

佐太对柔红霉素的增效作用

张婷^{1,2}, 贾雯靖^{1,2}, 岳会兰¹, 毕齐茂¹, 周国英¹, 赵晓辉^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 目的 考察佐太对柔红霉素在癌细胞中吸收富集、促癌细胞凋亡的增效作用。方法 选择 HN4、K562、HepG2 细胞, 设置佐太给药组、柔红霉素给药组、佐太联合柔红霉素给药组。给药后 24、48、72 h, 采用 HPLC-MS 法检测 3 种癌细胞内柔红霉素浓度, MTT、AnnexinV-FITC/PI 双染实验对比柔红霉素单独给药、联合给药后癌细胞凋亡情况。结果 佐太联合柔红霉素给药 48、72 h 后, 3 种癌细胞中药物浓度与单独给药比较有所增加; 给药 48、72 h 后, 佐太能增加柔红霉素对癌细胞的促凋亡效果。结论 佐太可促进柔红霉素进入癌细胞内部, 从而达到药物增效的作用。

关键词: 佐太; 柔红霉素; 增效作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)09-2500-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.043

佐太又称为“甘露精王”, 是藏医药的核心制剂和典型代表, 是由水银添加各种辅助药物后经过特殊复杂工艺加工炮制而得的一种具有独特作用的蓝黑色粉末制剂, 主要成分为硫化汞^[1-3]。藏医药理论认为, 佐太在复方药物中具有增强诸药疗效的作用, 是配制珍宝类药物必不可少的佐辅剂^[4-5], 许多知名的藏药复方中都含有佐太, 如七十味珍珠丸、仁青常觉、仁青芒觉等^[1,4,6], 相关制剂在治疗中风、麻痹病、高血压、神经系统疾病、心血管障碍、肝胆胃肠疾病、肿瘤等疾病时往往能发挥独特的功效^[3,6-7]。

随着安全性研究的不断深入, 初步证实佐太在正常临床剂量下对机体毒性甚微, 但关于其在复方药物中的增效作用一直以来缺少数据支持^[8-10], 究其原因, 一方面是藏药复方药物成份复杂, 另一方面是藏药都是综合施治, 很难确定目标成分, 而且缺少相应的药理模型对其增效作用开展研究。因此, 本研究选用抗癌单体药物柔红霉素作为研究对象, 考察佐太促进其进入癌细胞内部及促凋亡效果, 以期阐明该藏药的增效作用提供参考。

1 材料

1.1 细胞株 人慢性髓原白血病细胞株 K562、人喉鳞癌细胞株 HN4, 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 人肝癌细胞株 HepG2, 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 动物 SPF 级雌性 BALB/c 无胸腺裸鼠, 4~6 周龄, 体质量 (20±2) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2014-0004, 于中国科学院西北高原生物研究所动物实验中心 SPF 级环境下饲养。动物实验程序严格按照国家卫生研究所实验动物护理和使用指南开展, 并经中国科学院西北高原生物研究所实验动物伦理委员会批准。

1.3 药物与试剂 柔红霉素 (上海海正辉瑞制药有限公司, 批号 18005711); 佐太 (青海久美藏药药业有限公司)。二甲基亚砜 (天津百世化工有限公司, 批号 20161010); 甲醇 (山东禹王和天下新材料有限公司, 批号 20181103026); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号 18110505); RPMI 1640 细胞培养基、DMEM/F-12 1:1 细胞培养基、DMEM 细胞培养基、胰酶消化液 (美国 Gibco 公司, 批号分别为 2091763、8119160、30819011、1974026); PBS 缓冲液 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 14F12B21); MTT 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C0009、082319190826)。

1.4 仪器 DM11 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司); BE-9010 型微孔板恒温振荡器 (浙江赛德仪器设备有限公司); Epoch2 型微孔板分光光度计 (美国 BioTek 公司); 5430R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); FACSMelody 流式细胞仪 (美国 BD 公司); RV10 型旋转蒸发仪 (美国 IKA 公司); Agilent 1260-6470 液质联用仪 (上海安捷伦科技有限公司); INCO108 CO₂ 培养箱 (德国 Memmert 公司); XM-100T 超声波破碎机 (上海净信实业发展有限公司); 749540-0000 微量电动匀浆器 (美国 Kimble 公司)。

