

金荞麦体外抑制肿瘤细胞生长的研究

Pui-Kwong Chan

(Department of Pharmacology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX, 77030 USA)

[摘要] 目的 金荞麦 [*Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn] 在中国长期以来一直用于治疗肺部的各种疾病, 包括肺癌。本研究主要探讨金荞麦是否对其它器官具有疗效。方法 取 10 种来源于不同组织器官的人体癌细胞, 研究金荞麦对这些癌细胞生长的影响。结果 金荞麦对来源于肺、肝、结肠、白细胞和骨骼的癌细胞的生长具有抑制作用; 而来源于前列腺、子宫、卵巢及脑的癌细胞对金荞麦不敏感; 金荞麦提取物能刺激乳腺癌细胞 (MCF-7) 的生长。金荞麦和道诺霉素对人肺癌细胞 (H460) 的生长呈现协同抑制作用。用 2D-凝胶蛋白电泳的方法对经金荞麦处理后的 H460 细胞蛋白进行分析, 发现金荞麦能诱导某种蛋白 (M. W. /pI = 20 K/5.9) 的出现。用高效液相色谱 (HPLC) 法分析金荞麦提取物, 鉴定出 4 种主要成分和 20 种次要成分。结论 金荞麦对来源于某些特定器官的肿瘤细胞系的生长具有抑制作用。

[关键词] 肿瘤; 金荞麦; 人类器官

[中图分类号] R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2003)02-0128-04

Inhibition of tumor growth in vitro by the extract of *Fagopyrum cymosum*

Pui-Kwong Chan

(Department of Pharmacology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX, 77030 USA)

[ABSTRACT] **Objective** *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn has long been used in China to treat various ailments of the lung, including lung tumors. This study investigated whether *Fagopyrum cymosum* extract (Fago-c) has effects on other organs. **Methods** Human cancer cells derived from 10 different organs were employed, and their growths as affected by Fago-c were investigated. **Results** It was found that the growth of cancer cells from lung, liver, colon, leukocytes and bone is inhibited by Fago-c. However, cancer cells derived from prostate, cervix, ovary and brain are not sensitive to Fago-c, and the extract stimulates the growth of cancer cells from breast (MCF-7). Synergistic inhibition effect of Fago-c and daunomycin was observed in human lung cancer cells (H460). Cellular proteins from H460 cells treated with Fago-c were analyzed by 2D-gel electrophoresis. A protein (M. W. /pI = 20 K/5.9) was induced. The Fago-c extract was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Four major and twenty minor components were identified. **Conclusion** These studies indicate the effect of Fago-c in inhibiting the growth of cell lines derived from certain organs.

[KEY WORDS] tumor; *Fagopyrum cymosum*; human organs

[J Chin Integr Med, 2003, 1(2):128-131]

金荞麦是蓼科荞麦属植物的一种。荞麦在中亚及欧洲很常见, 然而其最初源于中国^[1], 具有悠久的药用传统。据中国文献报道, 金荞麦对包括肺癌在内的肺部疾患具有显著的疗效^[2~4]。另有报道发现, 金荞麦的提取物具有抗炎作用^[5]。

传统中医学认为, 每种药物都是针对人体内某个特定器官起作用的, 但其作用机制尚不清楚。我们所观察到的药物对某种器官产生的作用, 可能是与其它器官相互作用的结果。因此, 了解一种草药对某个器官的作用, 可能有利于了解复杂的免疫-神经-激素反应。目前还缺乏关于金荞麦对不同器官作用的研究。在本研究中, 我们选取不同组织器官来源的癌细胞, 观察其对金荞麦的反应。结果表明, 金荞麦具有选择性抑制细胞生长的作用; 金荞麦

与抗肿瘤药道诺霉素具有协同作用。金荞麦处理癌细胞后, 可能通过特异地作用于细胞中的某些特定蛋白而起到治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 药物和试剂 金荞麦提取物由美国纽约国际中草药制剂公司提供。此品在室温下很稳定, 当溶于乙醇及乙腈等有机溶剂中, 仍可保留其活性。道诺霉素 (Daunomycin)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、表儿茶素 [(-)-epicatechin, EC]、表没食子儿茶精-没食子酸盐 (epigallocatechin Gallate, ECGC)、槲皮素 (quercetin) 及单核细胞直接细胞毒性测定 (mononuclear cell direct cytotoxicity assay, MTT) 试剂均购自美国 SIGMA 公司。两性电介质 R (ampholine R) 由

