

张柏生,郭萍萍,叶晨雨,等. 基于细胞和动物实验的新疆 5 种阿魏抗结肠癌的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (11): 26-33.

Zhang BS, Guo PP, Ye CY, et al. Cell and animal studies on the anti-colon cancer effects of five species of *Ferula* from Xinjiang [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 26-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.004

基于细胞和动物实验的新疆 5 种阿魏抗结肠癌的作用研究

张柏生¹, 郭萍萍², 叶晨雨², 张海英^{1,3*}

(1.新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000;
3.新疆中药炮制研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 体外细胞实验研究新疆 5 种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制、促凋亡作用, 体内研究新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的影响。**方法** 新疆 5 种阿魏及不同极性部位干预人结肠癌 HCT 116 细胞, 采用 MTT 比色法检测吸光度 OD 值, 计算增殖抑制率, 应用流式细胞术检测细胞凋亡率。建立 BALB/c 结肠癌 CT-26 小鼠肿瘤模型, 随机分为正常组、模型组、顺铂组和 5 种阿魏低、高剂量组。连续灌胃给药 10 d, 第 11 天处死小鼠, 取出肿瘤、脾、肾与胸腺, 计算各组小鼠的脏器指数与抑瘤率。**结果** 对于人结肠癌 HCT 116 细胞, 多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的乙醇提取物抑制作用较好, IC_{50} 分别为 26.06、28.31、42.27 $\mu\text{g/mL}$, 托里阿魏抑制作用较弱, IC_{50} 为 131.61 $\mu\text{g/mL}$, 圆锥茎阿魏作用最弱, IC_{50} 为 261.77 $\mu\text{g/mL}$; 准噶尔阿魏石油醚部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的抑制作用均很明显, 水饱和正丁醇部位抑制作用较弱, 而水提部位几乎没有作用。新疆 5 种阿魏中, 准噶尔阿魏对于人结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用较好。对于结肠癌 CT-26 小鼠, 与正常组相比, 新疆 5 种阿魏给药组小鼠的脾重、肾重、胸腺重及其脏器指数均有降低趋势, 与阳性药物顺铂组作用趋势一致; 从抑瘤效果来看, 准噶尔阿魏高低剂量组抑瘤率分别为 61.73%、67.40%。**结论** 准噶尔阿魏抗结肠癌作用较好, 值得更进一步的深入研究。

【关键词】 结肠癌; 增殖抑制; 凋亡; 准噶尔阿魏

【中图分类号】 **【文献标识码】** **【文章编号】** 1671-7856(2022) 11-0026-08

Cell and animal studies on the anti-colon cancer effects of five species of *Ferula* from Xinjiang

ZHANG Bosheng¹, GUO Pingping², YE Chenyu², ZHANG Haiying^{1,3*}

(1. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China.
2. the Fourth College of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000. 3. Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective In vitro cell experiments were conducted to study the proliferation-inhibition and apoptosis effects of five species of *Ferula* from Xinjiang and several polar regions on human colon cancer HCT 116 cells, and an *in vivo* study examined the effects of five species of *Ferula* from Xinjiang on colon cancer CT-26 mice. **Methods** Human

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82060734)。

[作者简介] 张柏生(1980—), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药合理用药。E-mail: 236398128@qq.com

[通信作者] 张海英(1973—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药理学研究。E-mail: 1030737878@qq.com

colon cancer HCT 116 cells were treated with five species of *Ferula* from Xinjiang and several polar regions. The optical density absorbance was measured by MTT method, the proliferation-inhibiting rate was calculated, and the cell apoptosis rate was measured by flow cytometry. A BALB/c colon cancer CT-26 mice tumor model was established and randomly divided into a normal, model, cisplatin and *Ferula* species high-dose and low-dose groups. On the 11th day, the mice were sacrificed, the tumor, spleen, kidneys, and thymus were removed, and the organ index and tumor inhibition rate of each group were calculated. **Results** For HCT 116 cells, the inhibitory IC₅₀ values of *Ferula ferulaeoides*, *F. songorica*, and *F. sinkiangensis* were 26.06, 28.31 and 42.27 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while the inhibitory effect of *F. krylovii* was weak, with an IC₅₀ of 131.61 $\mu\text{g/mL}$. *F. conocaula* had the weakest inhibitory effect, with an IC₅₀ of 261.77 $\mu\text{g/mL}$. Petroleum ether, methylene chloride, and ethyl acetate extracts of *F. songorica* had obvious inhibitory effect on HCT 116 cells, but the water-saturated n-butanol extract had only a weak inhibitory effect, and the water extract had almost no inhibitory effect. Among the five species of *Ferula* found in Xinjiang, *F. songorica* had the best apoptotic effect on HCT 116 cells. Compared with the normal group, colon cancer CT-26 mice treated with *Ferula* tended to have decreased spleen, kidney, and thymus weights and organ index, which is consistent with the positive-control cisplatin drug group. In terms of tumor inhibition effect, the tumor inhibition rates of *F. songorica* high- and low-dose groups were 61.73% and 67.40%, respectively. **Conclusions** The anti-tumor effect of *F. songorica* is promising and worthy of further study.

