

苦参碱对大肠癌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 表达的影响

王 雷, 刘 明 (哈尔滨医科大学附属第四医院, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘 要: [目的] 探讨苦参碱对人大肠癌 Lovo 细胞增殖抑制和凋亡诱导作用及其对 Bax、Bcl-2 表达的影响。[方法] 0.05~1.6mg/ml 不同浓度苦参碱作用 Lovo 细胞, 采用 MTT 法检测苦参碱对大肠癌 Lovo 细胞增殖抑制作用, DNA ladder、Annexin V -PI 法及 TUNEL 染色检测细胞凋亡, Western Blot 法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的变化。[结果] 0.05~1.6mg/ml 苦参碱处理 Lovo 细胞 24h 或 48h 后, 细胞增殖均明显受抑制; DNA ladder、Annexin V -PI 法及 TUNEL 染色检测结果显示苦参碱呈时间、剂量依赖性诱导细胞凋亡; 促凋亡蛋白 Bax 随着苦参碱剂量增加表达增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 随着苦参碱剂量增加表达减少。[结论] 苦参碱具有抑制大肠癌细胞增殖, 诱导其凋亡的作用。苦参碱诱导大肠癌细胞凋亡的机制可能与促凋亡蛋白 Bax 表达增加、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少有关。

关键词: 苦参碱; 大肠癌; 凋亡; Bcl-2; Bax

中图分类号: R735.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)03-0237-04

The Influence of Matrine on Apoptosis and Expression of Bax and Bcl-2 in Colorectal Cancer Cells

WANG Lei, LIU Ming

(The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Matrine on proliferation inhibition, apoptotic and Bax and Bcl-2 expression in human colorectal cancer cell line Lovo. [Methods] Lovo cells cultured in vitro were interfered with 0.05~1.6mg/ml different concentration of Matrine. The proliferation inhibition effect on Lovo cells was observed by MTT method. Apoptosis induction effect on Lovo cells was detected by DNA ladder, flow cytometer and TUNEL staining. The expression of Bcl-2 and Bax proteins correlated with apoptosis were detected by Western Blot assay. [Results] After being exposed to Matrine (0.05~1.6mg/ml) for 24 and 48h, the proliferation of Lovo cells was inhibited in a dose-time dependent manner. DNA ladder, Annexin V -PI method and TUNEL staining showed Matrine was obviously increased along with Matrine concentration increased. The expression of pro-apoptotic protein Bax was increased, while anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased as Matrine doses increased. [Conclusion] Matrine can inhibit proliferation and induction of apoptosis in colorectal cancer cells. Increased expression of Bax and decreased expression of Bcl-2 might involve in Matrine-induced apoptosis.

Key words: matrine; colorectal cancer; apoptosis; Bcl-2; Bax

苦参碱是从中药苦参干燥根中提取的一类活性物质, 它的化学式为 $C_{15}H_{24}N_2O$, 属于四环的喹啉啶类, 分子骨架可看作 2 个喹啉啶环的杂体。有文献报道苦参碱对多种恶性肿瘤, 如: 胃癌、肺癌、白血病、大肠癌、肝癌及卵巢癌^[1]等均有疗效。苦参碱抗肿瘤作用包括抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞黏附转移、逆转肿瘤

细胞耐药性、调节肿瘤宿主免疫功能等多个方面^[2], 本实验从细胞生长抑制、细胞凋亡检测、蛋白表达分析等多方面来研究苦参碱对人大肠癌 Lovo 细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用, 并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

人大肠癌 Lovo 细胞(哈尔滨医科大学附属第三

收稿日期: 2011-12-12; 修回日期: 2012-01-16

通讯作者: 刘 明, E-mail: Mingliu35@yahoo.com.cn

医院科研实验中心馈赠),苦参碱(质量分数 98%,购自陕西慧科植物开发有限公司),细胞培养液 RPMI-1640、胎牛血清(美国 HyClone 公司),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),TUNEL 试剂盒(瑞士 ROCHE 公司),Bax 抗体、Bcl-2 抗体、HRP-羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 MTT 法检测细胞增殖率

取指数生长期 1×10^5 个/ml Lovo 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,分别加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mg/ml 苦参碱,每个实验组设置 6 个平行孔,同时用生理盐水作为空白对照,用不加药物组作为调零孔。培养 24h 或 48h 后,将带有药物的培养液移除,加入 MTT 作用 4h 后,吸出 MTT,加入 DMSO 于 37℃ 水浴 1 200r/min 作用 30min,测 492nm 波长处吸光度(A)值,按照以下公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(1-处理组 OD₄₉₂ 值/空白对照组 OD₄₉₂ 值)×100%。

