

苦参碱对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的抑制作用研究

★ 张力 李海英 吴式琇 吴建波 韩义香 (温州医学院附属第一医院 温州 325000)

摘要:目的:观察苦参碱对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响。方法:采用倒置显微镜观察苦参碱对鼻咽癌 CNE2 细胞形态的影响;采用 CCK-8 法检测苦参碱对鼻咽癌 CNE2 细胞生长的影响。结果:苦参碱处理后 CNE2 细胞形态发生改变,细胞皱缩,变小变圆,空泡明显。苦参碱能抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖。在实验浓度范围内,随着剂量的增加,抑制作用更加明显;同一剂量下,72 h 内药物作用时间越长,抑制作用越明显。结论:苦参碱能够抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖。

关键词:苦参碱;鼻咽癌细胞;增殖

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

An Experimental Study of the Inhibiting Effect of matrine on Human nasopharyngeal carcinoma cells line CNE2 Proliferation

ZHANG Li, LI Hai-ying, WU Shi-xiu, WU Jian-bo, HAN Yi-xiang

The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000

Abstract: Objective: To study the effect of matrine on human nasopharyngeal carcinoma cell Line CNE2 Proliferation. Methods: Morphological changes of matrine on CNE2 cells were observed by light microscope. Proliferation of matrine on CNE2 cells was measured by CCK-8 colorimetric assay after treated by various concentrations of matrine. Results: Morphological changes of matrine on CNE2 cells: cell shrinkage, cell size reduction and turn round, cytoplasmic vacuolar changes. Matrine at a concentration between 0.5 mg/ml and 2.0 mg/ml inhibited the proliferation of CNE2 cells in dose - dependent manner. From 0h to 72 h, matrine with same concen-

荧光图像较为清晰,强弱变化鲜明,能够较准确地反映细胞内游离钙的变化过程^[4]。

RSV 感染 24 h 分别用空白血清或含利巴韦林血清或含金欣口服液血清干预,病毒组和细胞组相比,金欣组和病毒组、空白血清组或含利巴韦林血清组相比,胞内钙离子均无显著性变化。RSV 感染 48、72 h 后病毒组显著性增加,显示胞内钙离子超载,可激活钙离子依赖性蛋白酶和蛋白激酶、合成酶、核酸内切酶、自由基生成酶、磷脂酶 A₂ 等,这些方面的协同作用促进了细胞凋亡^[3];但此时金欣口服液和病毒组、空白血清组相比,胞内钙离子减少,显示药物作用;和利巴韦林组相比,48 h 胞内钙离子有所减少,72 h 无明显变化,提示金欣口服液对 RSV 攻击后 HELF 细胞的保护作用比利巴韦林好,但不能说明体外抗 RSV 的作用比利巴韦林好。金欣口服液可能抑制成纤维细胞的钙离子内流,这也许是金欣口服液抑制 RSV 感染细胞凋亡的一个因素,因此可以抑制感染细胞增殖,同时提示金欣口服液可作为早期抗 RSV 感染治疗药物。鉴于成纤维细胞表面有 L 和 T 型钙通道(主要是 L 型钙通道)^[5],推测金欣口服液含药血清中可能有钙离子拮抗剂的成分,因此进一步研究金欣口服液含药血

清的抗 RSV 的物质基础很有必要,甚至可以从中发现或开发抗 RSV 的中药有效成分。

参考文献

- [1] 廖辉,汪受传,徐建亚,等.金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒粘附、膜融合影响的实验研究[J].南京中医药大学学报,2008,8(1):3-4.
- [2] Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway [J]. Endocrinology, 2000, 141 (11): 4209.
- [3] 敖琳,曹佳.细胞凋亡中钙离子稳态失调机制的研究进展[J].国外医学分子生物学分册,2001,23(2):106.
- [4] 程飏,付小兵,盛志勇,等.丝裂原活化蛋白激酶通路对成纤维细胞内游离钙的影响[J].解放军医学杂志,2002,27(5):380-383.
- [5] 李谨,蒋春梅,徐艳,等.硝苯地平对牙龈成纤维细胞内钙离子含量影响的激光共聚焦显微观察[J].口腔医学研究,2006,22(5):495-497.