【Keywords】 colon cancer; inhibiting proliferation; apoptosis; *Ferula songorica*

随着人们生活水平的提高,结直肠癌的发病率呈上升趋势,在恶性肿瘤里面位列第三;结肠癌早期无明显症状,发现时多为晚期,且与周围脏器无明显界限,易于转移及复发,手术治疗效果不理想,严重危害人们身体健康及生命安全。因此,开发具有多种化学结构和药理作用的天然抗肿瘤药物具有广阔的应用前景^[1]。

《中国药典》(2020 年版)收录的阿魏为伞形科植物新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)、阜康阿魏(*Ferula fukanensis* K. M. Shen)两种,具消积、散痞、杀虫等作用,临床上主治肉食积滞、腹中痞块、虫积腹痛等病症^[2]。本课题组前期研究发现新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis*)各极性部位对结肠癌细胞均有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯部位抑制效果最好^[3]。体外实验研究发现新疆阿魏可显著抑制结肠癌细胞的迁移、侵袭,动物实验表明新疆阿魏可抑制结肠癌小鼠肿瘤的生长^[4-5]。

《中国药典》品种的新疆阿魏、阜康阿魏均已濒临灭绝,据文献记载阿魏属植物中还有圆锥茎阿魏、多伞阿魏、托里阿魏、准噶尔阿魏在民间作为药典品种阿魏的代用品,且资源分布较广。因此,本研究以课题组前期的研究成果作为基础,考察新疆 5 种阿魏体外对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制、促凋亡作用。体内考察新疆 5 种阿魏抗结肠癌小鼠的作用。通过系统研究新疆 5 种阿魏,筛选出抗肿瘤活性较强的阿魏品种,为充分开发利用新疆特色药阿魏属植物资源奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人结肠癌 HCT 116、鼠结肠癌 CT-26 细胞:购于上海中国科学研究院细胞研究所,实验使用 3~5 代细胞。

1.1.2 实验动物

BALB/c 小鼠:130 只,SPF 级,体重 18~22 g(3 周龄),雌雄各半,由新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2018-0002]提供。动物饲养环境符合标准(室温 20℃~25℃,湿度 55%±5%,12 h 照明/12 h 黑暗),动物房人流物流通道分开,动物自由进食进水,动物饲养、实验操作在新疆医科大学实验动物中心[SYXK(新)2018-0003]进行。研究人员通过实验室的相关培训,对实验动物给予人道主义关怀,遵循 3R 原则。研究获得新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-20220301-40),符合动物伦理的相关要求。

1.2 主要试剂与仪器

青霉素/链霉素溶液(J170016,美国 Hyclone 公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS)(AC10257442,美国 Hyclone 公司);胎牛血清(FBS)(F160123,美国 Hyclone 公司);RPMI-1640 培养基(AD16192263,美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)(67685TT,美国 Sigma 公司);MTT(EZ2811D347,美国 Sigma 公司);FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒(8012947,美国 BD 公司)。

CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂);AL 204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);-80℃ 低温冰箱(海尔集团);流式细胞仪(FACScanto™, BD 美国);移液枪各型号枪头(美国 COSTAR 公司);25 cm² 细胞培养瓶(美国 COSTAR 公司);96 孔细胞培养板(美国 COSTAR 公司);0.22 μm 微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 新疆 5 种阿魏的来源及采集

圆锥茎阿魏(*Ferula conocaula* Korov)、托里阿魏(*Ferula krylovii* Korov)、新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)、多伞阿魏(*Ferula ferulaeoides* (Steud. Korov)、准噶尔阿魏(*Ferula songorica* Pall. ex Spreng)分别采集于喀什乌恰县、托里县周边、伊宁县拜石墩、石河子南山、塔城市周边等地。经新疆医科大学附属中医医院李永和主任中药师鉴定以上药材均符合《新疆植物志》中的记载。

1.3.2 新疆 5 种阿魏乙醇提取物及不同极性部位的制备

将新疆 5 种阿魏根切碎,置于阴凉处干燥,用 5 倍量的 95%乙醇进行回流提取,时间为 2 h,过滤后将残渣继续用相同方法重复提取 2 次,最后合并滤液,并浓缩为稠浸膏,即得乙醇提取物。

