

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00928

鸦胆子油自微乳剂对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用

杨洁, 赵林涛, 李凡, 李晔, 宋延平*

陕西省中医药研究院药理室, 西安 710003

[关键词] 鸦胆子油自微乳剂; 肺肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R 734.2 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)08-0928-02

Inhibitory effect of *Brucea javanica* oil self-microemulsion preparation on proliferation of human lung cancer cell line A549

YANG Jie, ZHAO Lin-tao, LI Fan, LI Ye, SONG Yan-ping*

Department of Pharmacology, Shaanxi Traditional Chinese Medicine Research Institute, Xi'an 710003, Shaanxi, China

[Key words] *Brucea javanica* oil self-microemulsion; lung neoplasms; cell proliferation; cell cycle

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8):928-Inside back cover]

鸦胆子[*Brucea javanica* (L.) Merr.]为苦木科植物鸦胆子的干燥成熟果实,是一种常用中药,主要分布在我国福建、云南、广东等地及台湾地区。《医学衷中参西录》中写道:“鸦胆子,性善凉血止血,兼能化痰生新。凡病之偏于热者用之皆有捷效,而以治下鲜血水之病,则尤效,又善清胃腑之热,胃院有实热充塞,噤口不食者,服之即可进食”。鸦胆子油主要成分为脂肪酸,内含少许挥发油。鸦胆子油对多种肿瘤的生长有一定的抑制作用而少有肝功能损伤^[1-2],临床应用亦证实原发和转移性肿瘤的治疗中,鸦胆子油制剂也显示出较好的疗效^[3]。本实验利用体外培养肺癌 A549 细胞的方法,研究新型制剂鸦胆子油自微乳剂对人肺癌细胞株 A549 增殖的影响,为临床应用提供新的治疗思路和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 鸦胆子油自微乳剂(0.025、0.05、0.1 mg/ml)由陕西省中医药研究院药剂研究室提供,批号:20111130。人肺癌细胞株 A549 购自第四军医大学实验动物中心。RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO;美国 Gibco 公司)、MTT(美国 Sigma 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、CO₂ 恒温培养箱、超净工作台、倒置显微镜、酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)、96 孔板(德国 Corning 公司)。FACSCalibur 流式细胞分析仪(美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养 将常规方法复苏冻存的 A549 细胞置于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养,用不含 EDTA 的胰酶消化传代,收集

对数生长期细胞。将处于对数生长期的细胞制成单细胞悬液,接种后过夜,弃原培养液,用无 Ca²⁺/Mg²⁺ 的 PBS 洗 3 次,接种于不含血清的培养液,使其处于血清饥饿状态,24 h 后绝大多数细胞处于 G₀/G₁ 期,达到细胞周期同步化。

1.3 MTT 检测细胞增殖 按文献[4]方法,将 1×10⁵/ml 细胞接种于 96 孔板,设 6 个复孔,另设不加药的正常细胞作阴性对照组。经不同浓度(0.025、0.05、0.1 mg/ml)鸦胆子油自微乳剂处理并培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 5 mg/ml MTT 试剂 20 μl,孵育 4 h,吸去上清,加入 200 μl DMSO,放振荡器振荡 15 min,使沉淀的结晶充分溶解,用酶标仪(测定波长 490 nm)测定每孔光密度(D)值,按下列公式计算抑制率:抑制率(%)=(1-实验组平均 D 值/对照组平均 D 值)×100%。

1.4 流式细胞术测定细胞周期时相分布及细胞凋亡 按文献[4]方法,用鸦胆子油自微乳剂以不同浓度(0.05、0.1 mg/ml)分别孵育 A549 细胞不同时间(12、24、36 h),并以质量分数 10% RPMI 1640 细胞培养液代替鸦胆子油自微乳剂作为阴性对照。按时收集经不同浓度处理的 A549 细胞,胰酶消化,制成单细胞悬液, PBS 洗涤后,离心,加入 -20℃ 预冷的无水乙醇固定 30 min,离心除去乙醇, PBS 洗涤,加入碘化丙啶溶液 400 μl, 4℃ 作用 20 min 后上 FACSCalibur 流式细胞仪检测,数据均经 Lysis 软件收集和分析。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 软件进行分析,各浓度及各时间点间比较采用 F 检验。检验水平(α)为 0.05。

[收稿日期] 2012-03-28 [接受日期] 2012-06-28

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技项目(2009ZDKG-82)。Supported by the “13115” Major Science and Technology Innovation Project of Shaanxi Province (2009ZDKG-82).

[作者简介] 杨洁, 硕士, 助理研究员。E-mail: yj1031@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 029-87251832, E-mail: syppdd2003@163.com

2 结果

2.1 鸦胆子油自微乳剂对人肺癌 A549 细胞增殖的影响 低浓度(0.025 mg/ml)的鸦胆子油自微乳剂对人肺癌 A549 细胞有抑制作用,随着鸦胆子油自微乳剂浓度的增加和作用时间的延长,其抑制作用增强($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 鸦胆子油自微乳剂对人肺癌 A549 细胞的抑制率

浓度 $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$	$n=6, \bar{x} \pm s, \%$		
	24 h	48 h	72 h
0	0.34±0.27	0.39±0.22	0.39±0.38
0.025	46.52±5.88	61.72±6.42	76.84±5.15
0.050	58.89±6.75	72.76±5.73	88.25±6.28
0.100	66.74±5.86	84.29±5.28	97.53±6.15