2 方法

2.1 佐太促进柔红霉素在癌细胞内部的富集研究 (HPLC-MS 分析)

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取柔红霉素对照品 1 mg, 加入甲醇制成 1 mg/mL 溶液, 即得。

2.1.2 给药与样品采集 称取适量柔红霉素、佐太, 加入 3 种对应细胞所需培养基, 配成 1 mg/mL 溶液备用。取对

收稿日期: 2020-08-05

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才项目 (西部青年学者 [2018] 99); 青海省科技合作专项 (2018-HZ-815)

作者简介: 张婷 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 871898365@qq.com

* 通信作者: 赵晓辉 (1979—), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事天然产物研究。E-mail: xzhao@nwipb.cas.cn

数生长期的 K562、HN4、HepG2 细胞，按 3×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中，于 24、48、72 h 给药，每个时间段分为柔红霉素 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 给药组、佐太 (5 ng/mL) 联合柔红霉素 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 给药组，适量胰酶消化细胞并转移至离心管中，加入 PBS 缓冲液，2 000 r/min 离心 5 min，吸弃上清，清洗 3 次除去胞外药物，沉淀中再加入 500 μL PBS，充分混匀后细胞计数，以 3×10^5 个/mL 浓度收取细胞，加入 100 μL 甲醇，超声波破碎机充分裂解后加入甲醇至终体积 1.5 mL，超声提取 30 min，有机膜过滤至离心管中待分析。

2.1.3 色谱条件 流动相甲醇-水 (含 0.1% 甲酸) (7 : 3)；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 5 μL 。

2.1.4 质谱条件 Agilent1260-6470 三重四级杆液质联用仪分析，电喷雾离子源 (ESI)，正离子模式；多重反应选择离子检测 (MRM)；离子喷雾电压 4 000 V，雾化温度 400 $^{\circ}\text{C}$ ；柔红霉素监测离子对 m/z 528.4~321.2。

2.2 佐太体外增效作用研究

2.2.1 溶液制备 将柔红霉素和佐太溶于 DMSO (< 0.05%) 中，加入对应培养基制成 2 mmol/L 溶液备用。

2.2.2 细胞培养 将 K562、HepG2、HN4 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素、1% 链霉素的 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基和 DMEM/F-12 培养基中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱中培养，待细胞生长至培养皿的 70%~80% 时进行传代，生长至对数期时进行实验。

2.2.3 MTT 法 取对数生长期的 K562、HN4、HepG2 细胞，以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中，每孔 200 μL ，每组设 6 个复孔，培养 24 h 后弃上清，分别给予柔红霉素或柔红霉素+佐太，设置空白组 (培养基)、对照组 (细胞+培养基)、佐太给药组、柔红霉素给药组、佐太联合柔红霉素给药组，HN4、K562 组每孔加入不同浓度柔红霉素 (处理 48 h 给药浓度为 4.0、8.0、16.0 $\mu\text{mol/L}$ ，处理 72 h 为 2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$) 或联合 5 ng/mL 佐太给药，HepG2 组每孔加入不同浓度柔红霉素 (处理 48 h 给药浓度为 2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$ ，处理 72 h 为 1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$) 或联合 5 ng/mL 佐太给药，培养 48、72 h 后吸弃

上清，每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL)，4 h 后吸弃上清，每孔加入 150 μL DMSO，振荡器混匀，用酶标仪分别检测 490、570 nm 处各孔 OD 值，计算细胞存活率，公式为存活率 = [(给药组 OD-空白组 OD) / (对照组 OD-空白组 OD)] $\times 100\%$ ，重复 3 次，取平均值。

