

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.013

## 苦参注射液对肺癌 Lewis 细胞增殖和凋亡的影响

### Effect of Yanshu injection on proliferation and apoptosis of lung cancer lewis cells

段哲萍,于新江,李芳,吴大勇,刘媛媛(河北省人民医院 肿瘤二科,河北 石家庄 050057)

**[摘要]** **目的:**探讨苦参注射液对肺癌 Lewis 细胞的增殖、细胞周期、凋亡的影响。**方法:**采用 MTT 法及流式细胞技术,观察在不同浓度的苦参注射液处理 24、48 h 后,Lewis 细胞增殖及细胞周期及凋亡的变化。**结果:**肺癌 Lewis 细胞在苦参注射液作用下表现出增殖抑制,且呈现剂量、时间依赖趋势;经处理后的肺癌 Lewis 细胞周期阻滞于 G1 期;在苦参注射液促进 Lewis 细胞凋亡。**结论:**苦参注射液能有效将肺癌 Lewis 细胞周期阻滞在 G0/G1 期,使其细胞增殖率显著降低,同时提高其细胞凋亡率。

**[关键词]** 肺癌细胞;苦参;细胞增殖;细胞周期;岩舒

**[中图分类号]** R734.2; R730.59

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)02-0180-03

近年来,我国非小细胞肺癌的高发病率及死亡率逐渐得到医学科研界的重视,I、II 期非小细胞肺癌经手术干预是完全可以达到根治的。但是,早期肺癌患者多无症状而不易被发现,大部分患者就诊时已发展到中晚期,已错过最佳手术时机,多以放疗化疗治疗为主。然而放疗化疗时毒副作用严重,使患者治疗周期难以为继,而中医中药在预防、治疗恶性肿瘤同时对于减轻毒副作用有独到之处。复方苦参注射液(商品名:岩舒,Yanshu)是纯中药抗肿瘤制剂,含有多种生物碱,如氧化苦参碱、脱氧苦参碱和苦参碱等。经多年的临床应用显示,复方苦参注射液具有良好的抑制肿瘤、提高病患生活质量、缓解放化疗毒副作用等作用。研究苦参注射液对肺癌 Lewis 细胞的作用机制,为临床应用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂与仪器

肺癌 Lewis 细胞株购自 Sigma 公司;MTT 购自 Sigma 公司。DMSO 二甲基亚砷购自 Sandland 公司,检测凋亡、细胞周期试剂盒购自 Partes 公司,优质新生小牛血清购自 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司。苦参注射液购自山西振东有限公司(批号:国药准字 Z14021231,5 ml/支)。ELX800 型酶标仪购自 BIO-TEK 公司;FACSTARCalibur 型流式细胞仪购自 BD 公司。

#### 1.2 MTT 法检测不同浓度苦参注射液对 Lewis 细胞增殖的影响

所用肺癌 Lewis 细胞经胎牛血清(10%)RPMI 1640 培养基培养至对数生长期后,在培养瓶中经胰

酶(0.25%)消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/ml。取细胞悬液 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板中。培养箱条件设置为 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度,在该条件下培养 24 h,单层细胞铺满孔底,吸除培养基,改用无血清培养液 100  $\mu$ l 进行饥饿培养,同时加入各浓度梯度的苦参注射液 100  $\mu$ l,梯度分为 6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ l/ml,阴性对照组每孔溶液体积亦为 200  $\mu$ l,包括细胞 100  $\mu$ l 及无血清培养基 100  $\mu$ l,空白组只加 200  $\mu$ l 无血清培养液而不加入细胞,上述 3 组及每个浓度组分别设置 5 个复孔,接种在 2 块培养板中。在培养箱中继续培养 24、48 h,吸除上清液,PBS 洗涤 2~3 次,每孔加入 MTT 20  $\mu$ l,培养箱继续培养 4 h,弃上清,加入二甲基亚砷 150  $\mu$ l,振荡 15 min,经酶联免疫检测仪检测 490 nm 处各孔光密度(D)值,取 5 个复孔的平均值。计算给药后 24、48 h 细胞增殖抑制率。增殖抑制率(%) =  $[1 - (A - B) / (C - B)] \times 100\%$ 。A:给药组 D 均值,B:空白组 D 均值,C:对照组 D 均值。

#### 1.3 流式细胞术检测苦参注射液对 Lewis 细胞凋亡及细胞周期的影响

选择 50、100  $\mu$ l/ml 浓度苦参注射液给药,并设置阴性对照组,阴性对照组不给药物刺激只加入等

**[基金项目]** 河北省卫生厅重点科技研究计划项目资助(No. 20100164)。Project supported by the Key Science and Technology Research Program of Health Bureau of Hebei Province(No. 20100164)