然后进行不同极性部位的制备,应用中药化学的极性分离法,取 5 种阿魏乙醇提取物加硅藻土拌匀,加入 5 倍体积石油醚(30℃~60℃),超声 30 min,用布氏漏斗过滤抽干,重复以上操作 3 次,合并滤液,滤液减压回收得石油醚部位;残渣挥散至无醚味,称重,加入 5 倍体积二氯甲烷,超声 30 min,用布氏漏斗过滤抽干,重复以上操作 3 次,合并滤液,滤液减压回收得二氯甲烷部位;残渣挥干,称重,依照上述步骤依次加入乙酸乙酯、水饱和正丁醇、水;即得到乙酸乙酯部位、水饱和正丁醇部位、水提部位。

1.3.3 MTT 比色法检测新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖的影响

取处于对数生长期的人结肠癌 HCT 116 细胞,调整细胞混悬液浓度为 2×10^5 cells/mL。加入 96 孔板中,CO₂ 培养箱贴壁培养,24 h 后取新疆 5 种阿魏乙醇提取物及不同极性部位,细胞培养液分别稀释成 300、150、75、37.5、18.75、

9.375 μg/mL 6 个浓度;小心弃去 96 孔板中上清液,分别加入药物 100 μL,每组设 6 个复孔;正常组加 100 μL 不含药物的细胞培养液,作用 24 h 后,显微镜下观察细胞的形态变化。弃去上清液,将 MTT 检测试剂加至 96 孔板中,每孔 100 μL,孵育 3~4 h,然后每孔加入 150 μL DMSO,振摇 15 min,用酶标仪(490 nm)检测吸光度^[6-7],计算新疆 5 种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制率及 IC₅₀。

增殖抑制率(%)=(正常组 OD-给药组 OD)/(正常组 OD-空白组 OD)×100%

1.3.4 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用

收集对数生长期的人结肠癌 HCT 116 细胞,调整细胞混悬液浓度为 2×10^5 cells/mL。加入 6 孔板中,CO₂ 培养箱培养 24 h 使贴壁,将新疆 5 种阿魏乙醇提取物配制为 75 μg/mL 浓度,于 6 孔板中每孔加 2 mL。给药 24 h 后,收集 6 孔板中的人结肠癌 HCT 116 细胞,用 PBS 缓冲液将细胞稀释,加入 5 μL Annexin V-FITC 试液,避光 37℃ 反应 15 min,然后加入 5 μL PI 染液,流式细胞仪检测,计算总凋亡率^[8-9]。总凋亡率=(早期凋亡率+晚期凋亡率)。

1.3.5 结肠癌 CT-26 小鼠分组和建模

将体重为 18~22 g 的 BALB/c 小鼠 130 只,雌雄各半,适应性喂养 3 d,随机数字表法进行分组,分别为正常组、模型组、顺铂对照组、新疆 5 种阿魏低剂量、高剂量组。将处于指数生长期的鼠结肠癌 CT-26 细胞,以生理盐水配制为 1×10^7 cells/mL 的细胞混悬液,用 1 mL 注射器每只小鼠左前肢腋下接种 0.2 mL,细胞混悬液新鲜配制,在 30 min 内完成接种,次日给药,阿魏组高、低剂量分别为 1.5 g/kg 生药、0.75 g/kg 生药每天灌胃给药;顺铂给药剂量为 5 mg/kg,每隔 3 d 腹腔注射 1 次;正常组和模型组分别灌胃含同等比例浓度的相应溶媒,连续灌胃给药 10 d,记录肿瘤生长情况^[10-11]。根据动物伦理的相关规定,模型对照组的平均瘤重小于 1 g。

1.3.6 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠抑瘤作用的研究

各组小鼠给药 10 d 后,末次给药 1 h 后,将小鼠异氟烷麻醉,进行颈动脉采血。采集的血液静置 30 min,4000 r/min 离心,吸取血清备用。剥离各组小鼠肿瘤组织,摘取脾、肾、胸腺等,分析天平称取重量,计算小鼠脏器指数、抑瘤率,并进行统计分析。

抑瘤率%=(模型组平均瘤重-给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重×100%

脾指数=脾重/体重×100%

肾指数=肾重/体重×100%

胸腺指数=胸腺/体重×100%

1.4 统计学方法

实验数据使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,定量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,首先对数据进行正态性、方差齐性检验,若方差不齐需要进行数据转换,然后再进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 新疆 5 种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖抑制的结果

