

# 有毒中药对人结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞的生长抑制作用

竺平<sup>1</sup>, 谷云飞<sup>1\*</sup>, 杨柏霖<sup>2</sup>, 林秋<sup>1</sup>, 陈红锦<sup>1</sup>, 孙桂东<sup>2</sup>, 丁义江<sup>3</sup>

(1.南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2.南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 3.南京中医药大学第三附属医院, 江苏 南京 210001)

**摘要:**目的 从已知具有抗肿瘤作用的有毒中药或中药化合物中筛选出具有抑制不同发生途径人结肠癌细胞作用的药物。方法 应用 MTT 法检测白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、藤黄、天南星、黄药子、华蟾素、斑蝥酸钠及亚砷酸氯化钠对不同发生途径的人结肠癌细胞 HCT116(hMLH1 缺失结肠癌细胞株)和 SW480(错配修复基因正常的结肠癌细胞株)生长抑制作用。结果 斑蝥酸钠、华蟾素、亚砷酸氯化钠及藤黄提取物对人结肠癌细胞 HCT116 及 SW480 的生长有抑制作用。斑蝥酸钠、华蟾素及藤黄提取物干预 HCT116 细胞的 IC<sub>50</sub> 值和干预 SW480 细胞的 IC<sub>50</sub> 值比较有统计学差异( $P < 0.05$ ), 亚砷酸氯化钠干预两细胞株的 IC<sub>50</sub> 值无统计学差异( $P > 0.05$ )。白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、天南星、黄药子这 6 种中药的提取物在本实验条件下无效。结论 藤黄提取物、斑蝥酸钠、亚砷酸氯化钠及华蟾素可有效抑制不同途径的人结肠癌细胞的生长, 其中斑蝥酸钠、华蟾素、藤黄提取物可能具有特异性抗错配修复基因缺失所致结、直肠癌的作用。

**关键词:** 有毒中药; 人结肠癌; HCT116 细胞; SW480 细胞; MTT

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2013)04-0351-04

## The Inhibitory Effect of Toxic Chinese Drugs on the Growth of Human Colon Cancer Cell Line HCT116 and SW480

ZHU Ping<sup>1</sup>, GU Yun-fei<sup>1\*</sup>, YANG Bo-lin<sup>2</sup>, LIN Qiu<sup>1</sup>, CHEN Hong-jin<sup>1</sup>, SUN Gui-dong<sup>2</sup>, DING Yi-jiang<sup>3</sup>

(1. The First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; 3. The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To screen out the medicines that can be specifically against human colon cancer cells from the already known toxic antineoplastic Chinese drugs. **METHODS** *Oldenlandia diffusa*, *Tripterygium wilfordii*, *Paris polyphylla*, *Solanum nigrum*, *Gamboges*, *Rhizoma arisaematis*, *Dioscorea bulbifera* L, *Cinobufacini*, *Sodium cantharidinate* and *Sodium arsenic* were applied to treat the human colon cancer cell line HCT116(MLH1-deficient) and SW480(proficient mismatch repair), MTT were used to analyze the growth inhibition of two cell lines. **RESULTS** Sodium cantharidinate, Cinobufacini, Sodium arsenic and Gamboges can inhibit cell growth of HCT116 and SW480, The IC<sub>50</sub> values of HCT116 cell line were significantly lower than SW480 cell line when they were both treated with Sodium cantharidinate Cinobufacini and Gamboges( $P < 0.05$ ). Meanwhile, there were no significant difference between the IC<sub>50</sub> values of HCT116 cell line and SW480 cell line when they were treated with Sodium arsenic( $P > 0.05$ ). However, *Oldenlandia diffusa*, *Tripterygium wilfordii*, *Paris polyphylla*, *Solanum nigrum*, *Rhizoma arisaematis*, *Dioscorea bulbifera* L did not present growth inhibition effect on HCT116 and SW480 in this study. **CONCLUSION** Gamboges, Sodium cantharidinate, Sodium arsenic and Cinobufacini can effectively inhibit the growth of human colon cancer cells developing from different genetic pathways. Gamboges, Sodium cantharidinate and Cinobufacini may specifically against MMR-deficient human colon cancer cells.