1.3 DNA 提取

取指数生长期 1×10^6 个/ml Lovo 细胞,加入终浓度为 0.4、0.8、1.6mg/ml 的苦参碱作用 24h 后,收集细胞,加入 600μl 裂解液进行裂解,向裂解产物中加 3μl 蛋白酶 K,55℃ 水浴 4h。取出样品降至室温,加 200μl 醋酸钾震荡 20s,充分混匀后冰浴 5min,13 000r/min 离心 3min,取上清移入加有 600μl 异丙醇 EP 管中混匀后,13 000r/min 离心 1min,弃上清收集沉淀,用 70%乙醇洗沉淀 1 次,空气中干燥沉淀 15min,加入适量 TE 缓冲液溶解沉淀,-70℃ 保存备用。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取指数生长期 1×10^6 个/ml Lovo 细胞,加入终浓度为 0.4、0.8、1.6mg/ml 的苦参碱作用 24h 后,用胰酶轻柔消化细胞,PBS 轻柔洗涤 2 次。将细胞悬于结合缓冲液中,加入膜联蛋白 V(annexin V),避光室温反应 15min 以上,临检测前加入碘化丙啶(propidium iodide,PI)反应 5min,用美国 BD 公司 Fascalibur 型流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

取指数生长期 Lovo 细胞爬片,待细胞贴壁后,加入终浓度为 0.4、0.8、1.6mg/ml 的苦参碱作用 24h,PBS 轻柔洗涤 2 次,每次 5min,室温 4%多聚甲醛中固定 15min;PBS 轻柔洗涤 2 次,每次 5min,将吸附细胞的载玻片在 0.1%的 Triton X-100 中处理 2min;

PBS 轻柔洗涤 2 次,每次 5min,用滤纸吸去载玻片上的多余液体,滴加 100μl 的 TUNEL 反应液 37℃ 作用 1h;PBS 浸洗后,滴加 100μl Converter-POD 溶液,室温反应 30min;PBS 轻柔洗涤 2 次,每次 5min,滴加 100μl DAB 工作液,直到呈现浅棕色背景;用去离子水漂洗 2~3 次;甘油封片,光学显微镜下进行观察并拍照。200 倍光镜下进行计数分析,每张玻片选 10 个视野进行计数,计量每个视野的阳性细胞数以及总细胞数,计算凋亡率。

1.6 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达

取指数生长期 Lovo 细胞,加入终浓度为 0.4、0.8、1.6mg/ml 的苦参碱作用 24h 后收集细胞,用适量细胞蛋白裂解液裂解各组标本,4℃ 12 000r/min 离心 15min 后取上清液,用 Bradford 法测蛋白浓度,取 20μg 蛋白加上样缓冲液,95℃ 煮 5min 变性蛋白以获取样品,保存备用。配置 10%十二烷基苯磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行蛋白分离。电转至硝酸纤维膜,5%脱脂奶粉封闭 1h 后,加入一抗 anti-Bcl-2 (1:200)、anti-Bax (1:200)4℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗 3 遍,辣根过氧化物酶(HRP)标记的相应二抗室温孵育 1h 后,再用 TBST 缓冲液洗 3 遍,ECL 试剂盒发光。暗室曝光胶片,显影及定影获得结果,凝胶扫描仪扫描分析条带。

1.7 统计学处理

数据采用均数±标准差表示。应用 SPSS 软件进行分析,差异性比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 苦参碱对大肠癌 Lovo 细胞增殖的影响

不同浓度苦参碱作用 24h、48h 后 LoVo 细胞 OD 值及抑制率见表 1。0.4、0.8、1.6mg/ml 苦参碱作用于大肠癌 Lovo 细胞 24h,与对照组相比抑制率均有显著性差异(P 值分别为 0.002、0.001、0.001)。0.2、0.4、0.8、1.6mg/ml 参碱作用于大肠癌 Lovo 细胞 48h,与对照组相比抑制率均有显著性差异(P 值分别为 0.02、0.001、0.001、0.001),说明苦参碱呈剂量依赖性及时间依赖性抑制 Lovo 细胞的增殖。

