

苦参碱和氧化苦参碱体外对肿瘤细胞增殖的影响

刘丽敏¹, 刘华钢^{1*}, 毛 俐², 陈振锋², 王恒山²

(1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021; 2. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 比较研究苦参碱与氧化苦参碱体外抑制多种肿瘤细胞增殖的效果并初步探讨其构效关系。方法: 不同剂量苦参碱与氧化苦参碱处理细胞, MTT 法观察细胞增殖抑制, 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果: 氧化苦参碱对大多数肿瘤细胞的 IC₅₀ 均低于苦参碱, 推测其抗肿瘤活性要大于苦参碱, 原因可能与二者的分子构象差异有关。

[关键词] 苦参碱; 氧化苦参碱; 肿瘤细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)11-0035-02

苦参碱(matrine)和氧化苦参碱(oxymatrine)分子属于四环喹啉啶类化合物, 骨架结构为 2 个喹啉啶环的稠合体, 分子中有 4 个六元环。苦参碱分子式 C₁₅H₂₄N₂O, 分子量 248.36, 氧化苦参碱分子式 C₁₅H₂₄N₂O₂, 分子量 264.36。近年来研究发现其具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤作用及镇静、镇痛、解热降温 and 强心、降压、抗心率失常等多种药理作用^[1,2]。近期关注的热点主要是其抗肿瘤活性, 针对肝癌和白血病细胞进行了较为广泛而深入的研究。但有关苦参碱、氧化苦参碱抗肿瘤活性对比的研究却少见报道。本研究培养多种常见且高发肿瘤的细胞株, 采用体外抗肿瘤筛选经典方法——四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法), 观察苦参碱、氧化苦参碱对肿瘤细胞增殖的抑制作用, 为深入研究与开发该类生物碱提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 苦参碱、氧化苦参碱 购自陕西昂盛生物试剂公司, 纯度 98%; 胰蛋白酶 MTT 购自美国 Amersco 公司; RPMI1640 培养基 DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为国

产分析纯。

1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱为美国 Forma 公司产品; 酶联免疫检测仪 Model-450 Bio-Rad USA; Axiovert 200 型倒置荧光显微镜为德国 zeiss 公司产品。

1.3 实验用细胞株及细胞培养 人鼻咽癌细胞株 CNE1 和 CNE2、结肠癌细胞株 HT29 和 HCT116、肺癌细胞株 NIC-H460、肾癌细胞株 7860、乳腺癌细胞株 MCF-7、胃癌细胞株 MGC803 均购自中科院细胞库, 肝癌细胞株 HepG₂、BEL7404 由本实验室传代保存。置 37 °C 5% CO₂ 的培养箱, 用含 10% 新生牛血清以及青、链霉素各 100 U·mL⁻¹ 的 RPMI 1640 培养液或 DMEM 培养液培养。倒置显微镜观察细胞生长情况, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.4 MTT 法检测细胞增殖抑制 将苦参碱、氧化苦参碱溶解后用基础培养基依次对半稀释成 5 个梯度的母液, 取对数生长期细胞, 以每孔 190 μL (约 1 × 10⁴ 个/孔) 接种于 96 孔板, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度的苦参碱或氧化苦参碱 10 μL, 每个浓度设 4 个复孔。另外设空白对照孔 3 个, 只加完全培养基 200 μL, 不加细胞, 孵育 48 h 后每孔加入 10 μL MTT (5 mg·mL⁻¹), 继续培养 4 h 后仔细吸去上清液, 加入 DMSO 150 μL/孔, 平板震荡器振荡 5 min, 空白孔调零, 用酶标仪以 570 nm/630 nm 双波长测定去除本底光吸收值后的吸光度值(OD 值), 计算细胞增殖抑制率。抑制率 = (1 - 样品 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。实验重复 3 次, Bliss 法计算 IC₅₀。

1.5 统计学处理 计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

[收稿日期] 2008-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金联合资助项目(30460153) 973 计划前期研究专项课题(2007CB516805) 药用资源化学与药物分子工程广西(省部共建教育部)重点实验室资助课题(桂科能 0630006-5D03)

[通讯作者] * 刘华钢, Tel: (0771) 5350964; E-mail: hgliu@263.net

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察肿瘤细胞生长受抑的形态学改变: 用药前细胞形态规则、轮廓清晰、胞体透亮, 而经苦参碱、氧化苦参碱作用后生长明显受抑, 表现为细胞生长缓慢、皱缩、破碎、漂浮等。对比用药前后细胞密度变化, 初步推测肿瘤细胞增殖阻滞。

2.2 苦参碱、氧化苦参碱对 10 种肿瘤细胞的抑制作用如表 1 所示, 可见氧化苦参碱对大多数肿瘤细胞的 IC₅₀ 值均低于苦参碱。仅肾癌 7860、乳腺癌 MCF-7 和胃癌细胞株 MGC803 结果相反。