**KEY WORDS:** toxic Chinese medicines; human colon cancer; HCT116; SW480; MTT

结、直肠癌是世界范围内导致癌症死亡的主要原因之一, 进展期结、直肠癌除手术外还需进行辅助

治疗<sup>[1]</sup>。氟尿嘧啶(FU)联合甲酰四氢叶酸(LV)目前仍是 III 期及选择性 II 期结、直肠癌的标准辅助

收稿日期: 2013-05-11; 修稿日期: 2013-06-15

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2008457); 南京中医药大学校基础研究和重点培育基金项目(09XPY01)

作者简介: 竺平(1978-), 男, 江苏南京人, 南京中医药大学讲师, 本校 2011 级博士研究生。\* 通信作者: gyunfei127@126.com

化疗方案<sup>[2]</sup>。近年来研究发现约 80%~85% 的结、直肠癌的发生源自染色体不稳定(Chromosomal instability, CIN), 另外约 15%~20% 左右的原发性结、直肠癌系由错配修复基因缺失(Defective DNA mismatch repair, dMMR)所致<sup>[3]</sup>, 后者错配修复蛋白表达下降、不表达或出现截短, DNA 复制错误增加, 微卫星不稳定(Microsatellite instability, MSI)而致结、直肠癌及其它肠外肿瘤的发生。临床研究表明与单纯手术相比, FU/LV 方案并不能提高甚至可能降低 dMMR 结、直肠癌患者的无病生存率<sup>[3-4]</sup>。因此寻找可特异性针对不同发生途径结、直肠癌的有效药物已成为当务之急。近年来, 随着对中草药研究的深入, 已报道有抗癌作用的约 500 种, 其中常用的约 100 余种<sup>[5]</sup>, 我们从中筛选出白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、藤黄、天南星、黄药子、华蟾素、斑蝥酸钠及亚砷酸氯化钠这 10 种确实具有抗肿瘤作用的有毒中药或中药化合物对不同发生途径人结肠癌细胞 HCT116(错配修复基因 hMLH1 缺失结肠癌细胞株)和 SW480(错配修复基因正常的结肠癌细胞株)进行体外干预, 并用 MTT 法检测 2 种细胞的生长抑制情况, 为进一步开发针对不同发生途径结、直肠癌的新型靶向制剂提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂

Multiskan spectrum MSS1500-320 酶标仪、3111 型细胞培养箱: Thermo Electron 公司; SW-CJ-IF 超净台: 苏州安泰空气技术有限公司; XSZ-D2 倒置显微镜: 重庆光学仪器厂; 1-15K 低温离心机: Sigma 公司。RPMI-1640 培养基: 美国 Gibco 公司; 胎牛血清、噻唑蓝(MTT): 美国 Sigma 公司。人结肠癌细胞 HCT116 及 SW480: 中国科学院上海细胞生物研究所; 亚砷酸氯化钠: 黑龙江哈尔滨医大药业有限公司, 批号: H20030347; 华蟾素注射液: 安徽金蟾生化股份有限公司, 批号: Z34020273; 斑蝥酸钠: 贵州金桥药业有限公司, 批号 H52020602; 藤黄、白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、黄药子、天南星: 南京中医药大学附属医院药剂科。

### 1.2 细胞培养

HCT116 和 SW480 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

## 2 实验方法

### 2.1 药物的粗提和制备

1) 白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、黄药子提取物的制备。分别取药材 200 g, 依次用 8 倍量、6 倍量的 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 浓缩得醇提物, 药渣依次用 8 倍量、6 倍量的蒸馏水回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 浓缩得水提物。将醇提物与水提物合并, 稀释至 200 mL, 得总提取物, 生药量为 1 g/mL。取总提取物 100 mL, 加蒸馏水稀释至 500 mL, 离心(转速 3 000 r/min, 离心 10 min), 取上清液, 得浓度为 0.2 g/mL 的药液。