2.2 苦参碱诱导 Lovo 细胞凋亡

由于苦参碱抑制大肠癌 Lovo 细胞增殖实验中,0.4mg/ml 苦参碱作用于大肠癌 Lovo 细胞 24h 即具

有明显增殖抑制作用,因此选用苦参碱 0.4、0.8、1.6mg/ml 作用于细胞 24h 进行诱导 Lovo 细胞凋亡实验。

DNA ladder 法可以检测细胞晚期凋亡,结果显示随着苦参碱剂量的增加,DNA 释放出小片段增多,说明细胞凋亡增多。可见苦参碱能够诱导 Lovo 细胞凋亡,并具有剂量依赖性(图 1)。

流式细胞仪检测 Lovo 细胞凋亡结果显示,随着苦参碱浓度的增加,在 UR 象限(代表早期凋亡)的细胞比例增多,即早期凋亡增多(图 2)。0.4、0.8、1.6mg/ml 苦参碱组与对照组比较均有明显差异(P 值分别为 0.02、0.01、0.008),见表 2。说明苦参碱能够诱导 Lovo 细胞早期凋亡,且具有剂量依赖性。

表 1 苦参碱对大肠癌 Lovo 细胞增殖的影响

苦参碱浓度 (mg/ml)	OD 值		抑制率(%)	
	24h	48h	24h	48h
对照组	1.19±0.04	1.30±0.03	0	0
0.05	1.14±0.03	1.25±0.02	3.68	4.01
0.1	1.13±0.02	1.22±0.01	4.36	6.53
0.2	0.98±0.08	1.06±0.05	17.43	19.16*
0.4	0.85±0.02	0.76±0.05	28.61*	41.63*
0.8	0.63±0.02	0.51±0.04	46.44*	60.71*
1.6	0.31±0.02	0.23±0.03	74.24*	82.22*

*:与对照组比较, $P<0.05$ 。

表 2 流式细胞仪检测苦参碱对 Lovo 细胞凋亡的影响(n=3)

苦参碱浓度 (mg/ml)	%Gated			
	UL	UR	LL	LR
对照组	0.26±0.22	1.78±0.50	96.71±0.74	1.26±0.28
0.4	0.41±0.11	4.56±1.60*	92.94±2.49	2.29±0.61
0.8	0.53±1.78	10.41±4.41*	82.96±5.43	3.10±1.24
1.6	3.59±2.69	12.39±4.59*	76.40±9.29	7.62±6.68

*:与对照组比较, $P<0.05$ 。

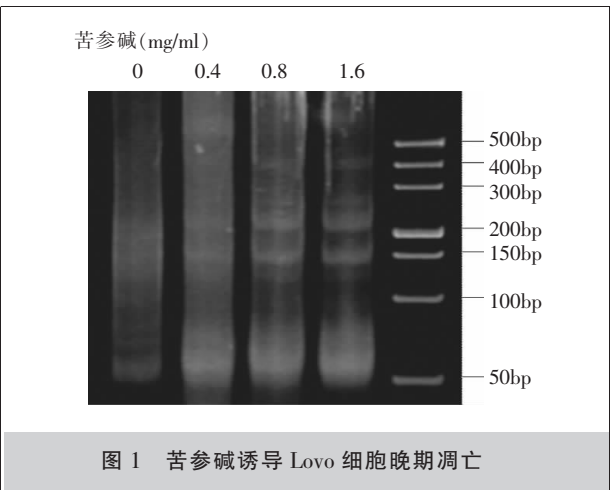


图 1 苦参碱诱导 Lovo 细胞晚期凋亡

TUNEL 染色结果显示,随着给药剂量的增加,Lovo 细胞凋亡率增高(图 3),且呈剂量依赖性。苦参碱 0.4、0.8、1.6mg/ml 组凋亡率与对照组比较差异有显著性(P 值分别为 0.007、0.001、0.004)。表 3。

2.3 苦参碱对 Lovo 细胞中 Bcl-2、Bax 表达的影响

苦参碱 0.4、0.8、1.6mg/ml 处理 Lovo 细胞 24h,结果显示,促凋亡蛋白 Bax 随着药物剂量增加表达增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 随着药物剂量增加表达减少(图 4)。对条带的灰度值进行统计学分析,随苦参碱浓度增加 Bax/Bcl-2 比值逐渐增大,0.4、0.8、1.6mg/ml 组与对照组比较差异均有统计学意义(P 值分别为 0.004、0.012、0.004)。见表 4。