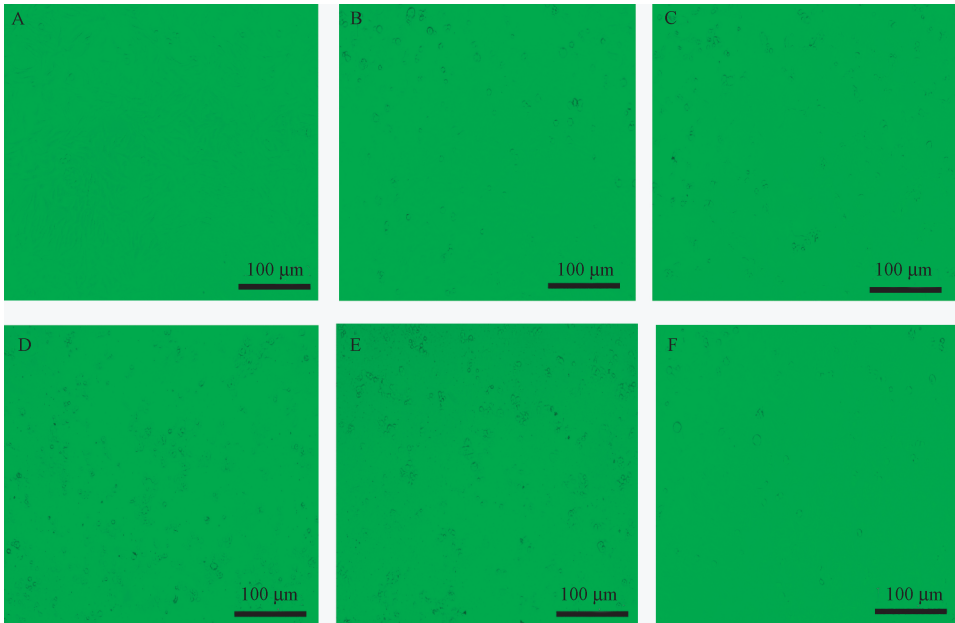
新疆 5 种阿魏 MTT 比色法检测结果如表 1、图 1,多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的乙醇提取物抑制作用较好,IC₅₀ 分别为 26.06、28.31、42.27 μg/mL,托里阿魏抑制作用较弱 IC₅₀ 为 131.61 μg/mL,圆锥茎阿魏作用最弱 IC₅₀ 为 261.77 μg/mL。显微镜下观察可知,新疆阿魏、多伞阿魏、准噶尔阿魏组的细胞形态不完整呈圆形、排列疏松,有聚团趋势,部分细胞漂浮、死亡;托里阿魏、圆锥茎阿魏组的细胞形态清晰、排列紧密、贴壁生长、细胞生长状态较好。

准噶尔阿魏不同极性部位 MTT 比色法检测结果显示如表 2,石油醚部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位对人结肠癌 HCT 116 的抑制作用均很明显,水饱和和正丁醇部位作用较弱,水提部位几乎没有抑制作用。

表 1 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖抑制结果(%)

Table 1 The inhibiting proliferation of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

浓度(μg/mL) Concentration	多伞阿魏 <i>F. ferulaeoides</i>	准噶尔阿魏 <i>F. songorica</i>	新疆阿魏 <i>F. sinkiangensis</i>	托里阿魏 <i>F. krylovii</i>	圆锥茎阿魏 <i>F. conocaula</i>
300	98.02	99.45	99.77	89.26	74.52
150	99.51	98.96	99.19	51.64	22.96
75	97.60	88.75	95.50	24.75	15.43
37.5	32.34	37.91	28.53	14.30	12.06
18.75	16.11	19.16	0.45	-6.14	11.81
9.375	19.58	18.28	4.30	-0.98	6.14
IC ₅₀	26.06	28.31	42.27	131.61	261.77



注:A:正常对照;B:多伞阿魏;C:准噶尔阿魏;D:新疆阿魏;E:托里阿魏;F:圆锥茎阿魏。

图 1 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制形态图

Note. A, Normal control. B, *F. ferulaeoides*. C, *F. songorica*. D, *F. sinkiangensis*. E, *F. krylovii*. F, *F. conocaula*.

Figure 1 The inhibiting proliferation of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

2.2 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的凋亡作用研究

新疆 5 种阿魏乙醇提取物对人结肠癌 HCT 116 细胞均有一定的凋亡作用,如图 2 所示,促凋亡率分别是新疆阿魏 18.92%,多伞阿魏 22.48%,托里阿魏 11.02%,准噶尔阿魏 28.50%,圆锥茎阿魏 5.94%,其中准噶尔阿魏的促凋亡作用最强。

表 2 准噶尔阿魏各极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞抑制增殖结果(%)

Table 2 The inhibiting proliferation of *F. songorica* various polar sites on colon cancer HCT 116 cells

