

[药 理]

青藤碱对体外人胆管癌细胞的抑制作用

吕彦霖， 朱昌毫， 潘耀振， 陈 玲， 喻 超， 孙诚谊*
(贵州医科大学附院肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

摘要: **目的** 研究青藤碱对体外人胆管癌细胞的抑制作用。**方法** CCK-8 和平板克隆实验检测青藤碱对胆管癌细胞存活率及增殖率的影响, 流式细胞术检测青藤碱对胆管癌细胞凋亡作用的影响, Transwell 检测青藤碱对胆管癌细胞侵袭能力的影响, 细胞划痕检测青藤碱对胆管癌细胞迁移能力的影响, Western blot 检测青藤碱对胆管癌细胞中凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-9 和侵袭相关蛋白 E-Cadherin、Vimentin 表达的影响。**结果** 随着青藤碱浓度的提高以及时间的延长, 胆管癌细胞的存活率逐渐下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞集落形成数量逐渐减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。青藤碱可呈剂量依赖性地促进胆管癌细胞凋亡 ($P<0.01$), 抑制胆管癌细胞的侵袭迁移 ($P<0.01$), 并且可以使 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白以及 E-cadherin 蛋白表达逐渐升高, vimentin 蛋白表达逐渐下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 青藤碱可以有效地抑制体外胆管癌细胞的增殖, 侵袭和迁移能力, 诱导细胞凋亡, 这可能与其上调 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 E-cadherin 蛋白表达, 以及下调 vimentin 蛋白表达有关。

关键词: 青藤碱; 胆管癌; 增殖; 凋亡; 侵袭; 转移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)11-2601-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.010

Inhibitory effects of sinomenine on cholangiocarcinoma cells *in vitro*

LÜ Yan-lin, ZHU Chang-hao, PAN Yao-zhen, CHEN Ling, YU Chao, SUN Cheng-yi*
(Department of Hepatobiliary Surgery, Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the inhibitory effects of sinomenine on cholangiocarcinoma cells *in vitro*. **METHODS** The changes of viability and proliferative rate of cholangiocarcinoma in response to sinomenine treatment were detected using CCK-8 assay and coloy formation assay. The flow cytometry was used to explore the effects of sinomenine on the cellular apoptosis of cholangiocarcinoma. Transwell assay and wound-healing assay were conducted to measure the cell invasion and migration abilities respectively. Western blot was applied to detecting the expression of apoptosis-related protein cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9, as well as the invasion-related proteins E-cadherin and vimentin. **RESULTS** The viability and proliferative rate of cholangiocarcinoma cells were significantly inhibited by sinomenine in a time-dependent and dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$), and the number of cell colony formation decreased gradually ($P<0.05$, $P<0.01$). In a dose-dependent manner, sinomenine increased cellular apoptosis ($P<0.01$), inhibited the cellular invasion and migration of cholangiocarcinoma ($P<0.01$), up-regulated the expressions of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and E-cadherin, and down-regulated the expressions of vimentin ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Sinomenine can effectively inhibit the cellular proliferation, migration and invasion of human cholangiocarcinoma most likely via up-regulation of the protein levels of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and E-cadherin, and down-regulation of the protein level

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 贵州省肝胆外科临床医学研究中心 (黔科合平台人才 [2017] 5404); 贵州省高层次创新人才培养计划 “十” 层次人才 (黔科合平台人才 [2016] 5647); 贵州省科学技术厅- 贵阳医学院院士工作站肝胆外科分站 (黔科合院士站 [2015] 4013); 贵州省孙诚谊 “肝胆胰脾疾病诊治” 导师工作室 (黔教研合 GZS [2016] 09); 贵州省科技厅贵州医科大学联合基金 (黔科合 [2015] 7406)

作者简介: 吕彦霖 (1993—), 男, 硕士生, 从事抗肿瘤中药有效成分研究。Tel: 18552881386, E-mail: lvyanlin99@163.com

* 通信作者: 孙诚谊 (1963—), 男, 博士, 教授, 从事肝胆疾病诊疗研究。Tel: 13885065979, E-mail: sunchengyi2014@163.com

of vimentin.

