

马钱子碱氮氧化物对 MKN-45 瘤株增殖及活体血管生成的影响

潘稚云, 朱天冀, 贾茹, 潘扬*

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 考察马钱子碱氮氧化物(Brucine N-oxide, BNO)对 MKN-45 瘤株增殖及活体血管生成的影响。方法 通过 MTT 比色法检测 BNO 对 MKN-45 细胞增殖的抑制作用;并采用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型,以不同浓度 BNO 给药,解剖显微镜下观察 BNO 对 CAM 血管形态的影响,同时对新生血管数目进行计数并计算抑制率。结果 ①BNO 在 50~350 $\mu\text{mol/L}$ 剂量范围内可以剂量依赖性地抑制 MKN-45 胃腺癌细胞增殖;②BNO 用药后 CAM 血管数目明显减少,出现血管形态异常甚至无血管区;与对照组相比,不同浓度的 BNO 对 CAM 血管形成均呈现一定的抑制作用,且有极显著的剂量依赖性($r^2=0.9010$, $P<0.01$);在 5~15 mmol/L 范围内可显著抑制血管的生成($P<0.05\sim0.01$),最高抑制率达 26%。结论 BNO 具有一定的抑癌及抗活体血管生成的作用,提示其对肿瘤或其他病理情况下的抗血管治疗具有重要应用价值。

关键词:血管生成;马钱子碱氮氧化物;MKN-45 瘤株;鸡胚绒毛尿囊膜

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1672-0482(2014)06-0557-04

Inhibiting Effect of Brucine N-Oxide on the Proliferation of MKN-45 Cancer Cell and Angiogenesis of Egg Embryo

PAN Zhi-yun, ZHU Tian-yi, JIA Ru, PAN Yang*

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the effect of brucine N-oxide (BNO) on the proliferation of MKN-45 cancer cell and angiogenesis of egg embryo. **METHODS** The proliferation of MKN-45 cell was detected by MTT method. The chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay was used to detect the effect of BNO on angiogenesis *in vivo*. **RESULTS** The inhibiting effect of BNO on the proliferation of MKN-45 cancer cell was dose dependent in the dose range of 50~350 $\mu\text{mol/L}$. The number of micro vessels of CAM decreased after the treatment of BNO, and there were also some abnormal-looking blood vessels and avascular zones around the site of drug application. Different concentration of BNO all had inhibitory effects on angiogenesis with concentration dependency ($r^2=0.9010$, $P<0.01$). Compared with controls, BNO inhibited significantly the angiogenesis in CAM in the dose range of 5~15 mmol/L ($P<0.05\sim0.01$), with the maximum inhibiting rate of 26%. **CONCLUSION** BNO has certain anti-cancer effect and can inhibit blood vessel formation in CAM, which implies its worth in treatment on angiogenesis in tumor or other pathological conditions.

KEY WORDS: brucine N-oxide; MKN-45 cancer cell; angiogenesis; chorioallantoic membrane

以抑制肿瘤组织血管生成为靶点开发血管生成抑制剂,是肿瘤治疗的新战略和新途径^[1]。我国传统中药一直在肿瘤治疗领域发挥着独特的功效,同时随着对中药抗肿瘤机制的深入研究,人们发现很多中药及其有效成分也是通过抑制血管的生成而发挥抗肿瘤作用的^[2]。

马钱子为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,剧毒,内服需炮制成制马钱子入药。马钱子碱氮氧化物(Brucine N-oxide,

BNO)是制马钱子在炮制过程中由毒性成分马钱子碱转化而来的一种特殊生物碱^[3],其小鼠口服的 LD_{50} 为 776.7 mg/kg,仅为马钱子碱($\text{LD}_{50}=50.1$ mg/kg)的 1/15^[4],属低毒物质。在前期研究中,我们对从马钱子碱一步合成 BNO 的反应条件进行了优化,得到纯度大于 98.0% 的 BNO;同时发现其对入鼻咽癌 KB 和胃癌 BGC-803 细胞有显著的抑制作用^[5]。