Pharmacia 提供。其它化学药品均为试剂纯。

1.2 细胞 人类癌细胞系由 American Type Culture Collection 提供,包括 HeLa-S3 癌细胞(子宫颈)、DU145 癌细胞(前列腺)、H460 癌细胞(肺)、MCF-7 癌细胞(乳房)、K562 癌细胞(白细胞)、HCT116 癌细胞(结肠)、HepG2 癌细胞(肝)、U2OS 癌细胞(骨骼)、T98G 癌细胞(脑)及 OVCAR-3 癌细胞(卵巢)。各种癌细胞均在含 10% 胎牛血清、谷氨酸盐及抗生素的培养基中生长 [HeLa-S3、DU145、MCF-7、HepG2、T98G 用 MEN (Earle's salts); H460、K562、OVCAR-3 用 RPMI-1640; HCT116、U2OS 用 McCoy-5A], 并置于 CO₂ 浓度为 5% 的 37℃ 培养箱中培养。

1.3 MTT 试验 MTT 试验在原方法^[6]的基础上仅做了很小的改动。用药前,将癌细胞置于 96 孔的培养板中培养 24 h, 其中 HeLa-S3、H460、HCT116、T98G、OVCAR-3 为 10 000 个/孔, DU145、MCF-7、HepG2、U2OS 为 15 000 个/孔, K562 为 40 000 个/孔。然后加入药物共同培养 48 h (HepG2、U2OS 为 72 h, MCF-7 为 96 h)。经药物处理后,再加入 0.5 mg/ml 的 MTT 培养 1 h。用二甲亚砜(DMSO)溶解甲臞结构(formazan, 细胞繁殖产生的四唑类代谢产物),在 490 nm 处用 ELISA 读数器测定光密度(O. D.)值。细胞在用药前的 MTT 水平经测定记为 T₀。细胞生长率记为 %G, 其计算公式为: %G = (TD - T₀/TC - T₀) × 100。其中 TC 或 TD 代表对照组或药物治疗组的 O. D. 值。当 T₀ > TD 时,对照组的细胞毒性(LC)用百分比%来表示,计算公式为: %LC = (TD - T₀/T₀) × 100。

1.4 金荞麦组分 HPLC 柱层析 用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)柱层析分析金荞麦的成分。用 10% 乙腈及 0.005% 三氟乙酸(平衡溶液)平衡 A C-18 反相柱(水 P/N 27324)。上柱前将金荞麦溶于平衡溶液中。随着乙腈的浓度增加到 25% (0~50 min), 随后又增至 80% (50~60 min), 金荞麦成分被析出(流速为 0.8 ml/min)。在 280 nm 波长处测定其析出成分。

1.5 双向凝胶(2D-gel)电泳 (1) 样本处理: 癌细胞经药物处理后,溶解于 50 mmol/L 缓血酸胺(Tris)及 pH 8.0 3% SDS-1% β-巯基乙醇溶液。细胞悬液用 RNA 酶(25 μg/ml)和 DNA 酶(100 μg/ml)在 20℃ 的条件下消化 10 min。细胞悬液中加入 1 μl/ml 的亮肽菌素(leupeptin)(5 mg/ml)和 PMSF(异丙醇饱和溶解)。使用前样本置于 20℃ 下保存。(2) 等电聚焦凝胶的制备:按下述成分及最终

浓度混和制成等电聚焦(isoelectrofocusing, IF)凝胶: 46% 尿素、3.44% 丙烯酰胺、0.2% 2-丙烯酰胺、1.28% 缓冲液(pH 5~7)、0.64% 缓冲液(pH 3.5~10)、1.2% CHAP、0.4% NP-40、0.032% 二硫酸铵及 0.096% TEMED(N,N,N,N-tetramethylene-diamine)。使用之前,将凝胶置于 200 μl 的毛细管(0.17 cm × 11 cm)中,过夜进行聚合。(3) 电泳:在 IF 凝胶上点样之前,蛋白质样本用尿素(终浓度 8 mol/L)溶解。将蛋白质样本(50 μg)置于 IF 凝胶的基部。阳极溶液和阴极溶液分别是 10 mmol/L 的磷酸和 20 mmol/L 的碳酸氢钠。按下述方法进行等电聚焦电泳:在 100 伏特下电泳 1 h、200 伏特下电泳 1 h、300 伏特下电泳 2 h、400 伏特下电泳 4 h。等电聚焦电泳后,将凝胶从毛细管中取出后接受 SDS 凝胶(10%)电泳(在 BIO-RAD Protean II xi 2D 设备中进行)。电泳后,用硝酸银法对双向凝胶进行染色^[7]。