2) 天南星提取物的制备。取天南星 200 g, 按白花蛇舌草项下提取, 得总提取物, 生药量为 1 g/mL。取总提取物 100 mL, 加蒸馏水稀释至 500 mL, 盐酸调 pH 至 4.5, 离心(转速 3 000 r/min, 离心 10 min), 取上清液, 得浓度为 0.2 g/mL 的药液。

3) 藤黄提取物的制备。取藤黄 200 g, 依次用 8 倍量、6 倍量的 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 用蒸馏水稀释至 200 mL, 得醇提取物。取醇提取物 100 mL, 加蒸馏水稀释至 500 mL, 调 pH 至 8, 离心(转速 3 000 r/min, 离心 10 min), 取上清液, 得浓度为 0.2 g/mL 的药液。

实验时中药提取物以上述浓度为基准, 稀释成终浓度为 0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10 μg/mL 的药液, 中药化合物以原液浓度为基准, 分别稀释成相应浓度。

### 2.2 MTT 检测法

取对数生长期 HCT116 细胞和 SW480 细胞配制成密度为 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup> 细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 4 × 10<sup>3</sup> 个细胞, 加入不同浓度的待测药物。实验分为空白对照组和 6 个浓度梯度的药物组, 以不含细胞的 RPMI 1640 培养液为空白对照组, 培养 72 h 后, 每孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h, 弃上清后, 加入 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)原液, 振荡 10 min, 待结晶完全溶解后, 在酶标仪 570 nm 处测定吸光度 A 值。实验至少重复 2 次, 每次 3 个复孔。按以下公式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白对照组 } A_{570} - \text{化合物组 } A_{570}}{\text{空白对照组 } A_{570}} \times 100\%$$

### 2.3 统计学方法

使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计数资料用 % 表示, 2 组间比较采

用独立样本 *t* 检验,确定  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

### 3 结果

藤黄提取物,中药化合物中的亚砷酸氯化钠、斑蝥酸钠和华蟾素在实验浓度下干预 72 h 后对人结肠癌细胞 HCT116 及 SW480 的增殖有抑制作用,结果见图 1。实验浓度的白花蛇舌草、雷公藤、天南星、龙葵、重楼和黄药子作用于 2 种细胞 72 h 后无明显增殖抑制作用,结果见表 1、表 2。计算藤黄、亚砷酸氯化钠、斑蝥酸钠和华蟾素的半数抑制浓度值 ( $IC_{50}$ ),结果见表 3。藤黄、斑蝥酸钠和华蟾素干预 HCT116 细胞和干预 SW480 细胞的  $IC_{50}$  值之间比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),亚砷酸氯化钠干预两细胞的  $IC_{50}$  无统计学差异 ( $P > 0.05$ ),结果见图 2。以上实验结果提示进行筛选的药物中藤黄、斑蝥酸钠、华蟾素、亚砷酸氯化钠可有效抑制人结肠癌细胞 HCT116 和 SW480 的增殖,藤黄、斑蝥酸钠和华蟾素对 HCT116 细胞的抑制作用要好于对 SW480 的,而亚砷酸氯化钠对 2 种细胞的作用相似。

药及中药化合物,均已被证明具有抑制多种实体肿瘤生长的作用,但目前尚缺乏特异性针对结、直肠癌,特别是染色体不稳定和微卫星不稳定这 2 条结、直肠癌不同发生途径作用机制的研究。

表 1 白花蛇舌草等 6 种药物对 HCT116 细胞的增殖抑制率(%)

浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	白花蛇 舌草	雷公藤	天南星	龙葵	重楼	黄药子
0.312 5	-6.3	-3.1	-3.8	-14.8	-16.4	-28.0
0.625 0	1.3	9.4	1.5	0.65	-2.8	-24.0
1.250 0	-6.9	4.9	5.9	8.5	1.9	-19.8
2.500 0	-11.6	-3.3	-1.2	19.6	11.1	-13.4
5.000 0	3.2	7.1	6.1	20.9	21.5	43.4
10.000 0	21.5	-8.2	22.7	36.5	59.3	84.5

