

斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 及其裸鼠皮下移植瘤的影响*

晏 容^{1,3**} 刘 云^{2,3} 朱欣婷^{1,3} 易小飞¹ 刘 流¹ 李晓飞^{1,3***}

(1. 遵义医学院基础医学院, 遵义 563003; 2. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 遵义 563003;

3. 贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室, 遵义 563003)

摘 要 【目的】探讨斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 及其裸鼠皮下移植瘤的影响。【方法】1、采用磺酰罗丹明染色法 (SRB 法) 检测不同浓度斑蝥素酸镁在体外对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的抑制作用; 2、流式细胞术检测斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期和细胞凋亡的影响; 3、Hoechst33342 染色观察斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞形态的影响; 4、透射电镜观察斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 超微结构的变化; 5、建立人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型, 实验组每只裸鼠瘤周注射斑蝥素酸镁 6.26×10^{-5} mmol, 对照组给予相同容积的无菌生理盐水瘤周注射, 计算抑瘤率; 6、原位末端标记染色 (TUNEL) 法检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织细胞凋亡情况。【结果】1、斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 有比较明显的抑制作用, 抑制率随药物浓度的增加而升高, 呈剂量效应关系, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 1.79 μ mol/L; 2、流式细胞检测结果显示: 人肝癌细胞 SMMC-7721 在斑蝥素酸镁的作用下, G₀/G₁ 期细胞减少, G₂/M 期细胞增加, 细胞出现 G₂/M 期阻滞; 细胞凋亡率随斑蝥素酸镁浓度加大而逐渐增加; 3、Hoechst33342 染色镜下显示: 斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 出现凋亡细胞形态特征; 4、透射电镜观察: 斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 出现细胞核异形、染色质聚集成团、边集, 见凋亡小体; 5、斑蝥素酸镁组肿瘤体积、重量显著小于生理盐水组 ($P < 0.05$), 抑瘤率为 49%; 6、TUNEL 法提示斑蝥素酸镁组移植瘤组织细胞凋亡率显著高于生理盐水组 ($\chi^2=92.609$, $P=0.000$)。【结论】斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 在体内外均有抑制增殖作用, 并可以诱导肿瘤细胞凋亡, 其凋亡的发生与细胞分裂期阻滞有关。

关键词 斑蝥素酸镁, 人肝癌细胞 SMMC-7721, 裸鼠, 抗肿瘤, 细胞凋亡

Effect of magnesium cantharidate on hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and subcutaneous hepatocellular SMMC-7721 carcinoma transplantation tumors in nude mice

YAN Rong^{1,3**} LIU Yun^{2,3} ZHU Xin-Ting^{1,3} YI Xiao-Fei¹ LIU Liu¹ LI Xiao-Fei^{1,3***}

(1. Basic Medicine School, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 3. Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines, Zunyi 563003, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effect of magnesium cantharidate on hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and subcutaneous SMMC-7721 transplantation tumors in nude mice. [Methods] 1. The sulforhodamine B (SRB) assay was employed to evaluate the effect of magnesium cantharidate on the inhibition of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. 2. Flow

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (No.81260488); 贵州省科技厅社会发展攻关项目 (黔科合 SY 字[2012]3082); 贵州省科技厅社会发展攻关项目 (黔科合 SY 字[2011]3031); 贵州省教育厅特色重点实验室建设项目 (黔教合 KY 字[2014]212); 贵州省优秀科技教育人才省长奖金 (黔省专合字[2010]48 号); 汇川区科技计划项目 (E-114)

**第一作者 First author, E-mail: yanr3725881994@sina.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lixiaofei35@gmail.com

收稿日期 Received: 2014-10-28, 接受日期 Accepted: 2014-11-28

cytometry (FCM) was used to measure the effect of magnesium cantharidate on cell-cycle arrest and cell apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. 3. Hoechst 33342 staining was used to observe the effect of magnesium cantharidate on morphological changes in hepatocellular carcinoma cells. 4. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the effect of magnesium cantharidate on the ultra-structure of hepatocellular carcinoma cells. 5. A model system using subcutaneous transplantation tumors composed of hepatocellular carcinoma cells was set up in nude mice. The experimental group was injected with magnesium cantharidate (6.26×10^{-5} mmol) around the tumor and the control group was given the same volume of sterile saline. The inhibition rates of the tumor in the two groups were calculated and compared. 6. Apoptosis in the experimental group was observed with the TUNEL staining method. **[Results]** 1. The results show that magnesium cantharidate had an obvious inhibitory effect on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, and that this increased gradually with dosage. The IC_{50} value was $1.79 \mu\text{mol/L}$. FCM at which point the cell-cycle of SMMC-7721 changed. The ratio of cultured cells declined in the G_0/G_1 phase, whereas cells increased dramatically in the G_2/M phase. The cell-cycle arrested in the G_2/M phase. Cell apoptosis increased gradually with concentration of magnesium cantharidate. 3. Hoechst 33342 staining showed that hepatocellular carcinoma cells displayed morphological features typical of apoptotic cells. 4. TEM revealed nuclear abnormalities, including concentrations of chromatin on the nuclear edge and the formation of apoptotic bodies. 5. The volume and weight of tumors in the magnesium cantharidate group was significantly lower than in the sterile saline control group ($P < 0.05$) and the inhibition rate was 49%. 6. The TUNEL assay indicated that the apoptosis rate in the magnesium cantharidate group was significantly higher than in the sterile saline group ($\chi^2=92.609$, $P=0.000$). **[Conclusion]** Magnesium cantharidate can inhibit the proliferation of SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*, and induce the apoptosis of cancer cells. Apoptosis may be associated with the arrest of cell division.