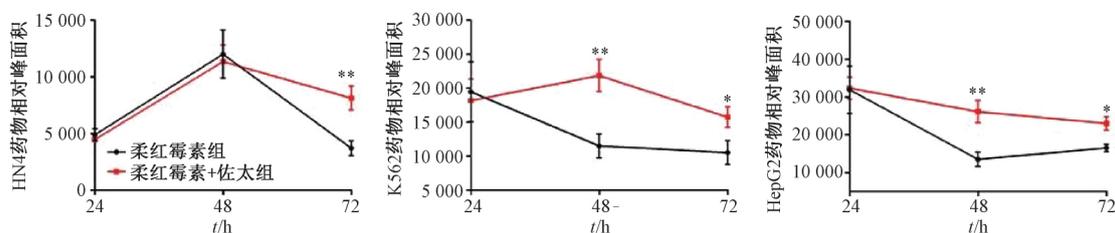
2.2.4 Annexin V-FITC/PI 染实验 取对数生长期 K562、HN4、HepG2 细胞，按 3×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中，分为对照组、柔红霉素 (2 $\mu\text{mol/L}$) 给药组、佐太 (5 ng/mL) 联合柔红霉素 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 给药组，培养 72 h 后收集细胞，用预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞 3 次，离心，吸弃上清，重悬于 195 μL 结合液，加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液、10 μL PI 溶液，轻轻吹打混匀，避光孵育 15 min，转移至流式管中，加入 1 mL PBS，流式细胞仪测定细胞凋亡率。

2.2.5 给药 4~6 周龄雌性 BALB/c 无胸腺裸鼠于 SPF 级动物房饲养，12 h 光照，小鼠右侧皮下注射 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个 K562 细胞进行肿瘤移植，2 周后待肿瘤组织较明显、直径大约在 2 mm 时随机分为 4 组，每组 10 只小鼠，荷瘤小鼠腹腔注射给药，分别设置空白对照组、柔红霉素给药组、佐太联合柔红霉素给药组，柔红霉素、佐太给药剂量分别为 2.5 mg/kg、0.2 $\mu\text{g/kg}$ ，每隔 1 d 给药 1 次，同时测定肿瘤体积 [体积 = (宽度) $^2 \times$ 长度/2]。给药 3 周后取小鼠肿瘤组织，称定质量。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 6.01、SigmaPlot 11.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 t 检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 佐太促进柔红霉素进入不同癌细胞内部实现药物富集 与单独给药组比较，联合给药组在给药 48、72 h 后 K562 和 HepG2 细胞内部柔红霉素水平分别提高 (94.0 \pm 46.1)%、(50.7 \pm 11.8)% 和 (93.6 \pm 9.8)%、(40.0 \pm 17.9)%，但在 HN4 细胞中给药 24、48 h 后呈现一定的抑制作用，而给药 72 h 后胞内药物浓度提高 (120.3 \pm 12.0)%，高于单独给药组，见图 1。



注：与空白组 (2.0 $\mu\text{mol/L}$ 柔红霉素) 比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