KEY WORDS: Sinomenine; cholangiocarcinoma; proliferation; apoptosis; invasion; migration

近些年来,胆管癌已经成为南美和亚洲第二常见的原发性肝癌,且早期难以诊断,大多数患者诊断时已为晚期^[1]。尽管随着科技的发展,对于胆管癌的治疗有了很多先进的方法,比如手术治疗、放射治疗和化学药物治疗等,但是在晚期患者中总体预后较差,5 年生存率仅为 20%~30%^[2]。最近研究表明,中国传统中药对包括胆管癌在内的多种癌症都有治疗作用^[3-4]。

青藤碱(7, 8-didehydro-4-hydroxy-3, 7-dimethoxy-17-methyl-9a, 13a, 14a-morphinan-6-one, SIN)是一种从中草药青藤中提炼出来的活性成分,在中国已经有两千多年用治风湿病的历史^[5]。近年来随着对青藤碱的深入研究,发现青藤碱不仅在治疗免疫相关疾病时具有抗炎^[6]、镇痛^[7]、免疫抑制和抗血管生成^[8]以及改善关节炎等作用,而且其抗肿瘤作用也尤为显著。近年来,许多研究人员做了大量关于青藤碱在抗肿瘤方面的科学实验,发现青藤碱对胃癌^[9]、肝癌^[10]、卵巢癌^[11]以及胰腺癌^[12]等多种肿瘤具有明显的抑制作用。然而,青藤碱是否对胆管癌也具有相同的抑制作用,相关研究目前还比较少。

本研究通过研究青藤碱对人类胆管癌细胞系 HUCCT-1 及 TFK-1 生长增殖和侵袭转移的调节作用,探讨青藤碱对胆管癌的治疗作用,为开发和寻找新型抗胆管癌药物做积极探索。

1 材料

1.1 细胞株 HuCCT-1、TFK-1 胆管癌细胞株购自湖北省武汉市同济医院肝胆胰外科实验室。

1.2 试剂 青藤碱(Selleck,批号 S235901),胎牛血清(Gibco,批号 1992275)、RPMI-1640(Gibco,批号 22400105)、0.25% 胰蛋白酶(Gibco,批号 25200056)、0.05% 不含 EDTA 的胰蛋白酶(Gibco,批号 15400054)、Cell Counting kit-8(CCK-8)(碧云天,批号 C0037)、Transwell 小室(Corning,批号 3422)、Matrigel 胶(BD,批号 354234)、AV-FITC/PI 凋亡试剂盒(Solabio,批号 CA1020)、RIPA 裂解缓冲液(Solabio,批号 R0020)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solabio,批号 PC0020)、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(Millipore,批号 V900858)、Cleaved-Caspase3(CST,批号 9661S)、Cleaved-Caspase9(CST,批号 9502S)、Vimentin(CST,批号 5741S)、E-cadherin(CST,批号 3195S)、GAPDH(CST,批号 5174S),羊抗鼠(Boster Bio,批号 BM2002)、羊抗兔(Boster Bio,批号 BA1066)。

2 方法

2.1 细胞培养 2 种人类胆管癌细胞株 HuCCT-1、TFK-1 均用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,放进恒温培养箱(37℃,5% CO₂)中进行孵育培养,待细胞铺满培养瓶底部 70%~80% 后用胰蛋白酶进行消化后传代处理,后续试验选取处于对数生长期细胞。

2.2 CCK-8 检测细胞存活率 取对数生长期细胞,PBS 清洗,0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 10% 血清的培养基中和,制备细胞悬液。细胞计数后,接种 4 000 个细胞于 96 孔板每孔中,每个孔用培养基配足 200 μL 体积。实验分组分为 6 组,空白对照组(用不含青藤碱的 1640 处理)、0.125 mmol/L 青藤碱组、0.25 mmol/L 青藤碱组、0.5 mmol/L 青藤碱组、1.0 mmol/L 青藤碱组、2.0 mmol/L 青藤碱组,每组 5 个生物学重复,培养 24 h 后按照分组进行加药处理,处理完毕后封闭盖子,置于细胞培养箱中培养。根据实验分组情况,各组给予不同浓度的青藤碱处理 24、48、72 h 后,分别弃去 96 孔板内的培养基,向每孔中加入 110 μL CCK-8 显色液(10 μL CCK-8 溶于 100 μL 无血清培养基)。加液完毕后将 96 孔板置于培养箱中孵育,每隔 1 h 用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值,测量 3 次;最后根据实验数据,汇总分析并作图。其公式为细胞存活率=[(空白对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值]×100%。

2.3 克隆平板检测长期细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞,PBS 清洗,0.25% 胰酶消化,用含 10% 血清的培养基中和后得到细胞悬液。细胞计数后,接种 4 000 个细胞于六孔板每孔中进行培养,

需要反复吹打混匀,防止细胞抱团生长。待细胞贴壁后,将细胞分为 4 组,空白对照组(用不含青藤碱的 1640 处理)、0.5 mmol/L 青藤碱组、1.0 mmol/L 青藤碱组、2.0 mmol/L 青藤碱组,每组 6 个生物学重复,进行加药处理。各孔中青藤碱和 RPMI-1640 培养基总体积配足 3.5 mL,放入无菌细胞培养箱继续培养。培养 10~14 d 后终止培养,用 PBS 漂洗细胞后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 1% 结晶紫染色 30 min,最后使用 PBS 清洗数遍后放入烘箱,烘干进行拍照处理并统计分析克隆形成数量。

