

抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 陆茵, 李璘, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静, 南京中医药大学第三附属医院, 全国肛肠医疗中心, 江苏省南京市 210001
陆茵, 李璘, 南京中医药大学海洋药物研究所 江苏省南京市 210029
刘秀芳, 南京中医药大学研究生, 主要从事肿瘤遗传学方面的研究。
国家自然科学基金资助课题, No. 30572447
南京市医学发展重点项目资助课题, No. ZKX05028
通讯作者: 金黑鹰, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院, 全国肛肠医疗中心。
jinheiyang@yahoo.com.cn
电话: 025-86626137-6217 传真: 025-86627364
收稿日期: 2007-03-08 接受日期: 2007-04-21

Inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on a mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line

Xiu-Fang Liu, Hei-Ying Jing, Yi-Jiang Ding, Yin Lu, Lin Li, Shu-Qing Ding, Fei Liu, Min Ni, Jing Wang

Xiu-Fang Liu, Hei-Ying Jing, Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding, Fei Liu, Min Ni, Jing Wang, National Center of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China
Yin Lu, Lin Li, the Ocean Drug Institute of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572447 and the Key Project of Medicine Development of Nanjing City, No. ZKX05028
Correspondence to: Hei-Ying Jing, National Center of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, No. 1 Jingling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiyang@yahoo.com.cn
Received: 2007-03-08 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To study the inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on the mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line.

METHODS: Fourteen Chinese herbs were used to treat the hMSH2-deficient colorectal cancer Lovo cell line and mismatch-repair-gene-deficient colorectal SW480 cell line, and growth

rate was evaluated by the MTT method. The microsatellite instability change was examined by multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: Tea polyphenols, orindonin, baicalin and andrographolide had obvious inhibition effects on colorectal cancer cell lines. The effects of orindonin, tea polyphenols and baicalin on the Lovo cell line were better than on SW480 cells. In particular, the effect of baicalin on Lovo cells was five times better than that on SW480 cells, but the effect of andrographolide on SW480 cells was better than that on Lovo cells. The proliferation rate of the two cell lines was low after resveratrol, aloin, tanshinone IIA and curcumin treatment, and increasing drug concentration had no effect. These results demonstrated that epimedium brevicornum and the other five drugs had no inhibitory effect on the two cell lines, but they did have a proliferative effect. The microsatellite instability had no changes in the different drug group concentrations.

CONCLUSION: Chinese herbs with anti-mutation effects, such as orindonin, tea polyphenols and baicalin, exert an inhibitory effect on mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell lines. These effects are independent of the dose and duration of exposure. The mechanism may result from some yet unknown factors.

Key Words: Chinese herbs; Anti-mutation effect; Colorectal cancer; Mismatch repair; MTT assay; Multiplex fluorescent polymerase chain reaction; *In vitro*

Liu XF, Jing HY, Ding YJ, Lu Y, Li L, Ding SQ, Liu F, Ni M, Wang J. Inhibitory effect of Chinese herbs with anti-mutation activity on a mismatch-repair-gene-deficient colorectal cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(20):2201-2204

摘要

目的: 研究抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用。

■背景资料

HNPCC即遗传性非息肉性结直肠癌, HNPCC发生的分子遗传学基础是由于错配修复基因的生殖系突变, 当携带突变的等位基因体细胞的另一个等位基因发生突变, 导致该细胞中错配修复功能缺失, DNA复制时错配增加, 基因组DNA微卫星序列发生延长或缩短, 即发生微卫星不稳定(MSI), 从而使该细胞向肿瘤细胞发展。

■相关报道

目前国外报道,非甾体类药物如阿司匹林作用于错配修复基因缺失细胞可通过修复其错配修复基因功能而诱导肿瘤细胞凋亡,本文出发点在于从部分具有抗突变作用的中草药中筛选可以诱导错配修复基因缺失细胞(Lovo细胞株)凋亡的单体成分,从而为下一步的研究作基础。