(收稿日期:2009-02-24)

tration inhibited the proliferation of CNE2 cells in time-dependent manner. Conclusion: Matrine can specially inhibit proliferation of CNE2 cells.

Key words: matrine; human nasopharyngeal carcinoma cell; proliferation

苦参碱(MT)是中药苦参的主要有效成分,属于四环的喹诺里西啶类(quinolizidine),分子式为 $C_{15}H_{24}N_2$,具有抗病原体、抗炎症、抗肿瘤、抗心律失常等生物活性^[1]。但最近的研究热点集中在对肿瘤的防治作用及苦参生物碱类抗肿瘤机制的研究,而针对这些作用机制的研究可望开发出新型的与苦参碱抗肿瘤作用同一分子靶点的药物,这将会为治疗肿瘤开辟一条新的途径。

鼻咽癌是我国南方最常见的头颈部恶性肿瘤之一,病理类型以低分化鳞状细胞癌多见,临床治疗以放疗为主,晚期患者辅以化疗。与传统的化疗药物相比,天然抗肿瘤药物日益受到人们的关注^[2]。本实验通过观察苦参碱对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响作用,研究其抗鼻咽癌的可能机制,旨在为其更广泛的作用于临床提供有力的实验依据。

1 材料

1.1 细胞和试剂 人鼻咽癌细胞株 CNE2 购自湖南湘雅细胞中心,苦参碱购自西安市天园生物制剂厂,细胞培养基 RPMI-1640 购自 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,CCK-8 购自日本同仁化学研究所。

1.2 主要仪器设备 倒置相差显微镜,德国 Leica;酶标仪 ELx800,美国。

2 方法

2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞株 CNE2 贴壁培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每周换液 2~3 次,0.25% 胰酶(内含 0.02% EDTA)消化传代。

2.2 光镜观察苦参碱对 CNE2 细胞形态的影响 6 孔板上每孔接种 1×10^5 个 CNE2 细胞,24 h 后,分成空白对照组和用药组,用药组的剂量分别为 0.5、1 和 2 mg/ml,48 h 用倒置显微镜观察并照相记录用药组和对照组细胞的形态变化。

2.3 CCK8 法检测苦参碱对 CNE2 细胞增殖的影响

量效关系:96 孔培养板每孔接种 8×10^3 个 CNE2 细胞,24 h 后分别加入不同浓度苦参碱使其终浓度分别为 0、0.25、0.5、1、1.5、2 和 2.5 mg/ml,每组 6 复孔,继续培养 48 h,每孔加入 CCK-8 溶液 20 μ l,37℃继续孵育 2 h,轻轻振荡混匀,酶标仪 450 nm 波长测 OD 值。并按下列公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(对照组 OD 值-用药组

OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$,绘制抑制率曲线图。

时效关系:在 96 孔培养板中接种 8×10^3 个 CNE2 细胞,24 h 后取其中一个 96 孔板每孔加入 CCK-8 20 μ l,37℃继续孵育 2 h,振荡混匀,酶标仪 450 nm 波长测 OD 值。另 4 个 96 孔培养板分别加入 0.25、0.5、1、1.5、2 和 2.5 mg/ml 苦参碱,每组 6 复孔,继续培养 12、24、48、72 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 20 μ l,37℃继续孵育 2 h,振荡混匀,酶标仪 450 nm 波长测 OD 值。按上述方法测值,计算抑制率,绘制抑制率曲线。

2.4 统计学处理方法 不同药物浓度组间的比较采用 one-way ANOVA 分析,各药物浓度组与对照组的比较采用 Dunnett t 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,采用 spss13.0 数据分析系统。