2.4 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡率 取对数期生长胆管癌细胞, PBS 清洗, 0.25% 胰酶消化, 用含 10% 血清的培养基中和后得到细胞悬液。显微镜下计数后按每孔接种 5×10^4 个胆管癌细胞均匀接种于六孔板中。后放入培养箱中培养,待细胞贴壁后,细胞分组同“2.3”项下。按照分组加入不同浓度的青藤碱,继续培养 24 h 后,收集各组细胞。将六孔板内各孔上清液收集于 15 mL 离心管, PBS 清洗后收集于 15 mL 离心管内,再使用 1.0 mL 不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 2.0 mL 含血清培养基中和后收集于 15 mL 离心管, 后再用 PBS 清洗一遍六孔板,各收集于相应 15 mL 离心管内,设置离心机 1 200 r/min,离心 5 min,弃上清。后加入 3 mL PBS 于 15 mL 离心管,转移细胞悬液于流式管内,继续离心, 1 200 r/min,离心 5 min,以清洗细胞。弃上清后,每管加入 500 μ L 1 $\times$ Binding buffer、悬浮细胞数目为 1×10^6 /mL,再加入 5 μ L 的 AnnexinV FITC 染液和 10 μ L PI 染色液,轻轻吹打均匀后,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,流式细胞仪上机检测,分析记录结果。

2.5 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数期生长胆管癌细胞, PBS 清洗, 0.25% 胰酶消化, 用含 10% 血清的培养基中和后得到细胞悬液。显微镜下计数后按每孔接种 2×10^6 个胆管癌细胞均匀接种于六孔板中。后放入培养箱中培养,待细胞贴壁后,将细胞分为 4 组,分组情况同“2.3”项下,每组设置 5 个生物学重复。使用 200 μ L 无菌枪头在六孔板底部细胞层上划痕,力度和角度一致,使各条划痕粗细均匀。后用 PBS 清洗两次将划痕脱落的细胞清洗干净,加入不含血清的 RPMI 1640 培养基后,使用倒置相差显微镜观察划痕的宽度并拍照,计算并记录 0 h 划痕面积。后按照分组按照各组所设浓度加入青藤碱。放入培养箱进行培养 24 h

后,再次使用倒置相差显微镜拍照并计算划痕面积,最后根据实验数据计算细胞迁移率(%)。细胞迁移率 = $[(0 \text{ h 划痕面积} - 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}] \times 100\%$ 。

2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 与 RPMI-1640 培养基按照 1 : 5 的比例稀释后,取 50 μ L 均匀地涂覆到 Transwell 上室的底部,将 Transwell 小室放入 24 孔板中,室温通风过夜使之形成凝胶状。取对数期生长胆管癌细胞, PBS 清洗, 0.25% 胰酶消化, 用无血清培养基中和后得到细胞悬液。显微镜下计数后按每孔接种 2×10^4 个胆管癌细胞均匀接种于上室中,使用无血清培养基配足 200 μ L 体积。下室加入 660 μ L 含 10% FBS 的 1640 培养基后,放入培养箱进行培养。待细胞贴壁后进行分组,将细胞分为 4 组,分组情况同“2.3”项下,每组设置 3 个生物学副孔,按照分组情况进行加药处理,后继续放入培养箱进行培养。培养 24 h 后终止培养,用 PBS 漂洗细胞后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 1% 结晶紫染色 30 min,最后使用 PBS 清洗数遍后放入烘箱,烘干进行拍照处理并计算穿膜细胞数。