表 2 白花蛇舌草等 6 种药物对 SW480 细胞的增殖抑制率(%)

浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	白花蛇 舌草	雷公藤	天南星	龙葵	重楼	黄药子
0.312 5	-6.9	-6.9	-4.7	9.9	16.4	3.6
0.625 0	-9.5	-5.6	-0.5	5.6	0	2.7
1.250 0	1.0	-5.1	5.5	17.5	15.2	28.1
2.500 0	12.5	11.0	6.4	19.1	27.3	40.0
5.000 0	21.2	7.0	22.4	67.1	60.0	56.0
10.000 0	28.7	15.4	32.4	83.2	58.2	47.2

表 3 斑蝥酸钠等 4 种药物干预 HCT116 细胞和 SW480 细胞的  $IC_{50}$  值( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

药物	HCT116 细胞	SW480 细胞
斑蝥酸钠	1.51 ± 0.01	2.16 ± 0.04
华蟾素	1.96 ± 0.71	29.38 ± 3.78
藤黄	1.75 ± 0.13	3.13 ± 0.70
亚砷酸氯化钠	3.32 ± 0.39	3.14 ± 0.21

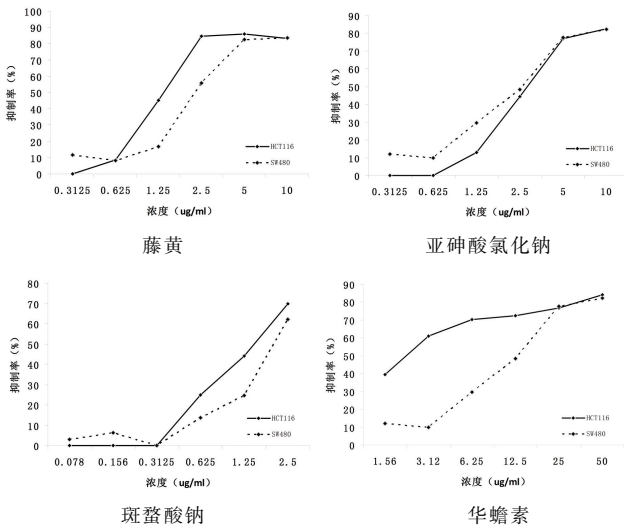


图 1 不同浓度藤黄、亚砷酸氯化钠、斑蝥酸钠、华蟾素分别干预 HCT116 细胞及 SW480 细胞 72 h 后的生长抑制情况

### 4 讨论

祖国医学认为癌瘤多为毒陷邪深,非攻不克,故治疗常用有毒之品,借其性峻力猛以攻邪,此即为中医药学“以毒攻毒”的医理和治则,现代临床广泛应用的化疗药,亦多属于“以毒攻毒”的范畴。随着现代分子生物学技术的发展,有毒中药抗肿瘤作用的机制得到了深入的研究,本研究采用的 10 种有毒中

