

重楼皂苷 II 对人皮肤鳞状细胞癌细胞 A431 增殖的影响

姜福琼, 王晓琼, 刘馨, 张佩莲, 周晓鸿, 王文芳, 毕云凤
(昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究重楼提取物单体重楼皂苷 II 在体外对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞增殖的影响. **方法** 采用 MTT 法检测重楼皂苷 II 对体外培养的 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞株增殖的影响; 透射电镜观察细胞超微结构的变化; 采用流式细胞术检测重楼皂苷 II 干预后 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞增殖周期变化的情况. **结果** 重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖有明显的抑制作用, 重楼皂苷 II 对 A431 细胞增殖的抑制作用呈现出浓度依赖性和时间依赖性 ($P < 0.05$). 与此同时, 重楼皂苷 II 引起皮肤鳞状细胞癌细胞 A431 的超微结构发生变化, 并将 A431 皮肤鳞状细胞癌细胞周期阻滞于 S 期 ($P < 0.05$). **结论** 重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌有潜在的抗癌作用, 可能是通过对皮肤鳞状细胞癌细胞周期的阻滞及引起细胞凋亡而发挥作用.

[关键词] 皮肤鳞状细胞癌; 重楼皂苷 II; 中药

[中图分类号] R739 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 12-0021-04

Effect of Polyphyllin II on A431 Human Squamous-cell Carcinoma Cells

JIANG Fu-qiong, WANG Xiao-qiong, LIU Xin, ZHANG Pei-lian, ZHOU Xiao-hong, WANG Wen-fang,
BI Yun-feng

(The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the potential effects of polyphyllin II (PP II) on A431 human squamous-cell carcinoma cells. **Methods** Human squamous cell carcinoma cell line A431 were cultured with or without PP II. The cell proliferation was measured by MTT assay. The change of cell morphology was observed by transmission electron microscopy. The change of cell cycles was measured by flow cytometry. **Results** The proliferation of A431 human squamous-cell carcinoma cells was significantly inhibited by PP II with dose- and time-dependent manners. The ultrastructure changes of A431 cells were observed. The cell cycles of A431 human squamous-cell carcinoma cells were arrested in S phase. **Conclusion** Polyphyllin II have potentially anticancer effect on A431 human melanoma cells in vitro. Inducing the cell cycle arresting and apoptosis of cells may be the potential mechanisms.

[Key words] Squamous-cell carcinoma; Polyphyllin II; Chinese medicine

皮肤鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 是一种恶性肿瘤, 来源于表皮角质形成细胞, 是最常见的皮肤恶性肿瘤之一. 皮肤鳞癌的发生与紫外线辐射密切相关, 日光中的紫外线, 主要是中波紫外线是引起皮肤鳞状细胞癌发生的主要环境因素之一, 随着环境污染、臭氧层破坏加重, 其发病率近年来呈逐年上升的趋势, 皮肤

鳞状细胞癌病情发展较快, 对组织的破坏性大, 同时可发生淋巴结转移, 晚期可出现内脏转移, 逐渐发展成为威胁人类健康的主要皮肤肿瘤^[1-3]. 皮肤鳞癌的防范与治疗也随之越来越受人们关注^[4]. 皮肤鳞状细胞癌的治疗目前仍以手术治疗最多, 但是, 临床病例中有些不适合手术治疗的, 或某些术后需要预防复发的患者, 采用非手术的治疗方

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2013C248)

[作者简介] 姜福琼 (1976~), 女, 云南昭通市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事皮肤科临床及研究工作.

[通讯作者] 王晓琼. E-mail: 1098710416@qq.com

法就很有必要,因此,研究有效的抗皮肤鳞状细胞癌的药物就具有重要意义^[9]。其中,中医药对皮肤鳞状细胞癌的治疗作用和优势也越来越受到医学工作者的重视^[6,7]。

重楼在我国有悠久的药用历史,2000 版《中华人民共和国药典》规定药材重楼为云南重楼和七叶一枝花的干燥根茎。在祖国传统中医学中,重楼常被用于治疗肿瘤的方剂中,用于多种肿瘤的治疗,例如直肠癌、肺部肿瘤、宫颈癌等,但具体机制尚不清楚^[8-15]。随着现代化学工艺的发展,目前已可以从重楼属植物中分离提纯出 80 余种化合物,并对其结构进行了鉴定,研究发现甾体皂苷是重楼的主要成分,也是主要活性物质,占总化合物的 70% 以上,重楼皂苷 II 是重楼甾体皂苷的主要组分之一^[16,17]。本试验采用体外实验研究重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株

A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞株购自上海蔚通实业有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