Key words magnesium cantharidate, hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721, nude mice, anti-tumor; cell apoptosis

中药斑蝥是一类重要的抗癌昆虫类药物,隶属于芫菁科 Meloidae 斑芫菁属 *Mylabris*,主要有大斑芫菁 *Mylabris phalerata* Pallas 和眼斑芫菁 *Mylabris cichorii* Linnaeus 2 种。斑蝥常被用于治疗多种癌症,特别是对原发性肝癌有特效 (Li *et al.*, 2010)。一直以来,斑蝥素 (Cantharidin) 被认为是斑蝥体内最主要的抗癌物质,但作者课题组前期的研究工作发现斑蝥素在斑蝥体有 2 种存在形式——游离斑蝥素和结合斑蝥素 (李晓飞等, 2007)。进一步研究发现,这些结合斑蝥素多数为斑蝥素的盐类衍生物,如:斑蝥素酸镁,斑蝥素酸钙、斑蝥素酸钾等 (李晓飞等, 2007)。以此发现为依据,以斑蝥素为原材料半人工合成了这一系列的斑蝥素盐类衍生物,并通过体外抗肿瘤实验发现其中的斑蝥素酸镁体外抗肿瘤活性高于斑蝥素及其它斑蝥素衍生物,且具有较好的水溶性 (李晓飞等, 2013a, 2013b; 刘云等, 2013), 极具开发潜力。为了明确斑蝥素酸镁的抗癌效应,本文从体内和体外 2 个层次进行斑蝥素酸镁的抗肿瘤实验,为其进一步深入开发利用这一宝贵昆虫资源提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 斑蝥素酸镁由自制斑蝥素合成,制备方法已授权国家发明专利 (李晓飞, 2013)。

1.1.2 肝癌细胞株 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国科学院细胞库。

1.1.3 实验动物 BALB/C 裸鼠, 4 周龄, 体重 15~17 g, 雄性, 购于重庆腾鑫生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2009-0004; 在遵义医学院实验动物中心 SPF 级条件下饲养, 动物实验室合格证号: SYXK (黔) 2011-003。

1.1.4 试剂 RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司; 南美胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 HYCLONE 公司; 磺酰罗丹明 (SRB) 购自美国 Sigma 公司; GenMed 细胞周期流式细胞分析试剂盒购自上海杰美基因医药有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、Hoechst33342 染液购自碧云天生物技术有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.1.5 主要仪器 3131 型 CO₂ 培养箱、Multiskan spectrum 全波长酶标仪, 美国 Thermo 公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; FACS Calibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; Nikon YS100 光学显微镜, 日本 Nikon 公司; 细胞图像分析系统, 德国 Leica 公司; H-7650 型透射电镜, 日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞的培养 人肝癌细胞 SMMC-7721 采用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清) 37℃、5% CO₂ 培养。待细胞长至对数生长期, 弃去培养液, PBS 冲洗, 0.25%胰蛋白酶消化, 加培养液吹打均匀成单细胞悬液, 取 100 μL 细胞悬液(8 000 个细胞)接种于 96 孔培养板, 于 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 磺酰罗丹明(Sulforhodamine B, SRB)染色法(Vanicha and Kanyawin, 2006) 平行接种人肝癌细胞 SMMC-7721 于两块 96 孔板, 一块为对照板(T₀), 另一块为实验板。CO₂ 培养箱中培养 20 h 后, 将对照板(T₀)取出, 用预冷的 50%三氯乙酸(TCA)固定, 待测。实验板中分别加入不同浓度的斑蝥素酸镁(终浓度分别是 1.25、1.67、2.09、2.50、2.92 μmol/L), 并设实验组(T), 空白对照组(C), 溶剂对照组(纯水), 每组设 5 个复孔, 继续培养 48 h 后取出培养板, 以预冷 50% TCA 固定(终浓度为 10%), 1 h(4℃)后以去离子水冲洗, 自然晾干, 用 100 μL 0.4%的 SRB 染色, 10 min 后用 0.1%醋酸冲洗、晾干, 最后用 200 μL 10 mmol/L 的缓冲 Tris 碱液(pH 10.5)溶解, 在酶标仪上选择 530 nm 处测吸光度值(OD 值), 按照下列公式计算生长抑制率。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = \left[1 - \frac{\text{OD}(T) - \text{OD}(T_0)}{\text{OD}(C) - \text{OD}(T_0)} \right] \times 100\%$$