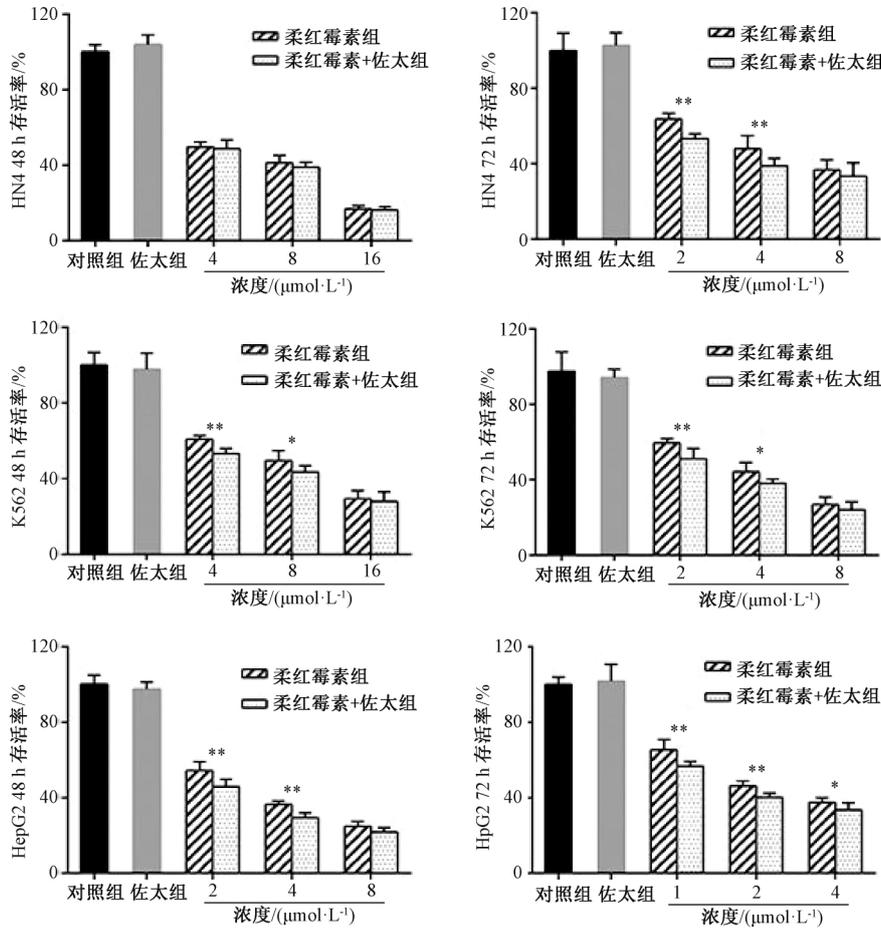
图 1 佐太对柔红霉素进入不同癌细胞后的促进作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 佐太对柔红霉素促癌细胞凋亡的影响 给药 48 h 后，柔红霉素对 HN4、K562、HepG2 的 IC_{50} 分别为 (7.20 \pm 0.52)、(8.65 \pm 0.45)、(4.62 \pm 0.68) $\mu\text{mol/L}$ ，给药 72 h 后分别为 (6.10 \pm 0.25)、(5.63 \pm 0.36)、(2.83 \pm 0.61)

$\mu\text{mol/L}$ ，而佐太对其 IC_{50} 均大于 40 $\mu\text{g/mL}$ ，而本实验中选择 5 ng/mL 佐太，对三者均无抑制作用。图 2 显示，佐太联合柔红霉素给药 48、72 h 后能增加后者促凋亡效果，其中 48 h 后能使低剂量给药组对 HN4、K562、HepG2 细胞的

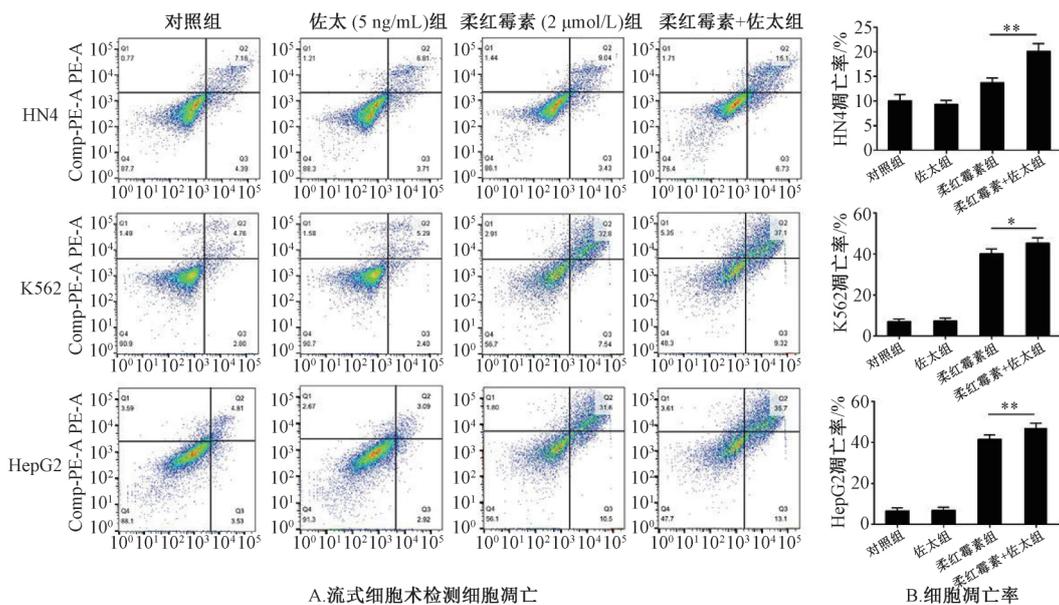
作用效果分别提高 1.42%、8.56%、7.56%，72 h 后分别提高 10.35%、8.70%、8.33%；佐太在中、低剂量组具有增效作用，而在高剂量组作用不明显，可能是高剂量下单独

