

[文章编号 1000-1182(2005)03-0254-04

# 苦参碱对 KB 细胞及其多药耐药细胞 KBv200 的凋亡诱导作用

张金廷<sup>1</sup>, 崔慧先<sup>2</sup>, 李庆星<sup>1</sup>, 张会军<sup>2</sup>, 白玉<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学第一医院 口腔科, 河北 石家庄 050031;

2. 河北医科大学基础医学研究所 人体解剖学教研室, 河北 石家庄 050011)

**[摘要]** 目的 观察中药苦参的提取物苦参碱对口腔上皮癌 KB 细胞及其多药耐药细胞 KBv200 的凋亡诱导作用。方法 MTT 法观察苦参碱对体外培养的 KB 及 KBv200 细胞存活率的影响。吖啶橙/溴乙啶 (AO/EB) 双荧光染色检测二者细胞凋亡率。流式细胞术分析苦参碱对细胞周期的影响; 扫描电镜观察苦参碱作用后的细胞形态学变化。结果 苦参碱质量浓度在 0.50、1.00、1.50、2.00 mg/ml 时, 均有抑制 KB 及 KBv200 增殖的作用, 双荧光染色及流式细胞术提示苦参碱可诱导 KB 及 KBv200 细胞凋亡, 使细胞生长停滞在 S 期; 扫描电镜观察发现不同质量浓度的苦参碱作用 24 h 后, 细胞出现体积缩小、细胞质空泡化、细胞核碎裂等凋亡现象。结论 苦参碱对 KB 及 KBv200 细胞有增殖抑制作用, 可诱导 KB 及 KBv200 细胞凋亡, 其机制可能与其导致细胞 S 期阻滞有关。

**[关键词]** 苦参碱; 口腔上皮癌; KB 细胞; 多药耐药; 凋亡

**[中图分类号]** R 730.52 **[文献标识码]** A

## Apoptosis of Human Oral Epidermoid Carcinoma KB Cells and Multidrug Resistant KBv200 Cells Induced by Matrine

ZHANG Jin-ting<sup>1</sup>, CUI Hui-xian<sup>2</sup>, LI Qing-xing<sup>1</sup>, ZHANG Hui-jun<sup>1</sup>, BAI Yu<sup>2</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 2. Dept. of Anatomy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the induction of apoptosis on human oral epidermoid carcinoma KB cells and multidrug resistant KBv200 cells by Matrine. **Methods** MTT assay was used to investigate the inhibition ability of Matrine on the cells *in vitro*. Transmission electron microscope was used to observe the ultrastructure feature of cells after treated by Matrine. Acridine orange (AO)/Ethidium bromide (EB) fluorescent staining and flow cytometry were used to observe apoptosis induced by Matrine. Flow cytometry was applied to study the effects of the drug on cell cycles of the cells. **Results** When 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/ml of Matrine was used, the vital rates of KB and KBv200 cells were decreased according to Matrine's concentration. The IC<sub>50</sub> concentrations of Matrine on KB and KBv200 cells were 1.35 mg/ml and 1.43 mg/ml individually. The results of AO/EB fluorescent staining and flow cytometry showed that Matrine could induce apoptosis of two kinds of cells. While observed by transmission electron microscope, there were more contraction of cells, condensation of nuclei, bubble of cytoplasm in both kinds of cells after treated by Matrine. Matrine could stop the growth of KB and KBv200 cells at S period and restrain mitosis of cells. **Conclusion** Matrine can inhibit the growth of KB and KBv200 cells by inducing apoptosis. The apoptosis effect is dose-dependent and it has certain relation to the blocking of S period cells.

**[Key words]** matrine; human oral epidermoid carcinoma; KB cell; multidrug resistant; apoptosis

苦参碱(matrine)是苦参的主要有效成分,化学分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub><sup>1</sup>。近年来发现苦参碱具有体外抗肿瘤的作用,可抑制肿瘤细胞增殖和转移、促进凋亡、诱导肿瘤细胞分化<sup>2</sup>。肿瘤多药耐药性(multidrug resistance, MDR)指肿瘤细胞对某种化疗药物产生耐药性的同时,对其他结构无关、作用机理各异的药物也

产生交叉耐药性,是临床肿瘤化疗失败的重要原因<sup>3</sup>。为明确苦参碱对 KB 细胞及 MDR 细胞的作用,本实验采用 MTT 法、双荧光染色法、流式细胞术及透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察苦参碱对人口腔上皮癌 KB 及其 MDR 细胞 KBv200 增殖的作用,并探讨其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株 人口腔上皮癌 KB 及其 MDR 细胞株

