

## 氧化苦参碱对 HepG-2 与 A549 细胞增殖抑制与促凋亡活性比较研究

王淑静, 任爽, 张家宁, 孙微微, 袁天宇, 马琳  
哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要:** 目的 研究氧化苦参碱在体外对人肺癌细胞 (A549)、人肝癌细胞 (HepG-2) 增殖抑制与促凋亡活性, 并进行比较。方法 通过 MTT 比色法和生长曲线法比较氧化苦参碱对两种肿瘤细胞增殖活性的抑制作用, 采用 HE 染色、Hoechst 33258 荧光染色和透射电镜 3 种方法比较氧化苦参碱对两种肿瘤细胞形态的影响及促凋亡作用。结果 MTT 结果显示, 与对照组比较, 氧化苦参碱 200、400、800  $\mu\text{g/mL}$  浓度组 A549、HepG-2 细胞存活率均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 分别为 1 055.45、774.11  $\mu\text{g/mL}$ ; 生长曲线结果显示, 与对照组比较, 氧化苦参碱组 HepG-2 细胞培养第 4、5 天及 A549 细胞第 5 天细胞数显著下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 在 HE 染色、Hoechst 33258 荧光染色和透射电镜形态学观察实验中, 氧化苦参碱对 HepG-2 细胞作用较明显, 细胞数量明显减少, 同时出现细胞绒毛减少、细胞核变小变圆、固缩等明显的细胞凋亡形态学特征, 对 A549 细胞形态的影响较弱。结论 氧化苦参碱具有抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡的作用, 对 HepG-2 作用较强, 对 A549 作用较弱, 具有一定的特异性。

**关键词:** 氧化苦参碱; 抗肿瘤活性; 人肝癌细胞 (HepG2); 人肺癌细胞 (A549); 增殖; 凋亡

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)11-1545-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.005

## Comparative study of proliferative inhibition and apoptosis promoting activity on HepG-2 and A549 by oxymatrine

WANG Shu-jing<sup>1</sup>, REN Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Jia-ning, SUN Wei-wei<sup>1</sup>, YUAN Tian-yui<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1</sup>  
College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

**Abstract: Objective** To study the proliferative inhibition and apoptosis promoting activity of oxymatrine on human lung cancer cells (A549) and human hepatocellular carcinoma cells (HepG-2) *in vitro*, and make a comparison. **Methods** Effect of oxymatrine on the proliferation activity of two kinds of tumor cells were compared by MTT method and growth curve method. HE staining, Hoechst 33258 fluorescent staining and transmission electron microscopy were used to compare morphological changes. **Results** MTT results showed that, compared with control group, the survival rate of oxymatrine 200, 400, and 800  $\mu\text{g/mL}$  concentration group in A549 and HepG-2 cells decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), half inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) were 1055.45 and 774.11  $\mu\text{g/mL}$  respectively; The growth curve showed that, compared with control group, the number of cells in oxymatrine group of HepG-2 cells cultured for fourth and fifth day and A549 cells cultured for fifth day decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). Oxymatrine affected morphological changes of HepG-2 cells more significantly than A549 cells. The number of cells in the oxymatrine group was significantly reduced; And the cell villi was decreased, the nucleus was small and round, and the cell apoptosis morphological characteristics were obvious. **Conclusion** Oxymatrine can inhibit the proliferation cells and promote the apoptosis of tumor cells. It affected HepG-2 cells more obviously, which suggests that it may have different sensitivity to different tumor cells.

**Key words:** oxymatrine; antitumor activity; HepG2; A549; proliferation; apoptosis

氧化苦参碱是苦参的主要有效成分, 具有多种药理作用, 近年来, 其抗炎、抗纤维化和抗肿瘤作用受到高度关注<sup>[1-2]</sup>; 其药理作用具有多种作用途

径, 如抗氧化应激、减轻炎症反应、参与细胞凋亡级联反应、抗组织纤维化、抑制癌基因表达、诱导肿瘤细胞凋亡作用等<sup>[3]</sup>。国内大量研究成果表明氧

收稿日期: 2017-06-22

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金资助(2016RQQXJ095); 哈尔滨商业大学大学生创新创业训练计划国家级项目(201710240001)

