论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0392-03

苦参碱联合抗肿瘤药抑制K562细胞增殖的研究

戴碧涛[1],蒋纪恺[2],王付丽[1],张 彦[2],张莉萍[2] (重庆医科大学:[1]儿科学院血液科,重庆 400014,[2]临床检验学院临床生物化学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 观察苦参碱(Ma)及Ma联合长春新碱(VCR)、阿糖胞苷(Ara-c)、三尖杉酯碱(HRT)、阿霉素(ADM)、柔红霉素(DNR)对K562细胞增殖的影响。**方法** 用MTT比色法测定Ma及Ma联合常用抗肿瘤药物对K562细胞的抑制率。**结果** Ma(160~400 μg/ml)对K562细胞有明显抑制作用。Ma(80 μg/ml)与VCR、Ara-c、HRT、ADM、DNR分别合用时抑制率较单用VCR、Ara-c、HRT时的抑制率高($P<0.05$),但较单用ADM、DNR时无明显增加抑制作用。**结论** Ma对K562细胞增殖具有抑制作用,呈剂量相关性。Ma能增强VCR、Ara-c、HRT对K562细胞增殖的抑制作用。

关键词: 苦参碱;细胞系,K562;抑制,细胞增殖;抗肿瘤药

中图法分类号: R282.71; R73-354; R979.1 **文献标识码:** A

Inhibitory effect of matrine combined with antineoplastic on proliferation of K562 cells

DAI Bi-tao[1], JIANG Ji-kai[2], WANG Fu-li[1], ZHANG Yan[2], ZHANG Li-ping[2] ([1]Department of Hematology, College of Pediatrics, [2]College of Clinical Laboratory, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate inhibitory effects of matrine (Ma) combined with vincristine (VCR), cytosine arabinoside (Ara-c), harringtonine (HRT), adriamycin (ADM), and daunorubicin (DNR) on proliferation of K562 cells. **Methods** MTT colorimetric assay was used to detect the inhibition rate of Ma combined with antineoplastic on K562 cells. **Results** The proliferation of K562 cells was inhibited by Ma at the concentration of 160 μg/ml to 400 μg/ml. The inhibitory rates of Ma combined respectively with VCR, Ara-c, HRT, ADM, and DNR were significantly higher than those of VCR, Ara-c, or HRT alone ($P<0.05$), but not significantly different from those with ADM or DNR alone ($P>0.05$). **Conclusion** Ma can inhibit the proliferation of K562 cells in a dose-dependent manner. The anti-proliferation effect of VCR, Ara-c, and HRT on K562 cells could be enhanced by Ma.

Key words: Matrine; cell line, K562; inhibition; cell proliferation; antineoplastic

中药苦参的主要生物碱成分苦参碱(matrine, Ma)已被证实具有一定的抑瘤、诱导细胞分化、抗耐药作用[1]。但苦参碱与化疗药合用对K562细胞增殖抑制作用影响鲜有报道。现将苦参碱分别与常用化疗联合,观察有无增强化疗药抑制白血病细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

K562细胞株由重庆医科大学生物化学教研室提供。苦参碱(MW=248.36,纯度99.6%)由重庆医科大学生物化学教研室惠赠。小牛血清,购自杭州四季青生物工程材料研究所。RPMI1640为重庆医科大学生物化学教研室配制。MTT(四甲基偶氮唑蓝),购自北方同正生物制品公司。抗肿瘤药物VCR和Ara-c购自上海华联制药有限公司,HRT购自杭州民生制药厂,ADM系汕头经济特区明治医药有限公司产品,DNR购自Pharmacia&Upjohn。

1.2 方法

K562细胞采用常规培养,培养液为10%小牛血清,青霉素、链霉素0.1 mg/ml的RPMI1640,在37 ℃、饱和湿度5% CO_2孵箱中培养,每3 d换液传代培养。

取对数生长期K562细胞1×10^5/ml,200 μl加入96孔细胞培养板,静置半小时,除对照组外,分别加入不同浓度的5种抗肿瘤药(VCR、Ara-c、HRT、ADM、DNR)和Ma。用生理盐水补足体积。VCR终浓度分别为0.008、0.016、0.024、0.032、0.040 μg/ml;Ara-c终浓度分别为0.008、0.016、0.024、0.032、0.040 μg/ml;HRT

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(960086)
Supported by the Sci & Tech Research Project Foundation of Public Health Department of Sichuan Province (960086)

作者简介:戴碧涛(1956-),女,四川省犍为县人,主任医师,主要从事血液肿瘤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)63862453

收稿日期:2004-09-26;修回日期:2005-10-10

终浓度分别为 0.004、0.020、0.040、0.080、0.160 μg/ml；ADM 终浓度分别为 0.008、0.016、0.024、0.032、0.040 μg/ml；DNR 终浓度分别为 0.080、0.160、0.240、0.320、0.400 μg/ml；Ma 终浓度分别为 80、160、240、320、400 μg/ml。微型震摇器摇 1 min，放入 37 ℃、饱和湿度 5% CO_2 培养箱。5 种抗肿瘤药不同浓度与苦参碱（80 μg/ml）联合作用，同上述方法培养。并设不加药对照培养组。