[收稿日期 2004-12-25; 修回日期 2005-02-11

[作者简介]张金廷(1953-),男,河北人,教授,博士

[通讯作者]张会军, Tel: 0311-5917061

KBv200(中国医学科学院药物研究所)。KBv200 是诱变剂甲基磺酸乙酯刺激后,在培养液中加入质量浓度递增的长春新碱得到的MDR 细胞株,对长春新碱的耐受程度为亲代细胞的175倍。

1.1.2 药物、试剂及仪器 苦参碱注射液(广州明兴制药厂);RPMI-1640 培养基(Gibco 公司,美国)含10%小牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml;吖啶橙(acridine orange, AO)、溴乙啶(ethidium bromide, EB)、MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、RNA 酶均购自华美生物试剂公司;CO<sub>2</sub> 培养箱(Hitachi 公司,日本);倒置显微镜(Olympus 公司,日本);荧光显微镜(Olympus 公司,日本);DG3201 型酶标仪(南京电子仪器厂);FACSTAR Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,美国);JEMX-1200 型透射电镜(日立公司,日本)。

## 1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养 用 RPMI-1640 培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub> 环境下分别培养 KB 及 KBv200 细胞,每日观察细胞生长情况。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期的 KB 及 KBv200 细胞,0.02% EDTA 消化、计数,以1×10<sup>5</sup> 个细胞/毫升接种于培养板,24 h 后加入质量浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml 经生理盐水稀释的苦参碱,对照组仅加生理盐水。孵育24 h 每孔加入20 μl MTT 溶液,4 h 后离心去培养液,每孔加二甲基亚砷150 μl,振荡10 min,在全自动酶标仪上选择波长570 nm 测定吸光值(A 值)。全部实验重复3次,取均值。根据 A 值计算各组细胞存活率(vital rate, VR)。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{用药组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\% ^4$$

1.2.3 AO/EB 双荧光染色检测细胞凋亡率 AO、EB 各1 mg 分别溶于10 ml PBS(pH 7.2)中,配成100 μg/ml 储备液,用前等量混合。细胞经以上4种浓度的苦参碱及生理盐水(对照组)作用24 h 后,分别取细胞悬液100 μl,加入 AO/EB 混合染料4 ml 混匀,滴至载玻片上。荧光显微镜下观察,可见4种细胞形态:活细胞(viable non-apoptotic cell, VAN),核染色质着绿色并呈正常结构;早期凋亡细胞(viable apoptotic cell, VA),核着绿色呈团缩状或碎裂串珠状;非凋亡的死亡细胞(non-viable non-apoptotic cell, NVNA),核着红色并呈正常结构,即鬼影细胞;晚期凋亡细胞(non-viable apoptotic cell, NVA),核着红色并呈团缩或串珠状。高倍镜下计数20个视野,按下式计算细胞凋亡率<sup>5</sup>,共计数3次,结果取均值。

## 双荧光细胞凋亡率(%)

$$= \frac{\text{VA} + \text{NVA}}{\text{VNA} + \text{NVNA} + \text{VA} + \text{NVA}} \times 100\%$$

1.2.4 流式细胞术测定细胞周期分布 细胞经以上4种质量浓度的苦参碱及生理盐水(对照组)作用24 h 后,0.02% EDTA 消化、离心,冷 PBS 洗2次,70%乙醇固定24 h,测定前离心去乙醇,PBS 洗2次,加100 μg/ml RNA 酶37℃ 消化30 min。碘化丙锭(propidium iodide, PI)50 μg/ml 染色30 min,经尼龙网过滤,流式细胞仪测定。实验结果经计算机软件 ModFit LT2.0 处理,计算出不同质量浓度苦参碱作用下的细胞周期分布。

1.2.5 TEM 观察细胞超微结构 细胞经苦参碱作用24 h 后,0.02% EDTA 消化,1 000 r/min 离心5 min, PBS 洗涤,重复3次,细胞团用2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液(pH 7.4)固定,常规梯度脱水、包埋,制备超薄切片,经醋酸双氧铀和铅染液双染后,JEMX-1200 透射电镜下观察细胞超微结构。

1.2.6 统计学分析 VR 及凋亡率的比较采用<sup>2</sup> 检验,细胞周期的比较采用构成比的<sup>2</sup> 检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞存活率