浓度(μg/mL) Concentration	乙醇部 Ethanol part	石油醚部 Petroleum ether part	二氯甲烷部 Dichloro methane part	乙酸乙酯部 Ethyl acetate part	正丁醇部 N-butyl alcohol part	水部 Water part
300	99.45	97.76	94.24	92.28	78.62	32.61
150	98.96	98.07	95.89	91.29	17.46	32.18
75	88.75	99.48	99.17	92.78	16.03	29.97
37.5	37.91	37.17	53.92	40.21	14.88	29.66
18.75	19.16	40.24	30.80	19.91	31.57	24.47
9.375	18.28	18.88	21.36	4.16	17.49	20.91
IC ₅₀	28.31	20.46	20.33	41.92	396.18	12395.51

表 3 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠瘤重及脏器的影响

Table 3 Effects of five species of *Ferula* in Xinjiang on tumor weight and organs of colon cancer CT-26 mice

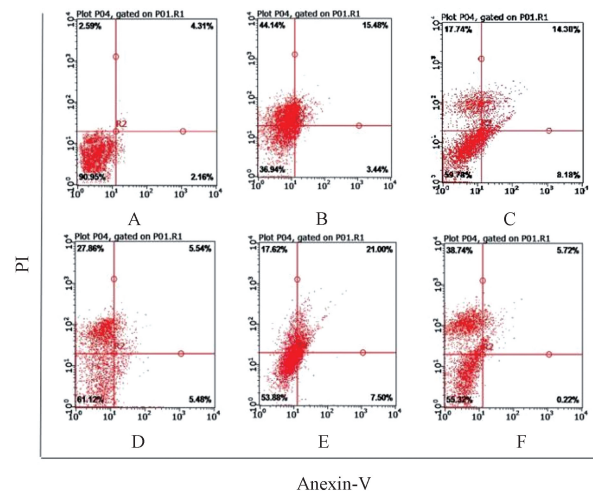
组别 Groups	<i>n</i>	平均体重(g) Body weigh	瘤重(mg) Tumor weigh	脾重(mg) Spleen weigh	肾重(mg) Renal weigh	胸腺重(mg) Thymus weigh
正常组 Normal group	10	24.07±2.68	/	93.33±0.01	157.99±0.02	42.90±0.02
模型组 Model group	11	21.83±2.31	370.48±0.16	74.63±0.01*	186.57±0.23	36.12±0.02
顺铂组 Cisplatin group	4	19.66±1.21*	5.94±0.01 ^{##}	17.30±0.01 ^{**}	106.20±0.02	1.42±0.01 ^{**}
圆锥茎高剂量组 <i>F. conocaula</i> high dose group	10	22.90±2.46	506.58±0.16 [#]	72.65±0.01*	123.96±0.03	25.01±0.01*
圆锥茎低剂量组 <i>F. conocaula</i> low dose group	10	23.12±1.76	447.34±0.16	63.58±0.01*	118.08±0.03	34.00±0.01
托里阿魏高剂量组 <i>F. krylovii</i> high dose group	10	21.25±1.74	435.20±0.13	47.83±0.02*	114.51±0.03	22.69±0.02*
托里阿魏低剂量组 <i>F. krylovii</i> low dose group	9	20.29±0.90	316.71±0.23	49.74±0.02*	110.63±0.04	19.33±0.01*
新疆阿魏高剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> high dose group	10	23.82±2.34	416.66±0.32	63.19±0.02*	121.28±0.02	26.69±0.01*
新疆阿魏低剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> low dose group	10	22.65±2.08	269.77±0.08	51.68±0.01*	116.89±0.03	24.54±0.12*
多伞阿魏高剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> high dose group	10	21.82±1.65	246.76±0.14	56.57±0.02*	116.68±0.03	23.75±0.01*
多伞阿魏低剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> low dose group	10	23.40±2.16	235.28±0.09 [#]	59.16±0.02*	125.58±0.04	28.00±0.01
准噶尔阿魏高剂量组 <i>F. songorica</i> high dose group	9	19.68±1.96*	141.77±0.08 ^{##}	13.94±0.004 ^{**}	68.16±0.01*	11.55±0.03 ^{**}
准噶尔阿魏低剂量组 <i>F. songorica</i> low dose group	10	19.87±1.31*	120.78±0.06 ^{##}	18.12±0.01 ^{**}	83.68±0.01*	3.48±0.03 ^{**}

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

2.3 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的作用和影响

实验结果如表 3、表 4、图 3 所示。在体重方面,结果表明准噶尔阿魏高低剂量组小鼠体重与正常组相比较明显减轻($P<0.05$),差异具有统计学意义;其它 4 种阿魏给药组小鼠体重与正常组相比较无明显变化($P>0.05$)。



注:A:正常对照;B:多伞阿魏;C:准噶尔阿魏;D:新疆阿魏;E:托里阿魏;F:圆锥茎阿魏。

图2 新疆5种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的凋亡作用图
Note. A, Normal control. B, *F. ferulaeoides*. C, *F. songorica*. D, *F. sinkiangensis*. E, *F. krylovii*. F, *F. conocaula*.