同一时间点不同浓度组之间比较, $P < 0.01$;同一浓度不同时间点之间比较, $P < 0.01$

2.2 鸦胆子油自微乳剂对人肺癌 A549 细胞周期分布的影响 对照组孵育不同时间后 $G_0 \sim G_1$ 、S 及 $G_2 \sim M$ 期细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$)。鸦胆子油自微乳剂在同一浓度条件下,随着药物作用时间延长, $G_0 \sim G_1$ 期细胞比例逐渐增加,而 S 期细胞比例逐渐减少($P < 0.01$)。在同一时间点,随着药物浓度增加,细胞周期的变化亦呈现上述趋势,表明鸦胆子油自微乳剂主要使 A549 细胞阻滞在 $G_0 \sim G_1$ 期。见表 2。

表 2 鸦胆子油自微乳剂对人肺癌 A549 细胞周期的影响

浓度 $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$	时间 t / h	$n=3, \bar{x} \pm s, \%$		
		$G_0 \sim G_1$	S	$G_2 \sim M$
0	12	53.68±3.38	31.35±3.25	14.97±3.12
	24	56.35±3.80	29.02±3.98	14.63±3.48
	36	59.49±3.85	27.63±2.35	12.88±3.44
0.05	12	52.76±4.25	37.94±5.67	9.30±3.25
	24	56.89±4.85	31.85±4.34	11.26±5.64
	36	60.15±4.15	25.14±3.64	14.71±4.47
0.10	12	63.75±4.28	28.47±4.49	7.78±4.86
	24	68.16±4.85	25.75±5.79	6.09±3.72
	36	73.03±5.43	21.27±5.17	5.70±4.35

同一时间点不同浓度组之间比较, $P < 0.01$;同一浓度不同时间点之间比较, $P < 0.01$

3 讨论

鸦胆子油苦、寒,易伤胃肠,不宜多用久服,尤其对于胃肠出血及肝肾病患者应禁用或慎用。为了缓解其对消化道的刺激性,提高疗效,目前大多将鸦胆子油制成乳剂后应用,已有软胶囊、口服乳剂及注射乳剂上市,但其生物利用度均不高。

微乳(microemulsion)在农药、医药和化妆品等领域已有较广泛的应用,其作为药物载体的优点已得到普遍的认可。

近来研究发现,由油相和非离子表面活性剂形成的均一透明并包含药物的溶液,当亲水性表面活性剂($\text{HLB} > 12$)含量较高($\geq 40\%$,W/W)或表面活性剂加上助乳化剂,在胃肠道内或环境温度适宜(通常指体温 37°C)及温和搅拌的情况下,可自发地形成微乳,称为自微乳化释药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)。口服给予 SMEDDS 后,脂溶性药物被包裹在微乳乳滴中溶出而被吸收,不仅可以减轻刺激性药物对胃肠道的刺激,而且由于微乳界面积极大、表面张力低,易于通过胃肠壁的水化层,可增加穿透性,促进药物吸收^[5]。因此,该给药系统主要用以改善脂溶性药物的口服吸收,增加其生物利用度,SMEDDS 同样也可以作为脂溶性抗癌中药活性成分口服给药的良好载体。

非小细胞肺癌(NSCLC)虽对放疗化疗敏感,但化疗药物毒副作用较大,且易产生耐药和出现复发、转移。本研究模型药物鸦胆子油是细胞周期非特异性抗癌药^[6],对 G_0 、 G_1 、S、 G_2 、M 期癌细胞有杀伤和抑制作用,能明显抑制肿瘤细胞 DNA 的合成,可直接进入癌细胞,用于治疗肺癌、肝癌、胃癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤,临床上在抗肿瘤、抗消化道溃疡及抗血脂方面亦有广泛应用。

本研究结果显示鸦胆子油自微乳剂在体外能够明显抑制 A549 细胞的增殖。MTT 结果表明,鸦胆子油自微乳剂对细胞增殖的抑制作用随其浓度的增高和作用时间的延长而增强。细胞周期实验证明鸦胆子油自微乳剂具有阻滞 A549 细胞增殖周期的作用,且 A549 的细胞周期改变为 $G_0 \sim G_1$ 期细胞的增加和 S 期细胞的减少,并且这种 $G_0 \sim G_1$ 期阻滞作用随药物作用时间延长和浓度的增高而增强。细胞的凋亡受阻是引起肿瘤发生以及耐药的一个主要病理学基础,可能是肿瘤发生以及发展的重要因素,肿瘤细胞周期发生改变往往与肿瘤细胞的凋亡相关,对于上述可能的作用机制还有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 梁晶. 鸦胆子油乳致肝损害 9 例临床分析[J]. 安徽医药, 2007, 11: 93-94.
- [2] 章霓,徐丽君,黄静,刘跃华. 鸦胆子油乳治疗 40 例恶性胸腔积液[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12: 513.
- [3] 江波,许东航,徐翔,吕庆华. 鸦胆子油乳对肺癌 A549 细胞凋亡及血管内皮生长因子分泌的影响[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44: 1387-1391.
- [4] 田春桃,韩利艳. 鸦胆子油对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的抑制作用[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18: 654-656.
- [5] Pouton C W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems[J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 11 (Suppl 2): 3-8.
- [6] 肖墙根. 新编中药志[M]. 2 卷. 北京: 化学工业出版社, 2002: 506.

[本文编辑] 尹茶