2 结果

2.1 金荞麦对细胞生长的影响 见图 1。

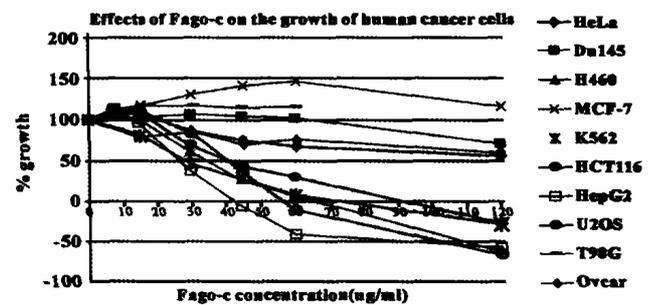


图 1 不同组织来源的人癌细胞在金荞麦作用下的生长曲线

图 1 示来源于不同器官的人癌细胞在不同浓度(15、30、45、60 及 120 μg/ml)金荞麦的作用下,48~96 h 后的生长曲线。正值表示与空白对照组相比的细胞生长百分率;负值表示在加入金荞麦之前,与空白对照组相比的细胞死亡百分率。如图所示,肝(HepG2)、白细胞(K562)、肺(H460)、结肠(HCT116)及骨骼(U2OS)来源的癌细胞的生长受到显著抑制,其中肝癌细胞最为敏感。使癌细胞的生长 50% 受到抑制(G₅₀)的金荞麦浓度范围大约为 25~40 μg/ml。而金荞麦对于 HeLa(子宫颈)及 OVCAR-3(卵巢)癌细胞的生长抑制作用则较弱(G₅₀ > 120 μg/ml)。对于前列腺癌细胞(DU145)与脑癌细胞(T98G)来说,只有当金荞麦的浓度超过 60 μg/ml,才对其生长产生抑制作用。另一方面,金荞麦能够促进乳腺癌细胞(MCF-7)的生长,其原因可

能是金荞麦中含有的植物类固醇物质与 MCF-7 细胞中的激素受体发生了相互作用。我们也注意到,当金荞麦浓度较低时(7.5~15 $\mu\text{g}/\text{ml}$),癌细胞(除 K562, DU145 以外)的生长有轻微的增长。

2.2 金荞麦与道诺霉素的协同抑制作用 图 2 示,在金荞麦与道诺霉素的共同作用下, H460(人肺癌细胞)的生长曲线。单用道诺霉素,当其浓度在 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间时,对于 H460 细胞的生长有抑制作用。当道诺霉素的浓度超过 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,则出现细胞死亡。对照组中,道诺霉素浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, H460 细胞的生长率分别为 86% 和 66%。金荞麦浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, H460 细胞的生长率与对照组相比分别为 60%、31.5% 及 7.1%;金荞麦浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,则对细胞的生长无抑制作用。金荞麦与道诺霉素共同作用于 H460 细胞时,能进一步地抑制细胞生长。金荞麦与道诺霉素联合应用的疗效要强于单用其中的一种。例如,0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的道诺霉素与浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的金荞麦共同作用于 H460 细胞,细胞的生长率分别为 36%、18% 和 3.8%,低于理论上道诺霉素与金荞麦的联合疗效(0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的道诺霉素和 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的金荞麦联合应用的理论疗效分别为 $86\% \times 60\% = 51.6\%$ 、 $86\% \times 31.5\% = 27\%$ 、 $86\% \times 7.1\% = 6.1\%$)。因此,金荞麦与道诺霉素对细胞生长的抑制具有协同作用。