Figure 2 The apoptosis rate of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

表4 新疆5种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠脏器指数及抑瘤率的影响

Table 4 Effects of five species of *Ferula* in Xinjiang on organ index and tumor inhibition rate of colon cancer CT-26 mice

组别 Groups	n	抑瘤率(%) Tumor inhibition rate	脾指数(mg/g) Spleen index	肾指数(mg/g) Renal index	胸腺指数(mg/g) Thymus index
正常组 Normal group	10	/	3.88±1.00	6.56±0.46	1.78±0.62
模型组 Model group	11	/	3.42±0.67	8.55±1.49	1.65±0.70
顺铂组 Cisplatin group	4	98.40	0.88±0.65**	5.40±0.82	0.07±0.05**
圆锥茎高剂量组 <i>F. conocaula</i> high dose group	10	-36.74	3.17±0.78	5.41±0.87	1.09±0.26
圆锥茎低剂量组 <i>F. conocaula</i> low dose group	10	-20.75	2.75±0.36*	5.11±1.02	1.47±0.40
托里阿魏高剂量组 <i>F. krylovii</i> high dose group	10	-17.47	2.25±0.70*	5.39±0.92	1.07±0.69*
托里阿魏低剂量组 <i>F. krylovii</i> low dose group	9	14.51	2.45±0.91*	5.45±2.02	0.95±0.41*
新疆阿魏高剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> high dose group	10	-12.47	2.65±0.90*	5.09±0.80	1.12±0.28
新疆阿魏低剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> low dose group	10	27.18	2.28±0.53*	5.16±1.41	1.08±0.77
多伞阿魏高剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> high dose group	10	33.39	2.59±0.85*	5.35±1.13	1.09±0.37
多伞阿魏低剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> low dose group	10	36.49	2.53±0.64*	5.37±1.30	1.20±0.42
准噶尔阿魏高剂量组 <i>F. songorica</i> high dose group	9	61.73	0.71±0.18**	3.46±0.99*	0.59±0.19**
准噶尔阿魏低剂量组 <i>F. songorica</i> low dose group	10	67.40	0.91±0.30**	4.21±0.68*	0.18±0.13**

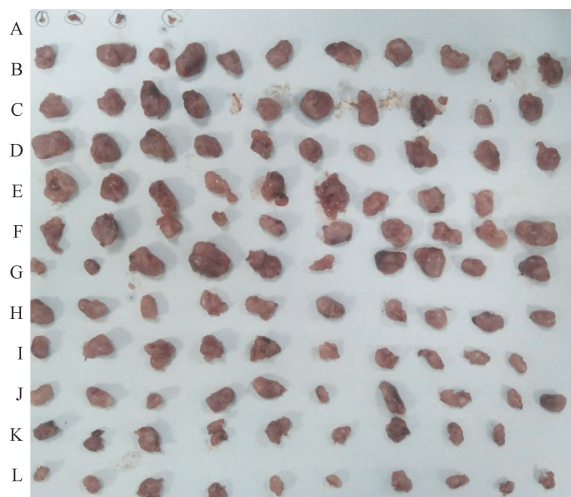
注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

在脾重、脾指数方面,结果表明5种阿魏高低剂量组小鼠脾重、脾指数与正常组相比较明显减轻($P<0.05$, $P<0.01$),差异具有统计学意义,其中准噶尔阿魏的减轻更为显著。

在肾重、肾指数方面,结果表明准噶尔阿魏高低剂量组小鼠肾重、肾指数与正常组相比较明显减轻($P<0.05$),差异具有统计学意义;其它4种阿魏给药组小鼠肾重、肾指数与正常组相比较无明显变化($P>0.05$)。

在胸腺重、胸腺指数方面,结果表明托里阿魏、准噶尔阿魏高低剂量组小鼠胸腺重、胸腺指数与正常组相比较明显减轻($P<0.05$),差异具有统计学意义;其它3种阿魏给药组小鼠胸腺重、胸腺指数与正常组相比较无明显变化($P>0.05$)。

在抑瘤率方面,从实验结果可知,托里阿魏低剂量组、新疆阿魏低剂量组、多伞阿魏高低剂量组、准噶尔阿魏高低剂量组抑瘤率分别为14.51%、27.18%、33.39%、36.49%、61.73%、67.40%。其中准噶尔阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的抑制作用最强。



注:A:顺铂组;B:模型组;C:圆锥茎阿魏高剂量组;D:圆锥茎阿魏低剂量组;E:托里阿魏高剂量组;F:托里阿魏低剂量组;G:新疆阿魏高剂量组;H:新疆阿魏低剂量组;I:多伞阿魏高剂量组;J:多伞阿魏低剂量组;K:准噶尔阿魏高剂量组;L:准噶尔阿魏低剂量组。

图3 结肠癌 CT-26 小鼠肿瘤生长情况

Note. A, Cisplatin group. B, Model group. C, *F. conocaula* high dose group. D, *F. conocaula* low dose group. E, *F. krylovii* high dose group. F, *F. krylovii* low dose group. G, *F. sinkiangensis* high dose group. H, *F. sinkiangensis* low dose group. I, *F. ferulaeoides* high dose group. J, *F. ferulaeoides* low dose group. K, *F. songorica* high dose group. L, *F. songorica* low dose group.