作者简介: 王淑静, 教授, 硕士生导师, 研究方向为重大疾病的预防与治疗。E-mail: misswsj@163.com

化苦参碱抗肿瘤作用具有全面性和普遍性, 具有广谱的抗肿瘤作用, 对肺癌、肝癌、胃癌、结肠癌等都有明显的抑制作用<sup>[4-7]</sup>。肝癌、肺癌都是当前发病率和死亡率较高的恶性肿瘤<sup>[8]</sup>, 由于发病隐匿, 发病率和致死率逐年升高, 是威胁人类健康的恶性肿瘤<sup>[9]</sup>。本实验通过体外实验, 研究氧化苦参碱对人肝癌细胞 HepG-2 和人肺癌细胞 A549 的增殖抑制和促凋亡活性, 研究其对不同肿瘤细胞是否具有特异性, 为氧化苦参碱的临床应用和抗肿瘤作用机制研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肺癌细胞株 (A549)、人肝癌细胞株 (HepG-2), 哈尔滨商业大学药学院保存。

### 1.2 主要试剂

氧化苦参碱(质量分数 $\geq 99\%$ 、批号 13021902), 购于成都曼斯特生物科技有限公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶, 购于 Invitrogen 公司; 溴化四氮唑蓝、台盼兰, 购于 Sigma 公司。

### 1.3 主要仪器

SW-CJ-LC 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; CKX 41 倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; Mco-15AC CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本 SANYO EI 公司; AR2140 分析天平, 美国 OHAUS 公司; TDL-60B 离心机, 上海安亭; 飞鸽 Model 680 酶标仪, 美国 BIO RAD 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

人肺癌细胞 (A549)、人肝癌细胞 (HepG-2) 于含 10% 的灭活胎牛血清的 1640 完全培养液中, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2~3 d 传代 1 次。

### 2.2 MTT 比色法测定细胞存活率

将对数生长期的 HepG-2 和 A549 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 制成悬液, 调整浓度为  $5 \times 10^4$  /mL, 铺设 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。用不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释氧化苦参碱终浓度为梯度 0、100、200、400、800  $\mu$ g/mL, 对照组加等体积培养基, 每个浓度设 3 个复孔。48 h 后, 每孔加 5 mg/mL 的 MTT 10  $\mu$ L, 4 h 后吸弃, 每孔加 150  $\mu$ L DMSO, 混合 15 min 后用酶标仪在 495 nm 测吸光度 (A) 值, 计算每种细胞的存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{氧化苦参碱}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.3 生长曲线

将对数生长期的 HepG-2 和 A549 细胞用 0.25% 胰酶消化制成悬液, 调整浓度为  $5 \times 10^4$  /mL, 24 孔板中每孔加 400  $\mu$ L, 37 °C 培养 24 h。弃上清液, 设对照组和氧化苦参碱组, 对照组加无血清培养基, 氧化苦参碱组终浓度为 500  $\mu$ g/mL (在此浓度下, 氧化苦参碱对 2 种肿瘤细胞具有一定的增殖抑制作用, 且用药浓度不至于过高), 培养 7 d。每天 2 组各取 3 个孔, 每个孔取 3 次, 每次 10  $\mu$ L, 对活细胞多次计数, 以细胞浓度为纵坐标, 以时间为横坐标, 绘制生长曲线。

### 2.4 苏木精-伊红 (HE) 染色

将对数期的 HepG-2 和 A549 细胞制成细胞悬液, 调整其浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔加入 1 mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h。吸弃原培养液, 氧化苦参碱组每个孔中加入 1 mL 浓度为 500  $\mu$ g/mL 的氧化苦参碱, 对照组加入等体积的无血清培养基, 继续培养 48 h。将细胞染色处理后显微镜下形态学变化观察, 具体操作见 HE 染色法<sup>[10]</sup>。

