

氧化苦参碱对卵巢癌 HO8910细胞凋亡影响的血清药理学研究

侯华新^{1*}, 黎丹戎², 邝晓聪¹, 张玮² (1. 广西医科大学化学教研室, 南宁 530021; 2. 广西肿瘤防治研究所, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨氧化苦参碱体内生物转化及含氧化苦参碱血清对人卵巢癌细胞 HO8910的诱导凋亡作用机制。方法 采用中药血清药理学实验方法, 获得大鼠含氧化苦参碱血清, 通过 HPLC测定含药血清中氧化苦参碱的生物转化情况, 通过 MTT法、荧光显微镜、DNA琼脂糖凝胶电泳测定含药血清对人卵巢癌 HO8910细胞的诱导凋亡作用, 流式细胞术检测含药血清作用后细胞周期时相分布。结果 给药大鼠血清中出现保留时间为 10.8 min的氧化苦参碱峰图, 且血清提取液中氧化苦参碱的浓度为 40 μ g/mL, 含氧化苦参碱血清能抑制 HO8910细胞生长, 经含药血清处理的细胞 48h出现典型的细胞凋亡形态学变化和 DNA片段的梯形条带, HO8910细胞被阻滞在 G₀-G₁期。结论 氧化苦参碱经肌注体内生物转化后, 血清中的主要代谢成分仍保持不变, 含氧化苦参碱血清也具有诱导 HO8910细胞凋亡的作用。

关键词:血清药理学; 氧化苦参碱; 卵巢癌; 凋亡

中图分类号: R979.1; R285.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2006)05-0349-04

Study on induction of human ovarian cancer HO8910 cells apoptosis by oxymatrine with serum pharmacology

HOU Hua-xin¹, LI Dan-rong², Kuang Xiao-cong¹, ZHANG Wei² (1. Department of Chemistry, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore oxymatrine biotransformation in SD rats and observe the effects of the serum containing oxymatrine apoptosis in human ovarian cancer HO8910 cells. **METHODS** The effects of oxymatrine were investigated in vitro using serum pharmacological approach. The concentration of oxymatrine in serum was detected by HPLC. Apoptosis induced by the serum containing oxymatrine in human ovarian cancer HO8910 cells was tested by MTT assay, fluorescent microscope, and DNA gel electrophoresis. The flow cytometry analysis was employed to investigate the effects of the serum containing oxymatrine on the cells cycle. **RESULTS** There was a chromatogram of oxymatrine peak in serum which retention time was 10.8 min. The concentration of oxymatrine in serum was 40 μ g/mL. HO8910 cell viability dropped down dependent on the concentration of the serum containing oxymatrine and treatment time. When incubated with oxymatrine for 48 hours, HO8910 cells showed morphological changes associated with the characters of apoptosis under fluorescent microscope. Typical DNA ladder was found during gel electrophoresis. The serum containing oxymatrine arrested cell cycle at G₀ ~ G₁ phase. **CONCLUSION** The serum still contains oxymatrine after oxymatrine is biotransformed in body after intramuscular injection. It also have the effects of inducing apoptosis and inhibiting the proliferation of ovarian cancer cells.

KEY WORDS: serum pharmacological approach; oxymatrine; ovarian tumor; apoptosis

氧化苦参碱是中药苦参的主要组分, 体外实验证实氧化苦参碱对肿瘤细胞生长具有诱导分化和明显的抑制作用^[1-2]。为了进一步探讨经口服、肌注等途径给药, 在体内吸收、生物转化等一系列过程后, 血清中是否仍存在氧化苦参碱, 其含量如何, 对肿瘤细胞是否仍具有诱导其凋亡作用, 本研究在国内首次以血清药理学方法, 研究氧化苦参碱的给药与作用结构形式的一致性和含氧化苦参碱血清诱导卵巢癌细胞 HO8910凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

氧化苦参碱 (C₁₅H₂₄O₂N₂) 从苦参中提取得到的淡黄色结晶 (含量大于 99%), 易溶于水, 使用时用生理盐水配制成所需的工作浓度。细胞株: 人卵巢癌 HO8910细胞购自中国医学科学院肿瘤研究所, 由广西肿瘤防治研究所临床中心实验室传代保存。动物: SD大鼠购自广西医科大学实验动物中心。MTT(噻唑蓝)、台盼蓝、蛋白酶 K等购自 Sigma 公司,

基金项目: 广西自然科学基金资助 (桂科自 0135030, 桂科攻 0235024-24)