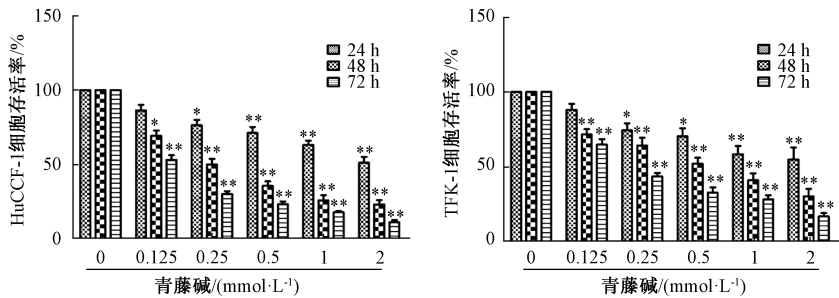
2.7 Western blot 检测凋亡及侵袭相关蛋白表达 取对数期生长胆管癌细胞, PBS 清洗, 0.25% 胰酶消化, 用含 10% 血清的培养基中和后得到细胞悬液。显微镜计数后接种 5×10^5 个细胞于六孔板每孔内,放入培养箱进行培养。待细胞贴壁后,对细胞进行分组,分组情况同“2.3”项下,按照分组对细胞进行加药处理。药物处理 24 h 后,收集细胞干粉。使用 RIPA 裂解液在 4 $^{\circ}$ C 环境下提取细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白测定浓度试剂盒测定蛋白浓度,按照蛋白上清液: 5 $\times$ Loading Buffer=4 : 1 的比例加入 5 $\times$ loading buffer, 95 $^{\circ}$ C 煮 10 min。取每孔泳道 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 90 V, 2 h。后恒流 300 mA 电转 2 h 转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入抗 Cleaved caspase 3、Cleaved caspase 9、E-cadherin、Vimentin 等一抗于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次 15 min/次。加入二抗室温孵育 2 h, TBST 再洗膜 3 次, 15 min/次,最后使用 ECL 发光液曝光显色,灰度值分析使用 ImageJ 1.45 s 软件。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析处理。实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差分析,2 组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 青藤碱抑制胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 增殖 CCK-8 实验结果显示, 人类胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 经过青藤碱处理后, 2 种胆管癌细胞生存率均明显降低, 且随着药物浓度增大以及药物作用时间的延长, 抑制作用逐渐加强, 呈剂量和时间依赖性。除青藤碱 0.125 mmol/L, 24 h 这

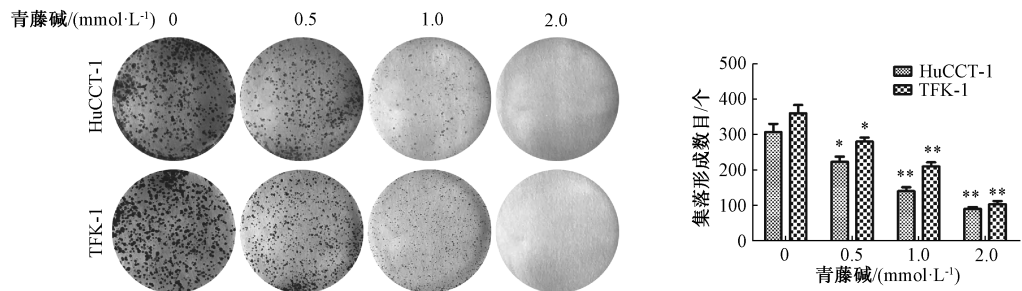
组外, 与空白对照组比较, 青藤碱能显著抑制 HuCCT-1、TFK-1 细胞存活率($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 1。此外, 克隆平板表明青藤碱对于胆管癌细胞的长期增殖具有明显抑制作用, 且抑制效果与药物浓度呈剂量依赖性 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 2。表明青藤碱可以抑制胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 增殖。



注: 与空白对照组 (青藤碱 0 mmol/L) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 1 不同浓度的青藤碱对胆管癌细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of sinomenine on cellular viability of cholangiocarcinoma



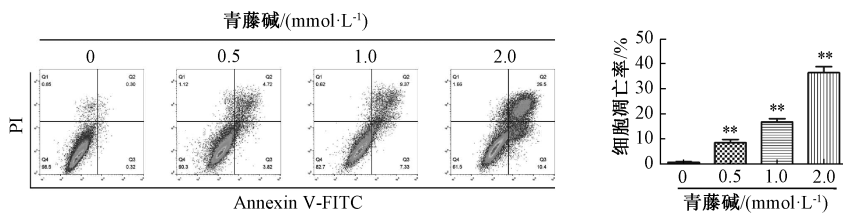
注: 与空白对照组 (青藤碱 0 mmol/L) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 不同浓度的青藤碱对胆管癌细胞长期增殖能力的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of sinomenine on long-term cellular proliferation of cholangiocarcinoma

3.2 青藤碱促进胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 凋亡 流式细胞数表明, 随着青藤碱药物浓度的提升, 胆管癌细胞凋亡率明显增加, 且呈剂量依赖性 ($P<0.01$), 见图 3~4。与空白对照组比较, 青藤

碱显著促进凋亡关键蛋白 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白表达, 且呈剂量依赖性 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 5~6。表明青藤碱可以促进胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 凋亡。



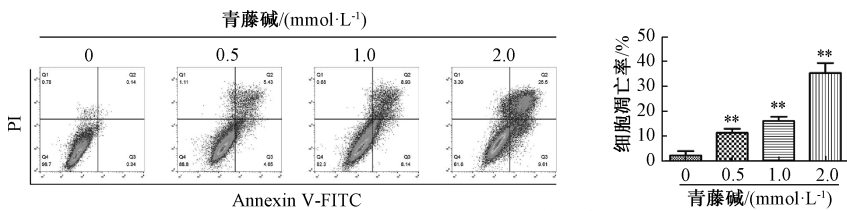
注: 与空白对照组 (青藤碱 0 mmol/L) 比较, ** $P<0.01$