### 2.5 Hoechst 33258 荧光染色

取处于对数生长期的 HepG-2 和 A549 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备成单细胞悬液, 调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  /mL, 每孔 400  $\mu$ L 接种于 24 孔板内, 培养 24 h。加入终浓度为 500  $\mu$ g/mL 氧化苦参碱, 继续培养 48 h, 吸出旧培养液, 加入 1 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛混匀, 常温固定 1 h, 吸出固定液, 磷酸 (PBS) 缓冲液洗涤 1 次, 加入 1 mL Hoechst 33258 染色液, 37 °C 避光孵育 30 min, 荧光显微镜 ( $\times 400$ ) 下观察细胞形态。

### 2.6 透射电镜观察细胞形态学变化

将对数期的 HepG-2 和 A549 细胞制成细胞悬液, 调整细胞的浓度为  $5 \times 10^4$  /mL, 每孔 1 mL 准确接种于 6 孔板中。氧化苦参碱组每孔加终浓度为 500  $\mu$ g/mL 的氧化苦参碱, 对照组每孔加等体积 1640 培养基, 培养 24 h, 加戊二醛固定、包埋、制成超薄切片, 透射电镜下观察细胞形态。

### 2.7 统计处理

采用 SPSS 20.0 统计分析软件, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据采用完全随机分组设计的多样本均数比较进行统计学处理。

## 3 结果

### 3.1 MTT 法检测氧化苦参碱对细胞的抑制率

如表 1 所示, 氧化苦参碱对 A549、HepG-2 细

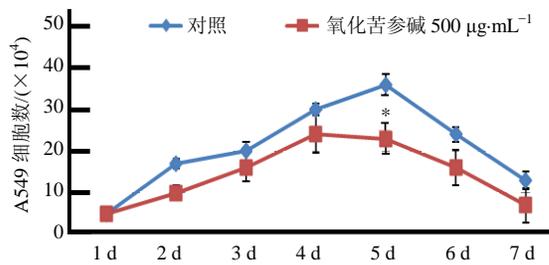
表 1 氧化苦参碱对 A549 和 HepG-2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Survival rate of A549 and HepG-2 cells treated with oxymatrine ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	存活率/%	
		A549 细胞	HepG2 细胞
对照	/	100	100
氧化苦参碱	100	94.34 $\pm$ 2.06	78.75 $\pm$ 2.64
	200	86.02 $\pm$ 1.24*	71.41 $\pm$ 1.25*
	400	77.57 $\pm$ 1.58*	64.92 $\pm$ 2.34*
	800	57.42 $\pm$ 3.03**	48.74 $\pm$ 2.76**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

胞均具有抑制作用, 与对照组比较, 200、400、800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组存活率显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 两种细胞的存活率随着氧化苦参碱浓度的增加而下降, 呈现药物剂量相关性; 氧化苦参碱 A549 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 值为 1 055.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对 HepG-2 的  $\text{IC}_{50}$  值为 774.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。氧化苦参碱对 HepG-2 作用较强, 而对 A549 细胞较弱。

### 3.2 生长曲线法检测对细胞的增殖抑制作用

如图 1 所示, 生长曲线主要检测不同给药时间、相同浓度药物对细胞增殖活性的影响。浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的氧化苦参碱对 A549、HepG-2 细胞进行干预, 与对照组比较, 氧化苦参碱对 HepG-2 细胞具

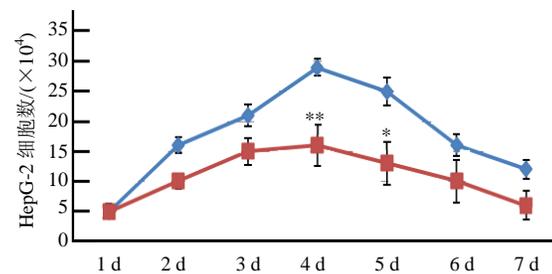


图 1 氧化苦参碱对 A549、HepG-2 的细胞增殖影响生长曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of oxymatrine on proliferation of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

有明显的增殖抑制作用, 在第 2 天细胞数量有所减少, 在第 4 天抑制作用最强, 第 4、5 天细胞数显著下降 ( $P < 0.05$ 、0.01); 对 A549 产生的抑制作用较弱, 与对照组比较, 第 5 天细胞数显著下降 ( $P < 0.05$ ), 其余时间细胞数量略有下降。

