

氧化苦参碱对 SGC7901 与 ECV304 的体外活性比较研究

马琳, 王淑静*, 孙微微, 周潇, 郑妍, 高薇, 刘汶杰

哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076

摘要: 本论文主要探讨氧化苦参碱对人脐静脉内皮细胞 ECV304 和人胃癌细胞 SGC-7901 细胞活性影响并进行比较研究。采用 MTT 法、生长曲线法检测氧化苦参碱在不同浓度、不同时间对两种细胞增殖抑制作用。HE 染色、透射电镜观察氧化苦参碱作用后两种细胞形态变化。结果显示, 氧化苦参碱对 SGC-7901, ECV304 的 IC_{50} 值分别是 660.07、1555.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对 SGC-7901 具有明显的增殖抑制作用。氧化苦参碱对 SGC-7901 细胞形态改变较大, 出现细胞质浓缩, 细胞染色加深, 细胞核变大等形态学改变, 细胞出现中期及晚期凋亡。而氧化苦参碱对 ECV304 形态改变较小, 细胞多处于早期凋亡。氧化苦参碱对 SGC-7901 和 ECV304 均具有增殖抑制和促凋亡作用, 对 SGC-7901 更明显, 氧化苦参碱具有抗肿瘤细胞增殖、抗肿瘤血管生成作用, 但对肿瘤细胞较为敏感。

关键词: 氧化苦参碱; 肿瘤细胞; 内皮细胞; 细胞增殖; 细胞活性

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.5.008

Comparative Study on The Activity of Oxymatrine to SGC-7901 and ECV304

MA Lin, WANG Shu-jing*, SUN Wei-wei, ZHOU Xiao, ZHENG Yan, GAO Wei, LIU Wen-jie

College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: The key point is observing the effects of oxymatrine on the activity of human umbilical vein endothelial cells (ECV304) and human gastric cancer cells (SGC-7901). MTT method and growth curve were used to detect the proliferation inhibitory effect of two kinds of cells at different concentrations and different times, respectively. HE staining and transmission electron microscopy were used to observe the morphological changes of two kinds of cells. The IC_{50} value of oxymatrine on SGC-7901 and ECV304 were 660.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1555.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. SGC-7901 cells of oxymatrine group appeared significant morphological changes, such as cytoplasm concentration, nucleus getting larger, and a number of cells were in the mid and late apoptotic stage. However, the morphological changes of oxymatrine on ECV304 were not obvious, and some cells were in the early apoptotic stage. Hence, oxymatrine can inhibit the proliferation of the two kinds of cells, but to SGC-7901 cells was more obvious. The morphological changes of SGC-7901 cells were more significant than ECV304 cells at the same concentration. Oxymatrine had obvious anti-tumor activity and partial anti-angiogenesis activity, which indicated that oxymatrine appeared different sensitivity to different cells.

Key words: oxymatrine; tumor cells; endothelium cells; cell proliferation; cell activity

氧化苦参碱主要来源于豆科植物苦参或广豆根干燥根, 分子式 $C_{15}H_{24}N_2O_2$ ^[1]。氧化苦参碱药理作用广泛, 具有抗炎、抗纤维化、抗增殖、抗肿瘤等作用。近年来研究发现, 氧化苦参碱通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化和凋亡、降低端粒酶活性、降低肿瘤耐药性、促进宿主肿瘤免疫反应等多种

途径达到抗肿瘤作用^[2-4]。其还可引起血管内皮生长因子(VEGF)基因表达降低而具有一定的抗肿瘤血管生成活性^[5]。胃癌是我国常见恶性肿瘤之一, 研究发现胃粘膜癌变过程中细胞发生凋亡异常, 细胞凋亡水平可作为评估抗癌药物重要标准之一。另外肿瘤细胞快速增殖需要大量血管生成来提供营养物质, 血管生成是指在原有血管基础上内皮细胞以发芽的形式形成新生血管, 肿瘤血管没有正常血管系统分层结构, 血管系统内血流紊乱, 血管内壁内皮细胞排列不规整^[6]。中药多靶点治疗肿瘤, 较化疗药物毒副作用小, 耐药性低^[7]。本实验选取人胃癌

收稿日期: 2017-06-12 接受日期: 2017-10-30

基金项目: 哈尔滨商业大学大学生创新创业训练计划(201710240001); 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金(2016RQ QXJ095)

* 通信作者 Tel: 86-451-84869572; E-mail: miswsj@163.com

细胞(SGC-7901)和人脐静脉内皮细胞(ECV304)作为研究对象,通过氧化苦参碱对人脐静脉内皮细胞(ECV304)和人胃癌细胞(SGC-7901)细胞增殖和凋亡的影响,观察氧化苦参碱的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株(SGC-7901),人脐静脉内皮细胞(ECV304),哈尔滨商业大学药学院保存。氧化苦参碱(纯度 $\geq 99\%$,批号:13021904),购自成都曼斯特生物科技有限公司。SW-CJ-LC超净工作台,购自苏州净化设备有限公司。Mco-15AC CO₂培养箱,购自日本SANYO EI公司。CX21光学显微镜,购自日本OLYMPUS公司。Model 680离心机,购自飞鸽公司。

