

熊果酸抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长及凋亡的实验研究

崔兵兵¹, 程丽芳^{2*}, 侯立静², 杨青², 刘瑾², 牟艳玲³, 闫雪生², 李克明²
(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014;
3. 山东省医学科学院药物研究所, 济南 250062)

[摘要] **目的:**探讨熊果酸对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制作用。**方法:**将不同浓度的熊果酸分别与人肝癌细胞 SMMC-7721 共同培养 24, 72 h 后, 采用中性红染色法测定吸光度(A), 评定熊果酸对肝癌细胞株的增殖抑制作用; 流式细胞术测定其对肝癌细胞凋亡及细胞周期的影响。**结果:**不同浓度熊果酸对 SMMC-7721 细胞的增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 呈时间和剂量依赖关系; 24, 72 h 的半数抑制浓度(IC_{50})为 12.59, 8.32 $mg \cdot L^{-1}$ 。流式细胞仪检测结果表明, 熊果酸 12.5 $mg \cdot L^{-1}$ 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率 14.07%, 凋亡率随药物浓度的增加而上升; SMMC-7721 细胞阻滞 S 期, 作用与药物剂量呈正相关。**结论:**熊果酸对肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖有明显的抑制作用, 抗肿瘤作用机制可能与诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞于 S 期有关。

[关键词] 熊果酸; 肝癌 SMMC-7721 细胞株; 细胞凋亡; 细胞周期; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0181-04

[doi] 10.11653/syfj2013180181

Effect of Ursolic Acid on Inhibiting Growth and Apoptosis in Human Hepatoma SMMC-7721

CUI Bing-bing¹, CHENG Li-fang^{2*}, HOU Li-jing², YANG Qing², LIU Jin²,
MU Yan-ling³, YAN Xue-sheng², LI Ke-ming²

(1. Traditional Chinese Medicine of Shandong University, Ji'nan 250355, China;

2. Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

3. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the inhibition mechanism of ursolic acid on inhibiting the growth of human carcinoma cell SMMC-7721. **Method:** Human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 were co-cultured with different doses of ursolic acid for 24 h and 72 h, respectively. The absorbance value was evaluated by neutral red staining method, evaluation of ursolic acid on the proliferation of hepatoma cells; and the apoptosis was detected by flow cytometry. **Result:** Different concentrations of ursolic acid on the proliferation of SMMC-7721 cells showed obvious inhibition effect ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) with a time and dose dependent manner. The half inhibitory concentration (IC_{50}) of ursolic acid on SMMC-7721 cell strain was 12.59 $mg \cdot L^{-1}$ and 8.32 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. The result indicated that the apoptosis rate was up to 14.07%, ursolic acid arrested SMMC-7721 the cell strain to S by flow cytometry with a dose-dependent manner. **Conclusion:** Ursolic acid on the proliferation of SMMC-7721 hepatoma cell line has the obvious inhibitory action, antitumor mechanism may be related to induction of cell apoptosis and cell cycle arrest in S phase.

[Key words] ursolic acid; SMMC-7721 cell; cell apoptosis; cell cycle; flow cytometry

[收稿日期] 20130424(011)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2010ZX09401); 山东省科技攻关项目(2011GSF11902)

[第一作者] 崔兵兵, 硕士研究生, 中药药剂学专业, Tel:18765828257, E-mail: cuibingbing2011@163.com

[通讯作者] *程丽芳, 研究员, 从事中药药理与新药研究工作, Tel:0531-82949846, E-mail: chenglifang517@163.com

肝癌发病率在全球呈上升趋势^[1],每年新增患者约 60 万,多数患者就诊时已进入晚期,死亡率高,被称为“癌中之王”。临床上急需毒副作用小,对肝癌细胞选择性高的抗肝癌药物。

熊果酸(ursolic acid, UA),又名乌索酸、乌苏酸,是一种 α -香树脂醇(α -amyrin)型五环三萜类化合物,存在于椴子、白花蛇舌草、女贞子、乌梅、夏枯草等天然药用植物中,为自然界中分布较广的天然活性化合物之一。UA 对体外革兰阳性菌(G^+)和革兰阴性菌(G^-)及酵母菌均有抗菌活性,具有降血糖、降血脂及抗溃疡等多种药理作用^[2]。研究说明^[3-7],熊果酸具有明显的抗肿瘤作用,其抗肿瘤谱广,可广泛用于多种癌症的治疗。本文旨在探讨本课题组研制的 UA 对肝癌的作用,通过人肝癌 SMMC-7721 细胞株,检测和评价 UA 对肝癌细胞增殖的抑制作用、诱导细胞凋亡等作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 熊果酸(纯度 >99.0%,实验室自制),DMEM 培养液(美国 Gibco 公司,批号 900162),胎牛血清(济南劲牛生物材料有限公司,批号 100422)、中性红(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号 010107)、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究,编号 C1062)、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究,编号 C1052)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO,批号 T20110620)、0.25% 胰蛋白酶(Amresco 公司,批号 201307)。