* 通讯作者: 侯华新, 广西南宁市双拥路 22号广西医科大学, 邮编: 530021 Tel: 86-771-5355801, 86-771-5358827 E-mail: houhuaxin@163.com

RPMI1640为 Gibco公司产品;小牛血清为美国 Hyclone公司产品,薄层色谱(TLC)硅胶₆₀ F254铝板购自德国 MERCK公司。显色剂:碘化铋钾,上海振欣试剂厂出品。苦参碱和氧化苦参碱对照品购自中国生物制品检定所。其余试剂均为国产分析纯试剂。荧光显微镜为德国 Leica公司产品,MR-300酶标仪为美国产品。流式细胞仪为美国 Backman Epics XL型。HPLC为日本岛津 LC-10A。PCR扩增仪为珠海黑马医学仪器有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清的制备 SD大鼠体重约 230g,雌雄各半,随机分为给药组和空白对照组,每组 10只。给药组分别肌注给药,给药剂量为 150mg/kg,空白对照组肌注等量生理盐水,每日 2次,连续 3d,于最后 1次给药后 1h,无菌条件下腹主动脉采血,分离血清,并将给药组和空白组的血清各自混合,即可获得含药血清和空白血清。

1.2.2 含药血清的成分鉴定 取含药血清 2mL,加入 20%三氯醋酸 0.5 mL,混匀,离心(4℃,1500 r/min),取上清,加入 20% NaOH 0.5mL,用等体积氯仿萃取,氯仿层温水浴通氮气挥干,加入 100μL 甲醇定容,提取物供 HPLC 使用。HPLC采用的色谱柱为 Zorbax-ODS(4.6mm×250 mm),以甲醇-水-三乙胺(7:2:1)为流动相。检测波长为 220nm,流速 1 mL/min,柱温 50℃。样品的出峰时间与苦参碱和氧化苦参碱标准品比较,确定血清的有效成分及含量。

1.2.3 噻唑蓝(MTT)法确定含氧化苦参碱血清对卵巢癌 HO8910细胞的存活抑制作用 取对数生长期的卵巢癌 HO8910细胞,浓度为 5×10⁴/mL,加入到 96孔板,每孔加含细胞的培养液 100μL,置 37℃,5% CO₂培养箱孵育 24h后,将细胞分为 2组,分别加入不等量的含药血清、空白血清,并用生理盐水调整每孔细胞总体积为 200μL,24h后加入 20μL MTT(2mg/mL),37℃,5% CO₂培养箱孵育 4h后,弃上清,每孔加入 DMSO 200μL,放入酶标仪,中速振荡 5min后,于 490nm 波长处测定吸光度(A)值,每个浓度平行测定 3孔。以生理盐水为空白对照,按下列公式求出生长抑制率(IR),通过由 IR对浓度作图,求出半数抑制浓度 IC₅₀。

抑制率 IR = (1 - $\frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{空白对照平均 A 值}}$) × 100%

1.2.4 细胞形态学观察 细胞爬片后,实验组加入 IC₅₀浓度的含药血清,对照组加入等量空白对照血清,作用 48h后 PBS洗涤,乙醇固定,在 CaCl₂介质中,加入吖啶橙储存液(10μg/mL)5μL染色,荧光显微镜观察,摄片。

1.2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳 实验组加入 IC₅₀浓度的含药血清,对照组细胞加入等量空白对照血清,作用 48h后,收集细胞,用 PBS洗涤数次,加入 0.5mL 细胞裂解液,10μL 蛋白酶 K(20mg/mL)置 37℃水浴中过夜后,用等体积的饱和酚萃取,10000 r/min 离心 5min,取上层,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)除蛋白,10000 r/min 离心 10min,取上清液,加入 3 倍体积的无水乙醇、1/10 体积的(3mol/L)的醋酸钠,置 -20℃ 20min,取出离心,沉淀用 70%乙醇洗涤 2次,空气干燥。加入 200μL TE 溶解, RNase 酶 2μL(10mg/mL)反应 30

min(37℃)。取上述样品 20μL,在 2%琼脂糖凝胶中电泳,75v 1.5h,摄像。

1.2.6 流式细胞仪对细胞周期分析 实验组加入 IC₅₀浓度的含药血清,对照组细胞加入等量空白对照血清,作用 48h后,收集 1×10⁶/mL 细胞,用 PBS洗涤 1次后,70%乙醇固定并分散为单个细胞悬液,-20℃保存。上机前,再用 PBS洗涤 3次,加入 50μg/mL 碘化丙啶染色 5min,上流式细胞仪对 DNA 含量测定和细胞周期分析。

