

复方苦参注射液对人肝癌 SMMC7721 细胞增殖的抑制作用

刘晓凤*, 简晓顺(广州医科大学附属肿瘤医院药学部, 广州 510095)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2190-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.10

摘要 目的:研究复方苦参注射液对人肝癌 SMMC7721 细胞增殖的抑制作用。方法:体外传代培养 SMMC7721 细胞。10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 24、48、72 h 后,采用 MTT 法测定细胞活力并计算抑制率。0(阴性对照)、10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 48 h 后采用流式细胞仪测定细胞凋亡率,并分析细胞周期分布百分比。结果:10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 24、48、72 h 对细胞具有明显的抑制作用,且具有时间和剂量依赖性。与阴性对照比较,40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例明显升高 ($P < 0.05$), S 期细胞比例明显降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。结论:复方苦参注射液对 SMMC7721 细胞的增殖具有抑制作用,其机制可能是诱导细胞凋亡、阻滞细胞于 G_0/G_1 期。

关键词 复方苦参注射液;人肝癌 SMMC7721 细胞;细胞增殖;凋亡

Inhibitory Effects of Compound Kushen Injection on the Proliferation of Human Hepatoma SMMC7721 Cells

LIU Xiao-feng, JIAN Xiao-shun (Dept. of Pharmacy, Cancer Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of Compound kushen injection on the proliferation of human hepatoma SMMC7721 cells. METHODS: Human hepatoma cell line SMMC7721 was subcultured *in vitro*. MTT assay was adopted to determine cell viability after the cells were cultured in 10 $\mu\text{l/ml}$, 20 $\mu\text{l/ml}$, 40 $\mu\text{l/ml}$, 80 $\mu\text{l/ml}$ and 160 $\mu\text{l/ml}$ Compound kushen injection for 24 h, 48 h and 72 h, and the inhibition rates were calculated. The apoptosis rates was determined after the cells were cultured in 0 (negative control), 10 $\mu\text{l/ml}$, 20 $\mu\text{l/ml}$, 40 $\mu\text{l/ml}$, 80 $\mu\text{l/ml}$ and 160 $\mu\text{l/ml}$ Compound kushen injection for 48 h, and the cells were cultured therein for 48 h, and percentage of cell cycle distribution was analyzed. RESULTS: After the cells were cultured in 10 $\mu\text{l/ml}$, 20 $\mu\text{l/ml}$, 40 $\mu\text{l/ml}$, 80 $\mu\text{l/ml}$ and 160 $\mu\text{l/ml}$ Compound kushen injection for 24 h, 48 h and 72 h, the injection showed obvious inhibitory effect on the cells with time and dose-dependence. Compared with negative control group, the proportion of the cells in G_0/G_1 phase was obviously increased ($P < 0.05$) and that of the cells in S phase was obviously decreased ($P < 0.05$), and the apoptosis rates of the cells were obviously increased ($P < 0.05$) after the cells were cultured in 40 $\mu\text{l/ml}$, 80 $\mu\text{l/ml}$ and 160 $\mu\text{l/ml}$ Compound kushen injection for 48 h. CONCLUSIONS: Compound kushen injection have inhibitory effects on the proliferation of SMMC7721 cells by a mechanism that may be related to the induction of apoptosis and G_0/G_1 cell cycle arrest.

KEYWORDS Compound kushen injection; Human hepatoma SMMC7721 cells; Cell proliferation; Apoptosis

复方苦参注射液是由以苦参、土茯苓经现代工艺制得的复方制剂。苦参作为该方的主药具有杀虫利湿、清热的功效;土茯苓具有祛风通络、散结解毒、利湿的功效。研究发现复方苦参注射剂主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、脱氧苦参碱、土茯苓多糖等,该类成分在提高免疫能力、抑制肿瘤细胞生长等方面有较强的药理作用^[1-2]。复方苦参注射液临床主要应用于中晚期恶性肿瘤的辅助治疗^[3-5],其临床应用广泛,但有关复方苦参注射剂的药效学与作用机制的基础研究相对于临床研究而言存在不足。笔者通过体外试验探讨复方苦参注射液对人肝癌 SMMC7721 细胞增殖的抑制作用,旨在从细胞学角度探讨该注射剂对人体呼吸系统肿瘤细胞的作用机制,为该中药复方临床应用提供有效的试验依据。