1.3　MTT 法[2] 测定抑制率

从孵箱中取出已加药培养 3 d 的 K562 细胞，吸去上清液，每孔加二甲亚砜（DMSO）150 μl，待溶解后于 BIO-RAD Model 450 型酶标仪 570 nm 处测吸光度（*A* 值）。

$$\text{肿瘤细胞抑制率(IR,\%)} = \left[1 - \frac{\text{实验孔吸光度}(A)}{\text{对照孔吸光度}(A)}\right] \times 100\%$$

细胞抑制率（IR）≥50% 表示敏感检测阳性，即细胞对抗肿瘤药物敏感；若抑制率 < 50%，则表示肿瘤细胞对抗肿瘤药物耐药。

1.4　统计学处理

用 SAS8.1 软件包统计分析。方差齐同性检验示数据具有齐同性，采用方差分析（包括析因实验设计方差分析）。

2　结果

2.1　苦参碱对 K562 细胞的抑制作用

结果显示：苦参碱有抑制 K562 细胞增殖的作用，随着苦参碱浓度增加（Ma 终浓度分别为 80、160、240、320、400 μg/ml），抑制作用增强。苦参碱浓度在 80 μg/ml 时，细胞抑制率为（9.439 ± 4.673）%，与空白对照无显著差异（$F = 2.46$，$P = 0.1919$，$P > 0.05$），对 K562 细胞几无抑制增殖的作用。

2.2　苦参碱联合抗癌药对 K562 细胞的抑制作用

苦参碱（80 μg/ml）分别与 5 种抗肿瘤药物在不同浓度时联合用药对 K562 细胞的抑制作用见表 1 ~ 4。

表 1　苦参碱（80 μg/ml）分别与 VCR、Ara-c 联合用药（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Inhibitory effect of matrine (80 μg/ml) combined with VCR or Ara-c on K562 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	VCR, Ara-c(μg/ml)				
	0.008	0.016	0.024	0.032	0.040
VCR (IR%)	24.774 ± 18.312	79.529 ± 7.676	86.255 ± 1.983	85.197 ± 4.931	90.933 ± 0.531
VCR + Ma (IR%) *	68.979 ± 5.489	79.359 ± 5.529	82.085 ± 1.625	86.003 ± 2.089	85.676 ± 4.386
Ara-c (IR%)	27.483 ± 7.995	32.062 ± 11.198	35.497 ± 8.224	39.043 ± 13.932	40.929 ± 12.245
Ara-c + Ma(IR%) ★	32.056 ± 9.51	39.695 ± 10.682	38.982 ± 4.127	50.838 ± 8.065	61.44 ± 7.305

*：$F = 7.52$，$P < 0.05$，*vs* VCR group；★：$F = 8.01$，$P < 0.05$，*vs* Ara-c group

表 2　苦参碱（80 μg/ml）与 HRT 联合用药（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Inhibitory effect of matrine (80 μg/ml) combined with HRT on K562 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	HRT(μg/ml)				
	0.004	0.020	0.040	0.080	0.160
HRT (IR%)	2.530 ± 2.227	9.466 ± 3.394	15.059 ± 1.993	65.54 ± 2.419	88.060 ± 2.236
HRT + Ma (IR%) *	37.982 ± 7.397	45.893 ± 2.303	71.532 ± 6.056	83.342 ± 3.737	92.187 ± 1.042

*：$F = 478.42$，$P < 0.01$，*vs* HRT group

表 3　苦参碱（80 μg/ml）与 ADM 联合用药（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3　Inhibitory effect of matrine (80 μg/ml) combined with ADM on K562 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	ADM(μg/ml)				
	0.008	0.016	0.024	0.032	0.040
ADM (IR%)	14.843 ± 11.128	41.210 ± 8.560	60.171 ± 2.238	64.112 ± 5.213	58.790 ± 3.442
ADM + Ma (IR%) *	39.973 ± 4.997	29.435 ± 13.388	62.940 ± 6.167	64.852 ± 1.804	68.842 ± 3.405

*：$F = 4.37$，$P < 0.05$，*vs* ADM group

表 4　苦参碱（80 μg/ml）与 DNR 联合用药（$\bar{x} \pm s$）

Tab 4　Inhibitory effect of matrine (80 μg/ml) combined with DNR on K562 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	DNR(μg/ml)				
	0.008	0.016	0.024	0.032	0.040
DNR (IR%)	39.873 ± 8.272	39.350 ± 16.223	41.578 ± 2.848	52.953 ± 7.458	72.972 ± 4.489
DNR + Ma (IR%) *	26.086 ± 13.393	35.069 ± 8.285	33.831 ± 7.411	46.808 ± 13.600	58.072 ± 8.987