给药组、联合给药组凋亡率都较高，掩盖了佐太增效作用。Annexin-V FITC/PI 双染实验结果见图 3，可知佐太能增加柔红霉素对 3 种癌细胞的促凋亡效果。



注：与柔红霉素组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 2 佐太对柔红霉素促癌细胞凋亡的增效作用 (MTT 法) ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A. 流式细胞术检测细胞凋亡

B. 细胞凋亡率

(C)1994-2021 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

图 3 佐太对柔红霉素药物促癌细胞凋亡的增效作用 (流式细胞术)

3.3 佐太对柔红霉素抑制 K562 移植瘤生长的增效作用
给药3周后,单独给药组、联合给药组均能抑制小鼠肿瘤生长,其中联合给药组小鼠整体状态、活跃度、体质量更优,肿瘤体积有所减小但无明显差异,联合给药组瘤体质量也有所降低。图4~5显示,联合给药组抑制肿瘤增长的作用优于单独给药组,表明佐太在体内也具有一定的增效作用。

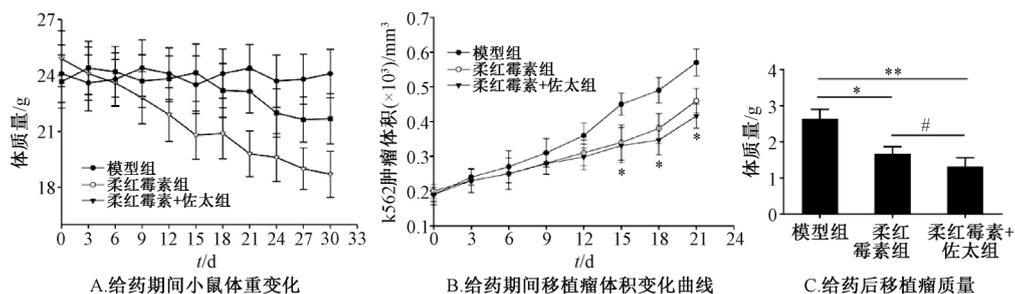
4 讨论

中医药中利用重金属类制剂治疗疾病历史悠久,其中朱砂、雄黄及砒霜最为知名^[11-12]。而藏医药中则以佐太为



注: A~C 分别为空白对照组、单独给药组、联合给药组。

图4 BALB/c 裸鼠移植瘤模型及各组裸鼠肿瘤体积



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与柔红霉素组比较, # $P < 0.05$ 。

图5 佐太对柔红霉素抑制 K562 移植瘤生长的增效作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

最典型代表,且目前仍广泛使用,在临床用药中发挥着不可替代的作用^[6]。这些重金属类制剂在中华民族医疗史中占据着重要的地位,同时在保障人民生命健康方面也发挥了重要作用。但在中医药的发展过程中,这些含汞、砷类重金属制剂也不断的因为毒性问题而受到质疑甚至禁用。但随着毒理学研究的不断深入,重金属制剂药用剂量的安全性问题已经逐步得到科学解释。而且随着 As_2O_3 联合反式维甲酸在治疗急性早幼粒白血病方面获得成功,使得民族医药中重金属制剂的现代应用值得研究和期待^[13]。