组织器官水平模型的优点是药物作用与在机体

收稿日期:2014-06-28;修稿日期:2014-09-02

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010);南京中医药大学科技重点培育项目(09XPY03)

作者简介:潘稚云(1992—),女,江苏南京人,南京中医药大学 2010 级本科生。* 通讯作者:y.pan2006@163.com

内用药近似,不容易漏筛,目前主要有鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)、兔耳皮肤、角膜移植、基质胶塞和纤维凝胶植入皮下^[6]等方法。1975 年,肿瘤的“饥饿”疗法的倡导者 Folkman 等首先把 CAM 法应用于肿瘤诱发血管生成的实验中^[7],CAM 试验方法简便,工作周期较短,是一种广泛用于血管生成研究的体内模型。鉴于以 BNO 作为血管生成抑制剂的抗肿瘤机制尚未见报道,我们先经体外模型筛选,再经组织器官水平(体内)模型复筛,对 BNO 抗肿瘤及其血管生成的作用进行了初步研究。

1 材料

1.1 药物与试剂

MTT, Amresco 0793, Ultrapure Grade。新鲜鸡胚(种蛋),5 d 龄,白皮蛋壳,表面清洁,无破损,质量相近,南京六合黄木桥孵化场;MKN-45,人低分化胃腺癌细胞株,由上海瑞金医院惠赠;马钱子碱氮氧化物(BNO)为本实验室半合成所得^[5],高效液相色谱面积归一化法分析,纯度 $\geq 98.0\%$;NS-398(COX-2 抑制剂),上海碧云天产品,S1771;苏拉明钠(Suramin sodium, SS), International Laboratory, USA, Lot No. 410677;双圈牌定性滤纸(1 号),杭州新华造纸厂;Parafilm 封口膜,10 cm $\times$ 38 m/卷,美国;RPMI 1640, Gibco 4998, lot No. 761260; Newborn calf serum, Gibco 16010, lot No. 8122180; Trypsin, Amresco 0458; EDTA, Amresco 0105, Ultrapure $\geq 99.0\%$;BNO 及 SS 均用生理盐水溶解配置成所需浓度,过滤除菌。

1.2 仪器与设备

GHP-9270 隔水式恒温培养箱,上海申贤恒温设备厂;二氧化碳培养箱,日本 SANYO, XD-101;倒置生物显微镜 XD-202 型,南京江南永新光学有限公司;超净工作台,苏州卓越净化设备有限公司;解剖显微镜,南京江南永新光学有限公司;酶标仪,美国 BIO-RAD;立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂, LDZX-50KB。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 MKN-45 细胞培养 MKN-45 细胞复苏后用含 10% 小牛血清-RPMI 1640 和氨苄青霉素钠、硫酸链霉素各 0.1 g/L 的培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。细胞长满后,弃去培养液,用 PBS 溶液轻轻洗涤 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液消化,每 2 d 按 1:3 比例传代 1 次,均取

对数生长期的细胞用于实验。

2.1.2 MTT 比色法检测 MKN-45 细胞的增殖影响

取处于对数生长期的人低分化胃腺癌细胞 MKN-45($4 \times 10^4/\text{mL}$)接种于 96 孔培养板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。用含 10% 小牛血清-RPMI1640 培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h,更换含不同浓度组的马钱子碱、土的宁氮氧化物、马钱子碱氮氧化物的培养液,经过预实验作用浓度摸索,浓度组均依次设置为 50、150、250、350 $\mu\text{mol/L}$,以 90 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 为阳性对照组,以不含药物培养基的细胞作为空白对照组,以培养基作为空白孔调零组,每组设 4 复孔,每孔 DMSO 浓度为 0.3% (对细胞生长不影响);细胞和药物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 培养箱中分别孵育 12、24、36、48 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 12 μL ,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内上清培养液,每孔再加入 200 μL DMSO,混匀振荡 10 min,使结晶物甲臍充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光密度(OD)值^[8]。按下列公式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{IR} = (1 - \frac{\text{OD}_{\text{treatment}}}{\text{OD}_{\text{control}}}) \times 100\%$$

