

# 不同浓度苦参碱、大蒜素对人胃癌细胞株 MKN-45 杀伤作用的实验研究

余玉清 陈昱倩 颜延凤 鞠娟 李芳 韩康生

(南京市中西医结合医院, 江苏南京 210014)

**摘要** 目的:观察不同浓度苦参碱、大蒜素对人胃癌细胞株 MKN-45 体外生长的影响。方法:体外培养人胃癌细胞株 MKN-45,分别用不同浓度的苦参碱、大蒜素处理,采用 CCK-8 法检测 MKN-45 细胞的生长情况。结果:不同浓度的苦参碱及大蒜素作用于 MKN-45 细胞后,对其增殖均表现出了明显的抑制作用,并表现出浓度与作用时长的依赖性,最高抑制值分别达到了 96.82%和 93.44%。结论:苦参碱及大蒜素可以抑制胃癌 MKN-45 细胞的增殖,且与作用时间、剂量呈正相关。

**关键词** 苦参碱 大蒜素 胃癌 MKN-45 细胞 实验研究

中图分类号 R735.2 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)11-0082-02

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率较高,为胃癌治疗寻找高效低毒的植物提取药,已成为目前的研究热点<sup>[1]</sup>。苦参碱是中药材苦参、山豆根的主要活性成分,具有抗炎、抗纤维化、抗病毒等生物学活性。近年来,国内外医学研究发现苦参碱在抗癌方面具有明显功效<sup>[2]</sup>。大蒜素具有抗菌、抗病毒、降血压、降血脂等功能,对乳腺癌、皮肤癌、结肠癌等均有抑制作用。流行病学研究表明,长期大量食用大蒜素者胃癌的发病率、死亡率均明显下降,大蒜的年摄入量与胃癌发病率成负相关<sup>[3]</sup>。此次我们通过体外实验研究不同浓度的大蒜素与苦参碱对人胃癌细胞株 MKN-45 的增殖是否具有明显的抑制作用,现将结果报道如下。

## 1 实验材料

**1.1 细胞与试剂** 人胃癌 MKN-45 细胞为本实验室保存,购自上海生命科学院细胞所。DMEM 细胞培养基购自 Inventrogen 公司,胎牛血清购自杭州四季青试剂公司,CCK-8 购自 Sigma 公司。大蒜素注射液购自山东鲁抗辰欣药业有限公司,苦参碱注射液购自广州明兴制药厂。

**1.2 细胞培养** 人胃癌 MKN-45 细胞在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下,用含 10%胎牛血清(加青霉素 100U/mL、链霉素 100μg/mL)的 DMEM 培养液常规培养。

## 2 实验方法

**2.1 分组** 实验分为苦参碱组、大蒜素组及阴性对照组。苦参碱终浓度分别为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.0mg/mL,大蒜素终浓度分别为 5、15、25、30、40μg/mL。另设不加药的阴性对照组,仅加入等体积的 DMEM 细胞培养液。

**2.2 CCK-8 法检测两种药物对 MKN-45 胃癌细胞的增殖抑制作用**

取对数生长期 MKN-45 细胞,0.25%胰酶消化制成细胞悬液,细胞浓度 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于 96 孔板中,每孔 90μL,空白孔加入 90μL DMEM,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h。后按一定质量浓度梯度分别加入苦参碱、大蒜素,每孔 100μL,阴性对照组加入等体积 DMEM 液,每个浓度 3 个复孔。继续培养 6、24、48、72h 后,每孔加入 CCK-8 10μL 继续培养 4h,酶标仪 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值,按下列公式计算抑制率:细胞增殖抑制率=[1-(A 给药组-A 空白孔)/(A 阴性对照组-A 空白孔)]×100%。以上实验重复 3 次。

**2.3 统计学方法** 采用 SPSS16.0 软件统计数据,变量均采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两样本均数间的比较用 *t* 检验,多样本均数间比较用单因素方差分析,统计学差异的标准为 *P*<0.05。

## 3 实验结果

**3.1 苦参碱注射液对人胃癌 MKN-45 细胞增殖抑制率的影响** 见表 1。当苦参碱浓度为 0.05mg/mL 时,48h 抑制率为 5.73%,72h 抑制率为 6.43%。但当浓度增加到 1.0mg/mL 时,48h 抑制率为 90.81%,72h 抑制率更是达到了 96.82%。这说明苦参碱注射液在浓度为 0.05~1.0mg/mL 范围内,随着药物浓度的增加和处理时间的延长,对 MKN-45 细胞的