重楼皂苷 II 惠赠于中科院昆明植物所(图 1)。MTT(二甲基噻唑二苯基四唑盐,AMRESCO 生产),DMSO(二甲基亚砜)、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液购自 Sigma 公司,胎牛血清、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、RPMI1640 购自美国 GIBCO 公司。生物安全柜(美国 Thermo 公司),紫外分光光度仪(美国 BIO-RAD 公司)、酶标仪(BIO-RAD 公司生产,680 型),液氮罐(美国 Thermo 公司),超低温冰箱(Thermo705: 美国 Thermo),细胞培养瓶及培养板(美国 Coning 公司)、台式离心机(美国 Thermo)、CO₂ 培养箱(美国 Thermo)、温浴振荡器(STARFAX2200, 美国 AWERESS)、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司生产,IX-7 型),流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司),注射用顺铂针剂(昆明贵研药业有限公司)。

1.3 A431 细胞的培养

使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞进行培养,置于湿度为 95%、温度为 37℃、含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞保存于液氮罐或 -70℃ 冰箱。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

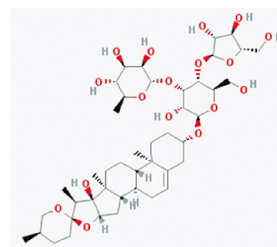


图 1 重楼皂苷 II 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of polyphyllin II
重楼皂苷 II 的化学为 diosgenin-3-O- α -L-rha-(1-2)-[α -L-are-(1-)- β -D-glu 分子量为 871.02D,分子式为 C₄₄H₇₀O₇(C₁D₇1307459)

将对数期生长的 A431 细胞使用胰酶消化,终止消化后制成单细胞悬液,接种到 96 孔板(4 × 10³ 孔),96 孔板置于恒温培养箱中培养 24 h,移除培养液,加入含不同浓度的重楼皂苷 II(0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ mol/L)的完全培养液,置于恒温培养箱中继续培养 24 h、48 h 和 72 h,检测各孔的吸光值。阴性对照:未用药组。阳性对照:注射用顺铂组。空白对照:二甲基亚砜、培养液、药物溶解介质、MTT。细胞增殖抑制率(%)采用公式进行计算:

$$\text{公式} = 1 - \frac{\text{用药组 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}} \times 100\%$$

实验重复 3 次。

1.5 电镜观察重楼皂苷 II 对细胞超微结构的影响

常规培养人 A431 皮肤鳞状细胞癌细胞后,加入重楼皂苷 II 后培养 24 h、48 h,使用胰酶消化,试管收集细胞,采用浓度为 3.5% 的戊二醛固定液固定后,使用乙醇、丙酮进行梯度脱水,获得的细胞团块采用环氧树脂 618 进行渗透、包埋,之后半薄切片,光镜定位,修块,使用 Leica-R 超薄切片机进行切片,染色方法采用柠檬酸铅-醋酸铀双染色法,细胞的超微变化采用 JEM-1011 透射电镜进行观察。

1.6 流式细胞术检测 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞周期的变化情况

将处于对数生长期的人 A431 皮肤鳞状细胞癌细胞制成细胞悬液,按每孔 5 × 10⁴ 的浓度接种到无菌 6 孔细胞培养板,继续放置于恒温培养箱中孵育 24 h(湿度 100%, 温度 37℃, CO₂ 浓度为 5%)。加入浓度分别为 0, 1, 2, 4, 8 μ mol/L 的重楼皂苷 II 恒温培养箱中继续培养 24 h,之后采用流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学分析。方差齐性检验采用 Levene 检验,计量资料数据采用均数 ± 标

准差 ($\bar{x} \pm s$), 依据方差齐性不同分别采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验和 Mann-Whitney U 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 重楼皂苷 II 抑制 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖

实验中应用 MTT 法检测了不同浓度 (0, 1, 2, 4, 8, 16 和 32 $\mu\text{mol/L}$) 的重楼皂苷 II 在 24 h、48 h、72 h 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞的抑制作用, 生长抑制率见表 1. 重楼皂苷 II 浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时对 A431 皮肤鳞状细胞癌细胞的生长呈现出明显抑制作用, 与对照组相比, 其对肿瘤细胞的抑制率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这种抑制作用表现出明显的浓度依赖性和时间依赖性.

2.2 电镜观察重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞超微结构的影响

A431 人皮肤鳞状细胞癌电镜图 (图 2-A) 重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞后 24 h 见到部分细胞体积缩小, 部分区域胞浆浓缩, 溶酶体增多, 细胞核膜皱缩, 染色质成块状, 图片中可以见到细胞核溶解、核碎裂, 细胞呈现出凋亡现象 (图 2-B). 作用 48 h 时电镜观察见到细胞形态不一致, 核碎裂、溶解, 可见出泡现象及凋亡小体形成现象 (图 2-C).

