

丹皮酚对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用

计春燕, 谭诗云*, 刘长青 (武汉大学人民医院消化内科, 武汉 430060)

摘要: 目的 探讨中药丹皮酚(Pae)对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用及其与多种化疗药物的协同作用。方法 应用 MTT 法(噻唑蓝比色试验)检测不同浓度的丹皮酚和 5-氟脲嘧啶(5-FU)、丝裂霉素(MMC)、顺铂(DDP)对体外培养的人大肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用,同时观察低浓度的 Pae 与化疗药物的协同作用。结果 Pae 可抑制 HT-29 细胞增殖,并且与药物浓度及作用时间呈正相关关系。低浓度的 Pae 与化疗药物协同可产生较强的抑制细胞增殖作用。结论 Pae 具有直接的抗肿瘤作用,并且具有增强化疗药物作用的功效。

关键词: 丹皮酚; 化疗; 大肠癌

[中图分类号]R735.3 [文献标志码]A [文章编号]1005-541X(2005)03-122-03

Inhibitory Effect of Paeonol on the Proliferation of Human Colorectal Cancer Cell Line HT-29 and its Synergetic Effect with Chemotherapy Agents

Ji Chun-yan, TAN Shi-yun, LIU Chang-qing.

Department of Gastroenterology, the People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of paeonol on the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its synergetic effect with chemotherapy agents. **Methods** The inhibitory effect of paeonol, 5-FU, MMC, DDP with different concentration on human colorectal cancer cell line in vitro were detected by MTT assay, and the synergetic effect of paeonol in low concentration with chemotherapy agents was observed. **Results** Paeonol could inhibit the proliferation of HT-29 cells, which showed obvious concentration-effect and time-effect relationship. Pae in low concentration had synergetic effect in inhibiting the proliferation of HT-29 cells with several chemotherapy agents. **Conclusion** Paeonol has a direct anticancer effect and can enhance the action of several chemotherapy agents markedly.

Key words: Paeonol; Chemotherapy; Colorectal cancer

大肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率呈上升趋势^[1]。以 5-氟脲嘧啶(5-FU)为基础的辅助化疗是目前治疗大肠癌最常用的方法^[2],但是化疗副作用较大,部分患者难以耐受。此外,化疗过程中肿瘤细胞易产生多药耐药而使大肠癌的临床化疗失败。因此在植物中寻找有效且副作用小的抗肿瘤药物已成为国内外重要的研究课题。研究表明,丹皮酚(Paeonol, Pae)具有一定的抗肿瘤活性,体外实验发现它对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用,灌胃给药有抗小鼠肝肿瘤作用^[3]。但 Pae 对大肠癌的增殖抑制作用在国内外还未见报道。本研究旨在探讨 Pae 对大肠癌 HT-29 细胞生长的影响及其与多种化疗药物的协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞株 HT-29 购自中南大学肿瘤研究所。主要药物和试剂 Pae 购自上海第一制药

厂(10 mg/2 ml,批号:990402),临用前用 RPMI 1640 培养液稀释成终浓度为 3.91 ~ 250 mg/L。5-FU 为上海旭东海普药业有限公司产品。MMC 为 Tokyo 公司产品。DDP 为山东齐鲁制药厂产品。RPMI 1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品。小牛血清为杭州四季青生物材料研究所提供。四噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司产品)用 pH 为 7.4 的 PBS 溶解(5 g/L),过滤除菌,置棕色小瓶中 4℃ 冰箱保存。二甲基亚砷(DMSO),Sigma 公司产品。

1.2 仪器与设备 CO₂ 培养箱为美国 HARIS 公司产品。酶标仪为美国 BIO-TEK 公司产品。医用超净工作台为北京半导体设备一厂产品。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 HT-29 细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,加入青霉素 100 u/L,链霉素 100 mg/L,置 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养,每 3 ~ 4 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.2 Pae 对 HT-29 细胞生长的影响 MTT 法参照文献^[4]取对数生长期的 HT-29 细胞以 5 × 10⁴/ml,每孔 0.2 ml,接种于 96 孔培养板,24 h 细胞贴壁生长后