1.2 仪器 BDS200-PH 倒置显微镜(Optec 奥特光学公司),FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 仪器公司),xMark 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),IL-161CI 二氧化碳培养箱(Silk 公司),高速离心机(美国 Beckman 公司),SW-CJ-2FD 净化工作台(Airtech 公司),电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司)。

1.3 细胞株 肝癌 SMMC-7721 细胞株(山东省医学科学院药物研究所馈赠)。

2 方法

2.1 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的抑制作用

2.1.1 细胞培养及实验分组 取冻存人肝癌细胞株 SMMC-7721 复苏,置于细胞培养瓶中,加入 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清,青霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C ,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,用 0.25% 胰酶消化液消化、传代。取对数生长期细胞用于实验。

实验分组:阴性对照组(细胞 + 培养液);溶媒对照组(细胞 + 培养液 + 0.1% DMSO);加药组(细胞 + 培养液 + 0.1% DMSO + 不同质量浓度 UA);以不加药物而加等体积的培养液为空白对照组。

2.1.2 UA 对 SMMC-7721 增殖的影响 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,调节细胞密度为 $2 \times 10^4 / \text{mL}$,接种于 96 孔板内,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。常规培养 24 h。每组分别加入不同浓度的 UA,使其终质量浓度为 60,30,15,7.5,3.75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度平行 5 个复孔。在 37°C ,5% CO_2 条件下分别培养 24,72 h 终止培养,吸去培养液,每孔加入中性红溶液(0.5%) $100 \mu\text{L}$,放入 37°C ,5% CO_2 箱内孵育 1 h,取出,倒出染料,冲洗至没有游离染料,甩干。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 脱色液,室温静置 10 min 后,用酶标仪测定 540 nm 处各组细胞的吸光度(A_{540}),计算肿瘤细胞生长抑制率。以上实验重复 3 次。以孙瑞元简捷综合计算法求其 IC_{50} 。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板中($2 \times 10^5 / \text{mL}$),贴壁 24 h 后分组,加入 UA,质量浓度分别为 3.125,6.25,12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 24 h 后终止,收集细胞并制成单细胞悬液,每个样本细胞总数为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃上清,参照试剂盒说明书进行操作,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.3 流式细胞术检测细胞周期 SMMC-7721 细胞以 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ 接种于 6 孔板中,每孔 2 mL。贴壁 24 h 后,分组,分别加入不同质量浓度的 UA,使其终质量浓度分别为 3.125,6.25,12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 24 h 后终止,收集细胞并制成单细胞悬液,每个样本细胞总数为 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min,弃上清,加入冰浴预冷 PBS 洗涤 1 遍,细胞沉淀加入 1 mL 预冷 70% 乙醇,混匀, 4°C 固定过夜。上机前,离心弃上清,加入 1 mL 冰浴预冷 PBS 洗 1 遍后,加入含有 RNase ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PI 染液($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 避光温浴 30 min,流式细胞仪进行检测。

2.4 统计学处理 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计比较,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 UA 对 SMMC-7721 细胞增殖有明显的抑制作用。UA 在 3.7 ~ 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用,随着剂量增加与用药时间延长,细胞增殖抑制作用增强,呈明显的依赖关系。熊果酸对 SMMC-7721

细胞 24,72 h 的 IC₅₀ 分别是 12.59,8.32 mg·L⁻¹。见表 1,图 1。

表 1 熊果酸对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	24 h		72 h	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
对照组	-	0.75 ± 0.09	-	1.25 ± 0.06	-
熊果酸	3.75	0.72 ± 0.08	3.5	1.03 ± 0.07 ¹⁾	19.5
	7.5	0.68 ± 0.10	9.6	0.93 ± 0.07 ¹⁾	27.8
	15	0.23 ± 0.05 ¹⁾	75.5	0.19 ± 0.02 ¹⁾	93.9
	30	0.08 ± 0.01 ¹⁾	96.8	0.15 ± 0.02 ¹⁾	97.2
	60	0.08 ± 0.01 ¹⁾	97.2	0.14 ± 0.01 ¹⁾	98.1