1.2.7 统计学处理 使用 SPSS10.0 统计软件。计量资料采用 t 检验,完全随机分组实验所得数据的计数资料和抑制率的比较采用 χ²检验。

2 结果

2.1 含药血清的组分确定

所采用 HPLC 色谱条件,可获得良好的分离效果,血清中内源性物质无干扰,对照品苦参碱和氧化苦参碱的保留时间分别为 5.8 和 10.8 min。而给药大鼠血清中出现保留时间为 10.8min 的峰图,说明氧化苦参碱经肌注治疗后,其血清中的主要代谢成分仍保持不变。且血清提取液中氧化苦参碱的浓度为 40μg/mL。

2.2 不同含药血清浓度对卵巢癌 HO8910细胞的生长抑制作用

在含有相同数量卵巢癌细胞的培养板,分别加入不同体积的含药血清和空白血清,使血清终浓度分别为 2.5%~20%。培养 24h后,实验结果表明,含药血清的浓度越高,对细胞的生长抑制率越高,而空白血清组的抑制率随浓度的增加,基本保持不变,其中含药血清 IC₅₀为 14%,相当于氧化苦参碱的量为 56μg/mL,结果见表 1。

表 1 不同浓度含药血清对卵巢癌 HO8910细胞的生长抑制率(n=3)

Tab 1 Inhibition rate after ovarian tumor HO8910 cells treated with different dose of the serum containing oxymatrine(n=3)

血清浓度 (%)	血清浓度抑制率(%)		含药血清 IC ₅₀ 浓度
	空白血清	含药血清	
2.5	1.38 ± 0.28	8.11 ± 1.45	13.75% (含氧化苦参碱 56μg/mL)
5	11.02 ± 1.56	15.93 ± 1.25	
10	13.85 ± 2.12	43.12 ± 2.36	
15	13.06 ± 1.35	52.93 ± 4.18	
20	15.83 ± 1.23	61.68 ± 5.29	

2.3 细胞形态学变化

实验组细胞培养 48h后,经吖啶橙染色,在荧光显微镜下观察细胞的形态:空白血清组的细胞呈大小较一致的圆形,核大浆少,形态完整;含药血清组作用的细胞胞体缩小,染色质浓缩,边缘化,核膜裂解,染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态学特征,见图 1。

2.4 DNA 凝胶电泳结果

实验组细胞培养 48h后,在琼脂糖电泳上显示典型的 180~200bp 左右的凋亡梯度状条带,而空白血清组的细胞未出现,见图 2。

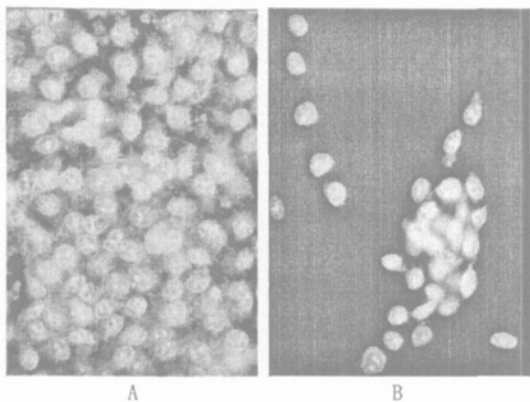


图 1 药物作用前后细胞形态学改变

Fig 1 Changes in the morphology of HO8910 cells untreated and treated with the serum containing oxymatine
A.空白对照细胞的荧光染色; B.为含药血清处理后荧光染色 (×400)
A. control group; B. HO8910 cells treated with the serum containing oxymatine determined by a fluorescence microscope (×400)

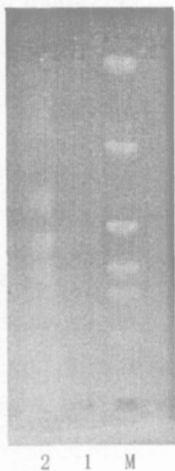


图 2 HO8910细胞 DNA琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 DNA ladder was found during gel electrophoresis
M:标准相对分子质量; 1为空白血清处理的细胞, 2为含药血清处理的细胞
M: markers; lane1: control cells. Lane2: HO8910 cells treated with the serum containing oxymatine

