

· 论著 ·

复方苦参注射液对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖、凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响

石博 徐慧

【摘要】 目的 探讨复方苦参注射液对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖、凋亡及 Caspases-3 蛋白表达的影响。**方法** 体外培养人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞,应用 MTT 法检测细胞增殖; Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期;ELISA 法检测 Caspases-3 蛋白表达。**结果** 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞的体外增殖具有抑制作用,量效关系显著,与对照组比较有统计学差异($P<0.01$),半数抑制浓度(IC_{50})为 0.84 g/ml。经流式细胞仪检测表明,复方苦参注射液能使 ACC-2 细胞 G_0 - G_1 期逐渐增加, G_2 -M 期和 S 期逐渐减少,并且随着剂量的增加,ACC-2 细胞凋亡率明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。复方苦参注射液能增强 ACC-2 细胞 Caspases-3 蛋白的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并呈剂量依赖性。**结论** 复方苦参注射液能有效抑制人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞 Caspases-3 蛋白表达,诱导 ACC-2 细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖。

【关键词】 复方苦参注射液; ACC-2 细胞; 增殖; 凋亡; Caspases-3

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.10.001

Effects of Compound Radix Sophorae Flavescentis injection on proliferation, apoptosis and Caspase-3 expression in adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells SHI Bo, XYU Hui. Department of Neurology, The First Hospital of Zibo, Zibo 255200, China

Corresponding author: SHI Bo, E-mail: zbdyyysnsb@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of compound Radix Sophorae Flavescentis injection on proliferation, apoptosis and Caspase-3 expression in human adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells. **Methods** ACC-2 cells were cultured in vitro. MTT assay was used to measure the cell proliferative effect. The Annexin V/PI double staining analysis by flow cytometry was used to evaluate apoptotic rate and the cell cycle. The expression of Caspases-3 protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compound Radix Sophorae Flavescentis injection could inhibit the proliferation of ACC-2 cells in vitro, and dose-effect relationship was significant ($P<0.01$). IC_{50} of ACC-2 was 0.84 g/ml. The flow cytometry test indicated, compound Radix Sophorae Flavescentis injection could make ACC-2 cells G_0 - G_1 phase gradually increasing, G_2 -M period and S phase reduce gradually, and with the increase of the dose, ACC-2 cell apoptosis rate increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compound Radix Sophorae Flavescentis injection could enhance ACC-2 cells Caspases-3 protein expression ($P<0.05$ or $P<0.01$), and with the dose dependent. **Conclusion** Compound Radix Sophorae Flavescentis injection could effectively restrain human adenoid cystic carcinoma ACC-2 cells Caspases-3 protein expression, induction ACC-2 cells apoptosis, inhibiting tumor cell proliferation.

【Key words】 Compound Radix Sophorae Flavescentis injection; ACC-2 cells; Proliferation; Apoptosis; Caspases-3

作者单位:255200 山东省淄博市第一医院神经内科(石博);山东省邹城市兖矿集团东滩煤矿医院肿瘤科(徐慧)

作者简介:石博(1972-),本科,主治医师。研究方向:神经肿瘤的临床治疗。E-mail:zbdyyysnsb@163.com

泪腺腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) 是泪腺恶性上皮性肿瘤中最为常见并且恶性程度最高的肿瘤,其发病率约占泪腺上皮性肿瘤的 29%,仅次于多形性腺瘤,居于第 2 位^[1]。其对常规放、化疗不敏感,以手术治疗为主,但由于该肿瘤生长具有较强的浸润性,手术无法根除,术后复发率高且远期疗效较差,治疗比较棘手。因此,探求新的治疗方法已成为 ACC 研究的新方向。复方苦参注射液是从中药苦参和白土茯苓中提取的有效成分,对肿瘤细胞的增殖有抑制作用,能诱导多种肿瘤细胞凋亡^[2-3],并能增强化疗药物的抑瘤作用,但其对泪腺腺样囊性癌的抗肿瘤作用及其机制研究尚未见报道。本研究通过观察复方苦参注射液对泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞增殖、凋亡及 caspase-3 蛋白表达的影响,探讨其可能的抗肿瘤作用机制,为其进一步临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