1.2 MTT法

取对数期的人胃癌细胞株(SGC-7901)及人脐静脉内皮细胞株(ECV304),PBS漂洗,胰酶消化,制备细胞悬液,调整细胞浓度到 5×10^4 个/mL。取96孔板,各孔加100 μ L细胞悬液。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱培养24 h,弃去旧培养液,各孔加不含血清的培养基配制氧化苦参碱母液,终浓度为0、100、200、400、800 μ g/mL,每个浓度设5个复孔。空白组各加等体积不含血清的培养基,培养箱培养48 h。各孔加5 mg/mL MTT 10 μ L,继续培养4 h。弃去含MTT的旧培养基,每孔加100 μ L DMSO。490 nm酶标仪测吸光度值。SPSS软件计算药物对细胞的半数抑制率。

1.3 生长曲线

取对数期的人胃癌细胞株(SGC-7901)及人脐静脉内皮细胞株(ECV304),PBS漂洗,胰酶消化,制备细胞悬液,调整细胞浓度到 5×10^4 个/mL。取24孔板,每孔加400 μ L细胞悬液,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱培养24 h。弃去旧培养基,每孔加500 μ g/mL氧化苦参碱400 μ L,继续培养24 h。台盼蓝染色,每天取三孔,每孔多次计数求平均值,持续计数6天。绘制时间-细胞浓度的生长曲线。

1.4 HE染色

取对数期的人胃癌细胞株(SGC-7901)及人脐静脉内皮细胞株(ECV304),PBS漂洗,胰酶消化,制备细胞悬液,调整细胞浓度到 5×10^4 个/mL。取6孔板,每孔加入盖玻片,滴1 mL细胞悬液于盖玻片上,静置10 min,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱培养24 h。

弃去旧培养基,每孔加500 μ g/mL氧化苦参碱1 mL,空白组加等体积不含血清的培养基,培养48 h。弃去旧培养基,PBS漂洗,95%酒精固定15 min。弃去酒精,PBS漂洗。每孔滴入苏木精1 mL,染液完全覆盖盖玻片,静止4 min。弃去苏木精,蒸馏水漂洗3次,每孔依次用30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇冲洗1 min,95%的乙醇冲洗2次,100%乙醇冲洗三次。用镊子将盖玻片取出放在呈有二甲苯的培养皿中,透明,5 min。载玻片上滴上中性树胶,盖玻片细胞面朝下盖在载玻片上,贴上标签,37 $^{\circ}$ C恒温干燥24 h,显微镜下观察。

1.5 透射电镜

取对数期的人胃癌细胞株(SGC-7901)及人脐静脉内皮细胞株(ECV304),PBS漂洗,胰酶消化,调整细胞浓度到 5×10^4 个/mL。取6孔板,每孔加1 mL细胞悬液,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱培养24 h。弃去旧培养基,每孔加500 μ g/mL氧化苦参碱1 mL,空白组加等体积PBS溶液,培养箱培养48 h。弃去旧培养基,PBS漂洗,胰酶消化,制成细胞悬液,3000 rpm离心15 min。弃去上清液,加戊二醛,4 $^{\circ}$ C固定24 h,包埋,固定,制成薄切片,透射电镜观察切片状态。

2 实验结果

2.1 MTT观察不同浓度氧化苦参碱对细胞增殖影响

氧化苦参碱对SGC-7901、ECV304均具有增殖抑制作用,随着给药浓度的增加,细胞增殖抑制作用增强,呈药物剂量依赖性,给药浓度在400 μ g/mL以上时对两种细胞都有显著抑制作用(表1),其对SGC-7901、ECV304细胞的IC₅₀值分别是660.07、1555.17 μ g/mL,说明氧化苦参碱对SGC-7901作用较ECV304细胞强。

2.2 生长曲线观察不同时间氧化苦参碱对细胞增殖影响

根据MTT实验结果发现氧化苦参碱浓度在500 μ g/mL时,对SGC-7901与ECV304抑制作用明显(图1、2)。氧化苦参在500 μ g/mL时,与对照组相比,SGC-7901细胞在加药后第1天,细胞数量开始下降,第4天达到最高抑制效果,细胞数量下降了20个百分点,而对于ECV304来说,给药组细胞数量略有下降,氧化苦参碱对SGC-7901抑制作用较ECV304更明显。

表 1 氧化苦参碱对 SGC-7901 和 ECV304 细胞增殖的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of oxymatrine on proliferation of SGC-7901 and ECV304 cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

