

文章编号:1673-1689(2006)01-0050-04

白花蛇舌草对肿瘤细胞信号传导通路的抑制

张 炜

(南京农业大学 生命科学学院,江苏 南京 210095)

摘 要:研究了白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*)提取物对肿瘤细胞信号传导通路的影响。首先采取四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)法测定各提取物对体外培养人宫颈癌细胞株 HeLa 增殖的抑制;进一步通过免疫印迹法分析了各提取物对 EGF 介导的 Erk 信号传导通路中 Erk1/2 蛋白磷酸化的影响。结果显示,煎煮及冷水提取物对 HeLa 细胞的增殖均有抑制,但两者无显著差别,而乙醇提取物显著抑制 HeLa 细胞增殖。对 EGF 介导 Erk 信号传导通路的影响显示,白花蛇舌草提取物处理细胞 90 min 后,EGF 诱导的 Erk1/2 磷酸化水平显著降低,且表现浓度依赖性。抑制效果:乙醇提取物>冷水提取物>煎煮提取物。研究证明,中药白花蛇舌草含有信号传导通路抑制剂,可能在抗肿瘤过程中发挥重要作用。

关键词: 白花蛇舌草;抗肿瘤作用;信号传导抑制剂;HeLa 细胞

中图分类号:R 73-36

文献标识码: A

The Inhibition of *Hedyotis diffusa* to the Signal Transduction Pathway of Tumor Cells

ZHANG Wei

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to study the effects of various extracts from the herb *Hedyotis diffusa* on signal transduction pathway in tumor cells, the inhibition of different extracts to the proliferation of cervix cancer cell line HeLa was measured by MTT. Western blots were used to detect the effects of different extracts on the EGF induced phosphorylation of Erk1/2. The results indicated that decocted- and cold-water-extracts show similar inhibition to HeLa proliferation, and ethanol extracts inhibit proliferation significantly. After 90min treatment, all of 3 extracts inhibited EGF-induced Erk1/2 phosphoralytion significantly, and inhibition showed dose-dependent manner. Inhibitory affect: ethanol extracts > cold-water-extracts > decocted extracts. The experimental results demonstrated that *Hedyotis diffusa* contains the signal transduction inhibitor, which may play a important role in the anti-tumor process.

Key words: *Hedyotis diffusa*; anti-tumor effects; signal transduction inhibitor; HeLa cell

白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 系茜草科耳草

属植物,在我国云南、广东、广西、福建、浙江、江苏

收稿日期:2005-07-09; 修回日期:2005-09-10.

基金项目:江苏省科技厅基础研究计划创新人才项目(Q200431).

作者简介:张炜(1970-),男,陕西西安人,理学博士,教授,博士生导师.

等地均有生长。中医学上以全草入药,性寒,味甘淡,清热解毒,利尿,主治恶疮肿毒,泻痢等症,临床常用于治疗各类癌症^[1]。动物实验和体外研究证明,白花蛇舌草提取物对多种肿瘤细胞如肝癌、乳腺癌、宫颈癌细胞的增殖均有抑制作用^[2,3]。高冬等报道了白花蛇舌草可显著提高 HeLa 细胞内游离钙的浓度,从而促进癌细胞凋亡^[2]。单保恩等研究了白花蛇舌草的免疫学调节活性,证明其能显著促进小鼠脾细胞的增殖,刺激机体的免疫系统杀伤或吞噬肿瘤细胞^[4]。作者以表皮生长因子 EGF 介导的 Erk 信号传导通路(EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK)下游分子 Erk1/2 蛋白的磷酸化为主要指标,观察白花蛇舌草多种提取物对 HeLa 细胞中信号传导通路的抑制作用,来阐明它们的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料处理

白花蛇舌草购自南京药材公司,经鉴定为 *Hedyotis diffusa* Willd. 全草 5 g,粉碎研磨。去离子水微火煮沸 60 min,冷却后滤去残渣,0.22 μm 滤膜(Millipore 公司)过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(煎煮提取物);去离子水室温下搅拌浸泡 15 d,滤去残渣,0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(冷水提取物);95%乙醇搅拌浸泡 15 d,滤去残渣,0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(乙醇提取物)。上述 3 种提取物母液质量浓度均为 0.125 g/mL,使用前以细胞培养液做 1:20, 1:100, 1:1000 稀释。

