

黄芪总苷对肺腺癌SPCA-1细胞增殖的抑制作用

王理锋*, 黄晓庆(浙江桐庐县第一人民医院重症监护室, 浙江桐庐 311500)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3502-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.16

摘要 目的:研究黄芪总苷对肺腺癌SPCA-1细胞增殖的抑制作用。方法:以0(空白对照)、7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h,MTT法测定细胞活力并计算半数抑制浓度(IC_{50});末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷(dUTP)和缺口末端标记测定(TUNEL)法、流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果:与空白对照比较,以7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,细胞活力降低($P<0.01$), IC_{50} 为61.75 $\mu\text{g/ml}$;15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,细胞凋亡率升高。结论:黄芪总苷具有一定抗肿瘤作用,其机制可能与抑制癌细胞增殖、促进其凋亡有关。

关键词 黄芪总苷;非小细胞肺癌;肺腺癌SPCA-1细胞;细胞增殖;细胞凋亡

Inhibitory Effects of Astragalosides on Proliferation of Lung Adenocarcinoma SPCA-1 Cells

WANG Li-feng, HUANG Xiao-qing (ICU, the First People's Hospital of Zhejiang Tonglu County, Zhejiang Tonglu 311500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of astragalosides on proliferation of lung adenocarcinoma SPCA-1 cells. METHODS: After the cells were cultured in 0 (blank control), 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125.0 and 250.0 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h, MTT method was used to determine cell viability and median inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) and flow cytometry were employed to detect apoptosis. RESULTS: Compared to the blank control, after the cells were cultured in 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125.0 and 250.0 $\mu\text{g/ml}$ astragalosides for 48 h, the cell viability was poorer ($P<0.01$), and IC_{50} was 61.75 $\mu\text{g/ml}$; after the cells were cultured in 15.6, 31.2, 62.5, 125.0 and 250.0 $\mu\text{g/ml}$ astragalosides for 48 h, the apoptosis rate was higher. CONCLUSIONS: Astragalosides have an anti-tumor effect to some degree by a mechanism which may be related to inhibiting cancer cell proliferation and accelerating apoptosis.

KEYWORDS Astragalosides; Nonsmall cell lung cancer; Lung adenocarcinoma SPCA-1 cells; Cell proliferation; Apoptosis

肺癌是我国甚至是全世界发病率最高的恶性肿瘤之一,也是预后最差的恶性肿瘤之一。据临床研究表明,肺癌具有高度异质性,能够抵抗化疗药物的治疗,5年内死亡率高达80%^[1]。虽然关于癌症的研究不断增多,但是肺癌的发病机制仍然不明确,仍然很难确定肺癌的异质性和耐药性的发病基础^[2]。非小细胞肺癌(NSCLC)在临床上发病率较高但治疗困难,其中肺腺癌又是非小细胞肺癌中最常见的病理类型^[3]。肺腺癌虽然只约占肺癌的20%,但是由于其恶性程度高、倍增时间短、容易转移,对化疗及放疗虽敏感,但极易发生继发性耐药,因此其治疗也一直颇受重视^[4]。黄芪总苷作为豆科植物蒙古黄芪的根提取而得的活性成分,可用于调节体内血糖、增强机体免疫力、提高机体抗氧化能力以及促进免疫生长。笔者拟研究黄芪总苷对肺腺癌SPCA-1细胞增殖的抑制作用,以其临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

IX-70型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);FACS Canto II型流式细胞仪(美国BD公司);全自动酶标仪(赛默飞世尔上海科技有限公司);B15型细胞培养箱(美国Thermo Scientific公司);超纯水仪[密理博(上海)贸易有限公司]。

1.2 药品与试剂

黄芪总苷(上海研生实业有限公司,批号:20110920,规格:20 mg/支,纯度: $\geq 98\%$);MTT、碘化丙啶(PI)、Hoechst

33258(美国Sigma公司);末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷(dUTP)和缺口末端标记测定(TUNEL)法细胞凋亡测试盒、Annexin V-FITC细胞凋亡测试盒(上海碧云天生物技术研究);多聚甲醛(天津科密欧化学试剂有限公司);RPMI 1640培养基(美国Gibco公司)。

1.3 细胞

SPCA-1细胞株由四川大学生物治疗国家重点实验室提供。

2 方法

2.1 细胞培养

SPCA-1细胞复苏接种于250 ml培养瓶中,采用RPMI 1640培养基(含10%小牛血清、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。

