

# 苦参碱联合顺铂抗肝癌的实验研究

刘秀均<sup>1\*</sup>, 刘婷<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 研究苦参碱和顺铂联合应用抗肝癌的疗效及增效机制。方法: 体外实验采用 MTT 试验观察苦参碱和顺铂联合应用对肝癌细胞 Hep G2 增殖的影响; 体内实验采用裸鼠移植性人肝癌观察二者联合应用对肝癌的抑制情况。结果: 体内外实验结果均表明, 苦参碱和顺铂联合用药对人肝癌的抑制率显著提高, 而毒副作用明显减轻,  $CDI \leq 0.75$ 。结论: 苦参碱和顺铂联合用药抗肝癌有协同增效的作用。

**[关键词]** 苦参碱; 顺铂; 联合用药; 肝癌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)06-0037-02

苦参碱(Matrine, Ma)是从传统中药苦参和苦豆子中提取的生物碱,临床上主要用于抗乙型肝炎治疗慢性病毒性肝炎<sup>[1]</sup>。有研究表明,苦参碱具有显著的抗肿瘤作用,对肝癌、肺癌、胃癌等肿瘤有较好的疗效<sup>[2-3]</sup>。

顺铂(CDDP)是临床常用的传统抗肿瘤药物,但可引起胃肠道、肾、神经系统及骨髓的毒性反应。

联合用药可以降低药物的给药剂量,从而降低药物的毒副作用,并可提高抗肿瘤疗效,延缓耐药性的产生,是临床和实验研究抗肿瘤的主要趋势和方向<sup>[4]</sup>。为此,我们探讨了苦参碱和顺铂联合用药抗肝癌的疗效。

## 1 材料

**1.1 细胞株和动物** 人肝癌细胞株 Hep G2 (ATCC HB-8065),高糖培养基(Gibco)常规传代培养。BALB/c(*nu/nu*)雌性裸鼠,(6~8)W,体重(18~22)g,由中国医学科学院实验动物研究所动物中心提供(合格证号:SCXK(京)2005-0013)。

**1.2 药品与试剂** 顺铂(CDDP,山东省德州制药厂),苦参碱(MW 248.36,长春国奥药业有限公司)

## 2 方法

**2.1 MTT 法检测苦参碱和顺铂对肝癌细胞增殖的影响** 取对数生长期的人肝癌 Hep G2 细胞4 000个/孔接种于96孔细胞培养板中,24 h后加入不同浓度的苦参碱和顺铂,作用细胞48 h,每组3个平行孔。

常规 MTT 法检测。每孔加 50  $\mu$ L MTT (2 mg/mL) 溶液,37  $^{\circ}$ C 温育 4 h。吸出上清液,加入 150  $\mu$ L DMSO,振荡 15 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪在 570 nm 处测定每个孔的光密度 OD<sub>570</sub>。将各测试孔的 OD 值减去本底 OD 值,各平行孔的 OD 值取平均数。细胞的存活率以 T/C (%) 表示,T 为加药细胞的 OD 值,C 为对照细胞的 OD 值。细胞存活率 % = (加药细胞 OD - 本底 OD) / (对照细胞 OD - 本底 OD)  $\times$  100%。采用改进寇氏法计算半数抑制率(IC<sub>50</sub>),重复 3 次,计算均值。并计算两药相互作用指数(coefficient of drug interaction, CDI),计算方法为:  $CDI = AB / (A \times B)$ 。AB 为两药联合作用组的 T/C 比值(吸光度比值);A、B 是药物单独作用组的 T/C 比值;T/C 是指给药组与对照组的 T/C 比值。当  $CDI \leq 0.85$  时存在协同作用, $CDI \leq 0.75$  时认为协同作用非常显著,下同。