复方苦参注射液 (商品名:岩舒),山西振东金晶制药公司生产,批号:20110520。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司; RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; MTT、二甲基亚砜、琼脂糖购自美国 Amresco 公司; Caspases-3 酶联免疫检测试剂盒购自美国 (Santa Cruz 公司。

1.2 细胞株

人泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院。用含 10% 胎牛血清、2% 的谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 仪器设备

CO₂ 培养箱 (MCO175, SANYO); 倒置显微镜 (IX-70, Olympus); 水平流超净工作台 (ZHJH-2112); 流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton Dickinson); 酶标仪 (128C-400, 奥地利 CliniBi 公司)。

1.4 方法

1.4.1 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 ACC-2 细胞制成 $2 \times 10^7 \cdot L^{-1}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ l,培养 24 小时。然后加入复方苦参注射液 100 μ l,使其终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 g/ml,同时设对照孔和调零孔,每

组 6 个复孔。继续培养 48 小时后,每孔加入 20 μ l MTT 溶液 (5 g/L),再培养 4 小时后吸去全部上清液,然后每孔加入 200 μ l 二甲基亚砜,振荡摇匀终止反应,使用酶标仪在 490 nm 处测吸光度 (A) 值。计算增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照组 A 值} - \text{药物组 A 值})}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.4.2 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡率^[4-5] 取对数生长期的 ACC-2 细胞制成 $1 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$ 细胞悬液,接种于 12 孔培养板中,每孔 2 ml,加入复方苦参注射液使其终浓度分别为 0、0.1、0.4、1.6 g/ml。培养 24 小时后,常规消化洗涤细胞,再用 PBS 洗涤后置于柠檬酸缓冲液中 1 小时以上,调整待测细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot ml^{-1}$,取 1 ml 细胞悬液,1000 r/min 4℃ 离心 10 分钟弃上清,加入 1 ml 冷 PBS 重悬细胞,再重复离心,弃上清,加入 200 μ l 结合缓冲液重悬,再加入 10 μ l Annexin V-FITC、5 μ l PI,混匀,室温避光孵育 15 分钟,加入 300 μ l 结合缓冲液,过 200 目尼龙网,立即用流式细胞仪进行检测细胞凋亡率并分析细胞周期。

1.4.3 Caspases-3 蛋白表达检测 取对数生长期的 ACC-2 细胞制成 $1 \times 10^5 \cdot ml^{-1}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ l。加入复方苦参注射液 100 μ l,使其终浓度分别为 0、0.1、0.4、1.6 g/ml,同时设对照孔,每组 6 个复孔,培养 24 小时,收集细胞,然后采用发光底物比色法,使用酶标仪在 405 nm 处测吸光度 (A) 值,空白孔作对照,确定 Caspases-3 蛋白表达程度。

1.5 统计学方法

用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞增殖的抑制作用

复方苦参注射液不同浓度对 ACC-2 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用,并且随着复方苦参注射液浓度的增高,抑制作用也在增强,量效关系显著。各剂量组与对照组比较均有统计学差异 ($t = 7.16, 9.83, 13.33, 14.69, 16.46, P < 0.01$); 经 Logit 方法计算半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.84 g/ml。见表 1。

表 1 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/ml)	A 值	抑制率(%)
对照组	—	0.857±0.057	—
复方苦参注射液组	0.1	0.660±0.036 ^a	22.98
复方苦参注射液组	0.2	0.582±0.038 ^a	32.09
复方苦参注射液组	0.4	0.478±0.040 ^a	44.22
复方苦参注射液组	0.8	0.436±0.041 ^a	49.12
复方苦参注射液组	1.6	0.393±0.039 ^a	54.14

注:与对照组比较:^a $P < 0.01$

2.2 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞周期和凋亡的影响

复方苦参注射液使 ACC-2 细胞 G₀-G₁期增加,S 期和 G₂-M 期略有减少,但与对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。但随着剂量的增加,ACC-2 细胞凋亡率明显增加($\chi^2 = 3.93, 5.40, 7.96, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1,表 2。

表 2 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞周期和凋亡的影响

组别	剂量(g/ml)	G ₀ -G ₁ 期(%)	S 期(%)	G ₂ -M 期(%)	凋亡率(%)
对照组	—	54.11	24.37	21.52	8.43
复方苦参注射液组	0.1	59.15	19.97	20.88	17.63 ^a
复方苦参注射液组	0.4	63.93	17.68	18.39	21.09 ^a
复方苦参注射液组	1.6	66.59	16.38	17.03	24.17 ^b