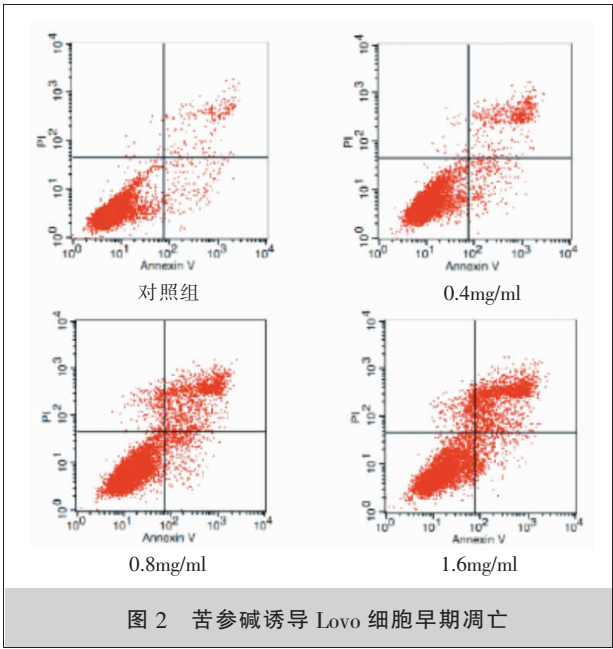


图 2 苦参碱诱导 Lovo 细胞早期凋亡

表 3 TUNEL 检测苦参碱对 Lovo 细胞凋亡的影响(n=3)

苦参碱浓度(mg/ml)	凋亡率(%)
对照组	2.67±0.5
0.4	23.3±2.5*
0.8	37.3±1.7*
1.6	47.0±4.5*

*:与对照组比较, $P<0.05$ 。

表 4 苦参碱对 Lovo 细胞中 Bcl-2、Bax 表达的影响(n=3)

苦参碱浓度(mg/ml)	Bax/actin	Bcl-2/actin	Bax/Bcl-2
对照组	0.77±0.01	7.13±1.34	0.11±0.02
0.4	1.65±0.26	6.06±0.96	0.27±0.05*
0.8	2.56±2.25	2.22±0.81	1.15±0.50*
1.6	5.96±0.58	0.99±0.29	5.98±1.88*