2.3 重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞周期的影响

采用不同浓度的重楼皂苷 II (0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞后 24 h 用流式细胞仪检测, 结果可见使用重楼皂苷 II 作用后, 细胞周期被阻滞于 S 期 (图 3).

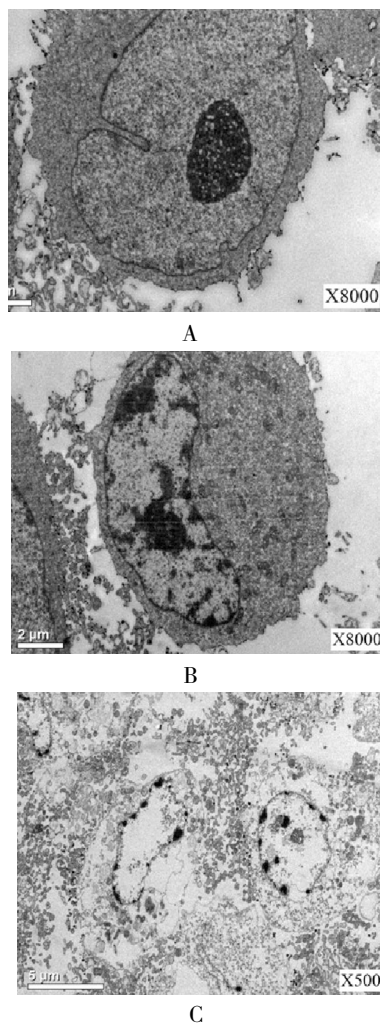


图 2 重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞超微结构的影响

Fig. 2 The effect of polyphyllin II on the ultrastructure of A431 cells

A: 对照组 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞; B: 重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞 24 h; C: 重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞 48 h.

表 1 重楼皂苷 II 对 A431 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 The effect of polyphyllin II on the growth inhibition of A431 cells ($\bar{x} \pm s$)

PP I ($\mu\text{mol/L}$)	生长抑制率		
	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
1	2.01 \pm 1.01	3.59 \pm 1.97	6.21 \pm 2.59
2	4.09 \pm 1.82	5.97 \pm 1.13	7.99 \pm 1.82
4	13.35 \pm 2.87*	23.82 \pm 3.54* Δ	34.23 \pm 4.27* Δ
8	20.01 \pm 4.22*	43.56 \pm 5.28* Δ	57.42 \pm 6.01* Δ
16	40.16 \pm 5.12*	58.01 \pm 6.31* Δ	73.44 \pm 4.16* Δ
32	56.16 \pm 4.39*	75.29 \pm 6.33* Δ	88.32 \pm 7.32* Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与用药 24 h 组比较, $\Delta P < 0.05$.

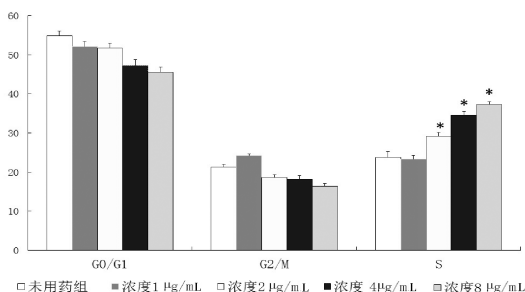


图 3 重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞周期的影响 (%)

Fig. 3 The effect of polyphyllin II on the cell cycles of A431 cells (%)

与对照组相比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

皮肤癌是发生于皮肤的恶性肿瘤,临床上主要分为鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)、基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)和恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)。中医认为皮肤鳞癌主要由肝火血燥生风、风毒相搏,或疮疡溃后风寒袭于患处,导致气血壅滞,营卫稽留而引起。西医认为皮肤鳞癌的发生与遗传、紫外线照射、高强度的 X 射线、吸烟、饮食、免疫抑制药物及人乳头瘤病毒(HPV)感染有关^[1,2]。现代医学治疗皮肤鳞癌主要采用传统外科切除的方法,现在也使用 Mohs 外科切除手术法、光动力疗法、放疗、生物治疗、化疗等不同方法^[3]。这些方法在治疗的同时也在一定程度损伤了正常组织。而中医擅长维持机体阴阳平衡,调节人体内环境、培护正气、从而减轻治疗副反应。近年来,中西医结合治疗皮肤鳞癌取得一定的进展,中药外治法能直接消散局部癌肿、治疗后不留疤痕、不影响美观,但是其抗肿瘤作用的机理不是很清楚^[4]。