图 3 不同浓度青藤碱对 HuCCT-1 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of sinomenine on apoptosis of HuCCT-1 cells

3.3 青藤碱抑制胆管癌细胞系 HuCCT-1、TFK-1 侵袭迁移 Transwell 实验结果表明, 随着青藤碱

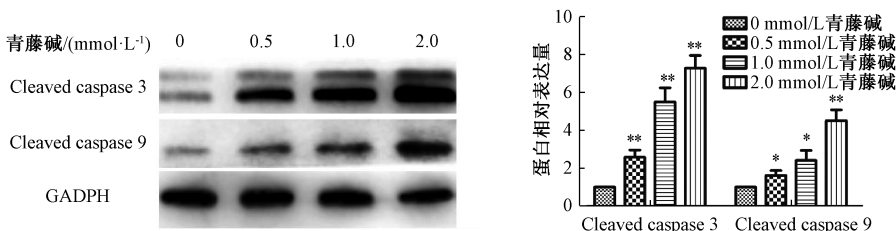
浓度的递增, 胆管癌细胞穿过铺有 Matrigel 胶小室的细胞数目也相应减少, 胆管癌细胞的侵袭率逐渐



注：与空白对照组（0 mmol·L⁻¹青藤碱）比较，***P*<0.01

图 4 不同浓度青藤碱对 TFK-1 细胞凋亡的影响

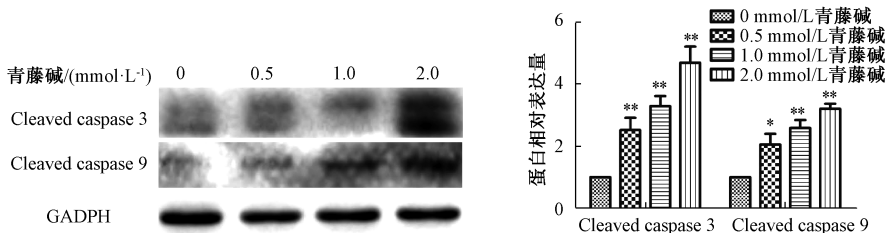
Fig. 4 Effects of different concentrations of sinomenine on apoptosis of TFK-1 cells



注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，**P*<0.05，***P*<0.01

图 5 不同浓度青藤碱对 HuCCT-1 Cleaved caspase 3、Cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of sinomenine at different concentrations on the expressions of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 proteins in HuCCT-1 cells



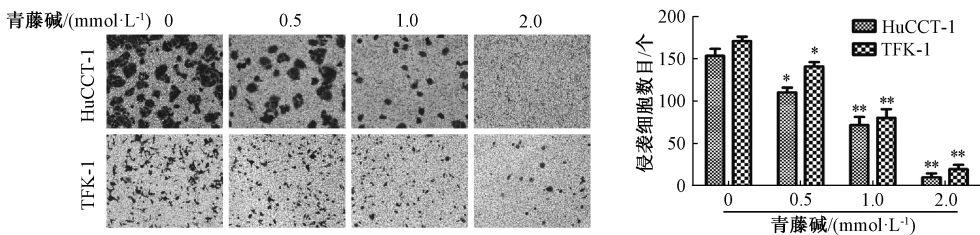
注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，**P*<0.05，***P*<0.01

图 6 不同浓度青藤碱对 TFK-1 Cleaved caspase 3、Cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of sinomenine at different concentrations on the expressions of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 proteins in TFK-1 cells

下降，且结果呈剂量依赖性（*P*<0.05），见图 7。划痕实验结果表明，与空白对照组比较，青藤碱组划痕宽度增宽，细胞迁移率显著下降，细胞迁移能力越来越慢，呈剂量依赖性（*P*<0.05），见图 8。此外，上皮-间叶转化（EMT）为恶性肿瘤浸润的

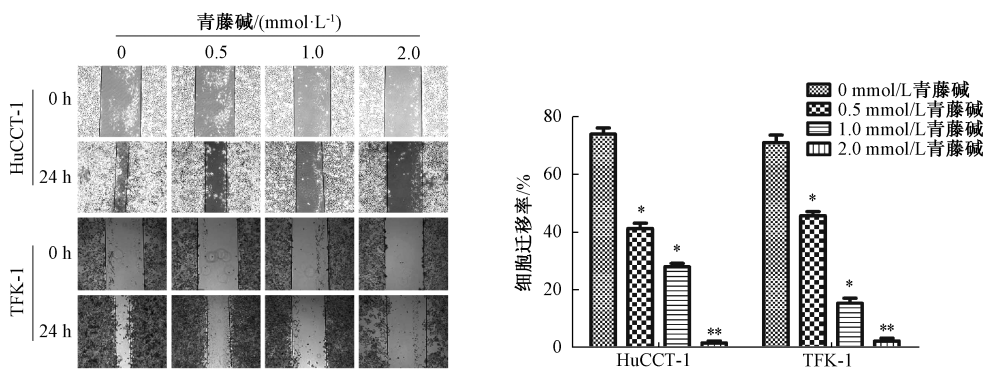
机制，E-cadherin、vimentin 为上皮间质转化标记物的表达，与空白对照组比较，青藤碱以剂量依赖的方式显著升高 E-cadherin、且降低 vimentin 蛋白表达（*P*<0.05），见图 9~10。