1 材料

1.1 仪器

BCM-1600A 型超净工作台(苏州安泰洁净科技有限公

* 副主任药师。研究方向:药学。电话:020-66673666-2002。E-mail: lxfww7507@126.com

司);LT-CIX160FT 型 CO_2 培养箱[立德泰勃(上海)科学仪器有限公司];MoFlo XDP 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);Tecan Infinite 200 PRO 型自动酶标仪(上海帝肯贸易有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方苦参注射液(山西振东制药股份有限公司,批号:14021231,规格:5 ml/支);MTT(上海榕柏生物技术有限公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡测试盒(南京凯基生物科技有限公司)。

1.3 细胞

SMMC7721 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

2 方法

2.1 细胞的培养

采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 SMMC7721 细胞,并制成单细胞悬液。

2.2 细胞抑制率的测定

取对数生长期的 SMMC7721 细胞。用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$, 接种于 96 孔板, 并于 37°C 、5% 饱和湿度 CO_2 培养箱中培养。形成贴壁细胞层后, 以 10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 24、48、72 h, 每个质量浓度平行操作 6 份。试验结束后弃去上清液, 并加入 MTT 溶液后继续培养 4 h, 依试剂盒处理方法处理后, 采用全自动酶标仪于 570 nm 处测定各样本光密度(OD)。以 OD 值代表细胞活力并计算细胞抑制率。

2.3 细胞凋亡率与周期分布百分比的测定

取对数生长期的 SMMC7721 细胞。用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$, 接种于 96 孔板, 并于 37°C 、5% 饱和湿度 CO_2 培养箱中培养。形成贴壁细胞层后, 以 0 (阴性对照)、10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 48 h 后, 每个质量浓度平行操作 6 份。用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 常规离心弃去上清液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 常规离心后取上清液, 依试剂盒方法处理后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 分析细胞周期分布百分比。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理试验数据。各组数据均为计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率的测定结果

10、20、40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 24、48、72 h 后对细胞生长具有明显的抑制作用, 且有明显的时间、剂量依赖性。细胞抑制率的测定结果见表 1。

表 1 细胞抑制率的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Determination results of cell proliferation rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, $\mu\text{l/ml}$	各时间点的细胞抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
10	15.84 \pm 1.78	16.97 \pm 1.67	18.01 \pm 1.73
20	16.37 \pm 1.93	19.04 \pm 2.01	22.12 \pm 1.78
40	24.17 \pm 2.47	47.19 \pm 2.01	69.04 \pm 1.88
80	28.12 \pm 2.04	54.18 \pm 1.99	77.86 \pm 2.31
160	32.78 \pm 2.45	67.97 \pm 2.05	81.27 \pm 0.15

3.2 细胞凋亡率的测定结果

40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 48 h 后, 细胞出现明显凋亡, 与阴性对照比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞凋亡率的测定结果见表 2。

表 2 细胞凋亡率的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Determination results of apoptosis rates ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, $\mu\text{l/ml}$	凋亡率, %
0 (阴性对照)	1.36 \pm 2.32
10	1.72 \pm 0.17
20	6.32 \pm 2.24
40	29.71 \pm 2.63*
80	30.85 \pm 2.58*
160	31.46 \pm 2.93*

注: 与阴性对照比较, * $P < 0.05$

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$

3.3 细胞周期分布百分比的测定结果

40、80、160 $\mu\text{l/ml}$ 复方苦参注射液培养细胞 48 h 后, G_0/G_1 期细胞百分比明显上升, S 期细胞百分比明显下降, 与阴性对照比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明复方苦参注射液能够促使 SMMC7721 细胞滞留于 G_0/G_1 期, 抑制其进入 S 期, 进而阻止其分裂和生长过程。细胞周期分布百分比的测定结果见表 3。