分为实验组和对照组。实验组分别加入不同浓度的 Pae(浓度分别为 3.91 mg/L、7.81 mg/L、15.63 mg/L、31.25 mg/L、62.5 mg/L、125 mg/L、250 mg/L), 每组设 5 个复孔, 对照组加入等量培养液。连续培养 24、48、72、96 h。根据细胞生长情况, 每天换液 1 次, 分别于 24、48、72 及 96 h 每次实验结束前 4 h 每孔加入 20 μ l MTT 液显色, 继续培养 4 h, 弃上清液, 然后每孔加 200 μ l DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定 570 nm 处各孔的吸光度值。药物对细胞增殖抑制率的计算方法为: 抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) \times 100%。

1.3.3 细胞形态的观察 取对数生长期 HT-29 细胞消化传代并延续培养 24 h 后换含不同浓度 Pae 的培养液培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。HE 染色标本的制备: 将细胞涂片用冷丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定 20 min, 自然凉干, 水化后用 0.5% Triton \times 100 PBS 处理 10 min, 水化后 Gill 苏木精染 2 min, 1% 盐酸乙醇 1 s, 42 $^{\circ}$ C 温水蓝化 10 min, 伊红染 2 s, 常规脱水封片。

1.3.4 Pae 与 4 种化疗药物的协同作用 根据以上

单药抑制实验的结果, Pae 设 7.81 mg/L。根据预实验测得的药物 IC₃₀ (30% 抑制浓度) 值, 5-FU 用 10 mg/L, MMC 用 0.5 mg/L, DDP 用 10 mg/L。取对数生长期的 HT-29 细胞以 5 \times 10⁴/ml, 每孔 0.2 ml, 接种于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后分组。单药组分别加入上述浓度的 Pae 和各种化疗药。联合用药组同时加入上述浓度的 Pae 和化疗药。每组设 5 个复孔, 对照组加入等量培养液, 作用 48 h 后, 用 MTT 显色, 测定 570 nm 的吸光度值, 计算各组细胞的生长抑制率。

1.4 统计学处理 SPSS 10.0 软件统计方差分析。

2 结 果

2.1 Pae 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用 Pae 在 7.81 ~ 250 mg/L 浓度范围内对 HT-29 细胞的增殖均有抑制作用, 药物浓度越高, 作用时间越长, 其抑制作用越强, 呈现明显的剂量依赖效应关系和时间依赖效应关系。见表 1。

表 1 丹皮酚对大肠癌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Pae (mg/L)	24h		48h		72h		96h	
	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)	A 值	抑制率(%)
0	0.859 \pm 0.028	—	1.073 \pm 0.021	—	1.338 \pm 0.024	—	1.595 \pm 0.019	—
3.91	0.817 \pm 0.024	4.889	1.014 \pm 0.031	2.982	1.341 \pm 0.033	3.386	1.457 \pm 0.024 *	8.652
7.81	0.751 \pm 0.030 **	12.573	0.871 \pm 0.013 **	18.826	1.084 \pm 0.025 **	21.902	1.026 \pm 0.014 **	35.673
15.63	0.599 \pm 0.023 **	30.325	0.575 \pm 0.026 **	46.412	0.570 \pm 0.017 **	58.934	0.497 \pm 0.031 **	68.840
31.25	0.439 \pm 0.016 **	48.803	0.423 \pm 0.081 **	60.578	0.386 \pm 0.030 **	72.190	0.323 \pm 0.018 **	79.749
62.50	0.329 \pm 0.025 **	61.622	0.317 \pm 0.014 **	70.456	0.305 \pm 0.023 **	78.025	0.278 \pm 0.024 **	85.571
125.00	0.252 \pm 0.014 **	70.676	0.227 \pm 0.025 **	78.844	0.201 \pm 0.014 **	85.518	0.167 \pm 0.016 **	89.529
250.00	0.225 \pm 0.025 **	73.806	0.202 \pm 0.016 **	81.174	0.171 \pm 0.019 **	87.680	0.130 \pm 0.025 **	91.849

注: vs 对照组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Pae 浓度为 0 mg/L), $P < 0.01$ vs 对照组 (Pae = 0 mg/L)