苦参碱作用24 h 后 KB 及 KBv200 细胞 VR 见表1。从表1可见不同质量浓度的苦参碱作用后2种细胞的 VR 均降低,且随质量浓度的增加 VR 逐渐下降,显示苦参碱对2种细胞均有增殖抑制作用,但同一质量浓度苦参碱作用下2种细胞的 VR 无差别( $P > 0.05$ )。

表1 不同质量浓度苦参碱作用24 h 后 KB 及 KBv200 细胞 VR(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Vital rates of KB and KBv200 cells treated by different concentration matrine for 24 hours(%,  $\bar{x} \pm s$ )

细胞株	VR			
	0.50 mg/ml	1.00 mg/ml	1.50 mg/ml	2.00 mg/ml
KB	92.1 ±2.5	76.5 ±2.1	59.4 ±3.7	32.8 ±1.8
KBv200	91.7 ±1.2	78.9 ±1.9	57.6 ±2.5	31.5 ±1.4

### 2.2 双荧光细胞凋亡率

不同质量浓度的苦参碱作用后2种细胞的凋亡率见表2。从表2可见与对照组(0 mg/ml)相比,2种细胞经不同质量浓度苦参碱作用后的凋亡率均有上升,且有统计学意义( $P < 0.05$ );但同一质量浓度苦参碱作用下2种细胞凋亡率间无明显差别( $P > 0.05$ )。

表2 苦参碱作用24 h后双荧光细胞凋亡率(%)

Tab 2 Apoptotic rate of cells induced by matrine for 24 h(%)

细胞株	苦参碱质量浓度(mg/ml)				
	0	0.50	1.00	1.50	2.00
KB	0.8	12.8	22.3	27.6	33.4
KBv200	1.1	14.3	16.7	25.4	30.2

### 2.3 细胞周期分布

不同质量浓度的苦参碱作用24 h后细胞周期变化见表3。从表3可见与对照组(0 mg/ml)相比,经苦参碱作用后S期细胞比例均增高,G<sub>2</sub>/M期细胞比例降低,其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),但同一质量浓度苦参碱作用下2种细胞之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表3 苦参碱作用24 h后细胞周期变化(%)

Tab 3 Apoptotic ratio and cell cycles of cells treated by matrine for 24 h(%)

苦参碱质量浓度(mg/ml)	KB			KBv200		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	45.89	33.72	20.39	43.27	32.84	23.89
0.50	44.76	53.03	2.21	44.51	53.02	2.47
1.00	47.85	52.15	0	43.34	56.66	0
1.50	46.76	53.24	0	46.38	53.62	0
2.00	49.75	50.25	0	50.37	49.63	0

### 2.4 细胞超微结构变化

苦参碱与2种细胞作用24 h后,通过TEM观察可见KB及KBv200细胞均出现一系列凋亡的形态学变化。KB细胞胞浆空泡样变性见图1,核固缩及核碎裂见图2。这些变化随苦参碱质量浓度增大而明显。

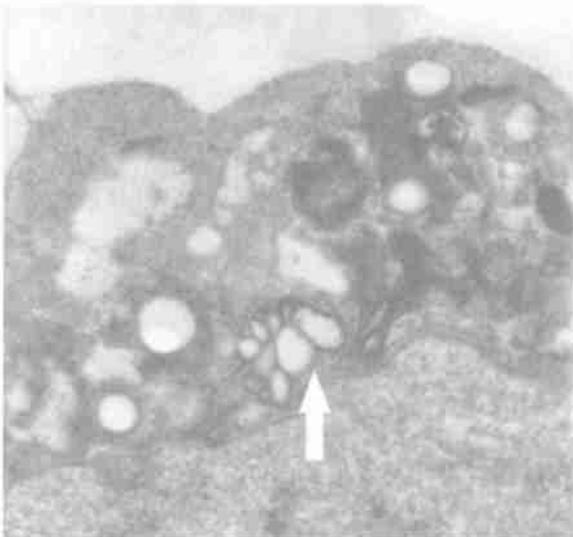


图1 2.00 mg/ml 苦参碱作用24 h后,KB细胞胞浆空泡样变性(↓) TEM ×5 000

Fig 1 Cytoplasmic bubble degeneration after treated by 2.00 mg/ml matrine for 24 hours TEM ×5 000