佐太是藏医药中配制珍宝类复方药物不可缺少的关键成分,在藏医药体系及临床治疗中占据着重要地位^[6,14]。“十一五”和“十二五”期间多个研究单位已经对佐太的安全性进行了全面评价,证实临床剂量下和临床服药周期内对机体无不良作用^[9-10]。但佐太在复方药物中增强诸药药效的作用及其机制仍缺少实验研究和数据支撑。

本研究以抗癌单体药物柔红霉素为研究对象,证实佐太在体外能够促进药物进入癌细胞内部实现药物富集,对药物的增量可以达到40%以上。同时,能够增加柔红霉素对HN4、K562和HepG2三种癌细胞的促凋亡作用,说明佐太能够通过促进药物吸收达到促进癌细胞凋亡实现增效的作用。体内实验同样证实,佐太能够提高柔红霉素对K562移植瘤生长的抑制作用。

通过研究证实,佐太能够促进单体药物的吸收进而实现增效作用。但它的增效作用机制仍需进一步深入研究。佐太中的主要成份为 HgS ,这种重金属成份是否以刺激剂或者以载体的形式促进药物吸收,这些问题都需要进一步的实验研究去验证。

参考文献:

- [1] 王曼曼,吕叶子,索朗,等.藏药水银洗炼法与藏药的发展现状及对策[J].中国民族医药杂志,2018,24(12):26-28.
- [2] Liu J, Zhang F, Ravikanth V, et al. Chemical compositions of metals in Bhasmas and Tibetan Xuotai are a major determinant of their therapeutic effects and toxicity [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1697804.
- [3] 蓝高武,陈忠杰,李文虎,等.藏药“佐塔”的成分分析[J].时珍国医国药,2010,21(12):3209-3211.
- [4] 张炜,刘海青,骆桂法,等.佐太及珍宝类藏成药中汞在大鼠体内的蓄积研究[J].中国药事,2020,34(2):195-201.
- [5] 李岑.藏药佐太中硫化汞大鼠胃肠转化形态与吸收研究[D].西宁:西北高原生物研究所,2014.
- [6] 杨梦,周雪姣,李向阳.藏药佐太的研究现状与进展[J].药学研究,2016,35(11):663-667.
- [7] Zhou L L, Chen H J, He Q Q, et al. Evaluation of hepatotoxicity potential of a potent traditional Tibetan medicine Zuotai [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 234: 112-118.
- [8] 向丽,曾勇,林波,等.藏药“佐太”长期给药对大鼠肾脏潜在氧化损伤的初步研究[J].中药与临床,2015,6(3):39-42.
- [9] 李岑,王东平,多杰,等.藏药佐太安全性研究及其复方当佐的临床安全观察初探[J].中国中药杂志,2014,39(13):2573-2582.
- [10] 朱洪梅,魏立新,杜玉枝,等.藏药佐太长期给药对小鼠毒性的初步研究[J].时珍国医国药,2013,24(8):2022-2024.
- [11] 韩旭,骆骄阳,刘秋桃,等.矿物药中重金属与有害元素

- 的形态及价态研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4552-4559.
- [12] 杨咪咪, 王旗. 我国中药中重金属毒理学研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(12): 1359-1368.
- [13] 陈士奎. 我国开创的中西医结合科研及其启示(九)——张亨栋教授等与中药砒霜治疗急性早幼粒细胞白血病的中西医结合研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1292-1296.
- [14] Li C, Yang H X, Du Y Z, et al. Chemical species, micromorphology, and XRD fingerprint analysis of Tibetan medicine Zuotai containing mercury[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2016, 2016: 7010519.