2.5 细胞周期分析

流式细胞仪分析显示实验组细胞 DNA含量直方图上出现明显的亚二倍体峰, G_0 期 DNA含量增多, 而 S期、 G_2 /M期含量降低, 说明含药血清将 HO8910细胞阻滞在 G_0 和 G_1 期, 与空白血清对照组比较差异有显著性, 也与 DNA片段凝胶电泳结果相吻合, 见表 2。

3 讨论

在体外抗肿瘤实验中, 当药物的结构形式与体内的作用形式、理化性质存在差异时, 往往药物直接加入离体反应体系的体外实验结果不能真实、客观地反映药物的作用效果。而血清药理学能在一定程度上弥补了这种缺陷。含药血清所含有的药物成分一般包括经过体内一系列生物转化后真正发挥作用的有效成分, 同时也包括那些在药物作用下机体

表 2 含药血清对卵巢癌 HO8910细胞周期分布的影响

Tab 2 The percentages of various cell cycles after ovarian tum or HO8910 cells treated with the serum containing oxymatine

组 别	细胞各周期的比率 (%)		
	$G_0 / G_1 (\bar{x} \pm s)$	S ($\bar{x} \pm s$)	$G_2 / M (\bar{x} \pm s)$
空白血清组	47.7 ± 2.6	38.5 ± 2.4	14.2 ± 0.8
含药血清组	69.5 ± 5.1*	28.5 ± 1.6	1.9 ± 0.2

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$

所产生的内生性有效成分, 即各种生理活性物质。血清中的上述有效成分是药物与机体相互作用之后产生的。许多研究发现, 大鼠经口服给药氧化苦参碱后, 在胃肠道发生生物转化, 大部分氧化苦参碱转变为苦参碱, 而经皮下和肌注给药, 则其结构和作用形式不发生改变^[3-4]。本研究 HPLC实验结果也表明, 氧化苦参碱经肌注吸收后未发生生物转化, 其药物结构形式与体内作用结构形式基本一致。这也从一个侧面说明, 采用肌注获得的含氧化苦参碱血清进行血清药理学研究, 能更好地明确氧化苦参碱与诱导肿瘤细胞凋亡的关系。

大量的研究表明^[5-7], 肿瘤细胞凋亡与细胞周期的特异性有一定的联系, 许多抗肿瘤药物正是通过诱导细胞周期特异性细胞凋亡, 达到治疗目的的。不同药物诱导的细胞凋亡可发生在细胞周期的不同时期, 当细胞凋亡发生时, 往往是细胞先被阻滞在细胞周期的某一时相, 然后发生细胞凋亡。经流式细胞仪检测我们发现, 含药血清处理后的卵巢癌 HO8910细胞, 细胞周期发生了变化, 其中 G_0 / G_1 期细胞比例增加, S期及 G_2 / M 期下降, 说明含药血清作用在 S期和 G_2 / M 期, 使 G_0 / G_1 期细胞堆积。从而通过诱导凋亡抑制肿瘤细胞的生长。同时经含药血清处理后的卵巢癌 HO8910细胞, 出现明显的 DNA梯状图谱和细胞凋亡形态学改变, 说明含药血清抗肿瘤活性与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] WANG B, WANG G J, CAI X, *et al*. Inhibitory Effect of Oxymatine on Vascular Endothelial Cell Proliferation Induced by Hepatocellular Carcinoma Cell [J]. China J Cancer Prevent Treat (肿瘤防治杂志), 2003, 10(7): 707.
- [2] LUO W J, YU R X, ZHU N X, *et al*. Induction differentiation of human promyelocytic leukemia cell (HL-60) by matrine [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中国医药学报), 2001, 16(5): 21-24.
- [3] WANG M L, ZHOU Q L, WANG B X. Studies on Metabolism of Oxymatine by Human Intestinal Bacteria [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2001, 26(4): 272-274.
- [4] WANG Y, MENG G D L, ZHENG W Y. Pharmacokinetics of Oxymatine Injection Healthy Volunteers [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2003, 19(4): 301-305.
- [5] Wang LD, Zhou Q, Wei JP, *et al*. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1 p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population in north-

em China[J]. World J Gastroenterol, 1998, 4(4) : 287-293.

- [6] John J, Hunter and Tristram G. Parslow. A Peptide Sequence from Bax That Converts Bcl-2 into an Activator of Apoptosis[J]. J Biol Chem, 1996, 271(15) : 8521 - 8524.

- [7] Basu A, Haldar S. The relationship between bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death[J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(12) : 1099-1109.

收稿日期 : 2005-12-07