表 1 不同浓度苦参碱不同作用时间对胃癌细胞株 MKN-45 的增殖抑制率( $\bar{x} \pm s, n=9$ ) %

浓度	6h	24h	48h	72h
0(阴性对照组)	0	0	0	0
0.05mg/mL	3.77±2.11	4.78±1.89	5.73±3.32	6.43±1.97
0.1mg/mL	5.54±3.47	6.83±2.88	8.82±2.91	10.63±3.83
0.25mg/mL	8.55±4.88	10.73±1.92	17.93±3.11	20.77±3.17
0.5mg/mL	19.45±3.96	36.82±6.15	53.92±7.89	61.95±8.44
1.0mg/mL	35.12±6.83	60.88±9.91	90.81±10.98	96.82±5.28

注:同一时间不同浓度与阴性对照组比较均 *P*<0.01;同一浓度不同时间比较均 *P*=0.000。

增殖抑制率逐渐增加,存在时间和剂量依赖性( $P<0.01$ ),各个浓度的生长抑制率之间存在显著性相关(ANOVA, $P=0.000$ )。

3.2 大蒜素对 MKN-45 细胞增殖抑制率的影响 见表 2。随着大蒜素浓度的增加和作用时间的延长,对 MKN-45 细胞的增殖抑制率逐渐增加,且各个浓度的生长抑制率之间存在显著性相关(ANOVA, $P=0.000$ )。在大蒜素浓度为  $5\mu\text{g/mL}$  时就出现了对人胃癌 MKN-45 细胞株的增殖抑制作用,48h 与 72h 增殖抑制率分别为 4.88% 与 5.91%; 当大蒜素浓度增加到  $40\mu\text{g/mL}$  时,48h 与 72h 增殖抑制作用最强,分别为 92.57% 与 93.44%。

#### 4 讨论

恶性肿瘤是中国人的第二大死因,而在我国因胃癌引发的死亡居恶性肿瘤死亡首位<sup>[4]</sup>。目前经典的化疗药物因毒副作用较大和化疗耐药限制了其在临床的应用,传统中药逐渐成了目前较热门的抗肿瘤研究方向。

近年来,体外实验研究中发现苦参碱可明显地诱导骨肉瘤、人乳腺癌及肝癌细胞等的凋亡<sup>[5-7]</sup>。本研究结果显示,不同浓度的苦参碱均可以明显抑制人胃癌 MKN-45 细胞的增殖,在一定的浓度范围内(0.05~1.0mg/mL),其对人胃癌 MKN-45 细胞的增殖抑制与时间和浓度呈正相关。其抗肿瘤的作用机制主要包括诱导肿瘤细胞凋亡、分化、自噬以及细胞毒等多种作用<sup>[8-9]</sup>。林氏等<sup>[10]</sup>研究表明,苦参碱可明显抑制黏附因子 CD44、CD49 的表达,抑制肿瘤细胞与内皮细胞的黏附,减轻内皮细胞的通透性,从而减少肿瘤的转移。Dai 等<sup>[11]</sup>发现苦参碱可抑制胃癌细胞系 SGC-7901 的增殖,并可使细胞的形态学发生变化,还可导致细胞的 caspase-3 含量明显升高,从而促进细胞凋亡。

大蒜素的抗癌作用在对照人群研究和临床研究中已经被证实,其作用机制主要有抑制致癌物的激活、抑制肿瘤细胞的转移和侵袭、诱导细胞凋亡、影响细胞周期、对细胞骨架的破坏作用、抑制血管生成等<sup>[12]</sup>。大蒜素的主要成分为二烯丙基三硫,占 40% 以上。二烯丙基三硫对胃液中分离出的硝酸盐还原菌的生长及其产生亚硝酸盐的能力均有明显的抑制作用。已有大量动物实验证实,大蒜素具有预防胃癌发生的作用。本研究结果进一步显示了大蒜素在体外对人胃癌 MKN-45 细胞的增殖具有抑制作用,并且随着大蒜素药物的浓度和用药时间的增加,其增殖抑制作用就更为明显。研究表明,大蒜素可通过第二信号系统 cAMP/PKC 途径,增强细胞凋亡始动基因 fas 及凋亡促进基因 box 表达,抑制凋亡抑制基因 bcl-2 的表达,从而提高细胞凋亡率,诱导胃癌细胞凋亡,并抑制其增殖活性,揭示了大蒜素诱导胃癌细胞凋亡的机制<sup>[3]</sup>。

