

苦参碱促进三苯氧胺诱导乳腺癌 Bcap-37 细胞凋亡的机制研究

Mechanism of Matrine Promoting Apoptosis Induced by Tamoxifen in Breast Cancer Cell Bcap-37

ZHENG Ru-zhen, ZHANG Jing-yi, SHAO Xi-ying, et al.

郑如珍¹, 张静宜², 邵喜英³, 王晓稼³

(1. 杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002; 2. 桐庐县第一人民医院, 浙江 桐庐 311500; 3. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 研究三苯氧胺(TAM)联合低剂量苦参碱对人乳腺癌 Bcap-37 细胞的增殖抑制及作用机制。[方法] 用 MTT 法检测各组细胞的抑制率, 克隆形成实验检测对细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 法检测 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达。[结果] TAM 对 Bcap-37 细胞增殖具有明显抑制作用, 且具有剂量和时间依赖性, 与低剂量苦参碱联合, 其抑制作用明显增强。药物作用 24、48、72h 后, 与对照组相比, TAM 组的凋亡率均明显增高($P<0.01$); 与 TAM 组相比, 联合组的凋亡率均明显增高($P<0.01$)。Western blot 检测发现, 与对照组相比, TAM 组 p53、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低; 与 TAM 组相比, 联合组 p53、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。[结论] 低剂量苦参碱能促进 TAM 对 Bcap-37 细胞增殖抑制作用, 其作用机制与增加 p53、Bax 蛋白表达, 降低 Bcl-2 蛋白表达, 促进细胞凋亡有关。

关键词: 苦参碱; 三苯氧胺; 乳腺癌; Bcap-37 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0840-04

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%^[1], 乳腺癌是一种激素依赖性肿瘤, 三苯氧胺(tamoxifen, TAM)是一种雌激素受体(estrogen receptor, ER)阻断剂, 已经广泛应用于乳腺癌雌激素受体、孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性患者的辅助治疗和解救治疗, 然而, 长期应用 TAM 可促进子宫内膜癌及血栓形成等危险^[2,3]。

相关研究发现, 苦参(*sophora flavescens ait*)的主要活性成分苦参碱(matrine)可以抑制多种肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞分化, 促进细胞凋亡。该实验以人乳腺癌 Bcap-37 细胞为研究对象, 探讨 TAM 联合低剂量苦参碱对 Bcap-37 细胞增殖抑制作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

细胞: 人乳腺癌 Bcap-37 细胞株购自上海中科

通讯作者: 王晓稼, 主任医师, 博士; 浙江省肿瘤医院化疗中心, 浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号(310022); E-mail: wxj88851@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-09-10; 修回日期: 2012-10-22

院细胞所。

药物: 苦参碱注射液购自广州白云山明兴制药有限公司(批号: 090204)。

试剂和仪器: 标准品 TAM 为欧洲药典生产, 纯度>99%, 分子量为 563.6, 溶于无水酒精, 冰箱储存备用。DMEM 高糖培养液购自杭州宏博生物工程有限公司。胎牛血清购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。MTT 粉、DMSO 购自美国 Sigma 公司。Cycle plus DNA-kit 试剂盒、Annexin V-FITC & PI Apoptosis Detection Kits 试剂购自美国 Becton Dickinson 公司(批号: 37615; 80625)。

1.2 方法

细胞培养: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养人乳腺癌 Bcap-37 细胞, 以 1:2~1:3 传代。

MTT 法检测药物对细胞的抑制率: Bcap-37 细胞按每孔 4 000 个细胞/100μl 接种于 96 孔板, 贴壁 24h, 倒去培养液, 分别加入不同浓度的 TAM 100μl, 浓度为 0、0.1、0.5、2.0、3.5、5.0、6.5、8.0mg/L, 另设对照孔(只加培养液 100μl), 每组设 8 个复孔。细胞培

养 24、48 和 72h 后,每孔加入 5mg/ml MTT 液 15 μ l,继续培养 4h,吸去上液,每孔加入 DMSO 150 μ l,摇床上摇晃 10min。用酶标仪检测 550nm 处各孔吸光值 OD₅₅₀,计算各组抑制率,细胞抑制率=(对照组 OD₅₅₀-试验组 OD₅₅₀)/对照组 OD₅₅₀×100%。实验重复 3 次,计算 TAM 的 IC₅₀、IC₃₀ 和 IC₂₀ 值。

