

复方苦参注射液对多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞增殖和凋亡的影响[△]

刘蕊^{1*}, 范宁建², 王英曼¹, 宋洁¹, 张岩¹ (1. 华北理工大学附属医院肿瘤放化疗科, 河北唐山 063000; 2. 唐山市第二医院脊柱三科, 河北唐山 063000)

中图分类号 R932; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)03-0300-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.03.011

摘要 目的: 探讨复方苦参注射液对多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞增殖和凋亡的影响。方法: 体外培养多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞系, 采用四甲基偶氮唑盐法检测不同浓度复方苦参注射液对细胞增殖的影响, 采用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, 采用酶联免疫吸附法检测白细胞介素 6(IL-6) 的表达水平。结果: 0.5、1、2、5 和 10 mg/mL 的复方苦参注射液均有抑制骨髓瘤 RPMI8226 细胞增殖的作用, 且呈时间和剂量依赖性。5、10 mg/mL 的复方苦参注射液可显著促进细胞凋亡, 并阻滞细胞周期于 G₁ 期。复方苦参注射液治疗后, 细胞 IL-6 表达水平明显下调。结论: 复方苦参注射液能抑制骨髓瘤细胞的增殖, 诱导凋亡, 其机制可能与抑制 IL-6 的表达有关。

关键词 多发性骨髓瘤; 复方苦参注射; 增殖; 白细胞介素 6

Effects of Compound Kushen Injection on Proliferation and Apoptosis of RPMI8226 Cells in Multiple Myeloma[△]

LIU Rui¹, FAN Ningjian², WANG Yingman¹, SONG Jie¹, ZHANG Yan¹ (1. Dept. of Chemoradiotherapy, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Spine, the Second Hospital of Tangshan, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the effects of compound Kushen injection on proliferation and apoptosis of RPMI8226 cells in multiple myeloma. METHODS: RPMI8226 cells in multiple myeloma was subcultured in vitro. The effects of different concentrations of compound Kushen injection on cell proliferation were detected by Methyl thiazolyl tetrazolium, and cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The expression of interleukin-6(IL-6) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. RESULTS: Compound Kushen injection of 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL and 10 mg/mL could inhibit the proliferation of RPMI8226 cells in multiple myeloma in a time and dose dependent manner. Compound Kushen injection of 5 mg/mL and 10 mg/mL could significantly promote cell apoptosis and block cell cycle in G₁ phase. The expression of IL-6 decreased significantly after the treatment of compound Kushen injection. CONCLUSIONS: Compound Kushen injection can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of RPMI8226 cells, and its mechanism may be related to the inhibition of IL-6 expression.

KEYWORDS Multiple myeloma; Compound Kushen injection; Proliferation; Interleukin-6

多发性骨髓瘤是起源于骨髓中浆细胞的恶性肿瘤, 目前多采取化疗、免疫治疗及骨髓移植等治疗。骨髓移植为唯一治愈方法, 但受供体、年龄及经济条件的限制, 疾病缓解率低, 且容易产生耐药。复方苦参注射液是从纯中药中提取的抗肿瘤制剂, 近年来被广泛用于结肠癌、乳腺癌、食管癌和肺癌等恶性肿瘤的治疗, 效果显著^[1-8]。但复方苦参注射液能否起到抑制骨髓瘤细胞增殖和侵袭的作用, 目前尚不明确。为此, 本

研究以骨髓瘤 RPMI8226 细胞为对象, 分析复方苦参注射液对骨髓瘤细胞增殖和侵袭的调控作用及其机制, 为深入研究复方苦参注射液的抗肿瘤作用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

骨髓瘤 RPMI8226 细胞系购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2 仪器

Transwell 小室 (美国 Corning 公司); FACSCelesta 型流式

△ 基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (No. 2019170)

* 主治医师。研究方向: 肿瘤学。E-mail: 410172715@qq.com

细胞仪(美国 BD 公司);ELx808 型酶标仪(美国 Bio-TEK 公司)。

1.3 药品与试剂

复方苦参注射液(山西振东制药公司,批准文号为国药准字 Z14021231,规格为每支装 5 mL);四甲基偶氮唑盐(MTT)、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);凋亡、细胞周期试剂盒(上海前尘生物科技有限公司);MEM 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测复方苦参注射液对 RPMI8226 细胞增殖的影响