表 1 苦参碱、氧化苦参碱体外抗肿瘤作用试验结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

细胞株	苦参碱 IC ₅₀ 值 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	氧化苦参碱 IC ₅₀ 值 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
CNE1	155.41 ± 34.12	27.76 ± 17.48
CNE2	38.51 ± 10.70	24.49 ± 3.96 ¹⁾
HT29	28.11 ± 1.02	17.89 ± 3.04 ¹⁾
HCT116	158.62 ± 19.02	11.61 ± 4.06 ¹⁾
NIG-460	42.98 ± 2.50	16.04 ± 3.01 ¹⁾
7860	59.92 ± 2.66	90.49 ± 3.01 ¹⁾
MCF-7	68.00 ± 2.00	110.09 ± 3.00 ¹⁾
MGC803	8.69 ± 1.96	15.06 ± 2.06 ¹⁾
HepG ₂	80.39 ± 14.44	68.73 ± 20.71
BEL7404	70.53 ± 2.51	48.35 ± 2.18 ¹⁾

注: 与苦参碱比较¹⁾ $P < 0.001$

3 讨论

苦参碱、氧化苦参碱体外抗肿瘤试验中, 二者对同一肿瘤细胞株的增殖有不同的抑制强度, 这或许是由于二者的分子构象差异所致。量子力学试验显示, 在构象方面, 苦参碱和氧化苦参碱最低能量的构象结构相近, 相异之处是氧化苦参碱多一个氧原子, 这增加了它的空间立体作用。在轨道方面, 两者轨道结构相似, 不同之处是氧化苦参碱的最低空轨道能量较低, 容易接受外来电子, 使其轨道作用增强。在电荷方面, 两者电荷结构相似, 都为单开口正包负电荷包含体系, 相异之处是氧化苦参碱开口处氧原子电荷值高, 增加了电性作用, 可见苦参碱与氧化苦参碱的电子结构具有相似性和相异性, 对生物受体的立体作用、轨道作用和电性作用相近而大小不同, 相比而言氧化苦参碱的作用要强一些, 因此推测其

药理活性要大于苦参碱^[3]。本实验也证实了这一点, 因此以后应加强对氧化苦参碱的研究。

众多实验表明, 苦参碱、氧化苦参碱还可抑制人胃癌 SGC-7901、肝癌 SMMC-7721、卵巢癌 SKOV3、T 细胞白血病细胞株 JM、乳腺癌 MCF-7/ADR、BT325 胶质瘤细胞等肿瘤细胞的增殖与转移, 诱导其分化和凋亡, 同时对正常细胞不产生破坏作用, 甚至能升高白细胞数、提高机体免疫功能, 没有明显毒副作用, 这是众多化疗药物所不能及的^[2,4,6]。就目前的研究结果来看, 苦参碱类抗肿瘤的作用是全面而广泛的, 包括抑制肿瘤增殖、诱导分化和凋亡、抑制端粒酶活性、抗肿瘤细胞粘附与浸润转移、抑制肿瘤新生血管形成、减轻肿瘤炎症和抑制肿瘤耐药性、减低化疗不良作用、促进肿瘤宿主的抗肿瘤免疫反应, 肿瘤预防性化疗等多个方面^[4,7]。但是在众多的苦参碱类抗肿瘤生物活性机制中, 哪一个是主要的药物作用靶点? 各种药理作用是如何相互关联的? 这些问题还有待深入研究。

[参考文献]

[1] Lai J P, He X W, Jiang Y, *et al.* Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid phases extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375(2): 264.

[2] 王俊学, 王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用[J]. *肝脏*, 2000, 5(2): 116-117.

[3] 赵宝中, 荣大齐, 王秀军, 等. 苦参碱和氧化苦参碱电子结构和药性的关系[J]. *分子科学学报*, 2000, 16(2): 88-93.

[4] 张燕军, 夏天, 赵建斌. 人参皂甙 Rb₁ 和苦参碱对 SMMC-7721 细胞周期和 DNA 含量的流式细胞仪研究[J]. *陕西中医*, 1997, 18(2): 93-94.

[5] 李龙江, 陈志琼, 郑元义, 等. 氧化苦参碱对人卵巢癌细胞 SKOV3 体外活性的影响[J]. *实用肿瘤学杂志*. 2003, 17(2): 100-101.

[6] 程光, 章翔, 费舟, 等. 苦参碱对 BT325 胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(23): 2152-2154.

[7] Zhang L P, Jiang J K, Tam J W, *et al.* Effects of matrine on proliferation and differentiation in K-562 cells[J]. *Leuk Res*. 2001, 25(9): 793-800.