个/ml,取 96 孔平底培养板,各孔加入 100 μ l 细胞悬液。细胞贴壁后,分别加入不同质量浓度的药物原液 20 μ l,实验组设 3~4 个药物质量浓度组,每组药物的终质量浓度分别为 10,100,400,1000 μ g/ml。其中药物质量浓度为 1000 μ g/ml 时含二甲基亚砜(DMSO)量最高,为 0.33%,因此设空白对照组和含 0.33% DMSO 对照组。以 200 μ M 的五氟尿嘧啶

收稿日期:2015-08-26; 修订日期:2015-12-20

基金项目:国家自然科学基金(No.31270398;No.31540006);

辽宁省“百千万人才工程”入选项目择优资助项目

(No.2013921008)

作者简介:于大永(1976-),男(汉族),吉林德惠人,大连大学副教授,博士学位,主要从事天然活性物质的研究工作。

* 通讯作者简介:冯宝民(1975-),男(汉族),吉林集安人,大连大学教授,博士学位,主要从事天然产物活性物质的研究工作。

啉(5-FU)作为阳性对照组。每个样品重复3孔。将培养板移入CO₂孵箱中,孵育24h,各孔加入MTT溶液(5mg/ml)10 μ l,同样条件继续孵育4h终止培养。弃上清液,每孔加入150 μ l DM-SO (40 $^{\circ}$ C恒温培养箱中放置使结晶物充分溶解)。选择570nm波长在酶标仪上测定各孔OD值,计算体外细胞存活率。细胞存活率=(药物孔OD值/对照孔OD值) \times 100%。

1.4 统计分析 实验重复3次,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学t检验进行组间比较分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 差异极显著。

2 结果

2.1 乙醇提取物的抗肿瘤活性 用三种植物的乙醇提取物处理A375细胞,结果(表1)发现三种植物的乙醇提取物均对A375细胞增殖有抑制作用,并且随着样品质量浓度的增加,细胞存活率逐步下降,且与空白对照组有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。豆瓣绿和石蝉草乙醇提取物的抑制作用更明显。另外含0.33% DMSO的样品与空白对照组相比没有显著差异(数据未列出)。

2.2 极性部位的抗肿瘤活性 分别用三种植物的乙酸乙酯层和水层处理A375细胞。结果(表2)发现三种植物的乙酸乙酯层均

对A375细胞增殖有抑制作用,并且随着样品质量浓度的增加,细胞存活率逐步下降,且与空白对照组有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。并且与乙醇提取物处理组相比,乙酸乙酯层处理组的抑制效果更佳。经统计分析,豆瓣绿、草胡椒和石蝉草三种植物的乙酸乙酯层抑制A375细胞的IC₅₀值分别为31.331 μ g/ml、210.251 μ g/ml和245.966 μ g/ml,其中以豆瓣绿的乙酸乙酯层抑制A375细胞增殖的作用最强。水层处理组对A375细胞增殖存在一定的抑制作用,但无明显的剂量依赖性(表3)。

表1 草胡椒属植物的乙醇提取物对A375细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	存活率/%		
	10 μ g \cdot ml ⁻¹	100 μ g \cdot ml ⁻¹	1000 μ g \cdot ml ⁻¹
空白对照组	-	-	-
5-FU	-	50.77 \pm 1.08**	-
豆瓣绿	87.39 \pm 3.23*	78.91 \pm 6.84*	25.35 \pm 3.37**
草胡椒	77.32 \pm 1.77*	74.34 \pm 1.36*	84.99 \pm 7.50*
石蝉草	85.18 \pm 5.18*	84.99 \pm 7.50*	28.10 \pm 1.61**

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;n=3

表2 草胡椒属植物的乙酸乙酯部位对A375细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	存活率/%			
	10 μ g \cdot ml ⁻¹	100 μ g \cdot ml ⁻¹	400 μ g \cdot ml ⁻¹	1000 μ g \cdot ml ⁻¹
空白对照组	-	-	-	-
5-FU	-	-	47.77 \pm 3.04**	-
豆瓣绿	109.90 \pm 7.19	77.86 \pm 4.07*	16.59 \pm 0.55**	17.54 \pm 0.63**
草胡椒	176.46 \pm 6.23	41.11 \pm 9.79**	29.74 \pm 0.74**	24.82 \pm 0.12**
石蝉草	91.14 \pm 9.81	91.01 \pm 5.56	21.59 \pm 1.43**	24.25 \pm 1.35**

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;n=3

表3 草胡椒属植物的水层部位对A375细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	存活率/%			
	10 μ g \cdot ml ⁻¹	100 μ g \cdot ml ⁻¹	400 μ g \cdot ml ⁻¹	1000 μ g \cdot ml ⁻¹
空白对照组	-	-	-	-
5-FU	-	-	47.77 \pm 3.04**	-
豆瓣绿	76.47 \pm 7.44*	65.55 \pm 1.88**	88.13 \pm 6.52*	51.08 \pm 6.86**
草胡椒	108.23 \pm 5.28	93.19 \pm 5.79	98.99 \pm 9.06	76.30 \pm 4.67*
石蝉草	109.73 \pm 6.64	94.64 \pm 8.38	83.06 \pm 3.13*	74.58 \pm 4.80