方法: 使用具有抗突变作用的14种中药(冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷等)处理hMSH2缺失结肠癌细胞株Lovo细胞和错配修复基因正常的结肠癌细胞株SW480细胞,采用MTT法观察细胞的增殖情况。多重荧光聚合酶链式反应(PCR)方法检测各浓度时Lovo细胞微卫星不稳定变化。

结果: 冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷对Lovo细胞和SW480细胞有明显的抑制作用。冬凌草甲素、茶多酚和黄芩苷对Lovo细胞的抑制作用优于SW480细胞,特别是黄芩苷对Lovo细胞作用为SW480细胞的5倍,差异有显著意义。穿心莲内酯对SW480细胞的作用优于Lovo细胞,差异具有有显著意义。白藜芦醇、芦荟苷、丹参酮IIA、姜黄素4种中药成分作用于这2种细胞后,增殖抑制率较低,且加大药物浓度,增殖抑制率也无明显变化。仙灵脾等6种单味中药对2种细胞不但无明显抑制作用,反而显示有生长促进作用。另在各浓度,Lovo细胞微卫星均没有明显改变。

结论: 茶多酚和黄芩苷等具有抗突变作用的中药具有抑制错配修复基因缺失结直肠癌细胞的作用,其作用与剂量无关。

关键词: 中药; 抗突变作用; 结肠癌; 错配修复; MTT法; 多重荧光聚合酶链式反应; 体外实验

刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江, 陆茵, 李璘, 丁曙晴, 刘飞, 倪敏, 王静. 抗突变中药对错配修复基因缺失结直肠癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(20):2201-2204

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2201.asp>

0 引言

结直肠癌根据其分子病理的不同可以分为微卫星不稳定结直肠癌(MSI)和染色体不稳定结直肠癌(CIN)。MSI结直肠癌是由于错配修复基因体细胞突变或种系突变导致的结直肠癌,其典型的遗传学模型为遗传性非息肉肉性结直肠癌(HNPCC); CIN结直肠癌是由于APC基因体细胞突变或种系突变导致的结直肠癌,其典型的遗传学模型为家族性腺瘤性息肉肉(FAP)。MSI结直肠癌发生是由于错配修复基因发生缺失或功能下降,导致DNA复制错误增加,微卫星不稳定而使肿瘤发生。因此MSI结直肠癌发生的始动因素是DNA复制错误增加,导致机体中功能基因、特别是抑癌基因的功能缺失,MSI结直肠癌发生的最突出的特征为基因突变的增加^[1-2]。因此我们推论,抗突变药物具有抗结直肠癌肿瘤

的活性。许多中药具有抗基因突变的作用。在本试验中,我们观察了14种在文献报道中具有抗突变功能中药单体成分或水煎剂对错配修复基因缺失细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Lovo细胞(hMSH2缺失结肠癌细胞株)、SW480细胞(错配修复基因正常的结肠癌细胞株)购自南京中医药大学细胞库。白藜芦醇、穿心莲内酯、冬凌草甲素、黄芩苷、芦荟苷、丹参酮IIA、茶多酚和姜黄素购自中国药品生物制品鉴定所标准品。仙灵脾,白术,半枝莲,生地,仙鹤草由本院提供。常规方法培养细胞,2-3 d传代。

1.2 方法 取对数生长期细胞调整细胞密度至 5×10^4 个/L,加入96孔细胞培养板,每孔200 μ L,置37℃,50 mL/L CO₂培养24 h,弃培养基,加入含不同浓度药物的培养基,另设培养基空白对照,每组4个重复,继续培养24 h,培养终止前4 h,每孔加5 g/L的MTT 20 μ L,培养终止,弃上清,每孔加100% DMSO 200 μ L,振荡器振荡10 min,酶标仪490 nm读取A值,计算细胞增殖抑制率=(1-加药孔A值/对照孔A值)×100%,另Lovo细胞微卫星不稳定变化按第一部分实验方法抽提培养细胞的DNA,以多重荧光PCR方法检测各浓度时Lovo细胞微卫星不稳定变化。