注:与对照组比较:^a $P < 0.05, ^bP < 0.01$

2.3 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞 Caspases-3 蛋白表达的影响

复方苦参注射液不同浓度均能增强 ACC-2 细胞 Caspases-3 蛋白的表达,与对照组比较有显著性差异($t = 2.82, 4.99, 9.53, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并呈剂量依赖性。见表 3。

表 3 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞 Caspases-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量(g/ml)	Caspases-3 (pmol · L ⁻¹)
对照组	—	23.07±1.15
复方苦参注射液组	0.1	25.12±1.36 ^a
复方苦参注射液组	0.4	26.65±1.33 ^b
复方苦参注射液组	1.6	30.96±1.67 ^b

注:与对照组比较:^a $P < 0.05, ^bP < 0.01$

3 讨论

泪腺腺样囊性癌是一种浸润性强预后差的肿瘤,其发病机制及治疗一直是临床亟待解决的重要课题,虽经多年研究,目前仍未找到有效的治疗手段。由于中药具有多途径、多靶点、毒副作用低等优点,已成为抗肿瘤研究的热点之一。复方苦参注射液是以苦参为主要成分的纯中药制剂,主要含有苦参碱、氧化苦参碱等多种生物碱,临床主要用于抗炎、抗病毒及免疫系统疾病的治疗^[6]。近年来,有研究证明复方苦参注射液具有一定的抗肿瘤活性,对胃癌、肺癌、肠癌及乳腺癌^[7-8]均有一定的杀伤作用,但其抗肿瘤作用的确切机制尚不十分明确。本研究中复方苦参注射液不同浓度对 ACC-2 细胞的体外增殖有一定的抑制作用,并且量效关系显著($P < 0.01$),经 Logit 方法计算半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.84 g/ml。

有研究表明肿瘤的发生、发展不仅与细胞的增殖分化异常有关,还与其凋亡障碍有关^[9]。细胞凋亡是一种维持机体自身平衡所必须的生理性细胞自杀过程,受基因调控。本研究采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测发现,复方苦参注射液促进 ACC-2 细胞凋亡的同时,也使 ACC-2 细胞周期分布发生明显改变。复方苦参注射液作用 48 小时后,停

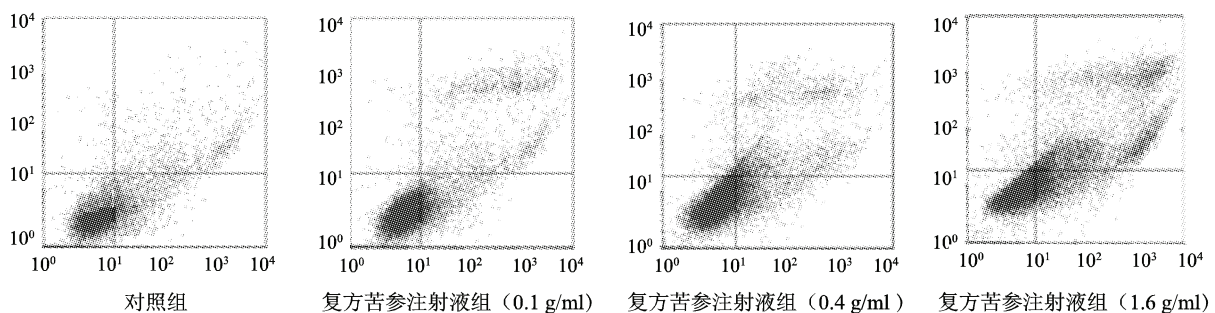


图 1 复方苦参注射液对 ACC-2 细胞凋亡率的影响

滞于 G_0 - G_1 期的细胞比例明显增加,而进入 S 期和 G_2 -M 期的细胞比例明显下降,并且这种阻滞效应具有一定的剂量依赖性。提示复方苦参注射液对泪腺腺样囊性癌细胞 ACC-2 的增殖抑制作用可能是由于复方苦参注射液改变了细胞周期的分布,使多数细胞停滞于细胞分化期即 G_1 期,阻止细胞向 S 期转化,从而减少了 DNA 合成和有丝分裂并促进其分化。