2.1.3 纸片的选择与制作 取定性滤纸,用打孔器把滤纸打成直径为 4 mm 的圆形纸片,装入干洁的青霉素小瓶内,每瓶装入 50 只,塞紧,将装有纸片的小瓶放入高压锅内,121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 高压灭菌,冷却后置 4 $\sim$ 8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

2.1.4 CAM 血管模型的制备 在鸡胚中植入待测物的时间,4 $\sim$ 5 d 龄鸡胚还处于“单珠”期,胚胎的活动度大,接种后血管丰富的一面常会移到接种点的对面,影响了药物的作用^[9];而鸡胚发育的 8 $\sim$ 12 d,血管生成以套叠式生长(Intussusceptive microvascular growth)为主,在此时鸡胚血管正处于生长的高峰期,是血管生成相关研究的极好模型^[10],因此我们采用孵育至第 8 日的鸡胚加入测试药物。取表面光泽、干净、孵育 5 d 的鸡蛋种蛋,用检卵灯观察鸡胚发育的情况。未受精卵只见模糊阴影,不能找到胚头,应予淘汰;如出现胚影活动吊滞或胚影固定于卵壳,或血管昏暗模糊者,说明鸡胚将要死亡或已死亡,应随时淘汰。于 0.01% 的新洁尔灭中浸泡 3 min,拭干后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 隔水式电热恒温培养箱内继续孵育,相对湿度为 40% $\sim$ 80%。孵育时将种蛋气室向上,鸡蛋的长轴与蛋托成 80 $^{\circ}$,每 4 h 翻蛋 1 次,将生长良好的鸡胚一直孵育到适当的胚龄。

2.1.5 测试药物的给药方式 参照文献方法采用改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术(无气室孵育法)^[11],取 7 d 龄鸡胚,随机分组,每组 11 只,消毒,通过检卵灯找到气室,并用记号笔标出。用尖锥在气室和壳膜上开一小孔,用无菌镊子剥去蛋壳,开成圆形窗口($d=1.5\text{ cm}$)。将无菌的滤纸片($d=4\text{ mm}$)贴在暴露的 CAM 上(2 条前卵黄静脉之间的相对无血管区),用封口膜封贴制备假气室。适应性培养观察 1 d 后给药,将受试药物加于滤纸片上,实验分为对照组和药物组。药物组每个鸡胚滴加相应剂量的 BNO(0.5 、 0.75 、 1.25 、 1.75 、 5 、 10 、 15 mmol/L);阳性药物为 0.5 mmol/L 的 SS,空白对照加同体积生理盐水,每组至少存活 5 个鸡胚,重新封闭窗口继续孵育。所有操作均在超净台内进行。

2.1.6 显微镜下观察和计数 4 d 后取出鸡胚,揭掉封口膜,将附贴在 CAM 上的滤纸用少许生理盐水湿润后小心取下,弃去滤纸。在解剖显微镜下随机选取 5 个视野,观察滤纸边缘的血管分支点数(BV)并进行拍摄和计数,同时按照下面的公式计算新血管生成的抑制率(IR)。

$$IR = \left(1 - \frac{BV_{\text{treatment}}}{BV_{\text{control}}}\right) \times 100\%$$

2.1.7 实验数据处理 本实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。选择方差分析进行方差齐性检验,多组均数间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 MKN-45 细胞培养 倒置显微镜下观察人低分化胃腺癌细胞 MKN-45 呈类上皮细胞样形态,单层贴壁生长,细胞清透,生长良好。细胞以 1 : 3 比例每 2 d 传代 1 次,细胞生长旺盛。