### 3.3 HE 染色法检测细胞形态

氧化苦参碱对两种肿瘤细胞均具有一定的增殖抑制作用, 与对照组比较, HepG-2、A549 细胞氧化苦参碱组细胞数量明显减少, 细胞形态变化明显,

出现细胞变圆、细胞体积缩小、细胞核深染, 胞质凝集等形态变化。见图 2。

### 3.4 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞形态变化

与对照组比较, 氧化苦参碱作用的 HepG-2、A549 细胞数量明显减少, 细胞折光度增大, 细胞形态发生改变, 用药后 HepG-2 细胞的折光度较 A549 更为明显, 很多细胞出现明显的凋亡形态改变, 氧化苦参碱对 HepG-2 细胞的作用强于 A549 细胞。见图 3。

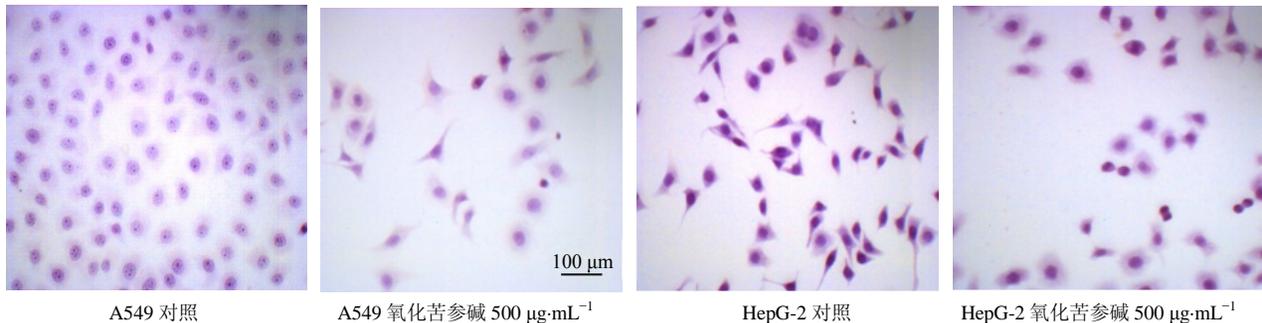


图 2 氧化苦参碱对肺癌细胞 A549 和肝癌细胞 HepG-2 HE 染色结果

Fig. 2 HE staining results of oxymatrine on A549 and HepG2 cell line

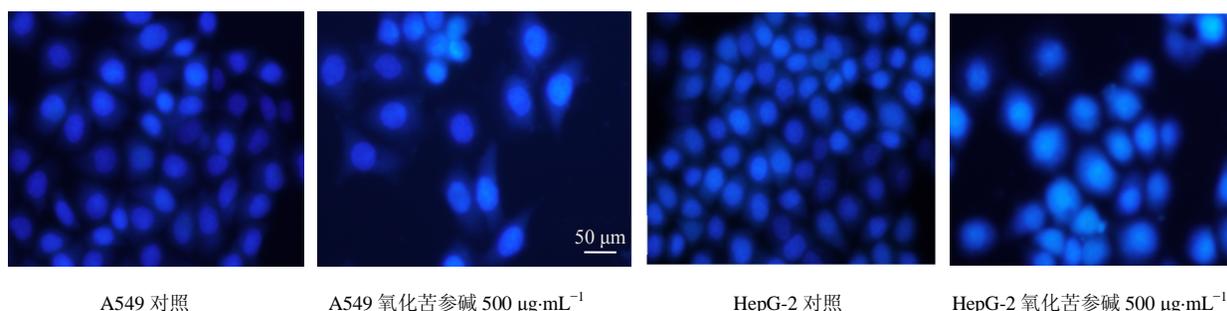


图 3 荧光实验研究氧化苦参碱对 A549 细胞和 HepG-2 细胞的影响  
Fig. 3 Effect of oxymatrine on A549 and HepG2 cells by fluorescence assay