Figure 3 The tumor growth of colon cancer CT-26 mice

3 讨论

阿魏属 *Ferula L.* 隶属于伞形科芹亚科 *Apiioideae* Drude. 前胡族 (*Peucedaneae* Drude.) 阿魏亚族 *Ferulinae* Drude. 植物。全世界该种植物较多,主要以地中海地区、非洲北部、西亚和中亚地区为主要生长地。根据《新疆植物志》记载,我国约有 25 种及 1 变种,分布于我国新疆、东北、山西、西藏等地。新疆以伊宁、阜康、托里、塔城及乌恰等地为主要生长区^[12-13]。该属植物大都有刺鼻的蒜臭味,常称为“臭阿魏”;无该气味的则称为“香阿魏”。臭阿魏类分泌的树脂大都被用来入药,最早记载于中国的《新修本草》,其后历代本草均有记载,具有悠久的历史。

据记载,阿魏的油胶树脂常被用来治疗结肠癌、子宫癌和胃癌等恶性肿瘤,并且发现其具有一定的治疗作用。Kasaian 等^[14]从 *Ferula oopoda* 中分离的倍半萜内酯化合物 dehydrooopodin 作用于人乳腺癌细胞 MCF7 和人白血病细胞 K562,均具有显著的抑制作用。Matin 等^[15]从羊食阿魏 (*Ferula ovina*) 中分离出的萜类化合物 Ferutin,对人乳腺癌 MCF7

细胞与膀胱移行细胞癌 TCC 产生快速凋亡作用。王飒等^[16]提取多伞阿魏挥发油、水提、乙醇、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯等不同极性部位,研究表明对人胃癌 SGC-7901 细胞均有一定抑制作用,其中三氯甲烷提取部位活性最强;发现应用水蒸气蒸馏法与微波萃取法两种不同提取方法,其挥发油对 SGC-7901 细胞的抑制作用最为明显。

MTT 法的原理是活细胞可使 MTT 还原为蓝紫色结晶甲臌,而死细胞没有这个作用,用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解细胞中的甲臌,细胞呈现的蓝紫色与细胞活性正相关,死细胞未染色,通过测定 OD₄₉₀,可反映细胞的活性。该法操作简单、快捷、稳定,能够准确测定细胞的增殖情况,且价格适中。虽 CCK-8 法具有检测速度快、灵敏度高、重复性好等优点,但其适用于检测悬浮细胞,价格昂贵;故本实验采用 MTT 法检测细胞增殖情况^[17-18]。

肿瘤细胞具有非常强的增殖能力,这是肿瘤在机体内发展迅速的重要原因,抑制肿瘤细胞的增殖能提高肿瘤患者的综合治疗效果。根据美国国立癌症研究所公布的天然药物抗肿瘤作用标准,植物的粗提物对肿瘤细胞 IC₅₀ < 30 μg/mL 或 100 μg/mL 抑制率在 80% 左右,可初步认为有一定的抗肿瘤作用,有进一步研究的价值根据本实验结果显示,可做出以下推断:对于人结肠癌 HCT 116 细胞:多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的增殖抑制作用较好,托里阿魏、圆锥茎阿魏的增殖抑制作用较弱;其中抑制作用较强的部位多集中于石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯部位。植物粗提物中可能含有较多的杂质、离子,理化性质不稳定,本实验目前只是对 5 种阿魏的抗肿瘤作用进行初步的筛选,所以体外细胞实验部分并不能确定是否是药物的真实作用,其后将进行体内动物实验进行药效学验证。

肿瘤细胞结构功能和自身代谢异常导致肿瘤细胞无休止增殖是引起恶性肿瘤的主要原因,常采用细胞凋亡检测肿瘤细胞的结构功能、自身状态,其在控制细胞异常增殖,防止肿瘤的发生发展的研究中起重要作用。检测细胞凋亡的方法有形态学检测、线粒体膜势能的检测、流式细胞术等方法,其中流式法每次可以高速分析 10³ ~ 10⁷ 个细胞,并能从一个细胞中测得许多数值,具有检测方便、速度快、精密度高、准确性高等多种优点^[19]。