2 结果

中药单体成分中,冬凌草甲素、茶多酚、穿心莲内酯和黄芩苷对Lovo细胞和SW480细胞有明显的抑制作用。冬凌草甲素、茶多酚和黄芩苷对Lovo细胞的抑制作用优于SW480细胞,特别是黄芩苷对Lovo细胞作用为SW480细胞的5倍,差异有显著意义。穿心莲内酯对SW480细胞的作用优于Lovo细胞,差异均有显著意义(图1)。白藜芦醇、芦荟苷、丹参酮IIA、姜黄素4种中药成分作用于这2种细胞后,增殖抑制率较低,且加大药物浓度,增殖抑制率也无明显变化。仙灵脾,白术,半枝莲,白菊花,生地,仙鹤草作用于Lovo和SW480两种细胞株后不但无明显抑制作用,反而显示有生长促进作用。另在各浓度,Lovo细胞微卫星均没有明显改变。

3 讨论

多基因的突变是错配修复基因缺失结直肠癌的重要特征,通过调节错配修复基因表达可以

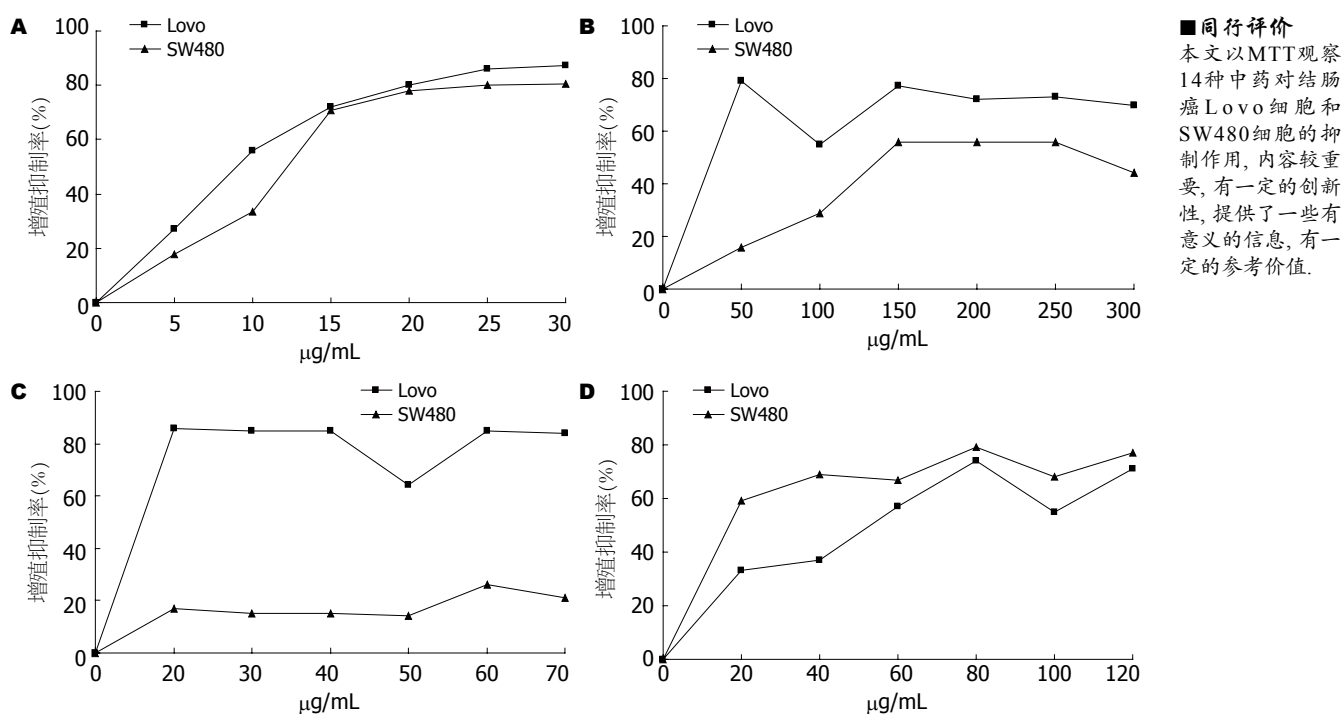


图 1 4种中药单体对结肠癌细胞的增殖抑制率. A: 冬凌草甲素; B: 茶多酚; C: 黄芩苷; D: 穿心莲内酯.