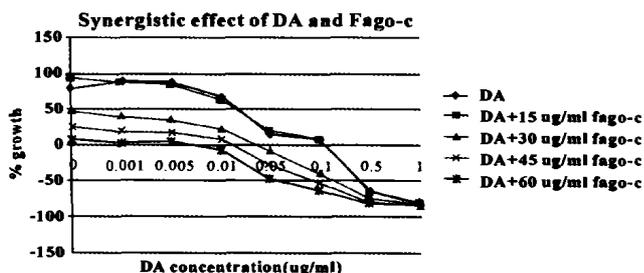


图 2 金荞麦与道诺霉素对 H460 细胞的协同抑制效应

2.3 双向凝胶(2D-gel)分析 用 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 金荞麦处理人肺癌细胞(H460)24 h 后,从细胞中提取蛋白并用双向凝胶电泳法进行分析。用银染的方法可清晰显示 200 多个蛋白点。样本中绝大多数蛋白的质量和数量均近似,只有少数蛋白有所差异。通过对于不同处理细胞进行多次双向电泳分析,我们发现经金荞麦处理后,有一种分子量大约为 20 000 道尔顿(daltons)及等电点(pI) = 5.9 的蛋白质呈持续增多(2~3 倍)。基于与对照组蛋白点强度进行比

较,以及参考了周围蛋白点的强度,我们发现了这种增多的蛋白(命名为 C1)。C1 的增多在金荞麦作用下更加明显,而经道诺霉素(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 h)处理后的细胞中, C1 只有少量的增多。

2.4 金荞麦成分的 HPLC 分析 将金荞麦溶于 10% 乙腈及 0.005% 三氟乙酸中,并用 C18 反相层析柱进行层析。随着乙腈浓度的增高(上升至 80%,见方法),金荞麦的成分被析出。图 3 为金荞麦的 HPLC 图谱。如图所示,可从金荞麦中析取并鉴别出大约 4 种主要成分和 20 种次要成分。

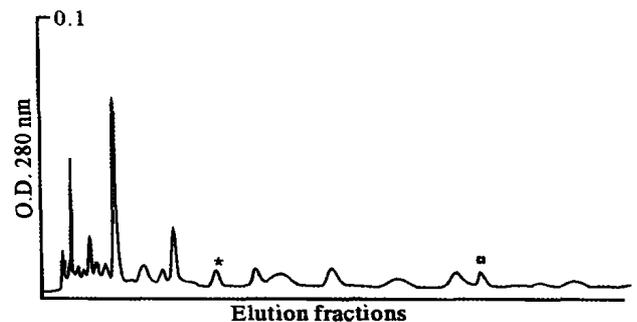


图 3 金荞麦提取物的 HPLC 图

注: * 为 EGCG 与(-)EC 的析出位置, □ 为槲皮素的析出位置。

3 讨论

金荞麦在中国作为医疗用药具有悠久的历史。传统中药学认为其能“清肺热”、“解毒”,提示其可能具有抗炎或抗增殖的功效,但机制尚未明确。我们的研究表明,金荞麦能抑制来源于包括肺在内的一些特定器官的肿瘤细胞系的生长。由于其公认的疗效,中国已生产出以金荞麦为原料的抗癌药品-威麦宁(WMN)。其治疗晚期肺癌患者的临床试验表明,WMN 无毒性作用,且能部分抑制肿瘤的生长(见国际出版书号 WO99/16319)。单用 WMN 治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的完全缓解(CR)和部分缓解(PR)的合率为 14.5%。WMN 配合放疗,(CR+PR)为 77.5%,高于单用放疗(50%)。WMN 配合化疗,(CR+PR)为 36.6%,高于单用化疗(16.6%)。以上结果表明,金荞麦联合放疗或化疗可以显著提高肺癌患者的缓解率。体外研究(图 2)表明金荞麦与道诺霉素起协同作用,这个结论与临床试验结果一致。

金荞麦含有多种成分(图 3),其活性成分已被提纯。其活性作用是否是多种成分的共同作用结果,目前尚不清楚。据报道,金荞麦提取物包括原矢车菊素(procyanidine dimmers B2、B4 和 C2)、EC、

EGCG、海可皂甙元(hecogenin)、槲皮素、 β -谷固醇(beta-sitosterol)、对-香豆酸(P-coumaric)及阿魏酸(ferulic acid)等成分^[5,8~11]。原矢车菊素属于浓缩鞣酸,是一种植物异聚体,具有多种抗癌生物活性^[12,13]。为研究金荞麦的活性与上述化合物之间的关系,我们用 MTT 分析方法检测了其中部分化合物的活性,发现(-)EC 和槲皮素对 H460 细胞无活性,而 EGCG 具有一定的活性($G_{50} = 80 \mu\text{g}/\text{ml}$),但其活性低于金荞麦。

金荞麦的作用机制及靶细胞尚不明确。我们发现,经过金荞麦治疗后,H460 细胞内一种特定的蛋白 C1 被激活。与道诺霉素相比,在金荞麦作用后,蛋白 C1 的增多更为明显,提示金荞麦的作用机制可能与道诺霉素不同。