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;n=3

3 讨论

本研究旨在初步探讨草胡椒属植物的醇提取物及不同部位对人黑色素瘤细胞的抑制作用。黑色素瘤是一种极易发生转移的恶性皮肤肿瘤,具有高度的致死性。在美国,每年有超过9000人死于黑色素瘤,用于治疗黑色素瘤的总成本在33亿美元^[11]。黑色素瘤本身的高增殖性和微环境血供丰富等特点,有利于该肿瘤的生长、浸润,对放疗不敏感,易产生治疗耐受,预后差^[12]。天然产物是人类预防和治疗疾病的重要来源,天然产物及其衍生物由于蕴藏巨大的生物活性和化学结构多样性引起了人们对天然产物的持续关注与热切期盼。草胡椒属植物化学成分多样,具有多样的生物活性。Peperomia sui的正己烷粗提取物对HONE-1和NUGC-3癌细胞表现出明显的细胞毒性^[13]。陈立等^[14]对石蝉草乙醇提取物影响A549、KBV200、K562等细胞增殖的作用亦有研究,但尚未见有关于其对黑色素瘤细胞增殖作用影响的研究。为探究草胡椒属植物对人黑色素瘤A375细胞增殖作用的影响,本实验对石蝉草、豆瓣绿和草胡椒的乙醇提取物和乙酸乙酯萃取层及水层不同植物部位抑制A375肿瘤细胞的活性进行了考察。研究结果显示豆瓣绿和石蝉草乙醇提取物对A375细胞增殖抑

制作用更明显(表1)。研究过程中还发现豆瓣绿的乙酸乙酯部位抑制A375细胞增殖作用最强(表2)。在所研究的三种草胡椒属植物中,其乙酸乙酯萃取部位均显示了比乙醇提取物更好的抑制作用,表明其抑制细胞增殖的有效部位在乙酸乙酯部位。在以后的研究中,我们将针对草胡椒属植物乙酸乙酯萃取部位的有效成分进行进一步的研究。

本研究表明,所选取的三种草胡椒属植物草胡椒、豆瓣绿及石蝉草的95%乙醇提取物及乙酸乙酯层均有抑制A375肿瘤细胞增殖的作用,三种植物虽同为草胡椒属,但对黑色素瘤A375细胞增殖的抑制作用不同,其中豆瓣绿具有更为显著的抑制黑色素瘤A375细胞增殖的作用。这些发现为草胡椒属植物抗肿瘤研究奠定了理论基础,同时为该属植物资源开发利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 程用谦. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 华应熊, 刘诗发. 中华本草[M]. 上海: 上海科技出版社, 2000.
- [3] 吴征镒, 周太炎, 肖培根, 等. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科技出

版社,1990.

- [4] Chieko T, Yuriko Y, Masayoshi A, et al. Peperomins as anti-inflammatory agents that inhibit the NF- κ B signaling pathway [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009, 19: 4084.
- [5] Li N, Wu J L, Toshiaki H, et al. Bioactive lignans from Peperomia dulouxii [J]. J Nat Prod 2007, 70: 544.
- [6] Wu J L, Li N, Toshiaki H, et al. Bioactive secolignans from Peperomia dindygulensis [J]. J Nat Prod 2006, 69: 790.
- [7] Zhang GL, Li N, Wang YH, et al. Bioactive lignans from Peperomia heyneana [J]. J Nat Prod 2007, 70: 662.
- [8] Xu S, Li N, Ning MM, et al. Bioactive compounds from Peperomia pelucid [J]. J Nat Prod 2006, 69: 247.
- [9] Lin MG, Yu DH, Wang QW, et al. Secolignans with antiangiogenic activities from Peperomia dindygulensis [J]. Chem Biol 2011, 8: 862.
- [10] Wang QW, Yu DH, Lin MG, et al. Antiangiogenic Polyketides from Peperomia dindygulensis Miq. [J]Molecules 2012, 17: 4474.
- [11] Guy GP, Machlin SR, Ekwueme DU, Yabroff KR. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the US 2002-2006 and 2007-2011 [J]. Am J Prev Med 2015, 48: 183.
- [12] Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, et al. Melanoma epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. [J]. In Vivo 2014, 28(6): 1005.
- [13] Cheng M J, Lee S J, Chang Y Y, et al. Chemical and cytotoxic constituents from Peperomia sui [J]. Phytochemistry 2003, 63: 603.
- [14] 陈立. 石蝉草化学成分及抗肿瘤活性的研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文, 2005.