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率 取对数生长期的人肝癌细胞 SMMC-7721, 将其制备成单个细胞悬液。取 25 cm² 培养瓶, 加入细胞悬液 2 mL, 放入 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 20 h。再加入配置好的斑蝥素酸镁, 药物终浓

度为 1/2 IC₅₀、IC₅₀。实验做 3 个重复, 同时设置空白对照组。将培养瓶继续放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。按照 GenMed 细胞周期流式细胞分析试剂盒操作, 流式细胞仪测定细胞中 DNA 含量, 将细胞周期各时相区分为 G₀/G₁ 期, S 期和 G₂/M 期, 并通过 Flow Jo 软件计算细胞周期各时相的百分率。细胞凋亡采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, Annexin V-FITC 是 FITC 标记, 该荧光标记通过 FL1 通道。PI 是通过 FL2 通道。凋亡结果是流式细胞仪自带收集软件收样后根据单标划分象限进行分析。

1.2.4 Hoechst33342 染色观察斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 形态的影响 接种细胞于有盖片的 6 孔板中(细胞数为 2 × 10⁵ 个/mL, 1 000 μL/孔), 37℃、5% CO₂ 培养 20 h 后弃上清, 再加入配置好的斑蝥素酸镁, 药物终浓度为 1/2 IC₅₀、IC₅₀, 对照组加等量的培养基, 各组设 3 个平行孔。培养 48 h 后弃培养基, PBS 洗一遍, 风干加 4%多聚甲醛固定 15 min, 弃固定液, PBS 洗一遍, 分别加 Hoechst33342 染色液 1 mL 避光染色 20~30 min, 弃染色液, PBS 洗一遍, 立即至荧光显微镜下观察细胞凋亡并拍照。

1.2.5 透射电镜观察斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 超微结构的变化 于一次性塑料培养瓶中接种细胞悬液(细胞浓度为 2 × 10⁶ 个/mL, 4 mL/瓶), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。20 h 后弃上清, 再加入配置好的斑蝥素酸镁, 药物终浓度为 IC₅₀, 对照组加等量的培养基。培养 48 h 后收集细胞, 2 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清后加入 2.5%戊二醛固定, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 再用 1%锇酸固定 1 h。用梯度丙酮脱水, Epon 812 浸透、包埋, 制作超薄切片。以醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染法染色, 上机观察。

1.2.6 人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型的建立 取对数生长期的人肝癌细胞 SMMC-7721, PBS 洗 2 次, 用 0.25%胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 镜下计数。生理盐水调整细胞密度为 1 × 10⁷/mL, 每只取 0.2

mL 接种于裸鼠腋窝皮下, 建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型。

1.2.7 实验动物分组及给药 实验随机分为两组, 分别为生理盐水组 ($n=5$)、斑蝥素酸镁组 ($n=5$)。待移植瘤体积大小约 $150\sim 250\text{ mm}^3$ 开始用药, 以每只裸鼠 $6.26\times 10^{-5}\text{ mmol}$ 剂量的斑蝥素酸镁进行瘤周注射, 对照组给予相同容积的无菌生理盐水瘤周注射, 注射隔日一次, 共计 11 次。

1.2.8 观察裸鼠皮下移植瘤生长情况 用药后每日观察肿瘤生长情况, 并且每 5 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径 (a) 及短径 (b), 计算肿瘤体积。计算公式为体积 (V)= $a\times b^2/2$ 。末次给药 24 h 后处死全部裸鼠, 剥离瘤块, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干后称重, 计算抑瘤率。抑瘤率 (%)=(对照组平均瘤重-用药组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.9 TUNEL 法检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织细胞凋亡 按 TUNEL 试剂盒的说明操作, 光学显微镜下观察, 凋亡的细胞其细胞核为棕褐色, 正常细胞核为蓝色, 每张切片随机选择 5 个高倍镜视野, 细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.10 统计学分析 数据用 SPSS 13.0 软件包进行单因素方差分析及 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖抑制作用

