DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.012
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
778 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)09-0778-03

苦参碱及氧化苦参碱抑制A549细胞增殖及诱导细胞凋亡的比较研究

王 源,司维柯,李 鹏,姚 婕 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察比较苦参碱及氧化苦参碱对A549细胞系增殖能力的影响及其对A549细胞凋亡的诱导效应。方法 以不同剂量的苦参碱及氧化苦参碱分别作用A549细胞,观察细胞形态,MTT法检测细胞的增殖能力,TNUEL法原位检测DNA断裂,流式细胞仪检测凋亡。结果 苦参碱在浓度为0.5 g/L时即表现出明显的抑制A549增殖的作用,浓度在1.0 g/L时TUNEL原位检测DNA断裂为强阳性,流式细胞仪检测出凋亡峰;相同浓度的氧化苦参碱没有明显的抑制A549增殖的作用,当其浓度增加到10倍出现对A549抑制增殖的作用,但是TUNEL原位检测DNA断裂为弱阳性,流式细胞仪不能检测出凋亡峰。结论 苦参碱可抑制A549细胞系增殖并诱导其凋亡;相同浓度下氧化苦参碱不能抑制A549细胞系增殖,10倍剂量也未出现细胞凋亡。

关键词:苦参碱;氧化苦参碱;A549细胞;凋亡
中图法分类号:R282.71;R329.28;R73-354 文献标识码:A

Effects of matrine and oxymatrine on the proliferation and the apoptosis of A549 cells

WANG Yuan, SI Wei-ke, LI Peng, YAO Jie (Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of matrine and oxymatrine on the proliferation and the apoptosis of A549 cells. Methods The morphological changes of A549 cells after treatment with different concentrations of matrine and oxymatrine were observed. The proliferative ability, the DNA breakage, and the apoptosis of A549 cells were detected by MTT method, *in situ* TUNEL method, and flow cytometry, respectively. Results The proliferation of A549 cells was remarkably inhibited by 0.5 g/L matrine. Strong positive DNA breakage was detected by TUNEL and the apoptotic peak was detected by flow cytometry in A549 cells after treatment with 1.0 g/L matrine. Nevertheless, oxymatrine at the same concentrations had no obvious inhibitory effect on the proliferation of A549 cells. When the concentration of oxymatrine was increased as high as 10 times, the proliferation of A549 cell was inhibited, and weakly positive DNA breakage was detected, but the apoptotic peak was not detected. Conclusion Matrine can inhibit the proliferation and induce apoptosis of A549 cells at some concentration, but oxymatrine at the same concentration has no inhibitory effect on the cell proliferation, and can not induce the cell apoptosis even at the concentration as 10 times as that of matrine.

Key words: matrine; oxymatrine; A549 cell; apoptosis

苦参是传统中药,广泛应用于临床各科,特别是它的抗肿瘤活性,近年来受到极大关注,苦参主要抗肿瘤活性成分是苦参碱和氧化苦参碱[1]。苦参碱(matrine)注射液目前临床主要用于肝炎的治疗中,氧化苦参碱(oxymatrine)临床主要用于过敏性皮肤病、病毒性肝炎及白细胞减少的治疗。我们研究发现苦参提取液在体外可诱导K562细胞向红系和粒系分化[2,3];以人肝癌细胞HapeG2作为细胞模型,以正常鼠肝细胞作为对照,发现苦参碱可抑制肝癌细胞增殖并诱导其凋亡[4,5]。但氧化苦参碱能否直接作用于肿瘤细胞,抑制其增殖及诱导其凋亡尚少见报道。本研究以人肺癌细胞株A549作为细胞模型,比较不同浓度苦参碱及氧化苦参碱作用不同时间后,对该细胞增殖能力的影响,观察细胞形态,TUNEL法原位检测DNA断裂并采用流式细胞仪检测凋亡峰,初步观察比较苦参碱及氧化苦参碱对A549细胞系增殖抑制及诱导凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

苦参碱注射液(商品名:斯巴德康)10 g/L,5 ml/支,购自广州明兴制药厂,批号011001。氧化苦参碱(商品名:博尔泰力)

作者简介:王 源(1973—),男,四川省南溪县人,硕士,实验师,主要从事抗肿瘤血管生成、肿瘤细胞增殖调控及肝胆疾病实验室诊断方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752313
通信作者:司维柯,电话:(023)68752314,E-mail:weikesi@yahoo.com.cn
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2003-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