藤黄酸通过增加 lncRNA GAS5 水平抑制卵巢癌细胞的增殖、炎症反应和转移标志物表达

许娟秀, 吴海根*

(江西省妇幼保健院肿瘤科, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 藤黄酸(Gambogic acid, GA)可在卵巢癌中扮演抗癌作用,但其抗癌的分子机制并不清楚。本研究旨在探讨卵巢癌细胞中藤黄酸抗癌的分子机制。方法 RT-qPCR检测12例卵巢癌组织和癌旁正常组织中非编码RNA(lncRNA GAS5)的表达;将具有稳定沉默GAS5的siRNA-GAS5(si-GAS5)和藤黄酸试剂共处理卵巢癌细胞系SW626,RT-qPCR检测GAS5、miR-21、MMP-2和MMP-9 mRNA表达变化。细胞增殖使用CCK-8试剂盒进行测定。Western blot法检测转移标记物MMP-2、MMP-9、VEGF和靶基因侧支发芽因子同源物2(Sprouty homolog2,SPRY2)的表达,ELISA试剂盒法检测IL-6和IL-1 β 在细胞培养物上清中水平。结果 卵巢癌细胞和组织中GAS5表达降低($P<0.05$),藤黄酸处理SW626细胞24h,上调GAS5表达($P<0.05$),抑制SW626增殖能力($P<0.05$),下调MMP-2、MMP-9、VEGF的表达及IL-6和IL-1 β 的分泌($P<0.05$)。藤黄酸减少细胞核磷酸化p65水平($P<0.05$)。在藤黄酸处理细胞的基础上沉默GAS5,可部分逆转藤黄酸的上述功能($P<0.05$)。另外,藤黄酸抑制miR-21的水平并上调SPRY2的表达($P<0.05$)。结论 藤黄酸通过上调GAS5抑制卵巢癌细胞的增殖、炎症反应、转移能力。

关键词: 藤黄酸; 卵巢癌; 增殖; 炎症反应; 转移标志物; lncRNA GAS5

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)09-2504-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.044

卵巢癌是女性生殖系统中最严重的恶性肿瘤之一。全球每年超过125 000例死于卵巢癌^[1],而在中国,近年来卵巢癌的发病率持续上升^[2]。目前的首要临床问题是提高患者的早期诊断和疗效。近年来,手术联合药物治疗可改善患者的预后,但晚期卵巢癌的5年生存率仍小于30%^[3]。因此,迫切需要更好地理解发病机理和鉴定分子改变,以开发有助于卵巢癌诊治的有效策略。

藤黄酸(Gambogic acid, GA)已被多次报道可在卵巢癌中扮演抗癌作用^[4-5]。但是其抗癌的内在分子机制并不清楚。研究发现在膀胱癌细胞中藤黄酸可以促进抗癌长链非编码RNA(lncRNA)GAS5水平的表达^[6]。而GAS5又可以通过调节miRNA和靶基因参与介导膀胱癌和卵巢癌中的抗癌机制^[6-7]。GAS5和藤黄酸都具有较明显的抗炎、抗增殖、抗侵袭和迁移的能力^[8-9]。因此藤黄酸很可能在卵巢癌中同样调节GAS5的表达,但在藤黄酸是否通过调节GAS5介导

卵巢癌进展方面缺乏报道。

本研究使用藤黄酸处理卵巢癌细胞,观察NF- κ B的激活状态、细胞炎症状态、以及增殖和转移标记物的变化,并基于lncRNA GAS5研究藤黄酸介导的卵巢癌细胞功能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 组织 2016年7月至2018年12月,从江西省妇幼保健院接受手术的患者中获得12例卵巢癌组织和相邻正常组织。根据组织病理学诊断为卵巢癌(II, III和IV期)根据国际妇产科联合会(FIGO)的标准进行评估。手术前未对这些患者进行局部或全身治疗。收集组织并立即在液氮中冷冻,储存在-80℃。本研究经江西省妇幼保健院伦理委员会批准,每个参与者都获得知情同意。

1.2 细胞系 人卵巢表面上皮细胞(HNOECs)和卵巢癌细胞系SW626分别购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)

收稿日期: 2020-02-23

基金项目: 江西省中医药科技计划项目(2019A350)

作者简介: 许娟秀(1979—),女,硕士,主治医师,从事妇科肿瘤研究。E-mail: juanxiu_xjx@163.com

* 通信作者: 吴海根(1966—),男,主任医师,从事妇科肿瘤研究。Tel: (0791) 86310932, E-mail: wlwhg163@163.com