从表 1 可知, 不同浓度的斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 的生长均有明显的抑制作用。且斑蝥素酸镁对其生长抑制作用在 $1.25\sim 2.92\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内呈剂量依赖性, 随着浓度增加, 抑制效果愈加明显。以斑蝥素酸镁浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标作回归曲线, 得方程 $y=87.085\ln(x)-0.9405$ ($R^2=0.9844$)。经计算并换算得到半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $1.79\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响 ($n=5$)

Table 1 Effect of magnesium cantharidate on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 ($n=5$)

组别 Group	斑蝥素酸镁 浓度 Magnesium cantharidate concentration ($\mu\text{mol/L}$)	OD 值 OD value	抑制率 Inhibition Rate (%)
空白对照组 The blank control group (C)	—	1.68 ± 0.05	—
对照板 Control board (T_0)	—	0.38 ± 0.03	—
溶剂对照 组 Solvent control group	—	1.67 ± 0.03	0.8
实验组 The experimental group(T)	1.25	$1.40\pm 0.03^*$	21.3
	1.67	$1.18\pm 0.06^*$	38.3
	2.09	$0.86\pm 0.04^*$	63.4
	2.50	$0.61\pm 0.05^*$	82.7
	2.92	$0.51\pm 0.03^*$	91.0

表中的数据为平均值 $\pm$ SD, 数据后标有*表示与空白对照组比较差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

Data are mean $\pm$ SD, with * indicate significantly different compared with the blank control group ($P<0.05$). The same below.

2.2 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期分布的影响

通过流式细胞仪测定细胞中 DNA 结合染料程度, 来定量 DNA 含量, 可以将细胞周期各时相区分为 G_0/G_1 期, S 期和 G_2/M 期, 并通过 Flow Jo 软件计算细胞周期各时相的百分率。由表 2 和图 1 结果可知, 与空白对照组比较, 人肝癌细胞 SMMC-7721 在斑蝥素酸镁的作用下 G_0/G_1 期的细胞减少, G_2/M 期细胞增加, 细胞出现 G_2/M 期阻滞。

2.3 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI) 染色后,

正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色(图 2 左下角) ; 凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色 , 碘化丙啶染色呈阴性(图 2 右下角) ; 坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和碘化丙啶染色(图 2 右上角)。左上角出现的是许可范围内的检测误差。如图 2 所示 , 细胞凋亡率随斑蝥素酸镁药物浓度加大而逐渐增加。凋亡率从空白对照组的 0.73 ± 0.21) %

表 2 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC- 7721 细胞周期的影响 ($n= 3$)
Table 2 Effect of magnesium cantharidate on the cell cycle of hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 ($n= 3$)

组别 Group	药物浓度 Drug concentration ($\mu\text{mol/L}$)	静息期/DNA 合成前期) G_0/G_1 (%)	DNA 合成期 S (%)	DNA 合成后期/细胞分裂期 G_2/M (%)
空白对照组 The blank control group	0	59.16 ± 4.43	30.47 ± 2.35	10.38 ± 2.09
实验组 The experimental group	0.90	$52.68\pm 0.69^*$	30.75 ± 0.92	$17.91\pm 1.16^*$
	1.79	$30.02\pm 2.06^*$	30.93 ± 3.30	$39.05\pm 3.71^*$

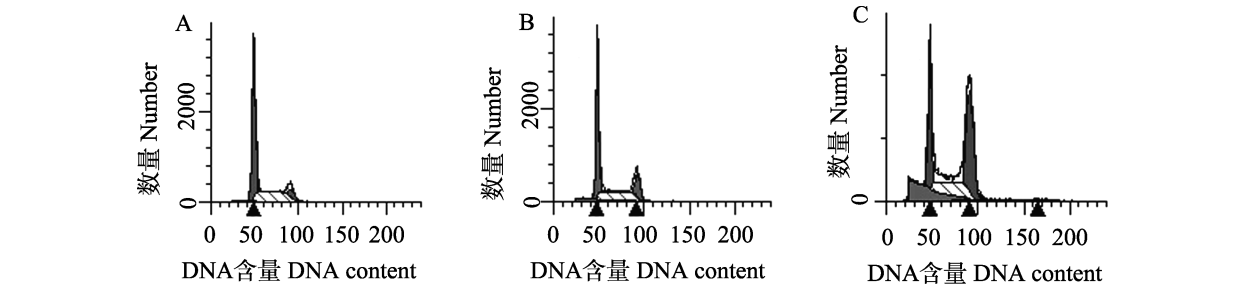


图 1 斑蝥素酸镁对人肝癌 SMMC-7721 细胞 DNA 含量的影响
Fig. 1 Effect of magnesium cantharidate on the DNA content of hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721
A. 空白对照组 ; B. 实验组 ($0.90\ \mu\text{mol/L}$) ; C. 实验组 ($1.79\ \mu\text{mol/L}$) 。
A. The blank control group; B. Experimental group ($0.90\ \mu\text{mol/L}$) ; C. Experimental group ($1.79\ \mu\text{mol/L}$) .