20 g/L, 2 ml/支。小牛血清（杭州四季青）。RPMI1640 培养基和胰酶均为 GIBCO 产品。MTT 为 Serva 产品。TUNAL 试剂盒（华美公司产品）。人肺腺癌 A549 细胞系, 由第三军医大学全军免疫学研究所陈安博士惠赠。

1.2　细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞以 1640 培养液（10%小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml）培养: 取回传代培养的 A549 细胞, 移入螺口 50 ml 培养瓶内, 置 37 ℃, 5%CO_2 孵箱培养, 隔天更换培养液, 待细胞长至 80%或接近完全融合成片时, 以 0.25%胰蛋白酶 37 ℃消化 3~5 min, 细胞皱缩变圆后弃去胰蛋白酶液, 加入完全培养液, 制备细胞悬液, 细胞分装接种于螺口 50 ml 培养瓶或 96 孔培养板中。

1.3　MTT 实验

常规培养 A549 细胞, 制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10^4/ml, 于 96 孔板中加入 A549 细胞, 及苦参碱和氧化苦参碱, 具体加样方法见表 1。

表 1　试剂加样方法

Tab 1　Adding method of reagents

Number	1	2	3	4	5	6
Matrine (g/L)	0	0.5	0.8	1	1.5	0
Dry matrine (g/L)	0	0.5	0.8	1	1.5	0
Oxymatrine (g/L)	0	5	8	10	15	0

1 号孔只加 200 μl 1640 培养基, 其余各孔均加入了 100 μl 的细胞悬液, 用 1640 培养基补足为 200 μl, 同时调整苦参碱和氧化苦参碱到所需浓度。

每组分别设置 3 个平行孔, 同样的加样方法再加样 3 块 96 孔板, 置 CO_2 孵箱中培养, 分别于 24、48、72、96 h 取出一块 96 孔板, 观察苦参碱及氧化苦参碱各组细胞形态的差异, 每个孔中加入 10 μl MTT, 放回 CO_2 孵箱中再培养 30 min, 吸尽液体, 各孔中加入 100 μl 二甲亚砜, 轻微振荡 10 min, 置酶标仪中, 波长 490 nm 测定各孔的 A 值。

1.4　凋亡峰检测

在 6 孔板的各个孔中加入 1.5 ml 细胞悬液, 1 号孔作为对照, 加入 1.5 ml1640 培养液补足体积为 3 ml, 2、3、4 号孔加入苦参碱, 用 1640 培养基补足体积为 3 ml, 同时使苦参碱的浓度分别为 0.5、1.0、1.5 g/l; 5、6 号孔加入氧化苦参碱, 用 1640 培养液补足体积为 3 ml, 同时使氧化苦参碱的浓度分别为 5、10 g/L。置 CO_2 孵箱中培养 72 h, 胰蛋白酶消化各孔的细胞, 将洗脱下来的细胞经洗涤离心后, 分别加入 4 ℃预冷的 70%乙醇 3 ml 中制备细胞悬液, 用流式细胞仪检测各管的凋亡峰。

1.5　TUNEL 法原位检测 DNA 断裂

在 6 孔板的各个孔中分别放入一块无菌盖玻片, 各孔加入 1.5 ml 细胞悬液, 1 号孔作为对照, 加入 1.5 ml 1640 培养基补足体积为 3 ml, 2、3、4 号孔加入苦参碱, 用 1640 培养基补足体积为 3 ml, 同时使苦参碱的浓度分别为 0.5、1.0、1.5 g/l; 5、6 号孔加入氧化苦参碱, 用 1640 培养液补足体积为 3 ml, 同时使氧化苦参碱的浓度分别为 5、10 g/L。置 CO_2 孵箱中培养 72 h, 取出盖玻片, 浸入 95%乙醇液中, 4 ℃固定 30 min。应用 TUNEL 法原位检测试剂盒, 检测 A549 细胞 DNA 断裂。

1.6　统计学分析

采用 u 检验。

2　结果

2.1　细胞形态观察

苦参碱组的 A549 细胞, 镜下可见大量折光较强的空泡状小体, 并且随着加入的苦参碱浓度的增加以及培养时间的延长而增多, 对照组及相同浓度的氧化苦参碱组的细胞未见这种空泡状小体, 但当氧化苦参碱的浓度增大到 10 倍, 细胞中也可见一些类似小体, 同样随着浓度的增加以及培养时间的延长而增多。