**2.2 苦参碱和顺铂对裸鼠移植性人肝癌的生长抑制作用** 将裸鼠体内传代的 Hep G2 无菌取出并切成(2  $\times$  2  $\times$  2) mm<sup>3</sup> 小块,用套管针将瘤块移植于裸鼠右侧腋窝皮下。接种后第 6 d,待瘤块长至大约(5  $\times$  5  $\times$  5) mm<sup>3</sup> 大小时,将裸鼠分成 6 组,腹腔注射不同剂量的苦参碱和顺铂。顺铂组给药剂量为 5 mg/kg,0.2 mL/只,隔周给药 1 次,共 2 次;苦参碱设低剂量和高剂量组,给药剂量分别为 50 mg/kg 和 100 mg/kg,0.2 mL/只,每周连续给药 5 次;联合用药组为:苦参碱低剂量(50 mg/kg) + 顺铂组,苦参碱高剂量(100 mg/kg) + 顺铂组,苦参碱和顺铂的给药方式分别同苦参碱组和顺铂组。空白对照组给予同体积的

[收稿日期] 2007-02-06

[通讯作者] \* 刘秀均, Tel: (010) 63010985; E-mail: liuxiujun2000@yahoo.com.cn

生理盐水腹腔注射。用游标卡尺测量瘤块的大小,每隔(3~4)d测量一次,根据公式 $ab^2/2$ 计算瘤块的体积,a为长径,b为短径。计算每组动物的瘤块体积平均值,计算药物对肿瘤生长的抑制率。同时观察动物的体重变化和死亡情况。28d后,将动物处死,取出瘤块称重并计算生长抑制率。

### 3 结果

**3.1 苦参碱和顺铂对肝癌细胞增殖的影响** 实验结果表明,苦参碱和顺铂对 Hep G2 细胞的 IC50 分别是  $4.99 \times 10^{-3}$  mol/L 和  $5.10 \times 10^{-6}$  mol/L,采用顺铂对 Hep G2 细胞的 IC10, IC25, IC30 剂量分别与苦参碱联合应用均可降低苦参碱的 IC50,其中以 IC25 和 IC30 的剂量最佳,CDI 值结果表明有显著的协同增效作用。详见表 1 和表 2。

表 1 顺铂对 Hep G2 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Drugs      | Concentration (mol/L)                         |
|------------|---|
| CDDP(IC10) | $1.01 \times 10^{-8} \pm 2.99 \times 10^{-9}$ |
| CDDP(IC25) | $1.87 \times 10^{-7} \pm 2.13 \times 10^{-8}$ |
| CDDP(IC30) | $8.20 \times 10^{-7} \pm 4.30 \times 10^{-7}$ |
| CDDP(IC50) | $5.10 \times 10^{-6} \pm 2.71 \times 10^{-7}$ |

表 2 苦参碱和顺铂联用对 Hep G2 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| Drugs               | IC50 (mmol/L)        |
|---------------------|----------------------|
| Matrine             | $4.99 \pm 0.19$      |
| Matrine+ CDDP(IC10) | $3.59 \pm 0.08^{1)}$ |
| Matrine+ CDDP(IC25) | $2.25 \pm 0.12^{1)}$ |
| Matrine+ CDDP(IC30) | $1.81 \pm 0.10^{1)}$ |

注:与 Matrine 组比较,  $^{1)} P < 0.001$ 。

**3.2 苦参碱和顺铂对裸鼠移植性人肝癌的生长抑制作用** 如表 3 所示,100 mg/kg 的苦参碱和 5 mg/kg 的顺铂对裸鼠移植性人肝癌的生长均有抑制作用,抑瘤率分别为 27.87% 和 32.79%,  $P < 0.05$ 。两药联合应用后,Matrine 50 mg/kg+ CDDP 5 mg/kg 组的抑瘤率增高至 63.11%,Matrine 100 mg/kg+ CDDP 5 mg/kg 组的抑瘤率增高至 87.70%,统计学分析有显著的增效作用,  $P < 0.01$ ,  $CDI < 0.75$ 。