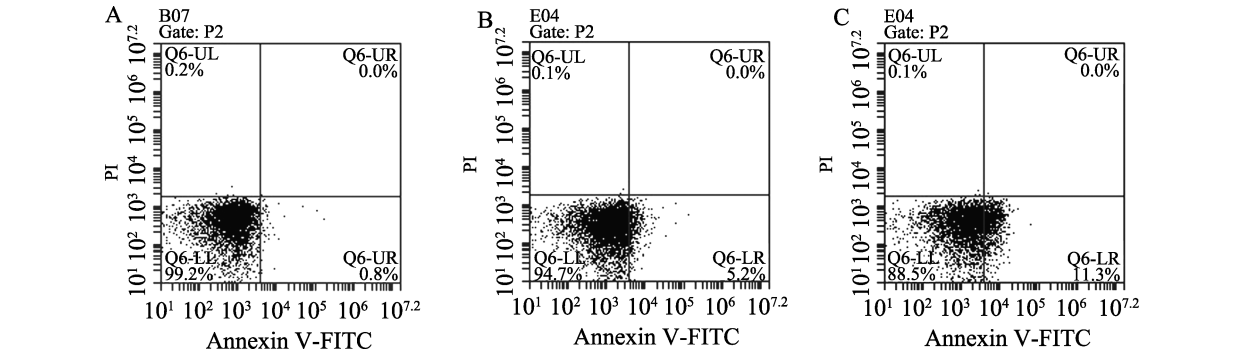


图 2 流式细胞术检测不同浓度斑蝥素酸镁诱导 SMMC -7721 细胞凋亡
Fig. 2 The SMMC-7721 cells apoptosis induced by magnesium cantharidate at different concentrations with flow cytometry
A. 空白对照组 ; B. 实验组 ($0.90\ \mu\text{mol/L}$) ; C. 实验组 ($1.79\ \mu\text{mol/L}$) 。
A. The blank control group; B. Experimental group ($0.90\ \mu\text{mol/L}$) ; C. Experimental group ($1.79\ \mu\text{mol/L}$) .

增至 IC_{50} 浓度时的 $(11.0 \pm 1.28) \%$ ($P < 0.05$)。

2.4 Hoechst33342 染色观察斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 形态的影响

荧光显微镜下观察 空白对照组 SMMC-7721 细胞形态呈梭形, 细胞生长密集, 数量多, 细胞核呈弥散、微弱、均匀荧光。斑蝥素酸镁作用后细胞数量逐渐减少, 无正常细胞形态, 细胞核固缩、致密浓染呈强蓝色荧光 (图 3)。

2.5 透射电镜观察斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 超微结构的变化

空白对照组肝癌细胞表面有突起, 核质比正

常, 核膜核仁清晰。1.79 $\mu\text{mol/L}$ 斑蝥素酸镁作用于肝癌细胞后, 细胞核异形、染色质聚集成团、边集, 见一个出芽后的凋亡小体, 内含粗面内质网和核染色质以及均质的胞质 (图 4)。

2.6 对裸鼠皮下移植瘤的抑制作用

从图 5 可知, 各组用药前裸鼠瘤块体积无差异 ($P > 0.05$)。用药后第 5、10、15、20 天斑蝥素酸镁组瘤块体积明显小于生理盐水组 ($P < 0.05$)。末次给药 24 h 后, 剥离瘤块, 移植瘤离体观见图 6, 用分析天平进行称重, 结果显示 (图 7), 斑蝥素酸镁组肿瘤重量显著小于生理盐水

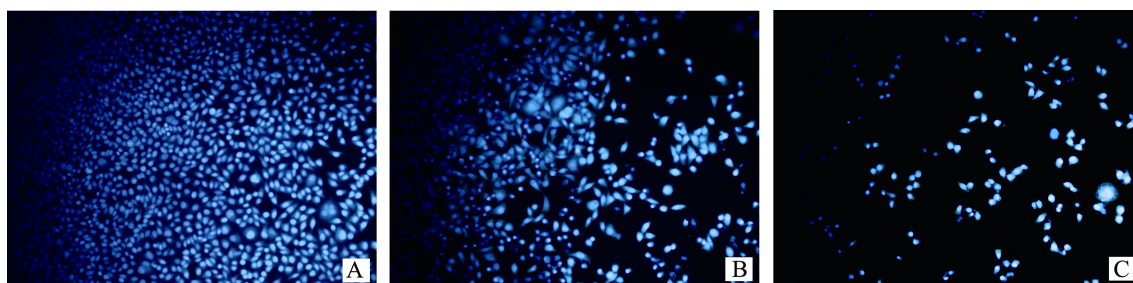


图 3 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 形态的影响 (Hoechst33342 染色 $\times 200$)