3 结果

3.1 苦参碱作用后 CNE2 细胞形态的变化 苦参碱作用 48 h 后,0.5 mg/ml 组的细胞数与对照组相比有所减少,形态变化不明显,1 mg/ml 组可见部分细胞变小变圆,胞内出现空泡,2 mg/ml 组可见大量细胞变小变圆,胞内空泡明显,折光性差,并有部分细胞脱落悬浮于培养液中,见图 1。

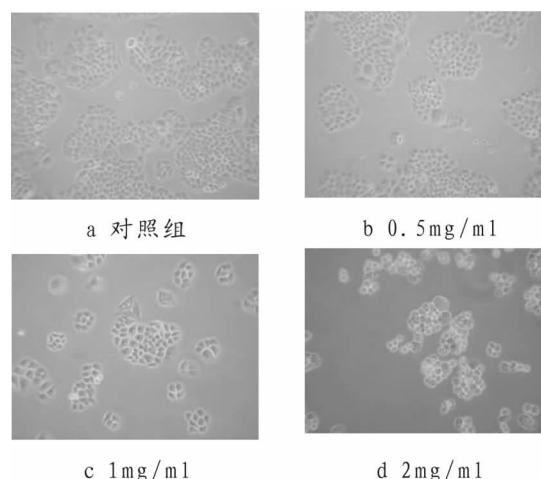


图1 苦参碱作用后 CNE2 细胞形态的变化

3.2 苦参碱对 CNE2 细胞的增殖抑制作用 量效关系:0.25 mg/ml 苦参碱对 CNE2 细胞增殖的影响与空白对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$),0.5 mg/ml 的苦参碱即能明显抑制 CNE2 细胞增殖,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),抑制率为 28.5%,1 mg/ml 苦参碱对 CNE2 的增殖抑制率为 66.5%,1.5 mg/ml 苦参碱对 CNE2 的增殖抑制率为

87.6%, 2 mg/ml 和 2.5 mg/ml 苦参碱对 CNE2 的增殖抑制率分别为 97.7% 和 98.3%, 两者之间无显著性差异 ($P > 0.05$), IC_{50} 为 0.71 mg/ml。可见在 0.5 ~ 2 mg/ml 浓度范围内, 苦参碱对 CNE2 细胞的抑制率随浓度的增加明显增加, 见图 2。

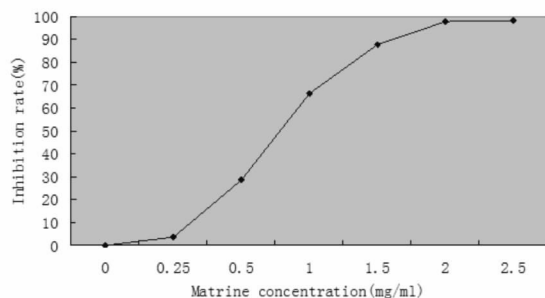


图 2 苦参碱对 CNE2 细胞增殖抑制作用的量效关系

时效关系: 由图 3 可以看出, 在 0.5 ~ 2 mg/ml 同一剂量的苦参碱药物对 CNE2 作用时间越长, 细胞增殖抑制率越高, 抑制细胞增殖的效果越明显。同一时段, 药物剂量越大, 对细胞增殖抑制作用越明显。