2.2 细胞形态的观察结果 倒置显微镜下每日观察各组细胞的形态变化。对照组细胞生长良好, 呈高折光率, 胞体大, 呈圆形, 随时间延长变化不大。Pae 组细胞随着药物浓度增大和时间延长, 细胞逐渐变小, 折光率减弱, 但细胞膜完整, 最后裂解。250 mg/L Pae 组除见少数圆形细胞外, 可见大量悬浮的细胞碎片。HE 染色可见对照组正常细胞核均匀着色呈现淡蓝色或蓝色, 未见凋亡小体。31.25 mg/L ~ 250 mg/L 浓度范围 Pae 组出现较多的凋亡细胞, 表现为细胞体积缩

小, 核固缩、碎裂、深染, 部分裂解形成凋亡小体。另可见肿胀的坏死细胞, 细胞膜的连续性破坏, 核染成很淡的蓝色甚至蓝色消失。

2.3 Pae 协同化疗药物对 HT-29 细胞增殖的抑制作用 Pae 选择浓度为 7.81 mg/L (其抑制率为 18.826%), 化疗药物选择 IC₃₀ 值作为协同作用实验的浓度。Pae 与化疗药物同时作用于 HT-29 细胞, 对其生长的抑制有显著的协同作用。见表 2。

表 2 Pae 协同 3 种化疗药物对 HT-29 细胞的协同抑制作用

 $(\bar{x} \pm s, n=6)$

分组	A 值	抑制率(%)
对照组	1.073 ± 0.021	—
单药组		
Pae	0.871 ± 0.013	18.826 **
5-FU	0.751 ± 0.028	30.002 **
MMC	0.749 ± 0.030	30.151 **
DDP	0.745 ± 0.019	30.569 **
联合用药		
Pae + 5-FU	0.280 ± 0.009	73.884 ** Δ
Pae + MMC	0.373 ± 0.025	65.267 ** Δ
Pae + DDP	0.497 ± 0.018	53.731 ** Δ

注:表中 Pae、5-FU、MMC、DDP 的浓度分别为 7.81mg/L、10mg/L、0.5mg/L、10mg/L,与对照组比较,** $P < 0.01$,与单药组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨 论

丹皮酚是毛茛科植物牡丹 *Paeonia Suffruticosa* And r. 根皮和萝藦科植物徐长卿 *Pycnostelma Paniculatum* (Bunge) K Schum 干燥根或全草的主要有效成分^[5]。Pae 是一种小分子的酚类化合物,呈白色针状结晶,其相对分子量为 166.18 kD,分子式为 $C_9H_{10}O_3$,化学结构是 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮。研究表明,Pae 具有镇静催眠、解热镇痛、抗菌消炎、免疫调节、抗氧化及保护心脑血管等广泛的药理活性^[6-9]。此外,Pae 能促进 SD 大鼠白细胞中致癌物质 2-氨基芴的乙酰化^[6],能提高人结肠肿瘤细胞中 N-乙酰转移酶(N-acetyltransferase, NAT)的活性,且呈剂量依赖性^[10],说明 Pae 具有一定的抗肿瘤活性。本实验研究发现,Pae 在 7.81 ~ 250 mg/L 的 6 个浓度下,对 HT-29 细胞株的增殖均有抑制作用,随着药物浓度的升高和作用时间的延长,抑制细胞增殖的作用逐步增强,呈现明显的浓度效应及时间效应关系。本实验中 Pae 作用于大肠癌 HT-29 细胞,通过光镜 HE 染色可观察到凋亡的肿瘤细胞。推测 Pae 作用于大肠癌 HT-29 细胞的作用机理可能与诱导大肠癌 HT-29 细胞凋亡有关。有关 Pae 抑制肿瘤细胞增殖的机制笔者正在继续研究之中。Pae 除了自身具有直接抑制肿瘤细胞增殖的作用外,还能对多种化疗药物有增敏作用。低浓度的 Pae (7.81 mg/L) 单独应用对 HT-29 细胞的抑制率仅为 18.826%,而其与 IC_{30} 浓度的化疗药物 5-FU、MMC