### 3.5 透射电镜观察细胞的凋亡形态改变

与对照组比较, A549 细胞给药组形态学改变较明显, 细胞绒毛完全消失, 早中期凋亡细胞数较多, 晚期凋亡细胞较少。HepG-2 细胞给药组细胞形态学

改变较大, 细胞核裂解, 核内染色质形成颗粒状, 出现明显的凋亡小体, 凋亡特征明显, 中晚期凋亡细胞较多。电镜结果显示, 氧化苦参碱对 HepG-2 细胞的作用强于 A549 细胞。见图 4。

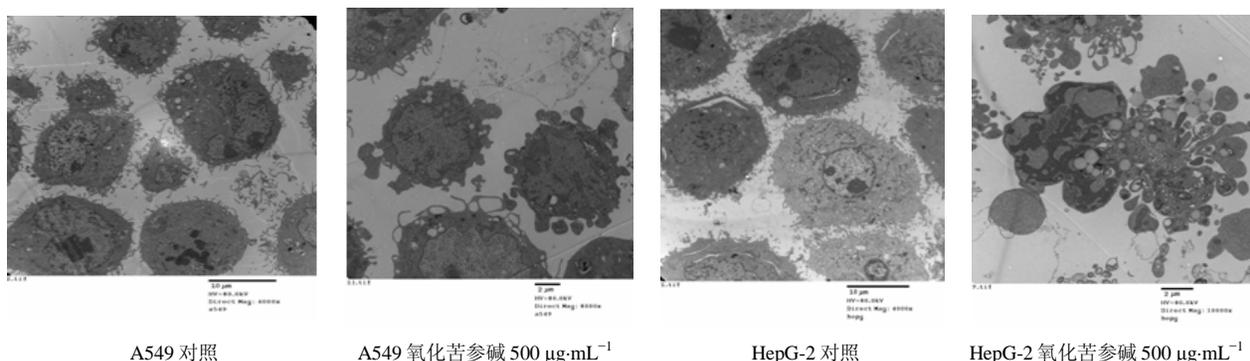


图 4 氧化苦参碱对肺癌细胞 A549、肝癌细胞 HepG-2 透射电镜图

Fig. 4 Electron microscopy of oxymatrine on lung cancer cell line A549 and hepatoma cell line HepG2

## 4 讨论

氧化苦参碱为传统中药苦参的主要生物活性成分, 具有广泛的药理学活性。近年其抗肿瘤作用受到较大关注, 氧化苦参碱能抑制多种肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡以及抑制肿瘤侵袭和转移等, 但对不同的肿瘤细胞的增殖抑制和促凋亡活性不同。

肿瘤的发生不但因为体内正常细胞发生基因突变产生增殖异常且不受机体控制, 而且还有变异的细胞凋亡受到抑制等因素<sup>[11]</sup>。细胞凋亡和细胞增殖共同维持着人体内细胞总数的稳态, 所以诱导肿瘤细胞凋亡也将成为肿瘤新药开发的发展方向<sup>[12]</sup>。本实验对氧化苦参碱 A549、HepG-2 增殖抑制和促凋亡活性进行比较, 研究氧化苦参碱体外抗肿瘤活性的特异性<sup>[13]</sup>。

MTT 法和细胞生长曲线法分别检测同一时间、不同浓度的氧化苦参碱和同一浓度、在不同时间氧

化苦参碱对 A549 细胞、HepG-2 细胞增殖抑制作用的整体趋势。MTT 结果显示, 随着给药浓度增加, 氧化苦参碱对两种肿瘤细胞的增殖抑制率上升, 与作用浓度呈正相关。通过 SPSS 分析得出, 氧化苦参碱对于 A549、HepG-2 的 IC<sub>50</sub> 分别为 1 055.45、774.11 µg/mL, 氧化苦参碱对 HepG-2 抑制增殖作用相对较强, 对 A549 的作用较弱。生长曲线实验也表明, 氧化苦参碱对 A549、HepG-2 具有抑制增殖作用, 在给药的第二天细胞浓度开始下降, 在第四、五天与对照组比较细胞浓度差异最明显, 对 HepG-2 细胞增殖抑制作用较强, 与 MTT 实验结果基本保持一致。