抑制错配修复基因缺失细胞的生长, 诱导细胞凋亡. 通过在HCT-116细胞和Lovo细胞中转入hMLH1或hMSH2基因的cDNA质粒可以提高hMSH2和hMLH1基因的表达, 导致该细胞发生凋亡, 减少细胞中的MSI及降低细胞自发性突变的效果. Ruschoff *et al*^[3]用阿司匹林对HCT-116细胞(hMLH1缺失)和Lovo细胞(hMSH2缺失)进行干预, 发现阿司匹林可以降低这2株细胞的微卫星不稳定, 导致细胞凋亡. 但是研究发现70% HNPCC结肠癌中COX-2基因呈低表达. Goel *et al*^[4]在HCT-116细胞、HCT-116+chr3细胞和SW480细胞加入阿司匹林, 发现这3株细胞在48和72 h可以发生凋亡, 而且这3株细胞hMLH1, hPSM2, hMSH6和hMSH2基因表达均提高, 作者认为阿司匹林抑制MMR结肠缺失的结直肠癌细胞是通过提高错配修复基因的表达诱导错配修复基因缺失的结直肠癌细胞的凋亡. 因此我们推论, 通过抗突变可以抑制错配修复基因缺失结直肠癌、诱导细胞凋亡.

中药的抗突变作用研究目前已取得重要的进展. 赵泽贞 *et al*^[5]对22种可食用中药进行研究发现蜂蜜、蜂王浆、蜂采花粉、柳芽、槐豆、桂圆、白菊花、山药及菱角9种显示对丝裂霉素C引起的致突变作用有拮抗效应, 而且均无致畸变作用. 用Ames试验平板掺入法研究75种中药, 发现椿根皮、石菖蒲、大黄有强烈的抗

突变作用, 甘草有抗移码型和置换型基因突变作用, 而椿根皮、大黄、地鳖虫等有抗移码型突变力^[6-7]. 赵浩如 *et al*研究显示从白花蛇舌草水溶液提取物可以显著抑制S-180实体瘤的生长, 且抑瘤率超过40%^[8]. 本试验选取抗突变作用强、同时具有抗肿瘤作用的14味中药作为研究对象. 其中白藜芦醇, 穿心莲内酯, 冬凌草甲素, 黄芩苷, 芦荟苷, 丹参酮II A, 茶多酚, 姜黄素等采用中药单体成分进行研究, 而仙灵脾、白术、半枝莲、白菊花、生地 and 仙鹤草等中药采用中药水煎剂进行研究. 研究模型采用hMSH2缺失的Lovo细胞作为研究对象, 以错配修复功能正常的SW480结肠癌细胞作为对照组以比较在治疗结果之间的差异. 对结直肠癌细胞的抑制作用采用MTT方法, 该方法是由Mosmann^[9]于1983年建立, 基本原理是黄色的四甲基偶氮唑盐(MTT)能被活细胞线粒体上的琥珀酸脱氢酶转化成兰紫色的甲赞颗粒, 颗粒溶解后, 其浓度可用分光光度计测定出吸光度值(A值), A值的大小与活细胞数呈正相关. 本研究发现, 冬凌草甲素对Lovo细胞和SW480细胞均有抑制作用, 且其抑制率可以达到80%以上, 当其浓度超过20 mg/L后其抑制率不在随浓度的上升而提高. 冬凌草甲素对Lovo细胞抑制作用略高于对SW480细胞, 但差异无显著意义. 提示冬凌草甲素可能通过Lovo细胞和SW480细胞共同的作用靶点发