及 DDP 协同应用可产生较强的抑制细胞增殖作用,抑制率分别达到 73.884%、65.267% 和 53.713%,与单药组抑制率的比较其差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),其中以 Pae 和 5-FU 联用的协同作用最为显著。目前临床所用的化疗药物均有一定的抗肿瘤作用,但由于其毒副作用而限制了其长期使用,加之肿瘤易产生多药耐药性,使得化疗的效果不尽如人意。中药丹皮酚具有抗肿瘤作用,同时能提高机体免疫力,且无明显副作用。如能在临床中用于抗大肠癌治疗或在化疗中与 5-FU 等化疗药物联合应用,必将能提高化疗药物的抗肿瘤作用,同时也能因化疗药物的剂量减少而降低常规化疗药物的毒副作用。本研究为丹皮酚的临床应用提供了实验依据,为大肠癌的中药防治开辟了一条新途径。

参考文献

- [1] 谢正勇,卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(7):1050.
- [2] Tebbutt NC, Cattell E, Midgley R. et al. Systemic treatment of colorectal cancer[J]. European Journal of Cancer,2002,38,1000.
- [3] 孙国平,沈玉先,张玲玲,等. 丹皮酚对 Hep A 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. 中国药理学通报,2003,19(2):160.
- [4] Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Br J Cancer,1989,60(2):206.
- [5] Riley CM, Ren TC. Simple method for determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid phase extraction and ultraviolet detection[J]. J Chromatogr, 1989,489(2):432.
- [6] Chang HL, Hung CF, Yeh CC, et al. Paeonol promoted 2-aminofluorence and p-amiobenzoic acid acetylations by mononuclear heucocytes from sprague-dawley rats[J]. Cytobios,2000,103(404):149.
- [7] 丘少鹏,王道虎,刘卓炜,等. 丹皮酚磺酸钠在动物肾缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华肾脏病杂志,2001,17(3):185.
- [8] 丁卫祥,包仁尧,邵国富,等. 丹皮酚、尼莫通对大鼠脑出血后 rCBF、脑水分含量及神经行为学干预作用的研究[J]. 中国血液流变学杂志,2001,11(1):21.
- [9] 戴敏,刘青云,顾承刚,等. 丹皮酚对脂质过氧化反应及低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J]. 中国中药杂志,2000,25(10):625.
- [10] Chung JG. Paeonol promotion of DNA adduct formation and arylamines N-acetyltransferase activity in human colon tumour cells[J]. Food Chem Toxicol,1993,37(4):327.

(收稿日期:2004-11-10)

END 结束

更多内容



【百万古籍库】

<https://www.fozhu920.com/list/>

【易】【医】【道】【武】【文】【奇】【画】【书】

1000000+ 高清古书籍

打包下载



查看完整版

付费下载



【百万古籍库】

<https://www.fozhu920.com/list/>

【易】【医】【道】【武】【文】【奇】【画】【书】

1000000+ 高清古书籍

打包下载





【风水】风水命理资料合集_9500 本

阴宅阳宅、风水堪舆、八字命理、手相面相、符咒卦象、奇门遁甲、紫微斗数.....



【中医】中华传统医学资料大全_15000 本

针灸、推拿、正骨术、汉医、苗医、民间秘方偏方、药洒药方、祖传医术、珍本...



【道术】道家法术\茅山术\符咒术\气术_3000 套

修真秘籍、丹道、道家秘术、胎息功、内丹术、茅山法术、道家符咒、巫术、...



【武术】传统武术与现代搏击术_6200 册

少林、武当、太极拳、形意拳、八极拳、咏春拳、气功、散打、格斗、拳击、...



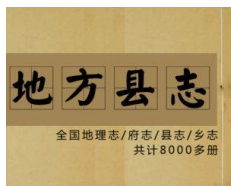
【集藏】经史子集库_13300 卷

【经史子集】楚辞、汉赋、诗集、词集、宝卷、正史、编年、别史、纪事本末、地理志...



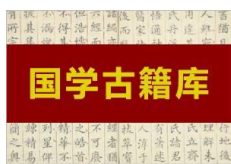
【国画】传世名画 _ 6100 卷

唐、金、辽、宋、元、明、清 800 多位画家近 6000 多幅传世...



【县志】方志\地方县志\乡志\地理志_8100 册

府志、区志、乡志、地理志..... 此合集为全国范围地方县志\府志古籍影印电子版，...



【国学】中华古籍库—32 万册古籍书

32 万册《中华古籍库》【32 万册影印古籍 + 20 多亿字，带检索器和阅读工具】包括各地方志、日本内...

【更多】 >> <https://www.fozhu920.com/list/>