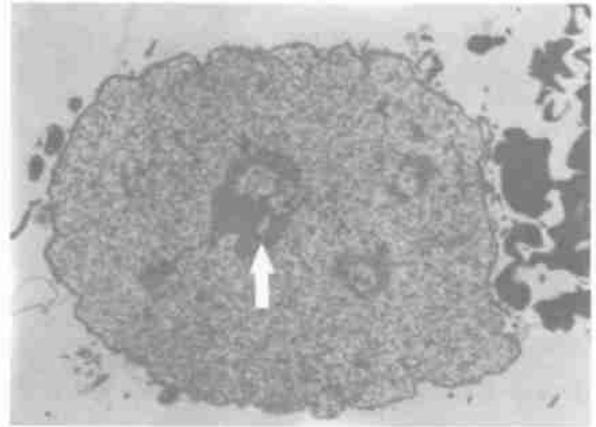


图2 2.00 mg/ml 苦参碱作用24 h后,KB细胞胞核染色质凝集(↓) TEM ×5 000

Fig 2 Chromatin condensation after treated by 2.00 mg/ml matrine for 24 hours TEM ×5 000

### 3 讨论

苦参类生物碱广泛存在于豆科槐属植物苦参、苦豆子及广豆根中,主要包括苦参碱(matrine)及氧化苦参碱(oxymatrine)等,均属于四环的喹啉啶类(quinolizidine)化合物,在我国有丰富的资源。苦参碱具有抗炎、抗肿瘤等多种药理作用,对肝癌、脑胶质瘤、白血病细胞具有增殖抑制作用<sup>6,7</sup>。

肿瘤细胞的多药耐药性是指肿瘤一旦对某种化疗药物产生耐药性,就同时对其他结构上无关、作用机理各异的药物也产生交叉耐药性,是一种特殊的广谱耐药现象,是临床化疗失败的重要原因,KBv200细胞除了对长春新碱耐药以外,对紫杉醇、阿霉素、足叶已甙、5-氟尿嘧啶等药物的耐药性分别是敏感细胞的156、14.5、5、2.1倍,是典型的多药耐药细胞株<sup>8</sup>。

本实验应用MTT比色法观察苦参碱对人口腔上皮癌KB及其多药耐药细胞株KBv200生长的影响,发现苦参碱在0.50 mg/ml以上时,对KB和KBv200细胞均有增殖抑制作用。抗肿瘤药物多可诱导肿瘤细胞凋亡,形态上表现为染色体边聚、细胞膜皱缩、细胞核固缩、核碎裂成串珠状等。本实验应用吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)双荧光染色和流式细胞术2种方法检测苦参碱的凋亡诱导作用。AO能透过细胞膜完整的细胞,嵌入细胞核DNA,发出明亮的绿色荧光。EB仅能透过细胞膜受损的细胞,嵌入细胞核DNA,发出橙红色的荧光。所以双荧光染色时凋亡细胞的核染色增强,荧光明亮,呈均匀一致的圆状或固缩状、团块状结构。非凋亡细胞核呈现荧光深浅不一的结构。本研究结果表明不同浓度的苦参碱均能促进KB及KBv200细胞发生凋亡,透射电镜结果也显示苦参碱作用后,细胞出现染色质离散、胞质空泡样变等凋亡改变。化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡与细胞周期的阻

滞密切相关,但药物对肿瘤细胞周期的影响较为复杂,同一药物作用于不同的肿瘤细胞,可能产生不同的结果<sup>9</sup>。有研究表明苦参碱可使细胞在G<sub>1</sub>期堆积,抑制肿瘤细胞进入S期<sup>10</sup>。也有学者认为苦参碱可使该细胞聚于S期,造成S期阻滞<sup>11</sup>。本实验发现经苦参碱作用后,S期细胞比例升高,G<sub>2</sub>/M期细胞比例降低,说明细胞阻滞在S期。S期为DNA合成期,S期阻滞说明细胞的DNA合成受阻,不能进入有丝分裂期,最终导致生长抑制,肿瘤细胞死亡。

本实验证实苦参碱不仅对口腔上皮癌KB细胞具有增殖抑制和凋亡诱导作用,而且对多药耐药KBv200细胞也具有同样的作用,提示苦参碱可克服肿瘤的多药耐药现象,故有可能成为一种理想的中药抗肿瘤制剂。