1.2 细胞培养

HeLa 细胞引自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液(Gibco 公司)在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 100%相对湿度下培养至对数生长期。

1.3 细胞增殖抑制试验

上述对数生长期贴壁细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,立即加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的新鲜培养液,轻轻吹打,配置成 8×10^4 个/mL 细胞悬浮液,分别接种于无菌 96 孔培养板,每孔 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 100%相对湿度下培养 12 h 后换成上述含不同质量浓度(0.125, 1.25, 6.25 mg/mL)提取物的培养液,每个处理设 3 个平行孔,对照组为不加提取物的培养液。提取物作用 24 h 后每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h。吸去上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,1 h 后在 570 nm 处用酶标仪测 OD 值。

细胞增殖抑制率 = (对照组 OD 值 - 药物组

OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4 提取物对 EGF 介导 Erk 信号传导途径的影响

细胞培养采用 70 mm 细胞培养皿进行,接种后培养 12 h,换无小牛血清的培养液饥饿处理 12 h,再用上述含不同质量浓度(0.125, 1.25, 6.25 mg/mL)提取物的培养液(无小牛血清)作用 90 min。37 $^{\circ}\text{C}$ 预热培养液,洗涤细胞 3 次,加入 10 mL 新鲜预热培养液,50 ng/mL EGF(Invitrogen 公司)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 刺激细胞 5 min,迅速弃去含 EGF 的培养液,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5)洗涤细胞 3 次。每个培养皿加 500 μL 1 $\times$ SDS 样品缓冲液裂解细胞,将裂解物刮下,转移至 1.5 mL 离心管中,冰上放置 10 min。超声波处理 15 s 以降解 DNA。裂解物分装为每份 20 μL , -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用前在沸水浴中保温 5 min,冷却后上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫印迹

SDS-PAGE 采用 10 g/dL 分离胶,4 g/dL 浓缩胶进行。电泳结束后,凝胶上的蛋白质电转移至 PVDF 膜(Millipore 公司)上。一抗为兔抗 diphosphorylated ERK 1 and 2 monoclonal antibody(磷酸化 Erk1/2, 1:5000 稀释, Sigma-Aldrich 公司),或兔抗 nonphosphorylated ERK monoclonal antibody(总 Erk1/2, 1:1000 稀释, Sigma-Aldrich 公司),二抗为羊抗兔 IgG-HRP(1:5000 稀释, Sigma-Aldrich 公司)。ECL 试剂盒显色(Perkin-Elmer 公司)。

2 实验结果

2.1 白花蛇舌草对 HeLa 细胞增殖的抑制

MTT 法测定显示,白花蛇舌草不同提取物对 HeLa 细胞的增殖均有抑制作用,结果见表 1。煎煮提取和冷水提取的抑制效果没有明显区别,6.25 mg/mL 时的抑制率分别为 35.1%和 33.7%。乙醇提取物对 HeLa 细胞的增殖具有显著抑制作用,6.25 mg/mL 药物浓度的抑制率为 52.3%。此外,3 种提取物的抑制作用均呈现浓度依赖性。以上结果与文献报道结果相似,表明白花蛇舌草中确存在抗癌有效成分,和传统的水煎煮方法相比,乙醇提取法更加有利于药效的发挥。

2.2 白花蛇舌草对 HeLa 细胞信号传导的抑制

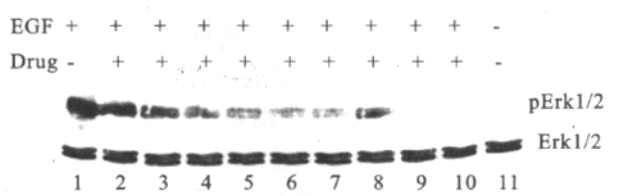
在明确了白花蛇舌草各提取物对 HeLa 细胞增殖的抑制作用后,进一步研究了这些提取物对 EGF 介导的 Erk 信号传导途径的影响。经饥饿处理的细胞内,信号传导途径处于低水平状态,检测不到

表 1 白花蛇舌草对 HeLa 细胞增殖的影响
Tab. 1 The effects of *H. Diffusa* on the proliferation of HeLa cells