Fig. 3 Effect of magnesium cantharidate on the cellular morphology of hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 (Hoechst33342 staining $\times 200$)

空白对照组; B. 实验组 (0.90 $\mu\text{mol/L}$); C. 实验组 (1.79 $\mu\text{mol/L}$)。

A. The blank control group; B. Experimental group (0.90 $\mu\text{mol/L}$); C. Experimental group (1.79 $\mu\text{mol/L}$).

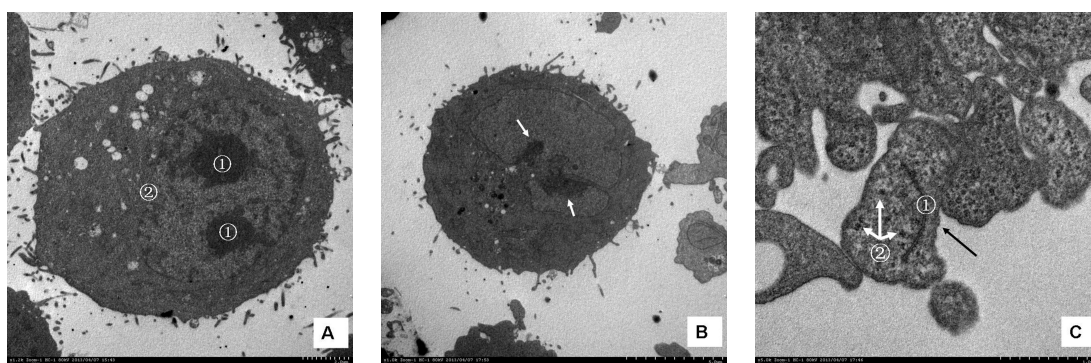


图 4 斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 超微结构的变化

Fig. 4 The ultra-structural changes of magnesium cantharidate on hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721

A. 空白对照组, ①核仁, ②核膜; B. 实验组 (1.79 $\mu\text{mol/L}$), 箭头示染色质聚集成团、边集;

C. 实验组 (1.79 $\mu\text{mol/L}$), 箭头示凋亡小体 ①粗面内质网, ②核染色质。

A. The blank control group, Nucleolus, Nuclear membrane; B. Experimental group (1.79 $\mu\text{mol/L}$) arrows show gathered chromatin on the nuclear edge; C. Experimental group (1.79 $\mu\text{mol/L}$), arrows show apoptotic body ① Rough endoplasmic reticulum, ②Chromatin.

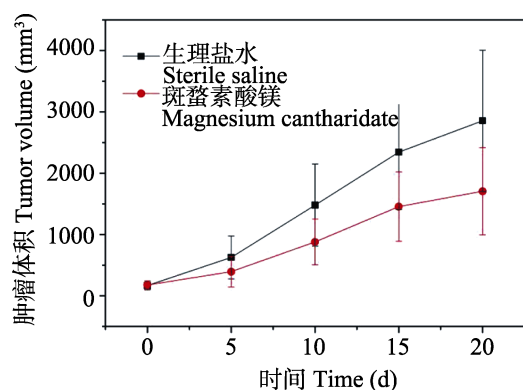


图 5 裸鼠皮下移植瘤生长曲线图

Fig. 5 The growth curve diagram of subcutaneous transplatation tumor in nude mice

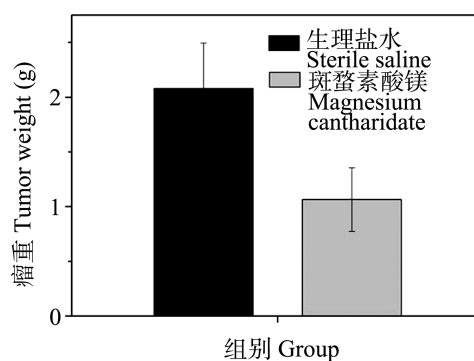


图 7 裸鼠移植瘤块平均重量

Fig. 7 The average weight of the transplatation tumor in nude mice



图 6 末次给药后移植瘤离体照片

Fig. 6 The photograph of the transplatation tumor in vitro after administration with the drug at last

A. 斑蝥素酸镁组; B. 生理盐水组。

A. Magnesium cantharidate group; B. Sterile saline group.

组 ($P < 0.05$), 抑瘤率为 49%。表明斑蝥素酸镁能明显抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤的生长。