收集对数生长期骨髓瘤 RPMI8226 细胞,接种于 96 孔板上, 5×10^4 /mL,每孔 100 μ L。孵育 24 h,加入不同浓度(0.5、1、2、5 和 10 mg/mL)的复方苦参注射液 100 μ L,设置 5 个平行复孔。同时设置阴性对照组(细胞 100 μ L,培养液 100 μ L)和空白对照组(培养液 200 μ L)。孵育 24、48 h 后每孔加入 MTT 20 μ L,继续孵育 4 h,按照试剂盒方法进行处理,以酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A),计算 5 个复孔的平均值。分别计算给药后 24、48 h 细胞增殖抑制率。增殖抑制率(%) = [1 - (给药组平均吸光度 - 空白组平均吸光度) / (对照组平均吸光度 - 空白组平均吸光度)] \times 100%。

2.2 复方苦参注射液对 RPMI8226 细胞凋亡及细胞周期的影响

选择增殖抑制率 > 50% 的高浓度复方苦参注射液(5、10 mg/mL)为实验组,设置 5 个平行对照,同时设置阴性对照组(加入等量的细胞)。孵育 48 h,按照试剂盒方法处理,进行流式细胞仪检测。

2.3 血清白细胞介素 6(IL-6)水平检测

以不同浓度复方苦参注射液(0、5 和 10 mg/mL)处理

RPMI8226 细胞 48 h,按照 ELISA 试剂盒方法处理。记录酶标仪 450 nm 波长处测吸光度(A),计算 IL-6 水平。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均值比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方苦参注射液对 RPMI8226 细胞的增殖抑制作用

MTT 法结果显示,与对照组相比,复方苦参注射液各浓度组 RPMI8226 细胞的增殖被显著抑制,抑制作用增强呈剂量和时间依赖性,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 细胞抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

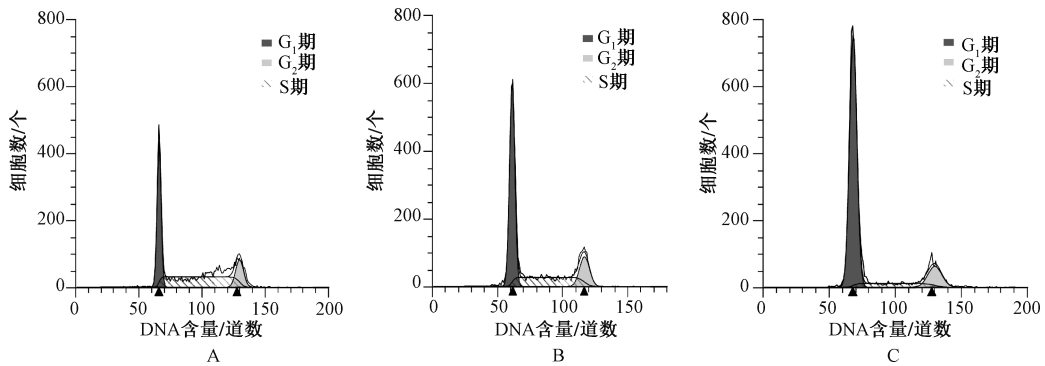
组别	细胞增殖抑制率/%	
	24 h	48 h
阴性对照组	0	0
空白对照组	1	1
复方苦参注射液 0.5 mg/mL 组	0.123 \pm 0.012	0.144 \pm 0.015 [▲]
复方苦参注射液 1 mg/mL 组	0.142 \pm 0.014 ^Δ	0.173 \pm 0.023 ^{Δ▲}
复方苦参注射液 2 mg/mL 组	0.152 \pm 0.019 ^Δ	0.442 \pm 0.015 ^{Δ▲}
复方苦参注射液 5 mg/mL 组	0.296 \pm 0.034 ^Δ	0.656 \pm 0.011 ^{Δ▲}
复方苦参注射液 10 mg/mL 组	0.364 \pm 0.064 ^Δ	0.753 \pm 0.014 ^{Δ▲}

注:与复方苦参注射液 5 mg/mL 组比较, ^Δ $P < 0.05$;与作用 24 h 相同浓度组比较, [▲] $P < 0.05$

Note: vs. compound Kushen injection of 5 mg/mL group, ^Δ $P < 0.05$; vs. the same concentration group after 24 h, [▲] $P < 0.05$

3.2 复方苦参注射液对 RPMI8226 细胞凋亡的影响

与阴性对照组相比,复方苦参注射液 5 mg/mL 组、复方苦参注射液 10 mg/mL 组 G_0/G_1 期细胞比例显著升高,而 S 期细胞比例显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。药物浓度提高后,细胞凋亡率明显升高,复方苦参注射液 5 mg/mL 组与复方苦参注射液 10 mg/mL 组的差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、表 2。