挥作用, 目前研究认为冬凌草甲素可能通过影响细胞凋亡基因诱导细胞凋亡^[10]。

茶多酚对Lovo细胞的作用明显高于对SW480细胞作用, 特别在50 mg/L的浓度即达到80%左右的抑制率, 而且其效果不随浓度的升高而升高。而对SW480细胞的研究中发现, 其抑制率较低, 最高抑制率为59%, 与Lovo相比差异有显著意义。提示茶多酚可能通过Lovo细胞特殊途径发挥作用。与茶多酚类似的还有黄芩苷, 该药物在20 mg/L的浓度即对Lovo细胞达到85%以上的抑制率, 而且随药物浓度增加抑制率无明显升高。提示茶多酚和黄芩苷可能是通过相同的作用途径作用于MSI结直肠癌。但是我们对茶多酚和黄芩苷作用的细胞进行微卫星不稳定检测, 均无明显变化。可能与本组研究的相对时间较短有关。Ruschoff *et al*^[3]研究观察微卫星不稳定状态, 其细胞处理时间为112 d, 但本组曾尝试进行长时间的培养, 但是药物处理组细胞不易长时间存活, 因此拟在下一步动物实验时来进行进一步的研究和分析。

穿心莲内酯对SW480细胞的影响高于对Lovo细胞的影响, 其差异有显著意义。提示穿心莲内酯可能是通过SW480细胞所特有的信号转导途径抑制结直肠癌细胞的生长。文献报道穿心莲对结直肠癌细胞有抑制作用, 但是其机制目前尚不清楚。白藜芦醇, 芦荟苷, 丹参酮IIA, 姜黄素4个中药单体对2种细胞作用的抑制率较低, 与其他一些文献的报道有一定差异。本组将进一步对其进行研究, 特别是丹参酮IIA在水中溶解度较低, 目前研制的丹参酮IIA磺酸盐其水溶性, 将进一步进行研究。

本研究中的仙灵脾, 白术, 半枝莲, 白菊花, 生地, 仙鹤草等6味中药进行研究均对Lovo细胞和SW480细胞无抑制作用, 而且部分中药对结直肠癌细胞有促进增殖的作用, 通过加大处理浓度其抑制率无明显增加。与文献[11-14]报道和中医临床有一定的差异。特别是半枝莲、仙鹤草、白术等是中医临床常用的抗肿瘤药物,

但是在本研究中其无明显的抑制肿瘤增殖的作用, 其机制尚需要进一步研究。单味中药在中医临床中较少使用, 在中医临床中强调复方的相互作用, 而单味中药并不符合中医方剂配伍的理论。下一步的研究中, 我们拟使用在临床中以确实有效的抗肿瘤的复方药进行细胞学的研究, 以观察其价值。

4 参考文献

- 1 金黑鹰, 严宏利. 遗传性非息肉病性结直肠癌. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 79-99
- 2 Olschwang S, Laurent-Puig P, Eisinger F, Millat B. An alternative to prophylactic colectomy for colon cancer prevention in HNPCC syndrome. *Gut* 2005; 54: 169
- 3 Ruschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, Bocker T, Brockhoff G, Hofstadter F, Fishel R. Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11301-11306
- 4 Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 383-390
- 5 赵泽贞, 魏丽珍. 22种可食性中药材的抗突变和致突变同步快速试验报告. 癌变·畸变·突变 2000; 12: 87-89
- 6 张世敏. 中药抗突变实验研究进展. 中国中医药信息杂志 2003; 10: 83-85
- 7 赵凤鸣, 邵山, 王明艳, 许冬青. 中药抗突变作用机制研究概况. 安徽中医学院学报 2003; 22: 59-60
- 8 崔健, 施松善, 王顺春, 王峥涛, 林景超. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展. 上海中医药杂志 2005; 39: 57-59
- 9 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
- 10 杨胜利, 韩绍印, 张巧, 宋爱云, 丁兰萍, 宫亚欧, 张覃沐. 冬凌草甲素抗突变性研究. 癌变·畸变·突变 2001; 13: 8-9
- 11 王锦菊, 王瑞国. 白术及其复方抗肿瘤研究进展. 中国中医药信息杂志 2004; 11: 927-928
- 12 彭伟文, 吴惠妃, 曾聪彦, 张瑜, 钟希文. 半枝莲的药理及临床应用研究概况. 时珍国医国药 2003; 14: 428-429
- 13 张东, 邬国栋, 张述禹. 仙鹤草的药理和临床研究新进展. 中国药业 2004; 13: 79-80
- 14 王春霞. 菊花化学成分的研究进展. 中药材 2004; 27: 224-226

编辑 何燕 电编 张敏