2.2　MTT 实验

将试样各孔的 3 个平行孔测得的 A 值求均值, 相对于对照孔的 A 值计算对 A549 细胞的抑制率, 抑制率=（A 对照-A 实验）/A 对照×100%。比较各个试验组在不同时相点对 A549 细胞的抑制率。

苦参碱与氧化苦参碱在相同浓度及同一时相点时对 A549 细胞增殖的抑制率有显著差异（$P<0.01$）, 但当氧化苦参碱的浓度增大 10 倍后在同一时相点与苦参碱对 A549 细胞的抑制率无显著差异（$P>0.05$）。

2.3　凋亡峰检测

6 孔板中的细胞经流式细胞仪检测可见, 随着苦参碱浓度的增加, A549 细胞凋亡峰也增加, 而氧化苦参碱虽然使用了 10 倍于苦参碱的浓度但是仍未检测到凋亡峰。流式细胞仪检测苦参碱及氧化苦参碱处理 A549 的凋亡峰结果显示, 苦参碱浓度为 0.5、1.0、1.5 g/L 其诱导 A549 细胞凋亡的细胞比率分别为 9.0%、18.2%、28.6%。而氧化苦参碱浓度为 5、10 g/L 时, 其诱导 A549 细胞凋亡的细胞比率分别为 1.29%、4.62%, 统计分析显示, 苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的作用显著强于氧化苦参碱（$P<0.01$）。

2.4　TUNEL 法原位检测 DNA 断裂

苦参碱处理的 A549 细胞应用 TUNEL 法原位检测试剂盒, 检测细胞 DNA 断裂结果为阳性（细胞核为棕黄色着染）, 见图 1, 随着苦参碱浓度增加, 阳性程度增加。氧化苦参碱处理的 A549 细胞应用 TUNEL 法原位检测试剂盒, 检测细胞 DNA 断裂结果为弱阳性（细胞核为淡黄色着染）, 见图 2。

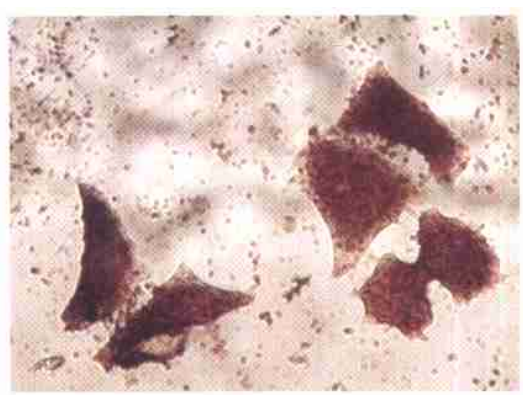


图 1　苦参碱 1.0 g/L 处理的 A549 细胞　（TUNEL×400）

Fig 1　A549 cells treated by 1.0 g/L matrine　（TUNEL×400）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 2 氧化苦参碱 5g/L 处理的 A549 细胞 (TUNEL× 400)
Fig 2 A549 cells treated by 5 g/L oxymatrine (TUNEL× 400)

3 讨论

本研究的目的在于证明苦参碱抑制肺癌细胞增殖并诱导其凋亡的作用,比较研究苦参碱和氧化苦参碱抑制肺癌细胞增殖并诱导其凋亡的能力。实验结果显示苦参碱能有效地抑制人肺癌细胞株 A549 的增殖。MTT 实验显示,苦参碱对 A549 抑制作用有时间剂量依赖性。随着作用时间延长和药物浓度的增加,A549 细胞存活率明显降低。而相同浓度的氧化苦参碱对 A549 抑制作用较弱,苦参碱与氧化苦参碱在相同浓度及同一时相点时对 A549 细胞的抑制率有显著差异($P<0.01$),但当氧化苦参碱的浓度增大 10 倍后表现出与苦参碱相似的对 A549 细胞的抑制作用。表明苦参碱抑制人肺癌细胞株 A549 增殖的能力优于氧化苦参碱。

肿瘤细胞在不同程度上缺乏成熟的形态和完整的功能,丧失某些终末分化细胞的性状,并常对正常的分化调节机制缺乏反应。近年来,细胞凋亡与肿瘤的关系受到日益重视,认为正常细胞通过增殖和凋亡来维持自身稳定,若两者失衡,则可导致肿瘤发生。苦参碱有较强的诱导肿瘤细胞凋亡的作用。流式细胞仪检测苦参碱及氧化苦参碱处理 A549 的凋亡峰,结果显示苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的作用显著强于氧化苦参碱。