注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，**P*<0.05，***P*<0.01

图 7 不同浓度青藤碱对胆管癌侵袭能力的影响

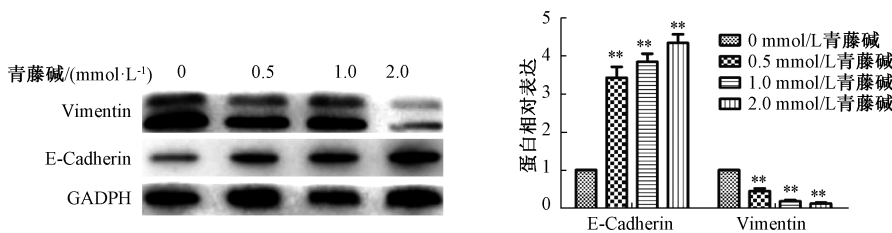
Fig. 7 Effects of different concentrations of sinomenine on invasion ability of cholangiocarcinoma



注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

图 8 不同浓度的青藤碱对胆管癌细胞迁移能力的影响

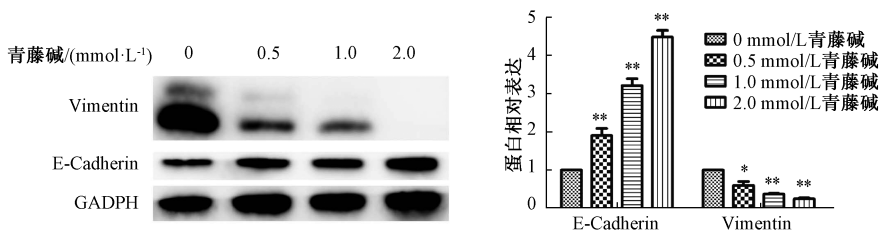
Fig. 8 Effects of sinomenine on invasion of cholangiocarcinoma



注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

图 9 不同浓度青藤碱对 HuCCT-1 Vimentin、E-Cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 9 Effects of sinomenine at different concentrations on the expressions of Vimentin and E-Cadherin proteins in HuCCT-1 cells



注：与空白对照组（0 mmol/L 青藤碱）比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

图 10 不同浓度青藤碱对 TFK-1 Vimentin、E-Cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 10 Effects of sinomenine at different concentrations on the expressions of Vimentin and E-Cadherin proteins in TFK-1 cells

4 讨论

胆管癌早期诊断困难，是以高发病率和高死亡率为特征的肝胆肿瘤。目前针对胆管癌的治疗取得了很大进展，但是患者的 5 年生存率依旧很低^[13]。现临床上应用的许多抗肿瘤药物不仅价格昂贵且不良反应较多^[14]。因此，寻找一种新的、廉价的、不良反应较小的抗肿瘤药物，从而提高患者的生活质量是非常必要且紧要的。据报道，青藤碱可以在体内体外发挥良好的抗肿瘤作用，且不良反应较小^[15]。本次实验，研究了青藤碱作用于胆管癌之

后产生的抗肿瘤作用。

本实验以人类胆管癌细胞为研究对象，采用一系列体外实验研究青藤碱对胆管癌的抗肿瘤作用。CCK-8 与克隆平板实验表明，青藤碱对胆管癌细胞的存活及增殖能力有明显的抑制作用，且成时间和剂量依赖性。Annexin V/PI 双染色法结果发现，青藤碱可以促进胆管癌细胞凋亡，且该凋亡作用呈剂量依赖性。Transwell 侵袭实验结果表明，胆管癌细胞的侵袭能力随着青藤碱浓度的升高逐渐降低。划痕实验结果表明，两株胆管癌细胞在相同的时间