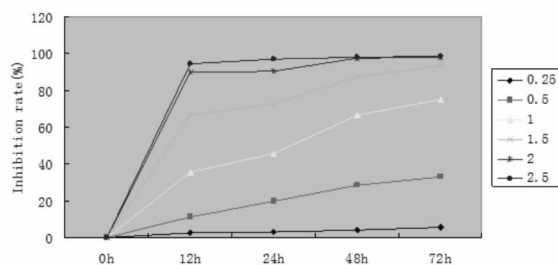


图 3 苦参碱对 CNE2 细胞增殖抑制作用的时效关系

4 讨论

苦参(*Sophora flavescens* Ait)为豆科槐属植物, 是我国历史悠久的传统药物之一, 据文字记载, 已有 2000 多年的药用历史。苦参根具有清热、除湿、祛风、杀虫、利尿等功效; 种子可明目; 全草煎汁外用为杀虫剂, 内服可健胃、驱虫及治赤痢等^[3]。苦参碱是从苦参根、苦豆子中提取的一类生物碱。据动物实验研究及临床报道, 其对多种肿瘤有防治作用, 如消化道的肝癌、胃癌, 神经系统的神经母细胞瘤、脑胶质瘤, 以及卵巢癌、白血病等, 临床还经常与其它化疗药联合治疗多种恶性肿瘤^[4]。

鼻咽癌是我国南方及东南亚地区高发的恶性头颈部肿瘤, 放射治疗是其主要的治疗方法, 但由于放疗对靶细胞杀伤缺乏选择性及在疗效和毒副作用方面的剂量依赖性, 鼻咽癌的 5 年生存率维持在 50% 左右^[5]。寻找新的治疗药物与方法以提高鼻咽癌的治疗效果是临床面临的棘手问题。本实验探讨苦

参碱对鼻咽癌细胞生长的抑制作用, 为鼻咽癌的临床治疗提供更多的实验依据。

细胞形态变化可以反映药物对活细胞的作用强度^[6], 本实验研究发现, 中等剂量的苦参碱能使 CNE2 细胞形态发生改变, 大剂量的苦参碱作用下 CNE2 细胞形态变化更加明显。

本实验通过 CCK-8 法观察苦参碱对 CNE2 细胞增殖的影响, 发现 0.5 mg/ml 的苦参碱即能明显抑制 CNE2 细胞的增殖, 并且抑制率随剂量的增加而增加; 而且同一剂量, 作用时间越长, 抑制增殖效果越明显, 提示苦参碱对 CNE2 细胞增殖的抑制作用存在明显的时间-剂量依赖关系。

体外实验表明苦参碱对多种肿瘤细胞有抑制或杀伤作用, 对 HepG2、K562、HL260 有明显的抑制作用, 并能诱导分化和凋亡^[7]。吴建波等^[8]发现 1.0 ~ 2.0 mg/ml 的苦参碱作用于 RPMI8226 细胞 48 h, G0/G1 期 RPMI8226 细胞比例增加, S 期细胞比例明显下降, 2 mg/ml 的苦参碱作用于 RPMI8226 细胞, 凋亡率达到 $(25.80 \pm 4.15)\%$ 。我们推测: 苦参碱对 CNE2 细胞的抑制作用是通过阻滞其 G1 期向 S 期的进程, 造成 G1 期细胞堆积, 从而影响细胞周期的进程, 并导致细胞分化和凋亡。我们将在进一步实验中对其机制进行研究。

参考文献

- [1] 王晓燕, 梁磊, 邓虹珠, 等. 苦参碱体外诱导人结肠腺癌 SW620 细胞凋亡的实验研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3): 432 - 435.
- [2] 杨甫文, 黄金中, 林晓岚, 等. 姜黄素诱导鼻咽癌细胞凋亡机制的研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41(8): 612 - 616.
- [3] Lai P, He X W, Jiang Y, et al. Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375(2): 264.
- [4] 周卫芬. 苦参生物碱抗肿瘤作用及机制研究的新进展[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(2): 15 - 18.
- [5] 罗京伟, 徐国镇. 鼻咽癌治疗的进展[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(8): 509 - 512.
- [6] 张静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1995. 76.
- [7] 王铁军, 李绍平, 简家荣, 等. 苦参碱抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 52 - 5.
- [8] 吴建波, 章圣辉, 韩义香, 等. 苦参碱诱导多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞凋亡及其对细胞黏附分子表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(1): 93 - 96.

(收稿日期: 2009-02-11)