*：$F = 6.41$，$P < 0.05$，*vs* DNR group

结果显示：①VCR、Ara-c、HRT、ADM、DNR 单独作用时，对 K562 细胞均有抑制增殖作用。但 K562 细胞对 Ara-c 的敏感性低。对各浓度的 Ara-c，敏感性均未超过 50%。②选择对 K562 细胞无抑制作用浓度的 Ma(80 μg/ml，抑制率 9.439%)，与 5 种抗肿瘤药分别联合应用，并与其单独作用时比较，发现 Ma 对 VCR 抑制 K562 细胞增殖的作用显著增强（$F = 7.52$，$P = 0.0126$），从表 1 可见 Ma 对 VCR 低浓度时增强抑制作用更明显。Ma 对各浓度 Ara-c、HRT 均有明显增敏作用（前者 $F = 8.01$，$P = 0.0103$，后者 $F = 478.42$，$P = 0.001$），差异有显著性。见表 1、2。Ma 对 ADM 的增敏作用差异无显著性（$F = 4.37$，$P = 0.0496$）；Ma 与 DNR 联合作用与 DNR 单独作用比较抑制率不仅未增加反有下降（$F = 6.41$，$P = 0.0198$）见表 3、4。

3 讨论

研究表明，苦参碱不仅在体外，而且在体内均有抑制部分肿瘤增殖的作用，其作用机制有诱导分化、抑制转移、影响细胞周期和端粒酶[1,3]。本实验用苦参碱与 K562 细胞株共同体外培养，发现苦参碱具有抑制 K562 细胞增殖作用，且随浓度增加而增加。苦参碱在单独作用 K562 细胞无抑制作用的低浓度时，与常用化疗药联合，可增加化疗药对 K562 细胞增殖抑制作用。既往文献少有类似报道。实验显示苦参碱对 HRT 各浓度均有明显的增强抑制 K562 细胞增殖作用；苦参碱对 VCR 的增敏作用在 VCR 低浓度时就明显表现。对 Ara-C 的增敏作用却表现在 Ara-C 高浓度段更明显。为什么有浓度差异尚不明确，可能与药物本身的化学结构、药物动力学有关。苦参碱对细胞膜 Na^+、Ca^{2+} 流动均有影响[4]，苦参碱增强抑制作用可能与此有关。实验表明苦参碱对 ADM、DNR 无增强抑制 K562 细胞作用，与相关报道类似[5]。苦参碱未增强 DNR 对 K562 增殖抑制作用，反而其抑制率较单用 DNR 时降低，提示苦参碱对某些化疗药可能有拮抗作用。ADM、DNR 药物均属蒽环类药，其结构相似、作用机制相仿，苦参碱对其均无增效作用，对 VCR、Ara-c、HRT 有增敏作用，提示苦参碱的化疗增敏作用有药物选择性。但其增敏作用的药物选择性和剂量选择性的原因以及增敏作用产生机制有待进一步研究。

由于肿瘤细胞对化疗药物可产生耐药性，人们把加大化疗剂量作为解决耐药问题的方法之一。用大剂量的阿糖胞苷、大剂量的甲氨喋呤治疗白血病及实体瘤的确取得了一定的效果。但随之而来的化疗不良反应使部分患者不能耐受化疗损伤而被迫停药。有不少报道采用中西药联合，调整机体免疫力，升白细胞，使患者度过强化疗期，但利用苦参碱联合化疗对抑癌的增敏作用研究少见报道。本项体外实验证实苦参碱对部分化疗药抑制 K562 细胞有增强作用，为临床抗肿瘤药联合中药治疗肿瘤以提高化疗敏感性提供了实验依据。由于 VCR 的神经毒性，加大剂量使用受到限制，实验中发现 VCR 低于抑制增殖浓度时与苦参碱联合，可有较强的抑制 K562 细胞增殖作用，值得在临床上试用。临床上对白血病已采用大剂量阿糖胞苷，研究表明苦参碱对高浓度的阿糖胞苷增效作用比低剂量时明显，故在大剂量阿糖胞苷使用时，可尝试联合苦参碱。中药苦参碱有多种药理作用，能在人体内安全使用，本研究的结果有临床应用前景。

参考文献：

[1] 陈伟忠，林 勇，谢渭芬. 苦参碱抗肿瘤机制的研究进展[J]. 肿瘤学杂志，2002，8(1)：4－6.

[2] Carmichael J，DeGraff W G，Gazdar A F，*et al*. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay：assessment of chemosensitivity testing[J]. Cancer Res，1987，47(4)：936－942.

[3] 张莉萍，蒋纪恺，张 彦，等. 苦参碱对 K562 细胞增殖与分化作用的机制研究[J]. 中华血液学杂志，1999，20(6)：315－316.

[4] 季 勇，孙丽洲，饶曼人，等. 苦参碱的正性肌力作用与心肌细胞内游离钙的关系[J]. 南京医科大学学报，1998，18(4)：265－267.

[5] 李文瑜，李舜华，崔克义，等. 苦参碱逆转白血病多药耐药细胞 K562/A02 对柔红霉素耐药性的研究[J]. 中国病理生理杂志，1998，14(5)：521－523.

（编辑 张大春）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每 3 位分 1 节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如 2,431 改为 2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计量单位，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部