细胞凋亡与机体生长分化过程密切相关, 具有维持体内平衡的重要作用<sup>[14]</sup>。本研究选择了多种细胞形态检测方法, 包括苏木素-伊红染色、Hoechst 33258 荧光染色、透射电镜等探究氧化苦参碱对肿

瘤细胞的促凋亡作用。Hoechst 33258 荧光染色、苏木素-伊红染色法<sup>[13]</sup>可从显微水平和宏观角度观察细胞的核质、形态学变化。电镜试验可从亚细胞水平和微观角度检测细胞核膜内染色质和细胞质内细胞器的改变, HE 染色结果显示, 给药组两种肿瘤细胞形态均发生了改变, 与对照组比较, 给药组细胞数目明显减少, 细胞体积变小, 胞质致密颜色变深。Hoechst 33258 荧光染色进一步证实了氧化苦参碱对两种肿瘤细胞的增殖抑制和促凋亡作用, 氧化苦参碱给药后的两种肿瘤细胞数量减少, 细胞之间连接减少, 细胞皱缩, 折光度上升, 边缘不规则。与 A549 比较, 氧化苦参碱组 HepG-2 细胞数量明显减少, 很多细胞出现核浓缩致密的强荧光团块以及核碎裂, 凋亡小体等典型细胞凋亡特征。透射电镜观察结果显示, 给药组 A549 细胞的早中期凋亡细胞数较多, 晚期凋亡细胞较少。给药组 HepG-2 细胞的细胞核裂解, 核内染色质形成颗粒状, 出现明显的凋亡小体, 凋亡特征明显, 中晚期凋亡细胞较多, 表明氧化苦参碱对 HepG-2 细胞促凋亡作用较 A549 细胞明显。

综上所述, 氧化苦参碱既可以抑制 A549、HepG-2 细胞增殖, 也可以促进两种肿瘤细胞凋亡, 对 HepG-2 细胞的作用较强, 表明氧化苦参碱对肿瘤细胞具有一定的选择性, 为氧化苦参碱的临床应用和抗肿瘤作用机制研究提供参考。

#### 参考文献

- [1] 石磊, 史丽娟. 中药单体——氧化苦参碱药理作用研究新进展 [J]. 山西医药杂志, 2015, 44(2): 123-126.
- [2] 王燕琴, 初而复, 李欣, 等. 注射用苦参碱对阿霉素致大鼠心脏重构的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 193-197.
- [3] 吴琴, 高云. 氧化苦参碱药理作用的分子机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 759-762.
- [4] 杨凌妍, 范惠珍. 苦参碱和氧化苦参碱治疗消化系统肿瘤作用机制及临床应用的研究进展 [J]. 实用临床医学, 2016, 17(5): 97-100.
- [5] 张庆, 茹庆国, 刘艳, 等. 苦参碱与氧化苦参碱对炎症相关结直肠癌的化学预防作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1548-1553.
- [6] 陈晓峡, 向小庆, 叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 361-364.
- [7] 钱利强, 高泉根, 沈根海, 等. 苦参碱类生物碱及其衍生物抗肝癌作用研究进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2015, 30(1): 97-100.
- [8] 王丽萍. 肺癌免疫治疗现状及展望 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(2): 105-110.
- [9] 梁宏元, 卢再鸣. 原发性肝癌综合介入治疗现状与困惑 [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(1): 44-48.
- [10] 胡文斌, 王瀚, 张少飞, 等. 线粒体 Smac 蛋白与 Bcl-2 蛋白家族的相关性及其促凋亡机制研究进展 [J]. 中国资源综合利用, 2015, 33(11): 42-44.
- [11] 朱元民, 刘玉兰. 感染、炎症与肿瘤的发生 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013, 22(3): 105-108.
- [12] 邱淑敏, 陈涛, 刘美玲, 等. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 83-86.
- [13] 鲍娇琳, 陆金健, 陈修平, 等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 369-373.
- [14] 林明华, 孙百臣. HE 染色涂片退色后原位免疫染色在肿瘤诊断中的应用价值 [J]. 当代医药论丛, 2014, 12(10): 49.