提取物质质量浓度/ (mg/mL)	光吸收值	抑制率/%
对照组	0.735±0.015	—
煎煮提取物	0.125	0.670±0.022 *
	1.25	0.660±0.018 *
	6.25	0.477±0.029 * *
对照组	0.735±0.021	—
冷水提取物	0.125	0.667±0.017 *
	1.25	0.651±0.031 *
	6.25	0.487±0.033 * *
对照组	0.681±0.038	—
乙醇提取物	0.125	0.593±0.023 *
	1.25	0.358±0.037 * *
	6.25	0.325±0.024 * *

* $P<0.05$, * * $P<0.01$, 与对照组比较

磷酸化的信号分子(见图 1,泳道 11),用 EGF 刺激经饥饿处理的细胞,数分钟内即可见 Erk 途径下游信号分子,相对分子质量分别为 42 000 和 44 000 的 Erk1/2 发生酪氨酸磷酸化(即 pErk1/2,见图 1,泳道 1)。通常,pErk1/2 磷酸化水平降低或消失是信号传导途径受阻的重要标志之一。由图 1 可以看出,在相同上样量的前提下(以总 Erk1/2 为内标),白花蛇舌草煎煮提取物(泳道 2,3,4)、冷水提取物(泳道 5,6,7)、乙醇提取物(泳道 8,9,10)均可抑制由 EGF 诱导的 Erk 信号传导途径,且呈现浓度依赖性。其中,煎煮提取物在 6.25 mg/mL 时 Erk1/2 的磷酸化显著降低(泳道 4)。冷水提取物的抑制效果强于煎煮提取物,0.125 mg/mL 时 Erk1/2 的磷酸化已显著低于阳性对照(泳道 5)。3 种提取物中乙醇提取物的抑制效果最强,质量浓度大于 1.25 mg/mL 时已检测不到磷酸化的 Erk1/2 (泳道 9,10)。为了排除白花蛇舌草各提取物本身对 Erk1/2 磷酸化的影响,在各组提取物作用细胞后,不经 EGF 诱导直接检测 pErk1/2,没有检测到任何阳性信号(结果未列出)。以上结果表明,白花蛇舌草中存在 EGF 诱导 Erk 信号传导途径抑制剂,而且该抑制剂存在剂量效应。



泳道 2,3,4:煎煮提取物 0.125, 1.25, 6.25 mg/mL;泳道 5, 6,7:冷水提取物 0.125, 1.25, 6.25 mg/mL;泳道 8,9,10:乙醇提取物 0.125, 1.25, 6.25 mg/mL;泳道 1:阳性对照;泳道 11:阴性对照;Erk1/2:总 Erk 蛋白;pErk1/2:磷酸化 Erk1/2 蛋白。

图 1 白花蛇舌草不同提取物对 HeLa 细胞中 EGF 介导 ERK1/2 磷酸化的影响

Fig. 1 The effects of extracts from *Hedysotis diffusa* on the EGF-mediated Erk1/2 phosphorylation in HeLa cells

3 讨 论

选择性阻断肿瘤细胞信号传导通路,从而破坏其自控性生长调节机制,这很早就引起人们的注意。信号传导抑制剂与传统的抗癌药物相比,具有选择性强、毒副作用小、不受细胞产生抗药性的影响等优点,很有希望成为新一代抗癌药物^[5]。作为信号传导途径的一个主要类型,许多肿瘤细胞中可见蛋白酪氨酸激酶受体(PTKR)的过度表达或过度激活^[6]。PTKR 途径的重要代表之一表皮生长因子受体(EGFR)是一次跨膜的糖蛋白,通过诱发 Erk 信号传导途径,在控制肿瘤细胞的生长、侵袭、转移等方面起重要作用,它的过度表达常与预后差、转移快、生存期短等相关^[7]。因此,长期以来寻找或设计 EGF 诱导信号途径的抑制剂受到人们的关注。继治疗急性粒细胞白血病的 EGFR 抑制剂新药 Gleevec 之后,2004 年 5 月,美国食品与药品管理局(FDA)又批准了 EGFR 途径抑制剂抗癌新药 Gifitinib Iressa^[8]。临床实验显示,Iressa 可以增加传统化疗药物的杀瘤效果,对非小细胞肺癌有较好的疗效。