2.7 TUNEL 检测结果

凋亡的细胞其细胞核为棕褐色, 正常细胞核为蓝色。与生理盐水组比较 (图 8:A), 斑蝥素酸镁组移植瘤组织 TUNEL 染色凋亡细胞数量增多 (图 8:B)。经计算斑蝥素酸镁组细胞凋亡率为 37.9%, 与生理盐水组细胞凋亡率 12.6% 比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=92.609$, $P=0.000$)。

3 讨论

斑蝥素酸镁是作者课题组在斑蝥素存在形式研究的基础上, 自主创新合成的一种斑蝥素新型盐类衍生物。采用 SRB 法检测结果表明斑蝥素酸镁对肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显的抑制

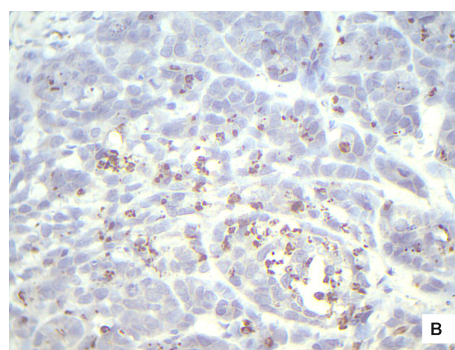
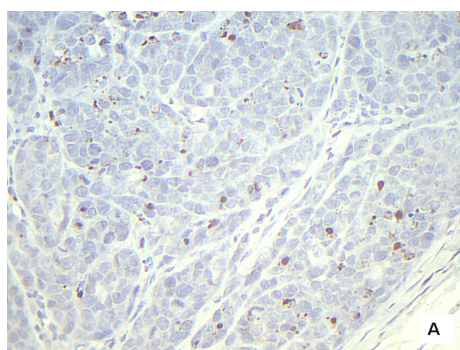
图 8 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤细胞凋亡的影响 ($\times 400$)

Fig. 8 Effect of magnesium cantharidate on the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 subcutaneous transplatation tumor in nude mice

A. 生理盐水组; B. 斑蝥素酸镁组。

A. Sterile saline group; B. Magnesium cantharidate group.

作用,且随着浓度的增加抑制率逐渐增加,呈剂量依赖关系。在此基础上,课题组进一步采用流式细胞术检测斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期的影响,结果显示:斑蝥素酸镁作用 SMMC-7721 肝癌细胞后, G_2/M 期细胞明显增加。这与桂尤胜等(2004)发现斑蝥酸钠能将 BEL-7402 肝癌细胞生长阻滞在 G_2/M 期的结果一致。在细胞周期调控中, G_2/M 期是细胞增殖的主要调控点。 G_2 期向 M 期的转变涉及到细胞分裂,包括胞质分裂和核分裂,完成一个细胞向两个细胞的转化(Heerdt *et al.*, 2000)。对于肿瘤细胞,由于其增殖能力极强,对 G_2/M 期阻滞显得更为重要。实验中 SMMC-7721 肝癌细胞出现了 G_2/M 期阻滞,提示斑蝥素酸镁能干预 SMMC-7721 肝癌细胞的周期变化,使细胞分裂期发生阻滞,从而减慢细胞的增殖速率。

King 和 Cidlowski (1995) 报道阻断细胞增殖周期进程可引起细胞凋亡,而细胞凋亡也常伴随有生长阻滞,细胞周期和细胞凋亡密切相关。有报道认为药物引起肿瘤细胞周期阻滞,修复成功的细胞向分化方面发展,继续进入增殖周期,不能修复者则进入凋亡途径(袁静萍等, 2004)。王浴生(1983)研究表明,斑蝥素能影响细胞周期的进程,促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖。研究表明斑蝥素能够影响细胞周期进而通过抑制蛋白磷酸酶 2A 诱导细胞凋亡(Zhang *et al.*, 2010)。因此,实验在发现 SMMC-7721 肝癌细胞出现 G_2/M 期阻滞的基础上,进一步探讨斑蝥素酸镁是否引起肝癌细胞发生凋亡。基于 Annexin V-FITC 染色的流式细胞检测结果显示:人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡率随斑蝥素酸镁浓度加大而逐渐增加。同时结合形态学检测,观察到典型的细胞凋亡的形态学改变。以上实验结果提示,斑蝥素酸镁在体外可诱导肝癌细胞 SMMC-7721 发生凋亡,并且凋亡与细胞分裂期阻滞有关。

体外抗肿瘤活性实验证实斑蝥素酸镁能明显抑制肝癌细胞的生长,但体外和体内环境存在很大的差异,进一步进行体内实验将有助于明

确斑蝥素酸镁的抗肿瘤效应。体内实验结果表明,斑蝥素酸镁组的移植瘤体积、重量明显小于生理盐水对照组;且斑蝥素酸镁组移植瘤组织的细胞凋亡率(TUNEL 法)明显高于生理盐水组,提示斑蝥素酸镁可明显抑制裸鼠肝癌皮下移植瘤的增殖并能诱发其发生细胞凋亡,具有很好的开发潜能。