A. 阴性对照组; B. 复方苦参注射液 5 mg/mL 组; C. 复方苦参注射液 10 mg/mL 组

A. negative control group; B. compound Kushen injection 5 mg/mL group; C. compound Kushen injection 10 mg/mL group

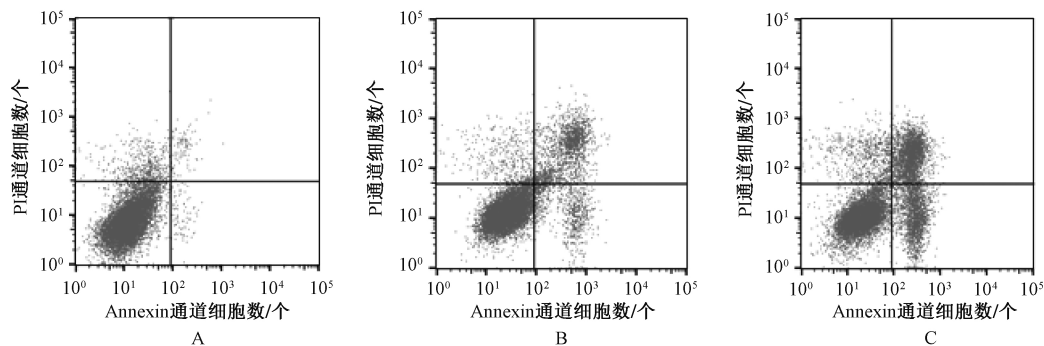
图 1 复方苦参注射液对细胞周期的影响

Fig 1 Effects of compound Kushen injection on cell cycle of RPMI8226 cells

3.3 复方苦参注射液对 IL-6 表达水平的影响

阴性对照组、复方苦参注射液 5 mg/mL 组和复方苦参注射液 10 mg/mL 组细胞 IL-6 表达水平分别为(23.97 \pm 1.87)、

(15.29 \pm 1.02) 和 (10.34 \pm 0.88) ng/L。与阴性对照组相比,复方苦参注射液各浓度组细胞 IL-6 表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);随着药物浓度的增加,IL-6 表达水平



A. 阴性对照组; B. 复方苦参注射液 5 mg/mL 组; C. 复方苦参注射液 10 mg/mL 组

A. negative control group; B. compound Kushen injection 5 mg/mL group; C. compound Kushen injection 10 mg/mL group

图 2 复方苦参注射液对细胞凋亡的影响

Fig 2 Effects of compound Kushen injection on apoptosis of RPMI8226 cells

表 2 细胞周期及凋亡率测定结果 ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Tab 2 Determination of cell cycle and apoptosis rate ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期	凋亡率
阴性对照组	43.28±2.38	40.75±1.56	15.97±0.71	1.56±0.11
复方苦参注射液 5 mg/mL	57.94±3.27 ^Δ	28.38±1.04 ^Δ	13.68±0.68	17.10±0.97 ^Δ
复方苦参注射液 10 mg/mL	70.42±4.83 ^{Δ▲}	14.53±0.72 ^{Δ▲}	15.05±0.58	30.20±1.21 ^{Δ▲}

注:与阴性对照组比较, ^ΔP<0.05;与复方苦参注射液 5 mg/mL 组比较, [▲]P<0.05

Note: vs. negative control group, ^ΔP<0.05; vs. compound Kushen injection of 5 mg/mL group, [▲]P<0.05

逐渐降低,复方苦参注射液 5 mg/mL 组与复方苦参注射液 10 mg/mL 组的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