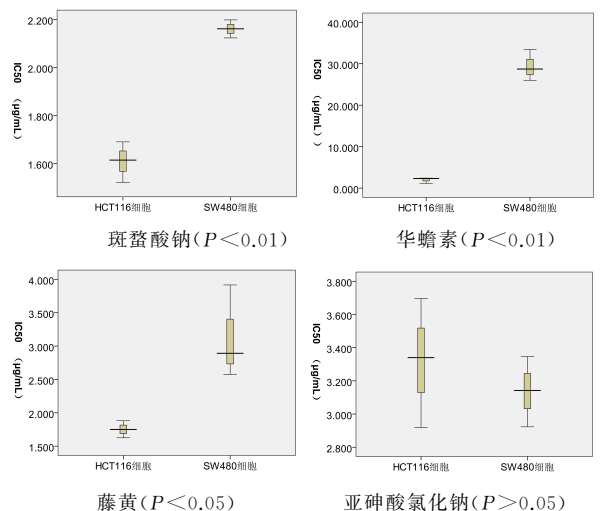


图 2 斑蝥酸钠、华蟾素、藤黄、亚砷酸氯化钠分别干预 HCT116 细胞及 SW480 细胞 72 h 后的  $IC_{50}$  值的比较

我们采用 MTT 法检测有毒中药影响结、直肠癌细胞增殖的情况,其原理是只有存活的细胞能使外源性的 MTT 还原为难溶的蓝色结晶物甲赞(formazan)并沉积在细胞中,在二甲亚砷中溶解显色,其浓度可用分光光度计测定出光密度值(A 值)。MTT 方法的优点为操作简便,费用低,重复性好,可批量实验,是目前最常使用的高通量的筛选方法。半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)是指在用药后存活的细胞数量减少一半时所需的药物浓度,作为反映药效的定量指标,在各种药物的筛选中广泛应用,已成为标志药物效应的一种重要定量指标<sup>[6]</sup>。

本研究发现白花蛇舌草、雷公藤、重楼、龙葵、天南星和黄药子这 6 种中药的提取物在初始实验浓度下对 HCT116 细胞和 SW480 细胞的抑制率较低,而相同浓度级别的藤黄、斑蝥酸钠、华蟾素及亚砷酸氯化钠则具有较高的抑制率,藤黄在 2.5 μg/mL 及以上浓度时对 HCT116 细胞和 SW480 细胞均有抑制作用,且其抑制率可以达到 80% 以上。斑蝥酸钠浓度在 2.5 μg/mL 时对 HCT116 细胞和对 SW480 细胞均有抑制作用,其抑制率可以达 60% 以左右。华蟾素浓度在 3.125 μg/mL 即对 HCT116 细胞产生抑制作用,且与浓度的增加正相关,呈浓度依赖性;在 50 μg/mL 方对 SW480 细胞产生抑制作用。亚砷酸氯化钠在 5 μg/mL 对 HCT116 细胞和 SW480 细胞产生抑制作用,呈浓度依赖性。通过计算并比较两细胞的 IC<sub>50</sub> 值,发现藤黄、斑蝥酸钠和华蟾素对 HCT116 细胞的 IC<sub>50</sub> 值小于对 SW480 细胞的 IC<sub>50</sub> 值,2 者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),

亚砷酸氯化钠干预两细胞的 IC<sub>50</sub> 无统计学差异( $P > 0.05$ )。以上结果提示筛选的 10 味有毒中药中藤黄、斑蝥酸钠、亚砷酸氯化钠及华蟾素可有效抑制不同途径的人结肠癌细胞的生长,其中斑蝥酸钠、华蟾素、藤黄可能具有特异性抗错配修复基因缺失所致结、直肠癌的作用,其作用机理有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Chung KY, Saltz LB. Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future directions[J]. Cancer J, 2007, 13(3): 192-197.
- [2] O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(1): 295-300.
- [3] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20): 3219-3226.
- [4] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(3): 247-257.
- [5] 李佩文.恶性肿瘤的术后治疗[M].北京:人民卫生出版社,2001:133.  
Li PW. Post-operation therapy of cancer[M]. Beijing: People's Medical publishing house, 2001:133.
- [6] 赵斌,葛金芳,朱娟娟,等.小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC<sub>50</sub> 的计算方法[J].安徽医药,2007, 11(09):834-836.  
Zhao B, Ge JF, Zhu JJ, et al. Argument for the calculating methods of IC<sub>50</sub> of inhibition rate by MTT[J]. Anhui Med Pharm, 2007, 11(09): 834-836.

(编辑:董宇)

#### · 投稿须知 ·

**标题、作者、单位和脚注** 来稿列出标题、作者姓名、工作单位(二级单位)、地名(省市、县)及邮政编码。论文署名不宜过多,应限于对该文能负责并解答有关问题者。不同工作单位的作者,应在姓名右上角加注阿拉伯数字序号,并在工作单位名称之前加与作者姓名序号相同的序号;通信作者应加注“\*”号上标。

首页脚注中注明[基金项目](注明项目名称及编号)、[作者简介](第一作者出生日期、性别、籍贯、职称、学历等)、[通信作者](Tel, Fax 或 E-mail)。