评价药物是否有抗肿瘤作用的重要标准之一是抑制肿瘤细胞的异常增殖的能力情况。本研究采用体外实验研究重楼皂苷 II 对皮肤鳞状细胞癌细胞 A431 的影响,观察其对 A431 的作用。实验中运用了传统的 MTT 法检测重楼皂苷 II 对 A431 皮肤鳞状细胞癌细胞增殖的作用后见到重楼皂苷 II 对 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖有抑制作用,这种作用表现出明显的浓度依赖性和时间依赖性。研究中见到重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞后,采用透射电镜观察到细胞体积变小,细胞浆内出现空泡、细胞质浓缩、细胞核膜皱缩、细胞核裂解为碎块,染色质成块状,产生凋亡小体等一系列的形态学变化。

药物的干预可能造成细胞 DNA 损伤和(或)DNA 复制缺陷,细胞周期就会停滞于某一期,如果细胞周期不能及时进行修复,那么细胞的增殖就会受到药物的抑制,进一步引发细胞凋亡的出现^[5]。本研究中,重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞后,引起细胞周期阻滞于 S 期,并随着重楼皂苷 II 浓度的升高,这种阻滞作用更加明显。因此,重楼皂苷 II 作用于 A431 人皮肤鳞状细胞癌细胞后引起停留于 S 期的 A431 细胞大量增加,停留 S 期后细胞功能没有得到修复,细胞增殖受抑制,细胞生长受阻,进而发挥了重楼皂苷 II 抗

皮肤鳞癌的作用。另一方面细胞周期的阻滞亦可引起细胞出现凋亡,这也是重楼皂苷 II 发挥抗人皮肤鳞癌作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] 蒋小云,肖风丽. 紫外线与皮肤癌[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2013,29(1):28-30.
- [2] 刘正超. 紫外线致皮肤光损伤皮肤癌的机制[J]. 大家健康(学术版),2014,8(4):156-157.
- [3] 朱云,程咏,李爱民,等. 非阿司匹林类非甾体抗炎药与皮肤癌发病风险:Meta分析[J]. 肿瘤防治研究,2014,41(8):897-901.
- [4] 魏国清,耿耘. 近年来中医药治疗皮肤癌的研究概况[J]. 中华中医药学刊,2014,32(2):269-270.
- [5] 刘兴禄. 氨基酮戊酸光动力疗法治疗90例皮肤癌及癌前病变的临床观察[J]. 中国肿瘤临床与康复,2013,20(11):1257-1259.
- [6] 贲芝雯,张海湃,苏永华,等. 皮肤癌的中药外治法[J]. 中医外治杂志,2012,21(1):47-49.
- [7] 曾红,陈德宇. 皮肤癌的中西医结合治疗进展[J]. 四川中医,2015,33(3):187-189.
- [8] 何含杰,章怀云,陈丽莉,等. 重楼皂苷的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中药材,2014,37(3):527-530.
- [9] 黄贤校,高文远,满淑丽,等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展[J]. 中草药,2009,40(3):483-489.
- [10] JOG N R, CARICCHIO R. The role of necrotic cell death in the pathogenesis of immune mediated nephropathies[J]. Clinical immunology,2014,153(2):243-253.
- [11] YUE G, WEI J, QIAN X, et al. Synergistic anticancer effects of polyphyllin I and evodiamine on freshly-removed human gastric tumors[J]. PLoS One,2013,8(6):e65164.
- [12] GAO M, CHEUNG K L, LAU I P, et al. Polyphyllin D induces apoptosis in human erythrocytes through Ca⁺⁺ rise and membrane permeabilization [J]. Arch Toxicol,2012,86(5):741-752.
- [13] SHULI M, WENYUAN G, YANJUN Z, et al. Paris saponins inhibiting carcinoma growth and metastasis in vitro and in vivo[J]. Arch Pharm Res,2011,34(1):43-50.
- [14] XIAO X, ZOU J, BUI-NGUYEN T M, et al. Paris saponin II of Rhizoma Paris--a novel inducer of apoptosis in human ovarian cancer cells. Biosci Trends [J]. 2012,6(4):201-211.
- [15] WU S, GAO W, QIU F, et al. Simultaneous quantification of Polyphyllin D and Paris H, two potential antitumor active components in Paris polyphylla by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2012,905:54-60.
- [16] 王永慧,杨光义,叶方,等. UPLC法测定重楼药材中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的含量[J]. 中国药师,2012,15(11):1596-1597.
- [17] 付绍智,李楠,刘振,等. HPLC法测定不同产地重楼属植物中7种甾体皂苷成分[J]. 中草药,2012,43(12):2435-2437.

(2015-09-11 收稿)