4 讨论

多发性骨髓瘤为血液系统恶性肿瘤,常规治疗方案缓解率较低,故寻求及时有效的治疗尤为重要。复方苦参注射液为纯中药制剂,具有清热利湿、凉血解毒、止痛止血的功效,具有提高化疗效果和免疫功能的作用^[9-10]。分子机制研究表明,复方苦参注射液能通过抑制细胞周期调节蛋白和 DNA 修复蛋白水平,提高 DNA 双链断裂基因蛋白水平,诱导宫颈癌细胞凋亡^[11]。另外,Gao 等^[12]研究结果发现,复方苦参注射液可通过 MMP2、MYC、CASP3 和 REG1A 等靶点以及抑制葡萄糖、氨基酸代谢途径发挥抗肝癌作用。研究结果显示,复方苦参注射液可通过减少肿瘤组织中的血管生成来抑制小鼠肝癌细胞生长,平衡转化生长因子 β /Smad7 信号,预防肝癌发生^[13-14];并通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B、雷帕霉素靶蛋白和 Janus 激酶/信号转导与转录激活子等信号通路,起到治疗胃癌和肝癌的作用^[15-16];亦可通过 Prdxs/ROS/Trx1 信号通路,在急性白血病治疗中发挥重大作用^[17]。因此,作为一种潜在的抗肿瘤药,复方苦参注射液的作用机制值得深入研究。本研究以骨髓瘤 RPMI8226 细胞株为研究对象,探讨复方苦参注射液对其增殖和侵袭能力的影响,并分析潜在的抗肿瘤作用机制,以期对多发性骨髓瘤的治疗开辟新途径。

本研究结果发现,复方苦参注射液浓度从 5 mg/mL 增至 10 mg/mL,作用时间从 24 h 增至 48 h,对 RPMI8226 细胞增殖抑制作用均呈升高趋势,随着药物浓度增加,细胞凋亡率升高,细胞周期阻滞于 G₁ 期,提示苦参注射液能参与诱导骨髓瘤 RPMI8226 细胞凋亡。多发性骨髓瘤发病机制复杂,免疫因素

在疾病发生发展中的作用已得到广泛共识^[18]。既往研究结果显示,IL-6 在体内外均可促进恶性肿瘤细胞的增殖。多发性骨髓瘤患者血清中 IL-6 水平显著升高,且与肿瘤负荷密切相关,是骨髓瘤患者独立预后因素之一^[19-20]。本研究中,复方苦参注射液可降低 IL-6 表达水平,提示复方苦参注射液可能通过抑制 IL-6 的表达从而起到抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。进一步验证了复方苦参注射液的抗肿瘤活性及发挥抗骨髓瘤作用的分子机制。但复方苦参注射液在多发性骨髓瘤发生发展中的具体作用和分子机制尚不清楚,仍需通过分子生物学实验进一步研究证实。

综上所述,复方苦参注射液对骨髓瘤 RPMI8226 细胞增殖具有抑制作用,且该作用与抑制 IL-6 表达、参与调节多发性骨髓瘤相关免疫微环境有关。

参考文献

- [1] YANG H S, XIE Y M, NI J S, et al. Association rule analysis for validating interrelationships of combined medication of Compound Kushen Injection in treating colon carcinoma: a hospital information system-based real-world study[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 4579801.
- [2] 高星,孙会群,郭永刚,等. 结直肠癌术中联合复方苦参注射液灌注治疗的效果[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(20): 17-20.
- [3] AO M, XIAO X, LI Q S. Efficacy and safety of Compound Kushen Injection combined with chemotherapy on postoperative patients with breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(3): e14024.
- [4] 马志强,雷威,王文胜,等. 复方苦参注射液联合化疗对乳腺癌术后患者的疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(6): 102-