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05。

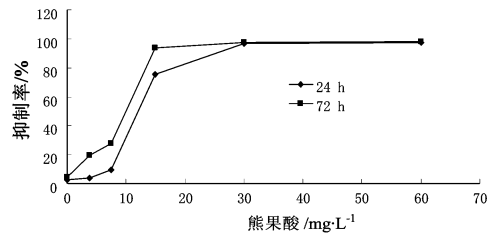


图 1 熊果酸对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的剂量与效应关系

3.2 熊果酸对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响
UA 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,早期凋亡率从 3.125 mg·L⁻¹ 0.99% 增加到 12.5 mg·L⁻¹ 2.73%; 晚期凋亡率从 3.125 mg·L⁻¹ 2.51% 增加到 12.5 mg·L⁻¹ 11.34%,UA 各实验组凋亡率明显高于对照组 (P < 0.01),并呈剂量依赖性关系。见表 2。

表 2 熊果酸对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	早期凋亡	晚期凋亡	凋亡率	坏死率
对照	-	0.11 ± 0.02	1.47 ± 0.11	1.58 ± 0.12	6.55 ± 2.21
熊果酸	3.125	0.99 ± 0.02	2.51 ± 0.23	3.50 ± 0.25 ¹⁾	8.56 ± 4.53
	6.25	1.64 ± 0.13	3.39 ± 0.47	5.03 ± 0.60 ¹⁾	17.12 ± 7.20
	12.5	2.73 ± 0.06	11.34 ± 0.13	14.07 ± 0.19 ¹⁾	18.32 ± 2.52

注:与对照组比较¹⁾P < 0.01(表 3 同)。

3.3 对 SMMC-7721 细胞周期的影响 SMMC-7721 细胞经不同浓度的 UA 处理 24 h 后,流式细胞仪检测各实验组的细胞周期,UA 可诱导 SMMC-7721 细胞周期 S 期细胞比例增高,G₀/G₁,G₂/M 期细胞比例降低 (P < 0.01)。说明 SMMC-7721 细胞分裂被 UA 有效的阻滞于 S 期 (P < 0.01)。见表 3。

表 3 熊果酸作用 SMMC-7721 肝癌细胞 24 h 对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	-	60.38 ± 1.01	36.96 ± 0.50	2.66 ± 1.02
熊果酸	3.125	50.74 ± 2.53	45.66 ± 0.71 ¹⁾	3.60 ± 1.94
	6.25	44.61 ± 1.19	50.09 ± 0.54 ¹⁾	5.30 ± 1.47
	12.5	43.39 ± 1.04	55.98 ± 1.18 ¹⁾	0.63 ± 1.10

4 讨论

肿瘤的发生一方面可能由于细胞大量增殖,另一方面可能由于凋亡抑制延长了细胞的生存周期。大量研究表明,肿瘤细胞的无限增殖与细胞凋亡紊乱有关^[8]。研究发现,从天然动物植物中获取的抗肿瘤物质,具有多靶点、多环节、多效应的作用特点,通过干扰肿瘤的生长、代谢及增殖过程,最终能使肿瘤细胞发生死亡或凋亡^[9]。

本试验从天然植物中获取的熊果酸,对人肝癌

细胞株 SMMC-7721 作用 24,72 h 后 IC₅₀ 分别是 12.59,8.32 mg·L⁻¹,质量浓度为 60 mg·L⁻¹作用 24 h 抑制率 97.2%,熊果酸对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率与剂量有明显的依赖性,阴性对照组凋亡率 1.58%,熊果酸凋亡率 3.50% 时剂量 3.125 mg·L⁻¹,凋亡率 14.08% 时剂量 12.5 mg·L⁻¹。试验说明熊果酸对人肝癌细胞株 SMMC-7721 具有明显的杀伤活性和诱导凋亡的作用。

细胞周期是细胞完成有丝分裂所经历的整个过程,需经过 G₁→S→G₂→M 期而完成增殖。当细胞的 DNA 被烷基化、断裂或复制受阻时,细胞周期出现停滞,不能及时进入下一个时相。S 期阻滞是细胞在 DNA 损伤后,细胞对 DNA 损伤修复的一种反应,S 期细胞比 G₁或 G₂/M 期细胞更易于凋亡,对化疗药物更敏感。一般认为,肿瘤化疗中,G₀/G₁ 期细胞的大量存在是肿瘤复发和转移的主要原因之一^[10]。熊果酸对细胞周期的影响主要表现在使 G₀/G₁ 期细胞比例明显减少,S 期细胞比例明显增多,表明熊果酸将细胞阻滞 S 期,使 DNA 合成受阻,S 期时相延长到一定时间后,细胞丧失增殖能力,从而抑制了肿瘤细胞繁殖,具有防止肿瘤细胞复发和转移的作用。

