

苦参碱对 EC109 肿瘤细胞增殖的影响^{*}

雷佳红^{1,2}, 蒋红², 刘素兰^{1,2}, 张军^{1,2}, 王光华^{1,2}, 柴震^{1,2}, 杨明辉^{1,2△} (1. 川北医学院检验系, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院风湿免疫研究所, 四川南充 637000)

【摘要】 目的 探讨苦参碱作用人食管癌细胞株 EC109 后对细胞增殖的影响。**方法** 应用不同浓度苦参碱(0.187 5、0.375、0.75、1.5 mg/mL)作用体外培养人食管癌细胞株 EC109 后,分别用倒置显微镜观察细胞生长数量及其形态的变化;四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测苦参碱的细胞毒作用。**结果** 不同浓度苦参碱作用人食管癌细胞株 EC109 后,细胞抑制率为 15.60%~65.69%,与对照组比较细胞生长明显受到抑制($P<0.05$)。且随着苦参碱浓度的增加及作用时间的延长,EC109 存活细胞显著减少,呈明显的剂量依赖性。**结论** 苦参碱能明显抑制人食管癌细胞株 EC109 细胞增殖。

【关键词】 苦参碱; 食管癌细胞; 增殖

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0129-02

Effects of matrine on proliferation of EC-109 cells^{*} LEI Jia-hong^{1,2}, JIANG Hong², LIU Su-lan^{1,2}, ZHANG Jun^{1,2}, WANG Guang-hua^{1,2}, CHAI Zhen^{1,2}, YANG Ming-hui^{1,2△} (1. Faculty of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Institute of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of matrine on proliferation of EC-109 cell. **Methods** EC-109 cells cultivated in vitro were treated by different concentrations of matrine(0.187 5, 0.375, 0.75, 1.5 mg/mL). And then, the changes of cell morphology and cell growth number were observed by inverted microscope and the cellotoxic activity of matrine was detected by MTT. **Results** In the range of 0.187 5—1.5 mg/mL, the cells inhibition rate was 15.60%—65.69%, showing obvious inhibition of cell growth compared with the control group($P<0.05$). With concentration increase and time extension, the survival EC-109 cells were significantly decreased, showing obvious dose dependence. **Conclusion** Matrine can significantly inhibit the proliferation of EC-109 cells in vitro.

【Key words】 matrine; esophagus carcinoma cell; proliferation

中药是我国的传统药物,历史悠久,是我国医药经济中独具特色的重要组成部分。天然产物特别是植物代谢产物一直是新药先导化合物和新药发现的重要资源,如:生物碱类、醌类化合物、黄酮类化合物、木脂素等。苦参碱(matrine, Mat)是苦豆子、苦参、广豆根等豆科槐属植物中生物碱的主要成分,是苦参型生物碱的主要活性成分^[1],是具有广泛药理作用的一种活性物质,具有抗病毒、抗感染、抗过敏等多种作用。对其进一步研究表明,苦参碱还具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡作用,但没有化疗药物的毒副作用^[2]。本实验在体外观察苦参碱对食管癌细胞株 EC109 细胞生长、增殖的影响,为其抗肿瘤治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人食管癌细胞株 EC109 由川北医学院附属医院风湿免疫研究所保存。细胞接种于含 10% 新生牛血清的 1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下培养,用 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2 主要试剂 四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);1640 培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];新生牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所)。

1.3 实验药物 苦参碱注射液为广州明兴药业有限公司产品

(批号:06090422),5 mg/mL, -20℃ 保存,用时以培养液稀释成所需浓度。

1.4 仪器设备 超净工作台(安泰公司),细胞培养箱(德国),倒置显微镜(Olympus),酶标仪(Benchmark)。

1.5 方法

1.5.1 细胞形态学观察 取对数生长期细胞以 1×10^5 /mL 悬液每孔 2.0 mL 接种于 6 孔板中。实验分 4 个不同浓度梯度,分别为 0.187 5、0.375、0.75、1.5 mg/mL 的处理组及不加药物的对照组。接种细胞培养 24 h,将培养液换成含不同浓度苦参碱的培养液,对照组加等量的生理盐水,按常规培养条件培养 24 h,分别于倒置显微镜下拍照,观察细胞形态学改变。

1.5.2 MTT 法检测苦参碱对 EC109 细胞毒作用^[3] 将传代后的 SGC7901 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成悬液,细胞计数板计数,调整细胞浓度为 1×10^4 /mL 到 96 孔培养板上,每孔加 200 μ L 细胞悬液,培养 24 h 后,加入不同浓度苦参碱(0.187 5、0.375、0.75、1.5 mg/mL),另设对照组(不加苦参碱)和空白对照组(只加培养基)。每组设 5 个平行孔,培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,置 37℃、5% CO₂ 条件下继续孵育 4 h 终止培养,倾去培养液。每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶充分溶解。选择 490 nm 波长,以空白孔调 0,在酶标仪上测定各孔吸光度(A)值。按下列公式

^{*} 基金项目:四川省卫生厅资助科研项目(100138)。 [△] 通讯作者, E-mail: ymh6782003@yahoo.com.cn。

计算细胞抑制率：

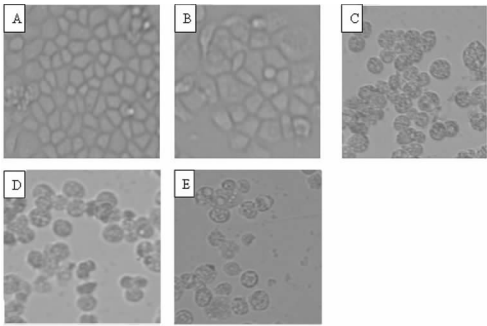
$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照组 A490} - \text{用药组 A490})}{\text{对照组 A490}} \times 100\%。$$