药物浓度配 Drug concentration	存活率 (%) = 1-抑制率 (%) Survival (%) = 1-Inhibition rate (%)	
	人胃癌细胞株 SGC-7901	人脐静脉内皮细胞 ECV304
0 $\mu\text{g/mL}$ (Control)	100 \pm 0.00	100 \pm 0.00
100 $\mu\text{g/mL}$	80.68 \pm 1.35	86.46 \pm 1.47
200 $\mu\text{g/mL}$	70.01 \pm 1.42	77.51 \pm 3.63 *
400 $\mu\text{g/mL}$	59.03 \pm 1.39 *	69.73 \pm 3.15 *
800 $\mu\text{g/mL}$	46.78 \pm 1.42 *	61.45 \pm 2.39 *

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异非常显著。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, significant difference; ** $P < 0.01$, very significant difference.

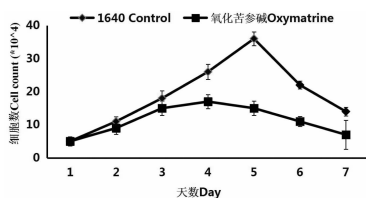


图 1 氧化苦参碱对 SGC-7901 生长曲线折线图

Fig. 1 Growth curve of SGC-7901 by oxymatrine

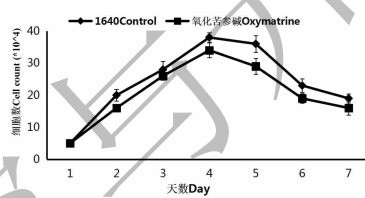


图 2 氧化苦参碱对 ECV304 生长曲线折线图

Fig. 2 Growth curve of ECV304 by oxymatrine

2.3 HE 染色观察氧化苦参碱对细胞形态的影响

与对照组相比,氧化苦参碱对 SGC-7901 和 ECV304 均有一定抑制作用。用药后 SGC-7901 细

胞数量明显减少,细胞变圆,变小,细胞核深染。而 ECV304 中,较少细胞形态发生变化,细胞变圆(图 3)。说明氧化苦参碱同等剂量作用 SGC-7901 较 ECV304 细胞形态改变更明显。

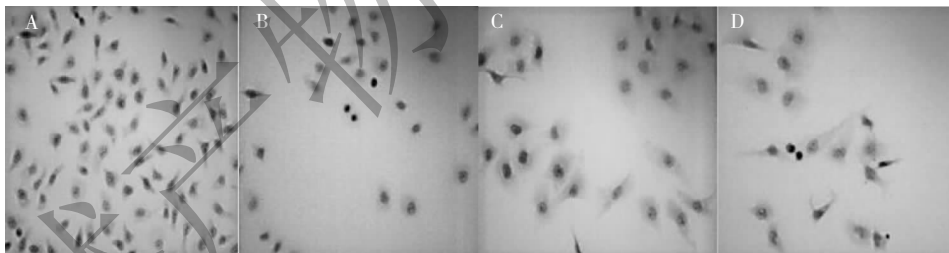


图 3 SGC-7901 对照组 (A)、SGC-7901 氧化苦参碱组 (B)、ECV304 对照组 (C) 及 ECV304 氧化苦参碱组 (D) 的细胞形态 (HE 染色, $\times 40$)

Fig. 3 Cell morphology of SGC-7901 control group (A), SGC-7901 Oxymatrine group (B), ECV304 control group (C) and ECV304 Oxymatrine group (D) (HE staining, $\times 40$)

2.4 透射电镜观察氧化苦参碱对细胞凋亡形态的影响

透射电镜观察结果如图 4 所示,与对照组相比,氧化苦参碱组 SGC-7901 细胞核变圆,细胞皱缩,细胞质凝集在边侧,明显观察到细胞出现大量凋亡和坏死现象。ECV304 氧化苦参碱组细胞形态变化不明显,个别细胞外绒毛减少,多为早期凋亡。

3 讨论与结论

苦参碱和氧化苦参碱都具有一定的抗肿瘤作用,氧化苦参碱在分子式上比苦参碱多出一个氧原子,导致了两种化合物之间某些理化性质、药理作用不同,有文献报道氧化苦参碱抗血管生成作用较苦参碱更为明显,氧化苦参碱具有抗氧化,调血脂,抗病原体,抗炎,抗过敏,抗心律失常,抗肿瘤等多方面