*:与对照组比较, $P<0.05$ 。

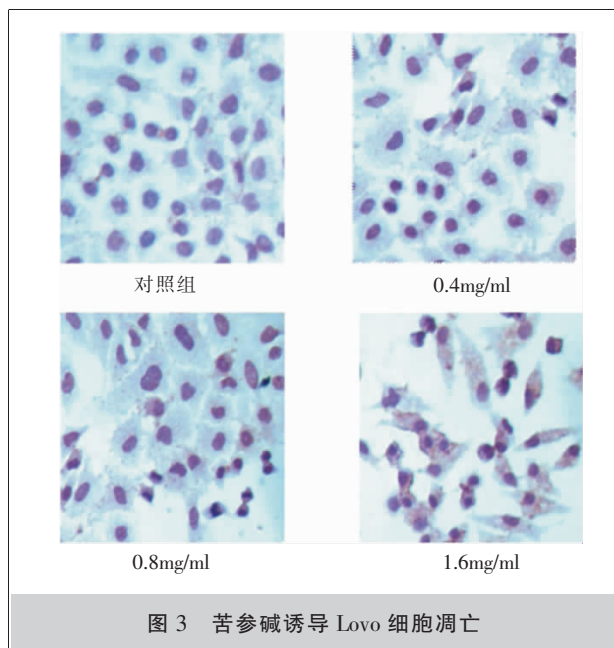


图3 苦参碱诱导 Lovo 细胞凋亡

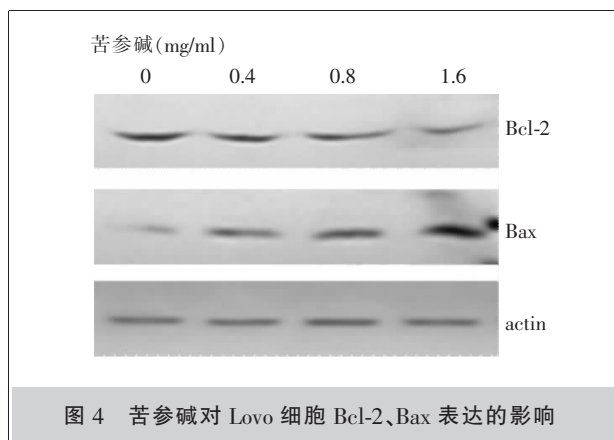


图4 苦参碱对 Lovo 细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响

3 讨论

苦参始见于《神农本草经》,以古代文献为依据,当代学者对苦参的抗肿瘤作用进行了深入研究,发现苦参水煎剂或醇提取物确有抑制小鼠肿瘤生长的作用^[3]。进一步分离提取得到的苦参碱提取物(含苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、槐胺碱等)对实体瘤和腹水癌均有明显抑制作用^[4]。本研究发现不同浓度苦参碱(0.05~1.6mg/ml)作用于大肠癌 Lovo 细胞 24h 或 48h,抑制率与对照组比较差异均具有统计学意义,提示苦参碱抗肿瘤机制之一是抑制肿瘤细胞的增殖,且随着药物剂量的增加,作用时间的延长,抑制率增高。

本研究应用流式细胞仪检测技术检测细胞凋亡,结果显示分别用苦参碱 0.4、0.8、1.6mg/ml 作用

于 Lovo 细胞,与对照组相比细胞早期凋亡率明显增加($P<0.05$),说明苦参碱能够诱导细胞早期凋亡,且呈明显的剂量依赖性。进一步用 DNA ladder 实验检测苦参碱诱导细胞晚期凋亡的情况,结果表明苦参碱呈剂量依赖性诱导细胞晚期凋亡。TUNEL 染色从形态学上观察 Lovo 细胞晚期凋亡,0.4、0.8、1.6mg/ml 苦参碱作用 Lovo 细胞 24h,死亡率与对照组相比明显增加($P<0.05$),可见苦参碱诱导 Lovo 细胞晚期凋亡率亦随着给药剂量的增加而增高,说明苦参碱能够同时诱导肿瘤细胞早期、晚期凋亡,发挥其抗肿瘤作用。

在细胞凋亡调控因子中,Bcl-2 家族倍受瞩目,其中 Bcl-2 是原癌基因,其作用是抑制细胞凋亡,而 Bax 是 Bcl-2 的同源基因,其过表达可拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用,而使细胞趋于凋亡。Bcl-2 和 Bax 在体内通常以二聚体形式发挥作用,两者的比例决定了细胞在体内遭到某些刺激后对凋亡的敏感性^[5]。如 Bax 的表达量少,Bcl-2 即可拮抗 Bax 的作用而阻止肿瘤细胞凋亡,细胞趋于生存;如 Bax 过多的表达,则细胞对外界凋亡诱导因素十分敏感,细胞趋于凋亡^[6]。本研究结果显示,0.4、0.8、1.6mg/ml 苦参碱分别作用 Lovo 细胞 24h,与对照组相比,Bcl-2 表达减少 Bax 表达增多,并且 Bax/Bcl-2 比例与对照组相比明显增大($P<0.05$),提示在苦参碱作用组中 Bax 高表达,可使肿瘤细胞对凋亡更敏感,更易发生凋亡,并且高剂量组 Bax 高表达更明显,这可能是苦参碱诱导细胞凋亡、发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。

综上所述,苦参碱能够明显抑制人大肠癌 Lovo 细胞的增殖,且呈时间剂量依赖性。苦参碱能够诱导 Lovo 细胞凋亡,其机制可能与抑制 Bcl-2 表达、激活 Bax 表达有关。

参考文献:

- [1] 熊小春, 安春妹. 苦参碱抗肿瘤研究概况[J]. 中国医药导报, 2009, 6(33): 10-12.
- [2] 陈滨海, 周郁鸿, 钱文斌. 苦参碱抗肿瘤作用机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(8): 524-526.
- [3] 成秉林, 王新华, 张淑杰. 苦参碱对大鼠胶质瘤干预作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(5): 349-350.
- [4] 陈慧芝, 包海鹰, 诺敏, 等. 苦参的化学成分和药理作用及临床研究概况[J]. 人参研究, 2010, 3: 31-36.
- [5] 郭昕, 佟丽波, 杜佳秋. 细胞凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 在子宫肌瘤中表达的意义[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 4: 65-66.
- [6] Choi BH, Kim W, Wang QC, et al. Kinetin riboside: preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells [J]. Cancer Lett, 2008, 261(1): 37-45.