表 3 细胞周期分布百分比的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Determination results of percentages of cell-cycle distribution ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, $\mu\text{l/ml}$	$\text{G}_0/\text{G}_1, \%$	S, %	$\text{G}_2/\text{M}, \%$
0 (阴性对照)	44.28 \pm 1.97	41.09 \pm 0.85	14.63 \pm 1.90
10	46.12 \pm 2.32	43.17 \pm 1.52	10.71 \pm 1.18
20	52.01 \pm 3.84	34.70 \pm 1.45	13.29 \pm 1.93
40	56.97 \pm 2.87*	24.17 \pm 0.73*	18.86 \pm 1.65
80	57.39 \pm 2.63*	23.84 \pm 0.94*	18.77 \pm 1.79
160	59.75 \pm 1.49*	23.02 \pm 1.06*	17.23 \pm 1.98

注: 与阴性对照比较, * $P < 0.05$

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$

4 讨论

肝癌是临床常见恶性肿瘤之一, 其致死率高居所有肿瘤致死率第 2 位^[6]。化疗是治疗中晚期肝癌的重要措施之一, 能够延长患者中位生存时间^[7]。临床研究表明, 复方苦参注射液对肺癌 Lewis 细胞^[8]、鼻咽癌 CNE 细胞^[9]和胃腺癌 SGC7901 细胞^[10]具有明显的体外杀伤作用, 影响 CNE 及 SGC7901 细胞周期, 促进 SGC7901 细胞抑制转移因子 NM23 的表达, 从而抑制肿瘤转移; 复方苦参注射液对大肠癌 Lovo 细胞、前列腺癌 PC3 细胞增殖均有抑制作用^[11]。本研究采用 MTT 法发现, 复方苦参注射液能够有效抑制 SMMC7721 细胞体外增殖过程, 且随着药物质量浓度的增加以及作用时间的延长, 该抑制作用逐步增加。此外, 经流式细胞仪分析发现复方苦参注射液能促使 SMMC7721 肿瘤细胞滞留于 G_0/G_1 期, 抑制其进入 S 期, 进而阻止其分裂和生长过程; 同时, 复方苦参注射液能够促进 SMMC7721 细胞凋亡, 升高 SMMC7721 肿瘤细胞凋亡率。

综上所述, 复方苦参注射液对 SMMC7721 细胞的增殖过程具有抑制作用, 能够影响其细胞周期分布, 并促进其凋亡。

参考文献

- [1] 张孙伟. HPLC 测定复方苦参胶囊中苦参碱与氧化苦参碱的含量[J]. 当代医药论丛, 2014, 16(2): 1.
- [2] 孙立伟, 任秀宝. 复方苦参注射液联合氟比洛芬酯脂微球注射液治疗中晚期癌痛的疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 23(4): 743.
- [3] 陈衍智, 李元青, 王薇, 等. 复方苦参注射液治疗轻中度癌性疼痛的临床研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(1): 61.
- [4] 黄思夏, 范文斌, 刘鹏, 等. 复方苦参注射液联合铂类药物化疗治疗中晚期胃癌的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3 198.
- [5] 钱锋, 周立新, 饶云. 复方苦参注射液对胃癌术后付诸化疗患者免疫功能的影响[J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 18(5): 335.
- [6] 李月, 郑作文, 唐云丽. 藤茶总黄酮体外抗人肝癌细胞作

淫羊藿苷对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌组织的保护作用

翟宏颖^{1*}, 于林楠²(1. 辽宁医学院附属第一医院中医科, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院附属第三医院肿瘤科, 辽宁锦州 121001)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2192-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.11