表 3 苦参碱与顺铂对裸鼠移植性人肝癌的生长抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| Groups                           | Weight of Tumor (g)      | Inhibition rate of tumor (%) | CDI  |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------------|------|
| Control                          | $1.22 \pm 0.35$          | —                            | —    |
| Matrine 50 mg/kg                 | $0.97 \pm 0.34$          | 20.49                        | —    |
| Matrine 100 mg/kg                | $0.88 \pm 0.28^{1)}$     | 27.87                        | —    |
| CDDP 5 mg/kg                     | $0.82 \pm 0.19^{1)}$     | 32.79                        | —    |
| Matrine 50 mg/kg + CDDP 5 mg/kg  | $0.35 \pm 0.16^{2,3,5)}$ | 63.11                        | 0.69 |
| Matrine 100 mg/kg + CDDP 5 mg/kg | $0.15 \pm 0.10^{2,4,5)}$ | 87.70                        | 0.25 |

注:与 Control 组比较,  $^{1)} P < 0.05$ ;  $^{2)} P < 0.001$ ;与 Matrine 50 mg/kg 组比较,  $^{3)} P < 0.01$ ;与 Matrine 100 mg/kg 组比较,  $^{4)} P < 0.01$ ;与 CDDP 组比较,  $^{5)} P < 0.01$ 。

### 4 讨论

以往的研究表明,苦参碱对多种肿瘤均有较好的效果,如白血病、肝癌和胃癌<sup>[5]</sup>。苦参碱能升高白细胞和 Th 细胞,提高机体免疫力,毒副作用小,其注射液已广泛应用于临床肝炎的治疗中。我们采用苦参碱和顺铂联合用药,从体外和体内实验角度探讨了它们的抗肝癌的疗效。

体内外实验结果表明,苦参碱和顺铂联合用药后,对肝癌的抑制率有显著的提高,CDI 数值表明二者有显著的协同增效作用。顺铂主要通过抑制 DNA 的复制,从而达到抑制肿瘤细胞增殖,并诱导其凋亡;苦参碱单独使用也可发挥这些作用,且其作用机理较为广泛,如:可抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化、诱导凋亡、周期阻滞、抗迁移侵袭、抗血管生成<sup>[6]</sup>。苦参碱没有骨髓抑制的副作用,因而其内在的作用机理与传统细胞毒药物作用机理可能不同;因此,二者可通过不同的靶点发挥抗肿瘤作用,并发挥协同增效作用。此外,二者联合用药,可降低药物各自的剂量,从而降低其毒副作用,因此,在本研究的动物实验中,未发现动物体重降低以及死亡现象。

联合用药是抗肿瘤临床和研究的主流方向,找到高效低毒的联合用药抗肝癌的化疗方案是当前医学科研工作者的一项重要研究任务。本研究证实了苦参碱和顺铂在抗肝癌治疗上的联合增效作用,并在增效机理上做了一些探讨,希望对临床用药和后续的实验研究有一定的指导作用。

### [参考文献]

[1] 蒋行健,包剑锋. 苦参碱治疗病毒性肝炎疗效观察[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2001. 10(2): 191-193.

[2] 龙发,王云,张永昶,等. 苦参碱对人肺癌 SPC-A-1 细胞作用的研究[J]. 实用医学杂志, 2006. 22(13): 1483-1485.

[3] 曾晖,邹冰,谭慧珍,等. 苦参碱联合 5-FU 抑制人胃癌裸鼠移植瘤的生长作用及机制[J]. 广州中医药大学学报, 2006. 2003(2): 164-171.

[4] 甄永苏. 抗肿瘤药物研究与开发[M]. 北京:化学工业出版社, 2004. 742.

[5] 王颖,刘德新,姚丽红. 吗特灵治疗原发性肝癌 128 例分析[J]. 牡丹江医学院学报. 1997, 18(3): 31232.

[6] 张鸣杰,黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展[J]. 中国中药杂志, 2004. 29(2): 115-118.