PCPA 失眠后大鼠不同时间大脑皮质钠-钾 ATP 酶和钙-镁 ATP 酶活性变化及酸枣仁汤的干预作用

史琴, 王慧*, 武静, 万亿, 藏印竹

(贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 研究 PCPA 失眠后大鼠大脑皮质不同时间大脑皮质钠-钾 ATP 酶和钙-镁 ATP 酶活性变化及酸枣仁汤的干预作用。方法 采用连续 3 天 ip 对氯苯丙氨酸(PCPA) 350mg·kg⁻¹的方法建立失眠大鼠模型。动物随机分为空白对照组、模型组、5-羟色氨酸(5-HTP)组、酸枣仁汤(SZRD)治疗组、5-HTP+SZRD组、SZRD 对照组和正常对照组。SZRD 治疗组按 15g·kg⁻¹ig 7d。各组分别在实验第 4、5、6、8、10 天取皮质组织, 采用无机磷法同时测定钠-钾三磷酸腺苷酶(Na⁺/K⁺-ATPase)和钙-镁三磷酸腺苷酶(Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase)活性。结果 实验第 4、5、6、8、10 天 PCPA 失眠模型组 Na⁺/K⁺-ATPase 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 活性均明显下降, 与空白对照组相比具有显著性差异(P<0.01), 实验第 8 天和第 10 天 SZRD 治疗组 Na⁺/K⁺-ATPase 活性明显升高, 与模型组相比具有显著性差异(P<0.01); 实验第 8 天和第 10 天 SZRD 治疗组 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 的活性明显升高, 与模型组相比具有显著性差异(P<0.05)。结论 PCPA 所致失眠能导致大鼠皮质组织 Na⁺/K⁺-ATPase 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 的活性明显下降, 酸枣仁汤能调节 PCPA 失眠大鼠皮质 Na⁺/K⁺-ATPase 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 的活性, 这可能是酸枣仁汤治疗失眠症的中枢机制之一。

关键词: 对氯苯丙氨酸; 失眠; 酸枣仁汤; 钠-钾三磷酸腺苷酶; 钙-镁三磷酸腺苷酶

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.05.010

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2016)05-1050-03

失眠症严重影响人类的身心健康, 失眠症的治疗至关重要。酸枣仁汤是临床治疗失眠症的常用方剂, 但酸枣仁汤治疗失眠的机制尚未明确。大量研究表明失眠症的发生与脑内 5-HT 递质代谢紊乱有重要关系, 但 5-HT 递质系统如何与脑内其他功能系统相互作用进而影响睡眠-觉醒功能调节目前仍不清楚。Na⁺/K⁺-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase (Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase) 目前已知对神经信息传递有重要作用。Na⁺/K⁺-ATPase 存在于细胞膜上, 可以分解 ATP 释放能量从而维持细胞内高 K⁺ 和细胞外高 Na⁺ 的不均衡分布状态, 以维持细胞生物电活动的正常进行。Ca²⁺ 是重要的细胞内信号分子, 神经元的功能受到细胞内 Ca²⁺ 浓度的调节, 维持细胞内 Ca²⁺ 浓度稳态的一个重要部分就是 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 的活动。细胞内

Ca²⁺ 浓度稳态的破坏可导致神经元活动的失常, 最终导致神经细胞死亡。脑内 5-HT 递质合成障碍是否影响 Na⁺/K⁺-ATPase 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 的功能活动目前尚未见报道。本研究通过建立 PCPA 失眠大鼠模型, 观察 PCPA 失眠后不同时间大鼠大脑皮质 Na⁺/K⁺-ATPase 和 Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase 活动变化及酸枣仁汤对这种变化的干预情况, 进一步探讨 PCPA 失眠的机制及酸枣仁汤的作用机理。

1 材料与仪器

1.1 动物 健康成年清洁级 SD 雄性大鼠 245 只, 体质量 200~220g, 由重庆腾鑫生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(渝)2007-0008。置于安静、温度保持恒定(22±2)℃、避免强光的环境中饲养 7 天。

1.2 试剂、药物与器材 超微量 ATP 酶测试盒(南京建成生物工程研究所提供, 批号: 20140911)。对氯苯丙氨酸(PCPA, DL-4-Chlorophenylalanine) Sigma 公司, 批号: 1001685258; 5-羟色氨酸(5-HTP) Sigma 公司, 批号: 101399644; 酸枣仁、川芎、知母、茯苓、甘草均购自贵阳中医学院第一附属医院中药房。721 分光光度计(上海欣茂仪器有限公司, 型号 721B), 大容量台式冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司, 型号 CT10R, 型号

收稿日期: 2015-09-15; 修订日期: 2016-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81360590)

作者简介: 史琴(1976-), 女(汉族), 贵州贵阳人, 贵阳中医学院副教授, 硕士学位, 主要从事中药药理研究工作。

* 通讯作者简介: 王慧(1967-), 女(汉族), 贵州贵阳人, 贵阳中医学院教授, 博士学位, 主要从事中西医结合基础研究工作。