但是,现有的信号传导抑制剂多为单克隆抗体或人工合成的小分子化合物,前者具有给药困难,进入体内易降解的缺点,而后者对人体产生的副作用难以估计,需要大量的动物实验及临床实验加以判别。相比较而言,传统中草药领域中,来自各种植物的天然有效成分具有人工合成化合物不可替代的优势。

白花蛇舌草是传统的抗癌中草药,和大多数中草药一样,其药理机制的研究并不深入。本研究表明,白花蛇舌草对 HeLa 细胞的增殖有明显的抑

制且呈剂量效应,乙醇提取物的抑制效率达 52.3%。中医在治疗各类癌症时,常将白花蛇舌草与半枝莲(*Scutellaria barbata*)配合使用,为此,作者采用相同的方法观察了半枝莲对 HeLa 细胞增殖的影响。结果表明,半枝莲同样抑制 HeLa 细胞增殖,其抑制效率略低于白花蛇舌草,这与已有报道的结果是一致的^[2,3],证明白花蛇舌草确实能显著抑制体外培养肿瘤细胞的增殖。

免疫印迹结果显示,白花蛇舌草各提取物均能抑制 EGF 介导的 Erk 信号途径,尤以乙醇提取物的效果最明显,质量浓度大于 1.25 mg/mL 时已检测不到磷酸化的 Erk1/2。同时,这一抑制作用与上述对细胞增殖的抑制作用具有正相关性:同样具有剂量效应,抑制效果均为乙醇提取物>冷水提取物>煎煮提取物。这表明:白花蛇舌草对 HeLa 细胞增殖的抑制与其对 EGF 介导 Erk 信号传导的抑制密切相关,正是后一抑制阻止了 Erk1/2 对转录因子活性的调节,延缓甚至抑制了 DNA 合成及细胞周期进展。

研究还表明,和白花蛇舌草相比(图 2,泳道 4,5,6),半枝莲煎煮提取物对上述信号传导途径无显著影响(图 2,泳道 1,2,3),其他两种提取物也无抑

制作用。这表明,和白花蛇舌草不同,半枝莲对 HeLa 细胞增殖的抑制不是通过抑制信号传导通路这一方式进行的。

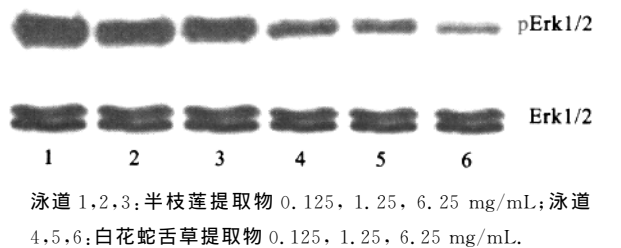


图 2 半枝莲和白花蛇舌草煎煮提取物对 HeLa 细胞中 EGF 介导 ERK1/2 磷酸化的影响

Fig. 2 The effects of decocted-extracts from *Scutellaria barbata* and *Hedyotis diffusa* on the EGF-mediated Erk1/2 phosphorylation in HeLa cells

值得指出的是,在本研究中,从对 EGF 介导 Erk 通路的抑制效果和体外增殖抑制实验看,白花蛇舌草乙醇提取物优于水提液,在较高浓度下已完全抑制了 Erk1/2 的磷酸化。但信号传导抑制剂治疗肿瘤的原则在于将肿瘤细胞中过度活跃的信号传导水平降低,而非完全阻断对细胞生长所必须的信号通路。因此,在对体内肿瘤的实际治疗过程中,乙醇提取物是否优于水提液尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995. 754.

[2] 高冬,高永琳,白平,等. 白花蛇舌草对宫颈癌细胞钙信号的影响[J]. 福建中医学院学报, 2002,12(4):37—39.

[3] 谭宁华,王双明,杨亚滨,等. 白花蛇舌草的抗肿瘤活性和初步化学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002,14(5):33—36.

[4] 单保恩,张金艳,杜肖娜,等. 白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性[J]. 中国中西医结合杂志, 2001,21(5):370—374.

[5] Lee A V, Schiff R, Cui X J, et al. New mechanisms of signal transduction inhibitor action: receptor tyrosine kinase down-regulation and blockade of signal transactivation[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 516s—523s.

[6] Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8: 161—173.

[7] Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signaling network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 127—137.

[8] Becker J. Signal transduction inhibitors-a work in progress[J]. *Nat Biotech*, 2004, 22:15—18.

(责任编辑:李春丽)