内的迁移距离明显受到青藤碱浓度的影响, 2 mmol/L 浓度的青藤碱基本上使胆管癌细胞丧失迁移能力。

细胞凋亡, 即细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡在消除突变和恶性肿瘤细胞中发挥着重要作用^[16]。已知多种中药可以通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到抑制肿瘤生长的目的^[17-19]。Annexin V/PI 双染色法表明, 青藤碱以剂量依赖性地促进胆管癌细胞凋亡。caspases 家族可以调节多种生物过程, 包括细胞凋亡、分化、炎症等。其中 caspase-3、caspase-9 又归为促凋亡 caspases。caspase-3 如今视为细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 而 caspase-9 被归类为凋亡效应者。活化的 caspase-9 (cleaved-caspase-9) 可以进一步激活 caspase-3, 而活化的 caspase-3 (cleaved-caspase-3) 的作用主要是催化多聚 (ADP-核糖) 聚合酶裂解, 该酶与 DNA 修复和基因完整性监护有关, 从而诱导细胞凋亡的发生^[20-21]。本实验结果表明, 青藤碱可能通过促进胆管癌细胞凋亡以达到其抗肿瘤作用。

肿瘤转移全身往往是导致肿瘤患者死亡的主要原因。众所周知, EMT 在肿瘤转移方面起着决定性的作用, 是肿瘤细胞侵袭和迁移的主要因素^[22]。当细胞发生 EMT 时, 上皮标志物, 如 E-cadherin 表达量下降; 而间质标志物, 如波形蛋白 vimentin 表达量上升^[23]。本实验结果表明, 青藤碱可能通过逆转胆管癌细胞 EMT 来达到抑制胆管癌细胞侵袭和迁移的目的。

总而言之, 青藤碱可以升高 cleaved caspase 3、cleaved caspase 9 和 E-cadherin 以及降低 vimentin 蛋白的表达水平, 有效地抑制胆管癌细胞增殖, 侵袭迁移并促进凋亡。研究表明青藤碱对胆管癌具有明显的抗肿瘤作用, 可能为胆管癌的临床治疗提供新的视角。但是若要实现青藤碱的临床用药, 还需更多的临床试验对青藤碱做出进一步研究。

参考文献:

[1] Rizvi S, Gores G J. Emerging molecular therapeutic targets for cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(3): 632-644.

[2] Zhu A X. Future directions in the treatment of cholangiocarcinoma[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015, 29(2): 355-361.

[3] 贾亚萌, 佟晓哲, 范敬炎. 巴西苏木素对舌癌 Tca8113 细胞凋亡和自噬的影响及分子机制[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(3): 351-356.

[4] 郑世勤, 王晓松, 陈 双, 等. 大蒜素对 TGF-β1 诱导人胆

管癌细胞上皮间质化的影响及机制[J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(2): 143-147.

[5] 刘 维. 青藤碱治疗风湿病的临床应用[C] //全国第十二届中西医结合风湿病学术会议论文汇编. 天津: 中国中西医结合学会风湿病专业委员会, 2014: 8.

[6] 抗晶晶, 刘晓宁. 青藤碱抗炎作用的新进展[J]. *中国野生植物资源*, 2017, 36(6): 32-35.

[7] 李 鑫, 魏艳霞, 谢志忻, 等. 青藤碱抗炎镇痛药效作用及其机制研究[J]. *中药材*, 2017, 40(10): 2445-2448.

[8] Feng Z T, Yang T, Hou X Q, *et al.* Sinomenine mitigates collagen-induced arthritis mice by inhibiting angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108759.

[9] 刘光霞. 青藤碱对人胃癌 SGC-7901 细胞 EMT 的作用机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

[10] 袁婉雯, 杨 玲, 叶名冠, 等. 青藤碱抑制人肝癌细胞 HepG2 作用的研究[J]. *广东药科大学学报*, 2018, 34(5): 604-607.

[11] 王新荣, 张印坡, 张延新. 青藤碱抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活力、迁移和侵袭[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5): 793-798.

[12] 朱昌毫, 孙诚谊, 喻 超, 等. 青藤碱对胰腺癌细胞系 SW1990 增殖及凋亡的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(8): 879-883.

[13] Khan S A, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: epidemiology and risk factors[J]. *Liver Int*, 2019, 39(S1): 19-31.

[14] Li T, Chen L, Deng Y, *et al.* Cholesterol derivative-based liposomes for gemcitabine delivery: preparation, *in vitro*, and *in vivo* characterization [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(12): 2016-2025.

[15] Gao L N, Zhong B, Wang Y. Mechanism underlying antitumor effects of sinomenine[J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 21(5): 1-6.

[16] Fallahian F, Aghaei M, Abdolmohammadi M H, *et al.* Molecular mechanism of apoptosis induction by Gaillardin, a sesquiterpene lactone, in breast cancer cell lines: Gaillardin-induced apoptosis in breast cancer cell lines[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2015, 31(6): 295-305.

[17] Chen L, Jiang K, Chen H, *et al.* Deguelin induces apoptosis in colorectal cancer cells by activating the p38 MAPK pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 11: 95-105.

[18] Zhang W, Ha M, Gong Y, *et al.* Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6): 1585-1592.