2.2 细胞存活率测定

将细胞培养皿中细胞采用胰酶消化,吹打成细胞悬液,调整细胞密度至 $6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,每孔200 μl 均匀接种于96孔板中培养48 h。以0(空白对照)、7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h,每孔加入5 mg/ml MTT 20 μl ,放入孵箱继续孵育4 h,弃去上清液,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl ,振荡10 min。用酶标仪在490 nm波长处读取光密度(OD)以代表细胞活力并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=给药OD/空白对照OD $\times 100\%$ 。通过几率单位加权回归(Bliss)法计算半数抑制浓度(IC_{50})^[6]。每一质量浓度重复测定6次。

2.3 细胞凋亡情况观察

将细胞培养皿中细胞采用胰酶消化,吹打成细胞悬液,调

* 主治医师。研究方向:肺癌的治疗。电话:0571-64399756。
E-mail: wanglif923@163.com

细胞密度为 $8 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。以每孔 $1\ 000 \mu\text{l}$ 均匀接种于预先放有细胞爬片的24孔板中培养24 h。以0(空白对照)、7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h,磷酸盐缓冲液(PBS)轻洗细胞2遍,采用镊子将细胞爬片夹起,将有细胞的一面覆盖于载玻片上,制备成细胞涂片;试验设阴性对照、阳性对照。用4%多聚甲醛PBS溶液固定,制备TUNEL反应混合液,用药组用 $50 \mu\text{l}$ 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)缓冲液+ $450 \mu\text{l}$ 荧光素标记的dUTP液混匀;而阴性对照仅加 $50 \mu\text{l}$ Alexa Fluor 488标记的dUTP液;阳性对照先加入 $100 \mu\text{l}$ 脱氧核糖核酸酶(DNase)1, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下反应10 min,后面步骤同用药组。加 $50 \mu\text{l}$ TUNEL反应混合液于标本上,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下、暗湿盒中避光孵育60 min后,用PBS液终止反应。染色完毕后,用滤纸吸尽标本上多余液体,滴 $10 \mu\text{l}$ 抗荧光淬灭封片液于组织切片上,加盖玻片,并用中性树脂封片。于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.4 细胞凋亡率测定

将细胞培养皿中细胞采用胰酶消化,吹打成细胞悬液,调细胞密度至 $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 。以每孔 $1\ 000 \mu\text{l}$ 均匀接种于预先放有细胞爬片的24孔板中培养24 h。以0(空白对照)、7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,吸弃培养基,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化并收集细胞(胰酶消化时间不易过长,以防引起假阳性);然后用冷PBS洗涤细胞2次后用PBS重悬细胞,计数,使每管 0.1 ml 含 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞;再次离心收集细胞沉淀,用 $400 \mu\text{l}$ Binding Buffer缓冲液悬浮细胞;最后加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC,混匀,再加入 $5 \mu\text{l}$ PI,混匀,室温避光反应10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 统计学分析

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

3 结果

3.1 细胞存活率测定结果

7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,对细胞生长具有明显抑制作用,且呈明显的浓度依赖性。 IC_{50} 为 $61.75 \mu\text{g/ml}$ 。细胞存活率测定结果见表1。

表1 细胞存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

药物	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	OD	存活率, %	$\text{IC}_{50}, \mu\text{g/ml}$
黄芪总苷	0(空白对照)	1.114 ± 0.302	100	
	7.8	$0.312 \pm 0.023^*$	28.01	
	15.6	$0.462 \pm 0.054^*$	41.47	
	31.2	$0.624 \pm 0.033^*$	56.01	61.75
	62.5	$0.782 \pm 0.068^*$	70.20	
	125.0	$0.870 \pm 0.072^*$	78.10	
	250.0	$0.983 \pm 0.149^*$	88.24	

注:与空白对照比较, $*P < 0.01$

Note: vs. blank control, $*P < 0.01$

3.2 细胞凋亡情况观察结果

7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,凋亡细胞增多,且呈明显浓度依赖性。当黄芪总苷质量浓度增大到 $250.0 \mu\text{g/ml}$ 时,细胞凋亡率接近90%。细胞凋亡情况观察结果见图1。