参考文献 (References)

- Heerdt BG, Houston MA, Mariadason JM, Auquenlicht LH, 2000. Dissociation of staurosporine-induced apoptosis from G_2-M arrest in SW620 human colonic carcinoma cells: initiation of the apoptotic cascade is associated with elevation of the mitochondrial membrane potential($\Delta\psi$). *Cancer Res.*, 60(23): 6704–6713.
- King KL, Cidlowski J, 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *Cell Biochem.*, 58(2): 175–180.
- Li W, Xie L, Chen Z, Zhu Y, Sun YJ, Miao Y, Xu ZK, Han X, 2010. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G_2/M cell-cycle arrest and apoptosis. *Cancer Science*, 101: 1226–1233.
- Vanicha V, Kanyawin K, 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3): 1112.
- Zhang C, Peng Y, Wang F, Tan X, Liu N, Fan S, Wang D, Zhang L, Liu D, Wang T, Wang S, Zhou Y, Su Y, Cheng T, Zhuang Z, Shi C, 2010. A synthetic cantharidin analog for the enhancement of doxorubicin suppression of stem cell-derived aggressive sarcoma. *Biomaterials*, 31(36): 9535–9543.
- Gui YS, Cao XY, Chen J, 2004. Experimental study of human hepatocellular carcinoma cells apoptosis induced with sodium cantharidate in vitro. *Medical Journal of Wuhan University*, 25(5): 493–496. [桂尤胜, 曹献英, 陈筠, 2004. 斑蝥酸钠体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. 武汉大学学报(医学版), 25(5): 493–496.]
- Li XF, Chen XS, Wang XM, Hou XH, 2007. Contents and existing forms of cantharidin in Meloidae (Coleoptera). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 750–754. [李晓飞, 陈祥盛, 王雪梅, 侯晓晖, 2007. 芫菁体内斑蝥素的含量及存在形式. 昆虫学报, 50(7): 750–754.]
- Li XF, Cao S, Lou FM, Yan R, Hou XH, Zhang H, Liu Y, 2013. Inhibitory Effect of bound cantharidin extracted from meloids *Mylabris cichorii* on the proliferation of cell SGC-7901. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 25(7): 963–966. [李晓飞, 曹嵩, 娄方明, 晏容,

- 侯晓晖, 张恒, 刘云, 2013. 芫菁体内结合斑蝥素对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用. *天然产物研究与开发*, 25(7): 963–966.]
- Li XF, Lou FM, Yan R, Hou XH, Zhang H, Liu Y, 2013. Inhibitory effect on human hepatoma QGY-7703 cell exposed to three kinds of cantharidate. *Chinse Journal of Gerontology*, 33(3): 2049–2050. [李晓飞, 娄方明, 晏容, 侯晓晖, 张恒, 刘云, 2013. 三种斑蝥素盐类物质对肝癌 QGY-7703 细胞生长的抑制作用. *中国老年学杂志*, 33(3): 2049–2050.]
- Li XF, 2013. Magnesium cantharidate and its preparation method: chinse, ZL201110149288.5.2013-04-17. [李晓飞, 2013.. 斑蝥素酸镁及其制备方法: 中国, ZL201110149288.5.2013-04-17.]
- Liu Y, Hu SS, Lou FM, Zhu XT, Yan R, Hou XH, Li XF, 2013. Inhibitory effect of magnesium cantharidate on proliferation of lung adenocarcinoma. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 24(1): 26–28. [刘云, 胡姗姗, 娄方明, 朱欣婷, 晏容, 侯晓晖, 李晓飞, 2013. 斑蝥素酸镁对肺癌细胞增殖的抑制作用. *时珍国医国药*, 24(1): 26–28.]
- Wang YS, 1983. Chinese herbal drug pharmacology and application. Beijing: People's Medical Publishing House. 1113. [王浴生, 1983. 中药药理与应用. 北京: 人民卫生出版社. 1113.]
- Yuan JP, Ling H, Zhang MX, Liu Y, He J, Su Q, 2004. Study of gastric carcinoma MGC-803 cells apoptosis and cycle arrest induced with dially disulfide. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 20(3): 299–302. [袁静萍, 凌晖, 张孟贤, 刘瑶, 何洁, 苏琦, 2004. 二烯丙基二硫诱导人胃癌 MGC-803 细胞凋亡及细胞周期阻滞的研究. *中国药理学通报*, 20(3): 299–302.]