2.2.2 MTT 比色法检测 MKN-45 细胞的增殖 MTT 比色法检测结果显示,与正常对照组比较,随着 BNO 作用浓度的增加和作用时间的延长,其对胃癌细胞生长的抑制率也明显增加,呈剂量依赖性和时间依赖性(图 1)。药物作用细胞 8 h 后显微镜下拍照显示 BNO 高剂量 $350\text{ }\mu\text{mol/L}$ 使部分贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落,细胞的体积变小、变形,可能与药物的细胞毒性作用有关,阳性药 NS-398 作用细胞 8 h 未见异常(图 2)。

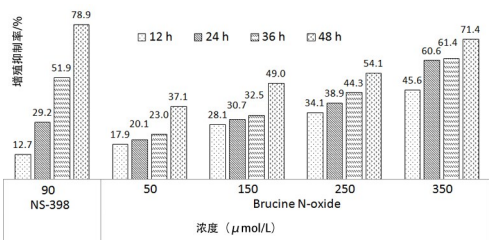
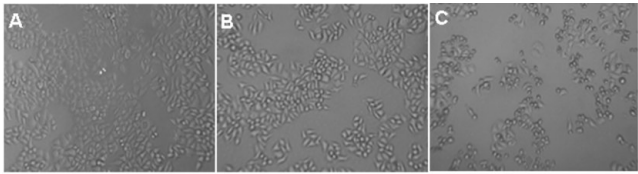


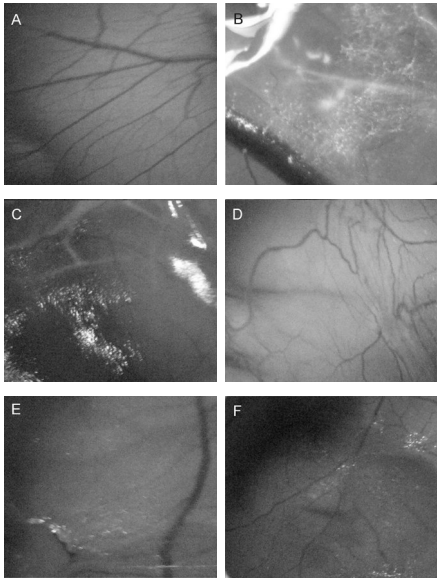
图 1 不同浓度 BNO 对 MKN-45 瘤株增殖的抑制作用



A:空白组;B:90 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 组;C:350 $\mu\text{mol/L}$ BNO 组

图 2 BNO 作用 MKN-45 瘤株 8 h 后细胞形态的变化($\times 200$)

2.2.3 CAM 血管生成的大体观察 对照组 CAM 测试区可见丰富的血管及毛细血管网,血管生长良好,呈树枝状。细小分支多且血管密度大,呈非特异性的贯穿、杂乱、包绕、叶脉样、平行生长;而 BNO 各浓度组及苏拉明钠组测试区血管和毛细血管显著减少,血管密度明显减小,甚至出现无血管区或血管断裂现象,且血管变细,血管形态异常,尤其细小血管数显著减少,表明 BNO 有明显抑制血管生成作用,且随 BNO 浓度增加抑制作用更明显(图 3)。



A.空白组;B.0.5 mmol/L SS 组;C.1.75 mmol/L BNO 组;D.5 mmol/L BNO 组;E.10 mmol/L BNO 组;F.15 mmol/L BNO 组

图 3 BNO 对 CAM 血管生成形态的影响($\times 40$)

2.2.4 CAM 血管生成的定量分析 不同浓度 BNO 对 CAM 血管形成均呈现明显的抑制作用,呈现极显著的剂量依赖性($Y = -14.5X + 89.5, r^2 = 0.9010, P < 0.01$);尤其在 $5 \sim 15\text{ mmol/L}$ 范围内可

显著抑制血管生成($P<0.05\sim0.01$),高浓度 BNO 血管生成抑制率达 26%,比阳性对照 SS(18%)还要高。见表 1。

表 1 BNO 对 CAM 血管生成的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ (mmol·L ⁻¹)	新生血管数	抑制率/%
空白组	8	—	100±15	—
SS 组	9	0.50	82±12*	18
BNO 组	9	0.50	97±18	3
	9	0.75	94±9	6
	8	1.25	86±8*	14
	10	1.75	81±15*	19
	10	5.00	78±17*	22
	10	10.00	76±14**	24
	9	15.00	74±9**	26