**[作者简介]** 段哲萍(1975-),女,硕士,主治医师,主要从事肿瘤临床学的研究,E-mail:julia-duan@sina.com

**[通信作者]** 于新江(YU Xinjiang, corresponding author),硕士,主治医师,主要从事心胸外科临床研究,E-mail:leslie\_yu@163.com

量的细胞。每组设置 5 个培养瓶,培养箱中培养细胞 48 h,各组细胞经胰酶消化后用离心管分别收集,常温  $2\ 000 \times g$  离心 8 min,吸弃上清液,每管加入 PBS 3 ml,取液后反复吹打洗涤后进行  $1\ 000 \times g$  离心 12 min,加入 200  $\mu\text{l}$  缓冲液将细胞悬浮,加入 Annexin V-FITC 10  $\mu\text{l}$ 、PI 5  $\mu\text{l}$  混均,后 4  $^{\circ}\text{C}$  避光条件下放置 30 min,再加入结合缓冲液 300  $\mu\text{l}$ 。依据检测细胞凋亡与细胞周期试剂盒的操作说明处理好细胞后,上机进行检测。

#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,多样本均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 苦参注射液对 Lewis 细胞增殖抑制作用呈剂量与时间依赖性

MTT 法检测结果(表 1)显示,6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  5 种浓度苦参注射液作用 24、48 h 后,给药浓度越高,对肺癌 Lewis 细胞增殖的抑制作用越显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),存在剂量依赖性。同一给药浓度组作用时间 48 h 的抑制作用均较 24 h 明显增强( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),存在时间依赖性。

表 1 不同浓度苦参注射液作用 24、48 h 对肺癌 Lewis 细胞的抑制率( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

苦参碱 [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]	作用时间( $t/h$ )	
	24	48
6.25	0.145 $\pm$ 0.028	0.154 $\pm$ 0.023 <sup><math>\Delta</math></sup>
12.5	0.162 $\pm$ 0.018 <sup>*</sup>	0.188 $\pm$ 0.022 <sup>**<math>\Delta</math></sup>
25	0.171 $\pm$ 0.023 <sup>*</sup>	0.409 $\pm$ 0.016 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>
50	0.284 $\pm$ 0.038 <sup>**</sup>	0.654 $\pm$ 0.011 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>
100	0.372 $\pm$ 0.084 <sup>**</sup>	0.727 $\pm$ 0.014 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  与 6.25  $\mu\text{l}/\text{ml}$  组比较;

$\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  与作用 24 h 相同质量浓度组比较

### 2.2 高浓度苦参注射液促进 Lewis 细胞凋亡并阻滞细胞周期于 G1 期

选择增殖抑制率在 60% 以上的 2 个高浓度苦参注射液(50、100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )作为实验组,阴性对照组不给药物刺激只加入等量的细胞,3 组作用细胞 48 h 后,流式细胞技术检测结果(表 2)显示,在细胞周期中 G2/M 期细胞比例变化不明显,而 G0/G1 期、S 期给药浓度越高,肺癌 Lewis 细胞周期内细胞的变化越为显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。肺癌 Lewis 细胞凋亡率随着给药浓度的增加也相应明显升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 2 苦参注射液作用 48 h 对 Lewis 细胞周期及凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s$ )%

组别	$n$	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	凋亡率
阴性对照组	5	42.70 $\pm$ 3.51	39.68 $\pm$ 2.35	17.62 $\pm$ 0.51	2.20 $\pm$ 0.19
苦参注射液 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 组	5	56.78 $\pm$ 3.17 <sup>*</sup>	27.54 $\pm$ 1.89 <sup>*</sup>	15.68 $\pm$ 0.43	14.80 $\pm$ 0.56 <sup>*</sup>
苦参注射液 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 组	5	68.42 $\pm$ 4.23 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	13.53 $\pm$ 0.67 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	18.08 $\pm$ 0.48	25.60 $\pm$ 0.78 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>

\* $P < 0.01$  与阴性对照组比较,  $\Delta\Delta P < 0.05$  与苦参注射液 50.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$  组比较

## 3 讨论

肺癌的综合治疗为手术治疗、放射治疗、化学治疗、靶向药物治疗、生物治疗以及中医药辅助治疗等。中医中药为我国肿瘤治疗的特色,苦参注射液是纯中药抗肿瘤制剂,经科学加工、提炼,有效成分包括多种生物碱,即氧化苦参碱、脱氧苦参碱和苦参碱等<sup>[1-2]</sup>。有文献<sup>[3-4]</sup>报道,苦参生物碱对癌细胞的端粒酶发挥抑制作用,上调抑癌基因的表达水平,使癌细胞的分化发生改变,延长细胞周期,阻止肿瘤细胞有丝分裂,加速肿瘤细胞凋亡,并可对黏附分子