[19] Lee D Y, Lee M K, Kim G S, *et al.* Brazillin inhibits growth and induces apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 2449-2457.

[20] Wan C, Zhu X H, Cheng Y H, *et al.* Effects of inner-heating acupuncture on apoptosis of chondrocytes and expression of caspase-3 and caspase-9 in rats with knee osteoarthritis [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2019, 39(4): 409-416.

[21] Rogers C, Erkes D A, Nardone A, *et al.* Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during

apoptosis and inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1689-1692.

[22] 吴建龙, 刘建伟, 刘海丽, 等. 错配修复蛋白与上皮间质转化标记物在大肠癌中的表达及相互关系 [J]. 河北医学, 2019, 25(3): 610-614.

[23] Zhu B, Zhao L, Liu Y, *et al*. Induction of phosphatase shatterproof 2 by evodiamine suppresses the proliferation and invasion of human cholangiocarcinoma [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 108: 98-110.

五味子乙素对大鼠心室肌细胞钠电流的影响

邹 丽¹, 王秀秀¹, 钱 薇¹, 杨蕴智¹, 葛 焱¹, 许正新^{1,2,3,4*}
(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225000; 2. 江苏省重点动物传染病和人畜共患病预防控制共创中心, 江苏 扬州 225001; 3. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州 225001; 4. 江苏省非编码 RNA 基础与临床转化重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要: **目的** 探讨五味子乙素对大鼠心室肌细胞钠电流 (I_{Na}) 的影响。**方法** 应用 Langendorff 主动脉逆向灌流、单酶解法获得单个大鼠心室肌细胞, 采用全细胞膜片钳技术记录不同浓度的五味子乙素对大鼠心室肌细胞膜上 I_{Na} 的影响。**结果** 五味子乙素 ($>3\text{ }\mu\text{mol/L}$) 对 I_{Na} 可产生显著抑制作用 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并呈浓度依赖性。五味子乙素 (10 、 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$) 可使钠通道的 I - V 曲线显著上移, 但 I - V 曲线的激活电位、峰电位及形态未发生改变, 使 I_{Na} 的激活曲线向去极化方向迁移 ($P<0.01$), 半数激活电位由给药前 (-53.90 ± 5.21) mV 变为 (-43.69 ± 5.34) mV 和 (-40.80 ± 3.23) mV 。五味子乙素能使 I_{Na} 失活曲线向超级化方向移动 ($P<0.01$), 半数失活电压 (对照、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$) 分别为 (-57.80 ± 6.21) mV 、(-71.16 ± 6.45) mV 和 (-81.03 ± 7.53) mV 。此外, 五味子乙素还能显著延长 I_{Na} 失活后恢复时间 ($P<0.01$), τ (对照、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$) 分别为 (16.68 ± 1.72) ms 、(25.73 ± 2.93) ms 和 (43.79 ± 3.87) ms 。**结论** 五味子乙素能浓度依赖性阻滞大鼠心室肌细胞 I_{Na} , 对其激活、失活和失活后恢复动力学特征均有影响。

关键词: 五味子乙素; 心室肌细胞; 膜片钳; 钠通道

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)11-2608-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.011

Effects of schisandrin B on sodium channel currents of rats’ ventricular myocardial cells

ZOU Li¹, WANG Xiu-xiu¹, QIAN Wei¹, YANG Yun-zhi¹, GE Yan¹, XU Zheng-xin^{1,2,3,4*}
(1. College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, 225000, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Control of Animal Infectious Diseases and Zoonosis, Yangzhou 225001, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Integrative Medicine for Prevention and Treatment of Diseases in Elderly, Yangzhou 225001, China; 4. Jiangsu Key Laboratory of Basic Medical Sciences and Clinical Transformation for Non-coding RNAs, Yangzhou 225009, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effects of schisandrin B (Sch B) on sodium current (I_{Na}) in rats ventricular myocytes. **METHODS** Single rats ventricular myocytes were obtained by reverse perfusion of Langendorff aorta and single enzymatic hydrolysis. Whole cell patch clamp technique was used to record the effect of different concentrations of Sch B on I_{Na} of rats ventricular myocytes. **RESULTS** Sch B significantly inhibited I_{Na} in a concentration-dependent manner. Sch B at concentrations of $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ and $30\text{ }\mu\text{mol/L}$ raised the IV curve of the sodium

收稿日期: 2018-12-23
基金项目: 扬州大学大学生科研创新计划项目 (x20180729)
作者简介: 邹 丽 (1992—), 女, 硕士生, 从事中药药理研究。E-mail: 1838458432@qq.com
* 通信作者: 许正新 (1964—), 男, 博士, 教授, 从事心血管药理研究。E-mail: xuzhengxin405@126.com