柴胡-白芍不同比例配伍应用的抗惊厥作用

谢炜^{1,2*}, 郑跃辉², 陈伟军², 于云红²

(1. 南方医科大学南方医院中医科, 广州 510515; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 观察柴胡-白芍不同比例配伍应用对实验性惊厥小鼠的影响。方法: 将雄性昆明种小鼠随机分为 7 组, 即模型组(A), 阳性药对照组(B), 柴胡-白芍 2:1 组(C), 柴胡-白芍 1:1 组(D), 柴胡组(E), 白芍组(F), 柴胡-白芍 1:2 组(G)。模型组给予等量生理盐水, 阳性药对照组用量为苯妥英钠 $0.025 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或地西洋 $0.004 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 柴胡-白芍不同比例配伍组用量为 $10.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 各组小鼠连续 ig 给药 7 d, 末次给药 60 min 后造模, 观察各用药组对小鼠最大电惊厥(MES)模型、戊四氮模型、土的宁模型及匹鲁卡品模型的阵挛潜伏期、强直潜伏期、死亡潜伏期及死亡数的影响。结果: 与 A 组相比较, 在 MES 模型中, B, F 组可以显著降低惊厥发生率 ($P < 0.05$); 在戊四氮模型中, B, C, D 组均能显著延长实验小鼠的阵挛潜伏期、强直潜伏期 ($P < 0.05$), B, C 组能显著延长实验小鼠的死亡潜伏期 ($P < 0.05$); 在土的宁模型中, B 组能够显著延长实验小鼠的阵挛潜伏期、死亡潜伏期 ($P < 0.05$), 其余各组对实验小鼠的阵挛潜伏期、死亡潜伏期, 无显著影响; 在匹鲁卡品模型中, B, C, D, E, G 组均能显著延长实验小鼠的死亡潜伏期 ($P < 0.05$)。结论: 柴胡-白芍配伍应用具有良好的抗惊厥的作用, 其抗惊厥作用优于单用柴胡或白芍, 其中以柴胡-白芍 2:1 配伍比例的抗惊厥作用最好。

[关键词] 癫痫; 柴胡; 白芍; 配伍; 抗惊厥

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0184-05

[doi] 10.11653/syfy2013180184

[收稿日期] 20130412(018)

[基金项目] 广东省科技计划课题(2008B080701028)

[通讯作者] * 谢炜, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合脑病临床及基础研究, Tel: 020-61641672, E-mail: xieweizn@fimmu.com

熊果酸是一种天然类药物, 实验研究说明对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞增殖, 具有较强的体外抑制作用, 这种抑制作用在一定程度上与用药剂量和时间密切相关。细胞凋亡率随着药物浓度增加逐渐上升, 并且伴有少量坏死。本试验熊果酸对人肝癌 SMMC-7721 体外抑瘤活性的药效学结果, 为下一步深入研究提供了基础实验数据。

[参考文献]

[1] 杜琴, 胡兵, 沈克平, 等. 白藜芦醇联合姜黄素对 SMMC-7721 肝癌细胞作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 262.

[2] 王婷, 宋怀燕. 熊果酸药理作用研究进展[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 9(5): 1.

[3] 孟艳秋, 陈瑜, 王赳, 等. 熊果酸的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(1): 25.

[4] 李剑敏, 周国兴, 宋海鹏, 等. 熊果酸对 HL60 细胞作用机制的初步研究[J]. 中国实用医药, 2011, 6(15): 5.

[5] 徐新伟, 郭玲玲, 顾振纶, 等. 熊果酸对乳腺癌 SK-

BR-3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2009, 29(1): 68.

[6] 吴其年, 黄炜, 黄敏珊, 等. 熊果酸对人乳腺癌细胞增殖、凋亡和细胞内游离 Ca^{2+} 的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(3): 145.

[7] 高福君. 女贞子提取物抑制人肝癌细胞血管生长因子表达作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 139.

[8] Chao Y, Chan W K, Birkhofer M J, et al. Phase II and pharmacokinetic study of paclitaxel therapy for unresectable hepatocellular carcinoma patients [J]. Br J Cancer, 1998, 78(1): 34.

[9] 赵冬耕, 孙佳, 王明艳, 等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 136.

[10] 童师亮. 四肽 Epithalon 对 HepG2 细胞和 L-02 细胞端粒及端粒酶活性的影响[D]. 重庆: 重庆大学, 2007: 11.

[责任编辑 聂淑琴]