苦参的主要抗肿瘤活性成分是苦参碱和氧化苦参碱。近年来随着对苦参碱提纯测定和药效作用的深入研究,发现苦参碱体外具有抗肿瘤的作用。目前临床上已有应用苦参生物碱对肿瘤有效的报道,具代表性的是吗特灵,其主要成分是苦参碱和氧化苦参碱,对消化道肿瘤效果好,并且能改善肿瘤患者的症状。目前已有单用氧化苦参碱抗肿瘤的注射液应用于临床,比如苦参白、博尔泰力等,主要是利用其增高白细胞的作用。

参考文献:

[1] 肖诗鹰. 苦参抗肿瘤方面的应用与研究[J]. 实用中西医结合杂志, 1991, 4(9): 564-566.

[2] 李先荣, 刘德宽, 张 焱, 等. 苦参生物碱抗小鼠移植性肿瘤研究[J]. 中西医结合杂志, 1982, 2(1): 42-43.

[3] Zhang Yan, Jiang J K, Liu X S, *et al*. Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by matrine[J]. Nat Med, 1998, 52(4): 295-299.

[4] 司维柯, 张广运, 马立强, 等. 苦参碱对 HepG2 细胞系增殖能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 451-452.

[5] 司维柯, 陈 安, 李 鹏, 等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 HepG2 凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 816-820.

(编辑 张大春)

(上接 777 页)

根据患者的病情,当血钾高于 6.5 mmol/L,血肌酐大于 600 mmol/L,尿素氮大于 25 mmol/L,作为急诊行血液透析适应证[1],待肾功能改善后再进行解除上尿路梗阻的病因治疗。由于急性肾功能衰竭,结石在输尿管停留时间短,结石与输尿管粘膜之间尚未形成炎性粘连,可首选 ESWL 治疗,能有效的解除结石所致的梗阻性肾功能衰竭[3]。如果上尿路梗阻持续性存在,可进一步行输尿管逆行插管或留置双 J 管后再行 ESWL。当输尿管逆行插管引流失败后,可选择输尿管镜下气压弹道碎石术,其优点是疗效确切,侵袭性小,成功率高,能够同时处理双侧梗阻,但由于需要专门设备,技术难度高[4],一般基层医院难以开展。一旦输尿管镜下气压弹道碎石术失败,就应考虑患者一般情况,如果病情条件不允许或阴性结石,定位不准确,先行经皮肾穿刺造瘘术,待术后 2 周左右再行二期手术[5]。如果患者一般情况允许,可行开放手术同时解决双侧输尿管梗阻。外院行子宫切除术后 2~3 d 致术后急性肾功能衰竭患者,在诊断明确后,立即行双侧输尿管膀胱吻合术,解除梗阻后,肾功能恢复正常。

在急诊处理上尿路梗阻所致急性肾功能衰竭时,总的原则是提高急性肾功能衰竭的救治率,解除梗阻,恢复肾脏功能。我们根据病情,在治疗方法上,首先采取快捷、简便、损伤小的治疗手段,随着病情的逐渐改善,进一步实施完善的治疗方案。由于泌尿外科的飞速发展在治疗急性肾功能衰竭的方法上,无论是 ESWL、腔内技术的广泛应用,还是开放性手术治疗,均存在着一定的局限性。因此,在急诊处理上尿路梗阻性急性肾功能衰竭时,要因人而异,采取最有效的方法,是其关键所在。

关键词:急性肾衰;急诊处理
中图法分类号:R692.505.97 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张璐仁. 血液净化临床[A]. 见:马滕骧 主编. 现代泌尿外科学[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2000. 206-208.

[2] 姜埃利. 急性肾功能衰竭治疗进展[A]. 见:马滕骧 主编. 现代泌尿外科学[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2000. 154-155.

[3] 严小英, 吴海啸, 龚秀青. ESWL 治疗输尿管结石急性梗阻肾无功能[J]. 中华泌尿外科志, 2001, 22(12): 763.

[4] 尹 杰, 麦能斌, 何国伟, 等. 腔内技术急诊处理梗阻性急性肾衰(附 23 例报告)[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(6): 726-727.

[5] 孙昌惕. 肾结石[A]. 见:吴阶平主编. 泌尿外科[M]. 山东:科学技术出版社, 1993. 613-614.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net