CD44 的表达起抑制作用,从而减少癌细胞的转移。有研究<sup>[5-7]</sup>显示,苦参碱可改变血管的通透性,增加血管的稳定性,使癌细胞与血管内皮细胞的黏附减少,控制肿瘤细胞血行转移;另外,可通过调节机体的免疫功能而直接杀伤肿瘤细胞,与非特异性细胞周期药物联用时起到协同增效的作用。

从本实验结果观察到,苦参注射液给药浓度从 6.25  $\mu\text{l}/\text{ml}$  增加至 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、作用时间从 24 h 增加至 48 h,对肺癌 Lewis 细胞增殖抑制作用均呈上升趋势,提示苦参注射液对细胞增殖抑制作用表现为剂量和时间依赖趋势。流式细胞技术检测结果发

现,给药浓度从0、50、100 μl/ml变化,肺癌 Lewis 细胞凋亡率随之升高,细胞周期阻滞于 G1 期。本实验证实苦参注射液能有效诱导肺癌 Lewis 细胞凋亡,且该作用与药物剂量呈依赖趋势。

临床治疗食管癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌及血液系统恶性肿瘤等,单药应用苦参注射液或同时联合化疗治疗,不但具有较好的疗效,而且可以缓解放化疗对于患者带来的临床不适症状,使患者在治疗肿瘤的过程仍能保证生活质量<sup>[8-10]</sup>。本研究显示,苦参注射液能抑制肺癌 Lewis 细胞增殖和诱导肺癌细胞的凋亡。

然而苦参注射液的中药制剂中均含有多种生物碱,有效成分复杂,各成分在抗肿瘤中的作用到底有多大? 何种成分发挥主导地位? 有没有其他机制可影响到细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡? 目前仍存在诸多问题,需要进一步实验以从分子水平论证其作用机制。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 田娟, 王维皓, 高慧敏, 等. HPLC 测定复方苦参注射液中苦参碱、槐定碱和氧化苦参碱的含量[ J ]. 中国中药杂志, 2007, 32( 3 ): 222-224. DOI: 10. 3321/j. issn: 1001-5302. 2007. 03. 011.

[ 2 ] 戈长征, 黄伟炎, 张定富. 岩舒注射液联合化疗治疗晚期恶性肿瘤疗效观察[ J ]. 山东医药, 2009, 49( 37 ): 80-83. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2009. 37. 045.

[ 3 ] 刘彦同, 张会英, 刘彦玲. 复方苦参注射液联合紫杉醇加顺铂治疗中晚期非小细胞肺癌的临床观察[ J ]. 临床肺科杂志,

2010, 15( 5 ): 727-728. DOI:10. 3969/j. issn. 1009-6663. 2010. 05. 071.

[ 4 ] 张茜, 白海, 蕙瑞, 等. 复方苦参注射液联合化疗治疗急性白血病的临床观察[ J ]. 中国医师杂志, 2007, 9( 1 ): 129-130. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1008-1372. 2007. 01. 067.

[ 5 ] 张薇薇, 杨新宇. 复方苦参注射液联合化疗治疗多发性骨髓瘤的临床研究[ J ]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30( 3 ): 68-69. DOI:10. 3969/j. issn. 1674-070X. 2010. 03. 022. 068. 02.

[ 6 ] 占明, 高宝安, 王锡恩. 复方苦参注射液联合伊班膦酸钠治疗非小细胞肺癌骨转移癌疼痛的临床观察[ J ]. 世界中医药, 2015, 10( 2 ): 206-208. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7202( sj ). 2015. 02. 016.

[ 7 ] 郭帅. 复方苦参注射液治疗 III ~ IV 期癌症患者癌性疼痛临床疗效[ J ]. 药物评价研究, 2015, 38( 3 ): 306-309. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2015. 03. 016.

[ 8 ] 杨秀娥, 任燕梅, 任武刚, 等. 复方苦参注射液联合鸦胆子油乳注射液姑息治疗晚期恶性肿瘤临床研究[ J ]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21( 5 ): 28-30. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-5304. 2014. 05. 009.

[ 9 ] 庄海峰, 任金贤, 周郁鸿, 等. 复方苦参注射液联合顺铂胸腔内注射治疗恶性血液病并发胸腔积液 24 例[ J ]. 中国新药杂志, 2012, 13( 9 ): 623-625. DOI: 10. 3779/j. issn. 1009-3419. 2012. 09. 008.

[ 10 ] 黄志文, 张红艳, 张凯, 等. 复方苦参注射液联合短棒状杆菌局部治疗晚期肺癌恶性胸腔积液的临床研究[ J ]. 临床肺科杂志, 2012, 17( 3 ): 497-498. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-6663. 2012. 03. 056.

[ 收稿日期 ] 2016 - 11 - 25 [ 修回日期 ] 2016 - 12 - 14  
[ 本文编辑 ] 王映红

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体质量;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状况;(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体( SPF )级;四级为无菌级( 包括悉生动物 )。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

( 本刊编辑部 )