Caspases-3 是 Caspases 家族的重要成员,是细胞凋亡的最关键效应分子,有研究表明 Caspases-3 蛋白表达下调或缺失可能是肿瘤发生和耐药的重要机制^[10]。本研究选择 Caspases-3 作为研究靶点,用不同浓度的复方苦参注射液作用于泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞株上,采用酶联免疫法分析 Caspases-3 蛋白的表达,结果表明,随着复方苦参注射液浓度的升高,Caspases-3 表达明显增强,量效关系明显。推测这可能是复方苦参注射液诱导泪腺腺样囊性癌 ACC-2 细胞凋亡的机制和抗肿瘤作用的分子基础。

参 考 文 献

- [1] Ducrey N, Villemure JG, Jaques B, et al. Cystic adenocarcinomas of the lacrimal gland [J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 2002, 219 (4): 231-234.

- [2] 郭启帅,黄曦,李少林. 苦参碱诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26 (8): 1104-1107.
- [3] 王景洁,何安兵,付美霞,等. 复方苦参注射液对肝癌细胞 survivin 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31 (21): 1770-1773.
- [4] 王素云,杨晓阳,邓凯,等. 青蒿琥酯对骨髓瘤 RPMI 8226 细胞增殖、凋亡及对 Survivin、Caspase-3、Caspase-7 的影响 [J]. 中草药, 2010, 41 (5): 785-789.
- [5] 吴倩,许爱华,杨茜,等. 银杏叶皮提取物有效部位 GBEE-2 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其通路的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (3): 270-273.
- [6] 刘梅,刘雪英,程建峰. 苦参碱的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (9): 801-804.
- [7] 周娟,倪松石,贾素琴. 苦参碱对人肺癌 A549 细胞增殖及 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52 (3): 25-27.
- [8] 王雷,刘明. 苦参碱对大肠癌细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 表达的影响 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21 (3): 237-240.
- [9] Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, et al. A(3) Adenosine Receptor-Mediated p53-Dependent Apoptosis in Lu-65 Human Lung Cancer Cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30 (1): 210-220.
- [10] 黑静雅,黄凌燕,张建中. Caspase-3、bcl-2 蛋白在乳腺癌中表达的临床病理研究 [J]. 宁夏医学杂志, 2010, 32 (1): 17-19.

(收稿日期:2012-09-15)

(本文编辑:秦楠)

· 信息之窗 ·

《环球中医药》2013 年征稿启事

《环球中医药》杂志是由中华人民共和国卫生部主管,中华国际医学交流基金会主办,国内外公开发行的中医药学术期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),美国《化学文摘》收录期刊,被万方数据、中国知网全文收录。

本刊 2013 年为月刊,每月 6 日出刊,大 16 开,每期 80 页。CN 11-5652/R,ISSN 1674-1749。环球中医药杂志网站 www.hqzyy.com 可免费下载 PDF 版全文。

报道时差短是本刊特色,欢迎广大中医药学界同仁积极投稿。

1. 杂志的主要用稿方向是中医临床研究。同时也欢迎中医实验研究、中医理论研究、中药研究。对介绍中医在海外的生存现状,海外对中医的法律、法规、态度,国内外中医药学术与文化的沟通与交流,外国民族传统医药文章优先刊登。欢迎综述文章。对中医护理、中医院管理、临床个案报道择优刊登。

2. 本刊在重点反映科研成果与临床进展的同时,重视学术思考与海内外信息交流。主要栏目有:述评、论著、理论探讨、综述、临床经验、学术论坛等;特色栏目有:中医病案析评、海外中医、争鸣、中医文化、名医心鉴等。

3. “论著”、“综述”等以 4000~5000 字为宜,“临床经验”等栏目须 2000 字以上。欢迎长篇稿件,重大科研创新与理论突破稿件不受字数限制。“论著”、“理论探讨”与“综述”栏目文章须有英文题名、中英文摘要和中英文关键词。

4. 请作者以电子邮件方式投稿,E-mail 发送至 hqzhyy@163.com。本刊 1 周左右发回含稿号收稿回执,本刊 2~12 周左右回复稿件处理情况。如未及时收到稿号回执和稿件处理情况请电话或邮件查询。

编辑部地址:北京市东城区东四西大街 46 号 邮编:100711 电话:010-65269860