摘要 目的: 研究淫羊藿苷对心肌缺血再灌注损伤(IR)模型大鼠心肌组织的保护作用。方法: 取SD大鼠随机分为假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组和淫羊藿苷低、中、高剂量(5、10、20 mg/kg)组, 除假手术组6只外其余每组12只。各组大鼠ig给予相应药物, 每日1次, 连续14 d, 末次给药1 h后行冠状动脉结扎术复制IR模型。采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法考察各组大鼠心肌梗死比例; 原位末端标记法检测各组大鼠心肌细胞凋亡率; western blot法检测各组大鼠心肌组织中p38和JNK磷酸化(p-p38、p-JNK)蛋白水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌梗死比例、心肌细胞凋亡率、心肌组织中p-p38和p-JNK蛋白水平均增加, 差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较, 淫羊藿苷各剂量组大鼠上述指标均降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 其中高、中剂量组效果较低剂量组更明显($P < 0.05$)。结论: 淫羊藿苷预处理对IR模型大鼠的心肌组织具有保护作用, 并呈浓度依赖性。其作用机制可能与降低心肌细胞凋亡, 下调p-p38和p-JNK蛋白水平有关。

关键词 淫羊藿苷; 大鼠; 心肌组织; 缺血再灌注损伤; 凋亡; p38蛋白; c-Jun氨基末端激酶

Protective Effects of Icariin on the Myocardial Tissue of Model Rats with Myocardial Ischemic-reperfusion Injury

ZHAI Hong-ying¹, YU Lin-nan²(1. Dept. of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China; 2. Dept. of Oncology, the Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of icariin on the myocardial tissue of model rats with myocardial ischemic-reperfusion (IR) injury. METHODS: SD rats were randomly divided into sham-operation group (isovolumetric saline) ($n=6$), model group (isovolumetric saline) ($n=12$) and icariin low, medium and high dose groups (5, 10, 20 mg/kg) ($n=12$). Rats in all groups were given related drugs, ig, once a day for 14 d. After 1 h of the last administration, coronary artery ligation was conducted to reproduce IR model. TTC staining method was used to detect the cardiac infarction proportion, western blot was used to determine the myocardial cell apoptosis rate and western blot was used to determine the protein level of p38 and JNK phosphorylation (p-p38 and p-JNK) in myocardial tissue of rats. RESULTS: Compared with sham-operation group, the cardiac infarction proportion, myocardial cell apoptosis rate and the protein level of p-p38 and p-JNK in model group were all increased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with model group, the above-mentioned indicators in icariin dose groups were all decreased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); and the effects in high and medium dose groups were more obvious than low dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The pretreatment of icariin has protective effect on myocardial tissue of IR rats with concentration dependent. The mechanism of the action may be associated with reducing the myocardial cell apoptosis and decreasing the protein level of p-p38 and p-JNK.

KEYWORDS Icariin; Rats; Myocardial tissue; Ischemic-reperfusion injury; Apoptosis; p38 protein; c-Jun N-terminal kinase

- 用研究[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 652.
- [7] 吴东德, 夏晓勤, 刘宝珍, 等. 药敏实验指导的区域化疗对不能手术切除肝癌的治疗作用[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(3): 621.
- [8] 段哲萍, 于新江, 刘媛媛. 复方苦参注射液联合放射治疗对肺癌Lewis细胞株在体外的放射增敏作用研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(12): 4 284.
- [9] 胡万宁, 王晓红, 王建功, 等. 复方苦参注射液体外诱导鼻咽癌CNE2细胞凋亡的作用及机制[J]. 山东医药, 2011, 51(9): 92.
- [10] 李芮, 杜健鹏, 侯仰韶, 等. 复方苦参注射液对SGC-7901, HepG2和BEL-7402肿瘤细胞作用的实验研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 18(1): 8.
- [11] 金弢, 胡伟琦, 方迪龙, 等. 苦参注射液与卡铂联合诱导原发性肝癌细胞凋亡的分析研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 13(6): 1 472.

* 医师, 硕士研究生。研究方向: 中西医结合防治心脑血管病。
电话: 0416-4605045。E-mail: Hongying28@126.com

(收稿日期: 2014-10-31 修回日期: 2015-01-11)

(编辑: 张 静)