### 【参考文献】

- 1] 王平全,陆国红,周贤懿,等. 苦参碱的药代动力学J. 药理学学报, 1994, 29(5): 326-329.
- 2] Zhang LP, Jiang JK, Tam JW, et al. Effect of matrine on proliferation and differentiation in K562 cells J. Leuk Res, 2001, 25 (9): 793-800.
- 3] 杨纯正. 肿瘤耐药研究的若干问题J. 中华医学杂志, 2001, 81(24): 1475-1478.
- 4] Sood AK, Buller RE. Drug resistance in ovarian cancer: from the laboratory to the clinic J. Obstet Gynecol, 1998, 92(2): 312-319.
- 5] 李华,许才斌,黄裕新. 抗癌药合用维拉帕米的体外人胃癌细胞的影响J. 第四军医大学学报, 2001, 22(9): 838-842.
- 6] 司维柯,罗朝学,陈庆海. 流式细胞术分析苦参碱诱导人肝癌细胞HepG2凋亡J. 肿瘤, 2001, 22(3): 213-214.
- 7] 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.
- 8] 张晓红,张福荣,籍秀娟,等. KB细胞耐药株的建立及其耐药机制的探讨J. 药理学学报, 1994, 29(4): 246-251.
- 9] 万永玲,吴德政. 拓扑异构酶抑制剂诱导肿瘤细胞程序化死亡的研究进展J. 中国临床药理学杂志, 1995, 11(2): 119-124.
- 10] 张燕军. 苦参碱对Smnc-7721细胞系的诱导分化作用J. 第四军医大学学报, 1998, 19(3): 340-342.
- 11] 张莉萍. 苦参碱对K562细胞株端粒酶活性和细胞周期的影响J. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(5): 328-330.

(本文编辑 王 晴)

## 赛特力多功能高强度发光二极管光固化灯 Mini LED

赛特力公司在2003年IDS展会上首次推出了Mini LED全新第二代发光二极管高性能聚合灯,投入市场2年以来,以卓越的性能受到牙医及牙椅厂商的欢迎。

在强大科研实力的支持下,赛特力公司不断完善Mini LED的功能,陆续推出新型产品,满足不同口腔治疗的需要。

Mini LED光谱波长范围在410~490 nm之间,如此宽的波长可固化市场上所有光固化树脂材料。

在光强度方面,普通光导棒(直径7.5 mm)光强可达1250 mW/cm<sup>2</sup>(原光强为1100 mW/cm<sup>2</sup>)。加强型光导棒(直径5.5 mm)光强达2000 mW/cm<sup>2</sup>,远远高于市场上同类LED产品,相当于等离子灯。如此高的光强度却不会提高牙髓的温度。特别推荐用于正畸科快速粘接托槽及美容科用于牙齿漂白。

根据临床医生的需要,最新推出了4种新型光导棒:直型单晶体光导棒:直径8.5 mm,光强达1300 mW/cm<sup>2</sup>,零角度,热量损失少,高光强,适用于漂白,已有诊所使用赛特力Mini LED进行漂白,并取得了良好的效果,欢迎来电索取临床研究报告。乳白色多纤维光导棒:直径7.5 mm和5.5 mm两种,光导头成45°角,光强1250 mW/cm<sup>2</sup>和2000 mW/cm<sup>2</sup>。此种光导棒设计独特,减少光线分散,聚光效果好,集中能量进行深度照射,适用于固化厚于4 mm树脂材料,推荐用于操作距离较远者如后牙托槽、修复体的固化等。琥珀色光导棒:直径3.5 mm,光导头成90°角,光强1100 mW/cm<sup>2</sup>。细小的光导头可照射到难于到达的地方和非常小的表面,如进入根管。特别适用于舌侧树脂的固化及根管内充填材料的固化和儿童牙科。

赛特力发光二极管的另外一个优势是它根据临床需要提供的3种固化模式:快速模式:连续10 s持续最大光强照射;脉冲模式:12 s间断提供最大光强照射;渐进模式:光强渐进式照射,共20 s,前10 s光强逐渐增强,后10 s最大光强照射,又称“软启动”照射。

与传统卤素灯泡不同之处还在于使用Mini LED在治疗过程中牙髓更安全,牙髓温度上升远远低于卤素灯泡。

无线台式充电型Mini LED采用高效锂电池(无记忆功能),一次充电在全功率模式下可使用300~350次。如有备用电池,电池可独立充电,两个半小时即可充满电。内置测光表,可检测电池容量是否足够。另有插电式及可与赛特力超声设备手柄接口相连的光固化灯供选择。

更值得一提的是Mini LED OEM机装产品在2004年取得了全球销售名列前茅的业绩。越来越多的牙医生产商选用了Mini LED光固化灯装备牙椅。

更详尽的产品信息请咨询:010-64657011/2/3/4,或发电子邮件:info@cn.acteongroup.com,网站:www.cn.acteongroup.com,法国艾龙集团(原法国赛特力·碧兰)北京办事处。