综上所述,苦参碱和大蒜素注射液在体外可直接抑制或杀伤人胃癌 MKN-45 细胞,具有较强的增殖抑制及杀伤能力,并且呈现与时间和浓度的正相关性。因此,这两种药物都是具有广泛应用前景的抗肿瘤药物。

表 2 不同浓度大蒜素不同作用时间对胃癌细胞株 MKN-45 的增殖抑制率( $\bar{x}\pm s, n=9$ ) %

浓度	6h	24h	48h	72h
0(阴性对照组)	0	0	0	0
$5\mu\text{g/mL}$	$2.83\pm 1.73$	$4.71\pm 0.89$	$4.88\pm 0.68$	$5.91\pm 1.33$
$15\mu\text{g/mL}$	$6.92\pm 2.97$	$8.91\pm 1.82$	$14.82\pm 3.57$	$17.93\pm 5.37$
$25\mu\text{g/mL}$	$11.83\pm 2.86$	$20.56\pm 2.11$	$25.28\pm 4.44$	$32.78\pm 6.91$
$30\mu\text{g/mL}$	$26.91\pm 5.57$	$39.91\pm 5.19$	$68.45\pm 8.24$	$61.95\pm 4.90$
$40\mu\text{g/mL}$	$39.96\pm 4.88$	$68.44\pm 11.74$	$92.57\pm 9.92$	$93.44\pm 6.99$

注:同一时间不同浓度与阴性对照组比较均  $P<0.01$ ;同一浓度不同时间比较均  $P=0.000$ 。

#### 5 参考文献

- [1] 朱艳琴, 鲁光华, 徐玉芳. MTT 法检测体外培养人胃癌细胞株 MGC-803 对苦参素注射液的药物敏感性. 中国药理学通报, 2006, 22(10):1278
- [2] 肖硕. 苦参碱多种抗癌功效研究进展. 实用医学杂志, 2010, 26(24):4605
- [3] 李勇, 刘冀, 红赵群. 大蒜素对人胃腺癌 BGC-823 细胞影响的研究. 中国中西医结合外科杂志, 2001, 7(5):307
- [4] 孙秀娣, 牧人, 周有尚. 中国胃癌死亡率 20 年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(1):4
- [5] 周炳刚, 孙靖中, 苏刚, 等. 苦参碱诱导人乳腺癌细胞 MCF27/ADR 的凋亡研究. 中华实验外科杂志, 2003, 20(6):515
- [6] 郑安祥, 陈杰, 陶惠民. 苦参碱抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和诱导凋亡的体外实验研究. 实用肿瘤杂志, 2005, 20(6):516
- [7] 张立明, 郑传莉. 苦参碱诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的实验研究. 西北药学杂志, 2006, 22(3):128
- [8] Zhang S, Qi J, Sun L, et al. Matrine induces programmed cell death and regulates expression of relevant genes based on PCR array analysis in C6 glioma cells. Mol Biol Rep, 2009, 36(4):791
- [9] 查勇, 寸英丽, 黄云超, 等. 苦参碱对肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡和自噬相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志, 2010, 18(29):3078
- [10] 林洪生, 李树奇, 裴迎霞, 等. 川芎嗪、苦参碱对癌细胞与内皮细胞粘附及粘附因子表达的影响. 中国新药杂志, 1999, 8(6):384
- [11] Dai Z J, Gao J, Ji Z Z, et al. Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3. J Ethno-pharmacology, 2009, 123(1):91
- [12] 蒋淑婉, 李云, 陈鹤. 大蒜素的抗肿瘤作用及其机制研究进展. 医学综述, 2013, 19(8):1420

第一作者: 余玉清(1971-), 女, 医学硕士, 副主任中医师, 研究方向: 中西医结合治疗内分泌系统疾病. Susan710316@163.com

收稿日期: 2014-06-18

编辑: 吴宁