凋亡早期的细胞表现为磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻,Annexin-V 是一种磷脂结合蛋白,可以与 PS 结合。碘化丙啶 (PI) 为核酸染料,用来区分存活的早期、坏死或晚期凋亡细胞,可以通过晚调和死细胞

膜使其染上颜色。故将 Annexin V 与 PI 联合使用检测细胞凋亡情况^[20]。本实验采用 Annexin V-FITC/PI 试剂检测,实验结果准噶尔阿魏乙醇提取物对于结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用较好,凋亡率为 28.50%。

《中国药典》品种的新疆阿魏、阜康阿魏已经濒临灭绝,其他品种阿魏资源较丰富,在新疆民间广泛使用。《新疆植物志》中记载:多伞阿魏 *F. ferulaeoides* 在新疆民间用作中药阿魏的代用品,准噶尔阿魏 *F. songorica* 在苏联哈萨克斯坦民间用来治疗头疼、感冒、胃病等。本课题拟从其他品种阿魏中寻找与药典阿魏药效相似的品种,验证其药用价值。结果表明新疆 5 种阿魏抗肿瘤实验中,准噶尔阿魏高低剂量组对结肠癌小鼠的抑瘤率为 61.73%、67.40%,且优于新疆、多伞阿魏等品种,托里阿魏与圆锥茎阿魏效果较差。在《抗肿瘤药效学指导原则》中要求,研究抗肿瘤药物时,天然药物对肿瘤的抑瘤率大于 40%时,可初步判定该药物具有一定的抗肿瘤作用,具有进一步的研究价值^[21-22]。故从实验结果显示准噶尔阿魏对结肠癌的抑制作用较好,有待进一步的深入研究与开发。

综上所述,新疆 5 种阿魏中,准噶尔阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞具有增殖抑制、促凋亡作用,对结肠癌 CT-26 小鼠的抑瘤率较高,具有较高的药用价值,因此,本课题后期将以准噶尔阿魏为研究重点,进行 5 种阿魏肝、肾病理切片及生化指标的测定,对人肝、肾正常细胞的影响,从而明确准噶尔阿魏抗肿瘤的有效性及安全性,为进一步深入研究奠定实验基础。

参考文献:

- [1] 赵嘉宁,梁惠玲,杨娟,等. 天门冬水提物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 14-22.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社; 2020.
- [3] Zhang HY, Lu J, Zhou LL, et al. Antioxidant and antitumor effects of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20845-20852.
- [4] 罗福祥,卢军,张海英,等. 新疆阿魏乙酸乙酯部位体内外对 CT-26. WT 细胞的影响[J]. 中成药, 2017, 39(2): 238-243.
- [5] 罗福祥,卢军,张海英. 新疆阿魏乙酸乙酯分离部位对 HCT116 细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(12): 69-72.
- [6] 毛玉宁,柳森森,巩森森,等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 23-30.
- [7] 黄虹,黄蝶,王瑞杰,等. 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 31-37.
- [8] 宣伟军,黄力毅,宣毅,等. 复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 338-344.
- [9] 刘友强,王贵英,胡冀陶,等. 洛铂对结肠癌细胞的抗肿瘤活性及机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 89-94.
- [10] Guo B, Han X, Tkach D, et al. AMPK promotes the survival of colorectal cancer stem cells [J]. Animal Model Exp Med, 2018, 1(2): 134-142.
- [11] Oliveira RC, Abrantes AM, Tralhão JG, et al. The role of mouse models in colorectal cancer research-the need and the importance of the orthotopic models [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 1-8.
- [12] 杨秀伟. 阿魏属药用植物的物质基础[J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 123-144.
- [13] 黄雅婷,岳丽君,申翔宇,等. 新疆阿魏化学成分及药理活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(6): 495-499.
- [14] Kasaian J, Iranshahy M, Masullo M, et al. Sesquiterpene lactones from *Ferula oopoda* and their cytotoxic properties [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(3): 248-253.
- [15] Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, et al. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from *Ferula ovina* [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2123-2128.
- [16] 王颀,盛萍,姚蓝,等. 维药多伞阿魏体外抗胃癌活性部位 GC-MS 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2874-2879.
- [17] Feng F, Li X, Li R, et al. The multiple-kinase inhibitor lenvatinib inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 178-184.
- [18] 崔玮,丁玲强,曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.
- [19] Ypsilantis P, Meditskou S, Lambropoulou M, et al. Spontaneous pancreatic undifferentiated pleomorphic sarcoma in a laboratory rat: a case report [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 222-225.
- [20] 金晶玉,朱成杰,权英实,等. 罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 88-92.
- [21] 吕建敏,龚金炎,刘士旺,等. 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 216-223.
- [22] 沙依拜·沙比提,丛媛媛,古丽尼歌尔·阿布都米吉提,等. 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 197-203.

[收稿日期]2022-05-19