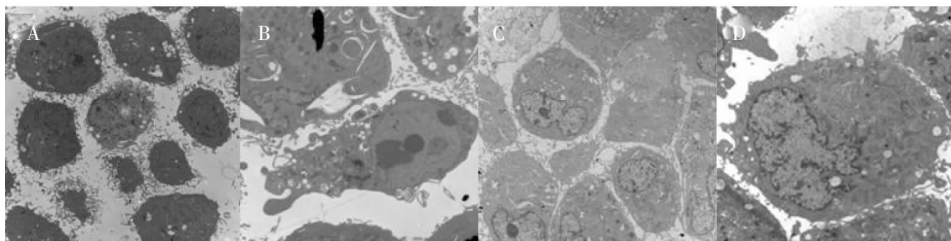


图4 SGC-7901 对照组(A)、SGC-7901 氧化苦参碱组(B)、ECV304 对照组(C)及 ECV304 氧化苦参碱组(D)中细胞形态的变化(透射电镜, $\times 4000$)

Fig. 4 Cell morphology changes of SGC-7901 control group (A), SGC-7901 oxymatrine group (B), ECV304 control group (C) and ECV304 oxymatrine group (D) (Transmission electron, $\times 4000$)

药理作用^[8]。近些年研究显示,氧化苦参碱能在一定程度杀伤肿瘤细胞,抑制 SGC-7901 增殖及 VEGF 基因转录和表达,有一定的抗肿瘤血管生成作用。VEGF 是肿瘤血管生成过程中重要的促进因子,阻断 VEGF 或抑制其与相关受体结合可在一定程度上抑制肿瘤生长^[9]。有研究报道氧化苦参碱作用人结肠癌 SW620 细胞,p16 表达升高,CDK4 蛋白表达水平下降,细胞发生 G1 期阻滞,抑制 SW620 增殖^[12]。肿瘤细胞的凋亡障碍与肿瘤发生有密不可分的关系^[10],正常人体组织细胞凋亡过程是受机体调控,而肿瘤细胞有无限生长的特性。通过调节细胞凋亡来治疗肿瘤也成为现在研究的热点,很多抗肿瘤中药通过调节凋亡相关蛋白表达,多靶向治疗肿瘤^[11]。

本文对氧化苦参碱是否能抑制肿瘤血管生成做了进一步探究,实验选取人胃癌细胞 SGC-7901 及人脐静脉内皮细胞 ECV304,观察氧化苦参碱对两种细胞的敏感性及其氧化苦参碱的抗血管生成作用。MTT 法,生长曲线法分别检测同一时间,不同浓度及同一浓度,不同时间氧化苦参碱对人胃癌细胞(SGC-7901)和人脐静脉内皮细胞(ECV304)增殖抑制作用的整体趋势。氧化苦参碱对 SGC-7901 和 ECV304 抑制作用呈剂量和时间的依赖性,随着药物浓度和时间的增加,对两种细胞增殖抑制作用增强,IC₅₀ 值分别是 660.07、1555.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与对照组相比,在用药后第 1 d 对 SGC-7901 细胞浓度开始下降,第 4 d 细胞浓度最低,可降低 20 个百分点,对 ECV304 增殖抑制作用不明显,氧化苦参碱对 SGC-7901 抑制作用最强,对 ECV304 抑制作用最弱。说明氧化苦参碱对 SGC-7901 增殖抑制作用较强。

本实验选择 HE 染色,透射电镜法来观察氧化苦参碱对 ECV304 及 SGC-7901 细胞形态变化和细

胞凋亡的情况。

与对照组相比,氧化苦参碱作用 SGC-7901 后,细胞数量明显减少,细胞形态变圆,变小,细胞核深染,细胞皱缩,细胞质凝集在边侧,明显观察到大量细胞出现凋亡和坏死现象。而对 ECV304 细胞形态变化不明显,个别细胞外绒毛减少,多为早期凋亡。

研究表明氧化苦参碱对人胃癌 SGC-7901 细胞的促凋亡作用较强,对 ECV304 内皮细胞作用较弱。进一步说明氧化苦参碱对不同细胞的形态影响及促凋亡作用具有特异性,结果与细胞增殖实验相一致。

综上所述,同种浓度下的氧化苦参碱对人胃癌 SGC-7901 实体瘤细胞作用较强,对人内皮 ECV304 细胞作用较弱。

参考文献

- Xu MZ (徐铭泽). Study on separation and purification process of total alkaloids from *Sophora flavescens* ait [D]. Harbin: Harbin University of Commerce (哈尔滨商业大学), 2015.
- Chen XX (陈晓峡), Xiang XH (向小庆), Ye H (叶红). Progress of research and application in tumors of matrine and oxymatrine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 361-364.
- Qiu ZL (邱至凌), Zhang JP (张军平), Guo XC (郭晓辰). Endoplasmic reticulum stress and vascular endothelial cell apoptosis [J]. *Acta Acade Med Sin* (中国医学科学院学报), 2013, 36: 102-107.
- Liu ZQ (刘竹青), Yin DK (尹登科), Han L (韩岚), et al. Protective effect of Taohong Siwu decoction on human umbilical vein endothelial cells injured by hydrogen peroxide [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 402-406.