【参考文献】

- 1 Wei YM. Buckwheat production in China[A]. In: Matano T, Ujihara A. Current Advances in Buckwheat Research[M]. vol. 2. Shinshu University Press, 1995. 7-10.
- 2 Gao Z, Meng FH. Effect of fagopyrum cymosum rootin in clonal formation of four human tumor cells[J]. Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih, 1993, 18(8): 498-500.
- 3 Liu WF, Song YM, Wang LZ, et al. Drug mechanism of Fagopyrum cymosum[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1981, 16(4): 247-251.
- 4 Xu GH, He TH, Zhou GH. Active ingredients of Fagopyrum cymosum[J]. Chinese Herbs, 1982, 13(4): 48.
- 5 Peng Y, Sun ZM, Xiao PG. Research and development

of Fagopyrum dibotrys[J]. Chinese Herbs, 1996, 27(10): 629-631.

- 6 Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing[J]. Cancer Res, 1987, 47(4): 943-946.
- 7 Sammons DW, Adams LD, Nishizawa EE. Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels[J]. Electrophoresis, 1981, 2: 135-141.
- 8 Liu YL, Fang Q, Zhang XQ, et al. Chemical constituents of Fagopyrum cymosum[J]. Yao Xue Xue Bao, 1983, 18(7): 545-547.
- 9 Saxena VK, Samaiya GC. A new acylated quercetin Cg-lycoside from the leaves of Fagopyrum cymosum[J]. Fitoterapia, 1987, 58: 421.
- 10 Yao RC, Huang MF, Wu YR. Activity constituents of anti-tumor from Fagopyrum cymosum[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1989, 11: 215-218.
- 11 Zhang WJ, Li XC, Liu YQ, et al. Phenolic constituents from fagopyrum dibotrys[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1987, 16: 354-356.
- 12 Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure and phytopharmaceutical applications [J]. Altern Med Rev, 2000, 5(2): 144-151.
- 13 Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants[J]. J Agri Food Chem, 1998, 46: 1887-1892.

【收稿日期】 2003-06-27 【本文编辑】 周庆辉 黄文华

(上接第 115 页)

河北省中西医结合学会 通讯地址: 050011 石家庄市富强大街 68 号

联系人: 董淑萍 电话: (0311) 5814762

内蒙古自治区中西医结合学会 通讯地址: 010020 呼和浩特市中山路 78 号 内蒙古卫生厅

联系人: 于连云 电话: (0471) 6939270

山西省中西医结合学会 通讯地址: 030012 太原市青年路 180 号

联系人: 宋明锁 电话: (0351) 2023577-2298, 4039503

辽宁省中西医结合学会 通讯地址: 110034 沈阳市皇姑区黄河北大街 60 号

联系人: 蒋淑媛 电话: (024) 86807998

吉林省中西医结合学会 通讯地址: 130012 长春市湖光路 32 号

联系人: 何莉 电话: (0431) 5513379-3888

黑龙江省中西医结合学会 通讯地址: 150001 哈尔滨市南岗区阿什河街 122 号

联系人: 韩志杰 电话: (0451) 3628864, 2528772

上海市中西医结合学会 通讯地址: 200040 上海市北京西路 1623 号 402 室

联系人: 张文菊 电话: (021) 62581714

江苏省中西医结合学会 通讯地址: 210029 南京市汉中

路 282 号

联系人: 李华 电话: (025) 6617284

浙江省中西医结合学会 通讯地址: 310007 杭州市天目山路 132 号

联系人: 顾佩芳 电话: (0571) 88082214-3410

安徽省中西医结合学会 通讯地址: 230031 合肥市梅山路安徽中医学院第一附属医院

联系人: 沈德凯 电话: (0551) 2821006-2013

福建省中西医结合学会 通讯地址: 350003 福州市古屏路 61 号

联系人: 肖钦朗 电话: (0591) 7824528

江西省中西医结合学会 通讯地址: 330077 南昌市文教路 221 号

联系人: 吴跃进 电话: (0791) 8511741, 8511921

山东省中西医结合学会 通讯地址: 250011 济南市青年东路 1 号

联系人: 于广梅 电话: (0531) 2626231

河南省中西医结合学会 通讯地址: 450004 郑州市城北路 7 号

联系人: 王凌云, 毛开颜 电话: (0371) 6348703, 6331768

(下转第 154 页)