注:与相应的空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 结论

人低分化胃腺癌细胞 MKN-45 是 COX-2 强表达细胞株^[12],故实验中采用 COX-2 抑制剂 NS-398 作为抑瘤的阳性对照。BNO 在 50~350 μmol/L 剂量范围内随剂量增加和时间延长,对 MKN-45 细胞增殖抑制率显著增加。细胞经 BNO 作用时在中高浓度出现细胞出现皱缩、变圆、脱落,细胞的体积变小、变形等现象,可能与药物的细胞毒性作用有关。CAM 是常用的血管生成相关研究的组织器官水平层次模型。本研究采用这一体内模型,发现 BNO 在 0.5~15 mmol/L 浓度内,抑制 CAM 血管生成生成率为 3%~26%,且呈现极显著的剂量依赖性;尤其是在 5~15 mmol/L 范围内,与对照组相比,具有显著性差异($P<0.05\sim0.01$),高浓度 BNO 血管生成抑制率达 26%,比阳性对照苏拉明钠(18%)还要高,提示 BNO 具有抑制血管生成的作用。

参考文献:

[1] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target[J]. Nature, 2005, 438: 967-974.
[2] 唐求,袁昌劲,聂彬,等.中药抗肿瘤血管生成研究进展[J].肿瘤学杂志,2010, 16(2):155-157.
Tang Q, Yuan CJ, Nie B, et al. Progression of Chinese medicine in anti-angiogenesis[J]. J Oncol, 2010, 16(2): 155-157.

[3] Cai BC, Hattori M, Namba T. Processing of nux vomica II. Changes in alkaloid composition of the seeds of Strychnos nux-vomica on traditional drug-processing[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1990, 38(5): 1295-1298.
[4] 马骋,何亚维,蔡宝昌,等.土的宁和马钱子碱及其氮氧化合物的毒性比较[J].南京中医学院学报,1994, 10(2):37-38, 64.
Ma C, He YW, Cai BC, et al. Strychnine and brucine compared with strychnine N oxide and brucine N oxide in toxicity[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 1994, 10(2): 37-38, 64.
[5] 张弦,吴晓峰,涂霞,等.马钱子碱氮氧化物一步合成工艺优化及其抑瘤作用[J].南京中医药大学学报,2011, 27(5):463-467.
Zhang X, Wu XF, Tu X, et al. Optimization of one-step synthetic process of brucine n-oxide and its anti-tumor effect[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2011, 27(5): 463-467.
[6] Davidoff AM, Nathwani AC, Spurbeck WW, et al. rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 3077-3083.
[7] Folkman J. Tumor angiogenesis[J]. Adv Cancer Res, 1985, 43: 175-203.
[8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
[9] 刘秀萍,王淑静,刘兴汉.用鸡胚尿囊膜血管检测内皮抑素活性方法的建立[J].哈尔滨医科大学学报,2002, 36(1): 73.
Liu XP, Wang SJ, Liu XH. Establishment of blood vessel detection of endostantin active with chick embryo chorioallantoic membrane[J]. J Harbin Med Univ, 2002, 36(1): 73.
[10] Schlatter P, Konig MF, Karlsson LM, et al. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo[J]. Microvasc Res, 1997, 54(1): 65-73.
[11] 贺国安,罗进线,张添元,等.改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术——无气室孵育法[J].中山大学学报:自然科学版,2003, 42(2): 126-128.
He GA, Luo JX, Zhang TY, et al. Improved chick chorioallantoic membrane technique: incubation without air chamber [J]. ACTA Scient Natur Univ Suny, 2003, 42(2): 126-128.
[12] Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancer with microsatellite instability[J]. Int J Cancer (Pred Oncol), 1999, 84: 400-403.

(编辑:董宇)