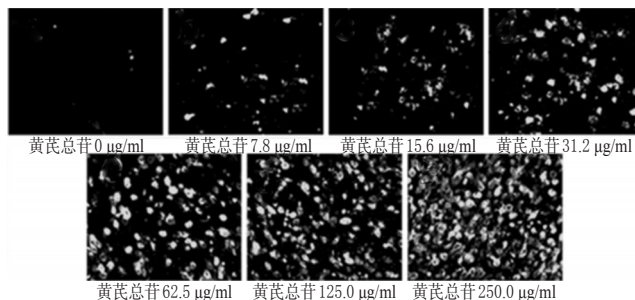


图1 细胞凋亡情况观察结果($\times 200$)

Fig 1 Observation results of cells apoptosis($\times 200$)

3.3 细胞凋亡率测定结果

空白对照和 $7.8 \mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,细胞无明显凋亡;15.6、31.2 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,细胞凋亡率分别为 $(25.19 \pm 2.3)\%$ 、 $(39.21 \pm 3.5)\%$;62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/ml}$ 黄芪总苷培养细胞48 h后,细胞凋亡明显严重,凋亡率分别为 $(63.05 \pm 3.9)\%$ 、 $(78.49 \pm 4.2)\%$ 、 $(84.27 \pm 2.7)\%$ 。细胞凋亡率测定结果见图2。

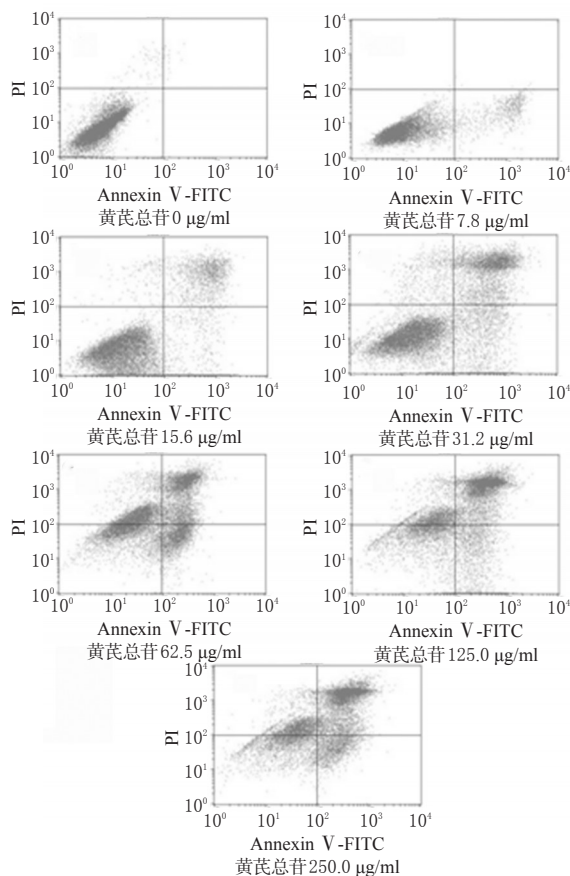


图2 细胞凋亡率测定结果

Fig 2 Determination results of cells apoptosis rate

4 讨论

近年研究表明,可通过阻断或抑制肿瘤细胞的生长、代谢、增殖等过程,从而使肿瘤细胞发生死亡或凋亡^[7]。抑制肿瘤生长、减轻肿瘤症状,为肿瘤的治疗带来希望。

在中医临床用药中,黄芪常单独或者与其他药物配合用于晚期癌症的治疗。主要是因为黄芪总苷能够提高机体的特

妇炎栓抗炎、镇痛与刺激性研究

吴文波*, 孙丽琛, 刘 兴[#](临沂市肿瘤医院, 山东 临沂 276001)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3504-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.17

摘要 目的:研究妇炎栓抗炎、镇痛、刺激性。方法:以小鼠耳肿胀实验(妇炎栓剂量为4.5、3.0、1.5 g/kg)、小鼠足跖肿胀实验(测定时间点为5 min与0.5、1、4、6 h)研究妇炎栓的抗炎作用;以小鼠扭体反应实验(妇炎栓剂量为4.5、3.0、1.5 g/kg)研究妇炎栓止痛作用;以家兔阴道黏膜刺激实验研究妇炎栓的阴道刺激性(妇炎栓剂量为1.0 g/只,每天1次,连续1周)。结果:4.5、3.0、1.5 g/kg剂量下,妇炎栓可抑制小鼠的耳肿胀、减少小鼠扭体反应次数;3.0 g/kg剂量下,给药0.5~6 h时妇炎栓可抑制小鼠足跖肿胀;对家兔阴道无刺激性。结论:妇炎栓具有较好的抗炎和止痛作用;对家兔阴道无刺激性,理论上可认为阴道给予妇炎栓较安全。