- [5] 田太华. 复方苦参注射液联合新辅助化疗治疗乳腺癌的价值研究[J]. 中国农村卫生, 2021, 13(11): 54-55, 57.
- [6] ZHOU W, HUANG Z H, WU C, et al. Investigation on the clinical efficacy and mechanism of Compound Kushen Injection in treating esophageal cancer based on multi-dimensional network meta-analysis and *in vitro* experiment [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114386.
- [7] CHEN H W, YAO X J, LI T, et al. Compound Kushen Injection combined with platinum-based chemotherapy for stage III/IV non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 37 RCTs following the PRISMA guidelines [J]. J Cancer, 2020, 11(7): 1883-1898.
- [8] 魏武杰, 洪娅丽, 潘放. 复方苦参注射液联合阿帕替尼治疗非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2021, 28(1): 63-65.
- [9] YANG X W, ZHAO X Y, WANG X X. Compound Kushen Injection for multiple myeloma: a protocol of systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(50): e18257.
- [10] 李华华, 杨峰, 裴俊文, 等. 杨峰教授在清热解毒理论指导下运用复方苦参注射液治疗恶性肿瘤经验[J]. 中医研究, 2021, 34(7): 74-76.
- [11] CUI J, QU Z P, HARATA-LEE Y, et al. Cell cycle, energy metabolism and DNA repair pathways in cancer cells are suppressed by Compound Kushen Injection [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 103.
- [12] GAO L, WANG K X, ZHOU Y Z, et al. Uncovering the anticancer mechanism of Compound Kushen Injection against HCC by integrating quantitative analysis, network analysis and experimental validation [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 624.
- [13] WANG H Y, HU H Y, RONG H, et al. Effects of Compound Kushen Injection on pathology and angiogenesis of tumor tissues [J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 2278-2282.
- [14] YANG Y, SUN M Y, LI W D, et al. Rebalancing TGF- β /Smad7 signaling via Compound Kushen Injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(7): e410.
- [15] ZHOU W, WU J R, ZHU Y L, et al. Study on the mechanisms of Compound Kushen Injection for the treatment of gastric cancer based on network pharmacology [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 6.
- [16] YANG Y, SUN M Y, YAO W B, et al. Compound Kushen Injection relieves tumor-associated macrophage-mediated immunosuppression through TNFR1 and sensitizes hepatocellular carcinoma to sorafenib [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000317.
- [17] JIN Y X, YANG Q, LIANG L, et al. Compound Kushen Injection suppresses human acute myeloid leukaemia by regulating the Prdxs/ROS/Trx1 signalling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 277.
- [18] Medical Masterclass Contributors, FIRTH J. Haematology: multiple myeloma [J]. Clin Med (Lond), 2019, 19(1): 58-60.
- [19] 褚娜利, 张靖宇, 郭丽, 等. 血液不同分离结果的多发性骨髓瘤患者 IL-6、IL-10、TNF- α 、 β_2 -MG 表达水平及临床意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(5): 1625-1630.
- [20] 王碧薇, 孙辉, 陈曦, 等. IL-6、IL-6R 及 MCL-1 在多发性骨髓瘤患者中的表达及临床意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(2): 553-557.

(收稿日期:2021-05-03 修回日期:2021-08-08)

(上接第 299 页)

- [3] 沈淑华, 王坤根, 吕宾, 等. 功能性消化不良中医研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(11): 852-853.
- [4] 高玉凤, 徐文平. 小儿消食颗粒联合推拿治疗小儿功能性消化不良的临床疗效观察 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(6): 934-935.
- [5] 中华中医药学会. 中医儿科常见病诊疗指南 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 121-125.
- [6] 王治铭, 伍丽萍, 孙晓滨, 等. 功能性消化不良发病机制研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(6): 161-164.
- [7] 许琨, 刘宝珍. 功能性消化不良的研究进展 [J]. 中国保健营养, 2021, 31(4): 10.
- [8] 赵琳琳, 巩露, 封东进, 等. 布拉氏酵母菌辅助雷贝拉唑治疗功能性消化不良小儿的短期疗效观察 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(7): 1432-1435.
- [9] 蒋芬. 布拉氏酵母菌散对功能性消化不良患儿肠道菌群及胃肠动力的影响 [J]. 中国妇幼保健研究, 2020, 31(11): 1549-1553.
- [10] 祝丽娟, 文建英, 罗玉兰. 参苓白术颗粒联合布拉氏酵母菌治疗小儿功能性消化不良的临床疗效分析 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2021, 26(5): 624-627.
- [11] 李俊松, 赖筱娟, 王华富, 等. 小儿消食颗粒促消化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 132-134.
- [12] 王凌. 小儿消食颗粒治疗小儿消化不良 60 例 [J]. 中医临床研究, 2010, 2(18): 62.
- [13] MCCULLOUGH R W. IBS, NERD and functional dyspepsia are immuno-neuronal disorders of mucosal cytokine imbalances clinically reversible with high potency sucralfate [J]. Med Hypotheses, 2013, 80(3): 230-233.
- [14] 李培菡, 温红珠, 卞慧, 等. 十二指肠低度炎症在功能性消化不良发病中的作用 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2021, 26(2): 276-279.
- [15] 王波, 王妃, 刘天媚. 儿童功能性消化不良 140 例临床分析 [J]. 安徽医药, 2020, 24(10): 2047-2049.
- [16] 李松财. 氟哌噻吨美利曲辛片结合匹维溴胺对更年期功能性消化不良患者植物神经及胃肠道功能的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(2): 426-429.
- [17] 王楠, 顾笑妍, 吴怡, 等. 鸡内金的临床应用及药理作用研究概况 [J]. 江苏中医药, 2021, 53(1): 77-81.
- [18] 叶建华. 麦芽炮制前后对胃液分泌的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(7): 78.
- [19] 张祺嘉钰, 赵佩媛, 孙静, 等. 山楂的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36(3): 521-523.

(收稿日期:2021-10-16 修回日期:2021-12-09)