1.5.3 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 苦参碱对 EC109 形态的影响 将对照组与实验组标本放在倒置显微镜下观察细胞形态(图 1),发现对照组细胞数量多,细胞贴壁生长,细胞间结构紧密,生长旺盛。而实验组细胞在加药 24 h 后,可见细胞变圆,胞体增大,胞内可见大小不等的空泡样结构,细胞不贴壁,死亡,细胞数量与对照组比较明显减少。

2.2 MTT 法检测苦参碱对 EC109 细胞毒作用 不同浓度苦参碱处理 EC109 细胞 24 h 后,经 MTT 法检测,活细胞数明显减少,IC50 值为 0.75~1.5 mg/mL,见表 1。由表 1 可以看出:苦参碱对 EC109 存在细胞毒作用,但与苦参碱浓度有关,0.187 5 mg/mL 组与对照组抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$),抑制率为 15.60%。0.375、0.75、1.5 mg/mL 三组抑制率分别为 18.66%、34.54%、65.69%,与对照组比较差异有统计学意义。



A:对照组细胞;B、C、D、E:分别为采用 0.187 5、0.375、0.75、1.5 mg/mL 苦参碱处理 24 h 后的细胞形态。

图 1 苦参碱对食管癌细胞株 EC109 的作用(×100)

表 1 苦参碱对 EC109 细胞毒作用				
组别	药物浓度(mg/mL)	A 值(A490)($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	P
空白组	0	0.322 3±0.014 5	0.00	—
对照组	0	1.104 8±0.046 8	0.00	—
实验组	0.187 5	0.982 7±0.019 0	15.60	0.097
	0.375	0.958 8±0.027 8	18.66*	0.032
	0.75	0.834 5±0.055 1	34.54*	0.003
	1.5	0.590 6±0.008 6	65.69*	0.001

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。—:表示无数据。

3 讨 论

食管癌是世界一些国家和地区常见的恶性肿瘤,早期很难发现,中晚期患者生存率较低。我国食管癌病死率居恶性肿瘤死亡第 4 位,年平均病死率为 14.59/10 万,位于胃癌、肝癌和肺癌之后,且发病有年轻化趋势,严重威胁着人们的身体健康^[4]。其发病有明显的地区性,作者所在的川北地区更是全国食管癌高发区。因此,加强对本病的研究,提高临床疗效,最大限度地改善患者的生存质量是当前研究的迫切需要。

苦参碱是从豆科植物苦参根茎中提取的一种生物碱类活性成分。众多研究表明,苦参碱具有体内及体外抗肿瘤作用,可以抑制细胞增殖,且对癌细胞具有直接杀伤作用。苦参碱可以抑制胃腺癌细胞系 MKN45 增殖并诱导凋亡,其促凋亡作用与 Bcl-2 相关^[5]。同时在对白血病细胞系研究中发现,苦参碱可以抑制 K562 细胞的增殖并诱导其分化^[6]。司维柯等^[7]研究表明,苦参碱在体外可诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 向正常肝细胞分化,一定量的苦参碱对肝癌细胞株 HepG2 的增殖有抑制作用。其直接抗肿瘤作用主要是作用于肿瘤细胞的生长周期,诱导肿瘤细胞凋亡和肿瘤细胞分化,抗肿瘤转移。此外,在动物实验中将苦参碱与 5-氟尿嘧啶(5-Fu)联用,两者可以产生协同作用^[8]。而这些都提示其在抗肿瘤细胞增殖方面有良好的效果。

本研究在体外以不同浓度苦参碱作用食管癌细胞株 EC109,光镜下观察苦参碱对 EC109 细胞形态的影响,用 MTT 法检测培养 24 h 的活细胞数量,探讨苦参碱对 EC109 细胞增殖的影响,结果发现:苦参碱作用 EC109 细胞后,细胞数量明显减少,细胞变为不规则形,胞体增大,胞内可见大小不等的空泡样结构,细胞核边移等一系列改变。MTT 实验证实,在 0.187 5~1.5 mg/mL 随着苦参碱浓度的增加,各组均出现细胞增殖抑制,并且抑制率与苦参碱浓度呈明显的剂量依赖性,二者具有良好的相关性,但具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 熊小春,安春妹.苦参碱抗肿瘤研究概况[J].中国医药导报,2009,6(33):10-12.

[2] 赵军燕,郑艳敏,赵红燕,等.苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖凋亡及 JAK2STAT 信号通路的影响[J].中药药理与临床,2008,24(4):81-83.

[3] 姜孟臣,王火,陈虹.苦参碱对人黑素瘤细胞系增殖抑制的体外研究[J].天津药学,2003,15(2):9-11.

[4] 叶任高.内科学[M].6 版,北京:人民卫生出版社,2005:374.

[5] Luo C, Zhu Y, Jiang T, et al. Matrine induced gastric cancer MKN45 cells apoptosis via increasing pro-apoptotic molecules of Bcl-2 family[J]. Toxicology, 2007, 229(3): 245-252.

[6] Zhang LP, Jiang JK, Tam JW, et al. Effects of matrine on proliferation and differentiation in K-562 cells[J]. Leuk Res, 2001, 25(9): 793-800.

[7] 司维柯,潘静,陆华,等.苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J].世界华人消化杂志,2001,9(2):185-186.

[8] Hu MJ, Zeng H, Wu YL, et al. Synergistic effects of matrine and 5-fluorouracil on tumor growth of the implanted gastric cancer in nude mice[J]. Chin J Dig Dis, 2005, 6(2):68-71.

(收稿日期:2011-07-27)