关键词 妇炎栓;药效学;小鼠;家兔

Study on the Anti-inflammatory, Antalgic Effects and Irritation of Fuyan Suppository

WU Wen-bo, SUN Li-chen, LIU Xing (Linyi Cancer Hospital, Shandong Linyi 276001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-inflammatory, antalgic effects and irritation of Fuyan suppository. METHODS: Mouse auricle swelling test (Fuyan suppository 4.5, 3.0 and 1.5 g/kg for administration) and mouse vola pedis swelling test (5 min and 0.5, 1, 4, 6 h) were employed to study the anti-inflammatory effect of Fuyan suppository. Mouse writhing response test (Fuyan suppository 4.5, 3.0 and 1.5 g/kg) was used to study the antalgic effect. Rabbit vagina mucosa irritation test was adopted to study the vaginal irritation (Fuyan suppository 1.0 g/rabbit, once daily for one week). RESULTS: Fuyan suppository at a dose of 4.5, 3.0 or 1.5 g/kg could inhibit auricle swelling of mice and reduce the times of mice's writhing response. 3.0 g/kg Fuyan suppository could, at 0.5-6 h from administration, inhibit vola pedis swelling of mice and be nonirritating to the rabbit's vagina. CONCLUSIONS: Fuyan suppository has better anti-inflammatory and antalgic effects and is nonirritating to the rabbit's vagina. Theoretically, vaginal administration of Fuyan suppository can be considered as safe.

KEYWORDS Fuyan suppository; Pharmacodynamics; Mouse; Rabbit

异或者非特异免疫功能,促进免疫因子产生,抑制肿瘤生长。

本研究通过采用终质量浓度为7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 μg/ml的黄芪总苷对SPCA-1细胞进行MTT试验。结果显示,各质量浓度下细胞存活率均降低,IC₅₀为61.75 μg/ml,具有明显的浓度依赖性。

本研究通过采用终质量浓度为7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 μg/ml的黄芪总苷对SPCA-1细胞进行TUNEL染色试验。结果显示,各质量浓度下细胞TUNEL检测阳性凋亡细胞均较高,且随着黄芪总苷质量浓度的增大,阳性凋亡细胞数量越多;当黄芪总苷质量浓度增大到250.0 μg/ml时,细胞凋亡率接近90%。

本研究通过采用终质量浓度为7.8、15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 μg/ml的黄芪总苷对SPCA-1细胞进行流式细胞仪凋亡检测。结果显示,15.6、31.2、62.5、125.0、250.0 μg/ml的黄芪总苷对SPCA-1细胞凋亡有促进作用。

综上,黄芪总苷具有调节机体免疫功能及抗肿瘤作用,能够显著抑制SPCA-1细胞的增殖作用,促进其凋亡。另外,由于黄芪总苷价格便宜、来源丰富,因此在肿瘤的治疗方面将具

有较广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 吴建军,任润珍,刘凯,等.蛇葡萄素(AMP)对SPCA-1细胞增殖的抑制作用[J].中国老年学杂志,2010,30(6):797.
- [2] 贺承健,邓立普.低氧对人肺腺癌细胞SPCA-1低氧诱导因子-1 α 和低氧诱导因子-2 α 的差异性调控作用[J].中国全科医学,2011,14(33):3 833.
- [3] 黄晶.黄芪有效成分在现代临床研究应用中的几点讨论[J].北方药学,2012,9(1):104.
- [4] 王培培.黄芪皂苷II和IV对人肝癌细胞BEL-7402/5-FU的耐药逆转作用及其机制研究[D].合肥:安徽医科大学,2010.
- [5] 黄熠,胡火珍.黄芪总苷对肝癌BEL-7402细胞株的抑制作用[J].时珍国医国药,2011,22(5):1 261.
- [6] 刘莲芳,章永红,潘迎英.番酯素诱导人肺癌细胞凋亡及其分子机制的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2012,21(34):3 785.
- [7] 李江超,李小妹,兰天,等.肺癌细胞自分泌Collagen I在三维培养中促进肺癌细胞的生长[J].南方医科大学学报,2014,34(8):1 129.

* 主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:wuwenbo1999@163.com

[#] 通信作者:副教授,主任药师。研究方向:医院药学。电话:0539-8121890。E-mail:12577qq818@qq.com

(收稿日期:2014-12-09 修回日期:2015-07-10)

(编辑:张 静)