克隆形成率实验:以低浓度苦参碱注射液(80mg/L)、TAM(2.6mg/L)为研究药物浓度,设对照组、苦参碱(80mg/L)、TAM(2.6mg/L)、苦参碱(80mg/L)+TAM(2.6mg/L)4 组(以下实验同)。Bcap-37 细胞贴壁 24h,加入实验药物,继续培养 48h,消化计数,每组分别接种 Bcap-37 细胞 400 个/培养瓶,继续培养 2 周,PBS 漂洗两次,每孔加入甲醇 3ml,固定 15min,弃固定液,加适量姬姆萨染液染色,自然干燥,肉眼直接计数克隆,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

流式细胞仪测定细胞凋亡率:Bcap-37 细胞按每瓶 10×10⁴ 接种,设对照组、苦参碱组、TAM、苦参碱联合 TAM 4 组,贴壁 24h,加入实验用药,继续培养 24、48、72h,胰酶消化,1 200r/min 离心 6min,收集各时间点细胞。将各组细胞经 PBS 液漂洗 2 次,按 Annexine/PI 试剂盒操作,上流式细胞仪检测细胞凋亡率,每份标本计数 10 000 个细胞,实验重复 3 次。

Western blot 检测 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达:Western blot 检测药物作用 48h 后各试验组细胞 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达情况,按说明书操作。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验方差齐性,均数间两两比较用单因素方差分析,多组均数间比较用方差分析, F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TAM 对 Bcap-37 细胞增殖的影响

由表 1 可见,与对照组相比,TAM 对 Bcap-37 细胞具有明显抑制作用,且随着药物浓度增加(0.1、0.5、2.0、3.5、5.0、6.5、8.0mg/L)、药物作用时间延长(24、48、72h),平均抑制率逐渐增加,呈现剂量和时间依赖效应。TAM 作用于 Bcap-37 细胞 24、48、72h

的 IC₅₀ 分别为 5.276、2.676、1.693mg/L,IC₃₀ 分别为 1.363、0.827、0.556mg/L,IC₂₀ 分别为 0.576、0.392、0.274mg/L。

表 1 不同浓度 TAM 作用 24、48、72h 后对 Bcap-37 细胞生长抑制率(%)的比较

TAM 浓度(mg/L)	24h	48h	72h
0	0	0	0
0.1	9.30±0.09	11.30±0.08	15.90±0.13
0.5	17.70±0.12	20.40±0.10	23.10±0.05
2.0	26.10±0.03	33.30±0.04	37.80±0.07
3.5	40.00±0.01	48.90±0.06	54.20±0.03
5.0	47.80±0.11	57.10±0.13	61.10±0.10
6.5	55.60±0.04	65.50±0.04	72.00±0.08
8.0	65.90±0.02	82.00±0.08	91.90±0.09

2.2 苦参碱、TAM 对细胞克隆形成率的影响

对照组、苦参碱组、TAM 组和联合组每 400 个细胞形成的克隆数分别为 87±2.52、78±2.08、54±2.52 和 44±2.52,与对照组相比,单药组的克隆数明显下降,与 TAM 组相比,联合组的克隆数明显下降,差异均具有统计学意义($F=207.900$, $P < 0.01$)。结果提示,TAM 可以抑制 Bcap-37 细胞增殖,而且联合低剂量苦参碱可以增强其对 Bcap-37 细胞的生长抑制作用。

2.3 苦参碱、TAM 对细胞凋亡率的影响

由表 2 可见,药物作用 24、48、72h 后,与对照组相比,TAM 组的凋亡率均明显增高,与 TAM 单药组相比,联合组的凋亡率均明显增高($P < 0.01$),差异均具有明显统计学意义($P < 0.01$), F 值为 331.038(24h)、359.630(48h)、630.456(72h)。并以作用 48h 后的细胞凋亡最为明显。

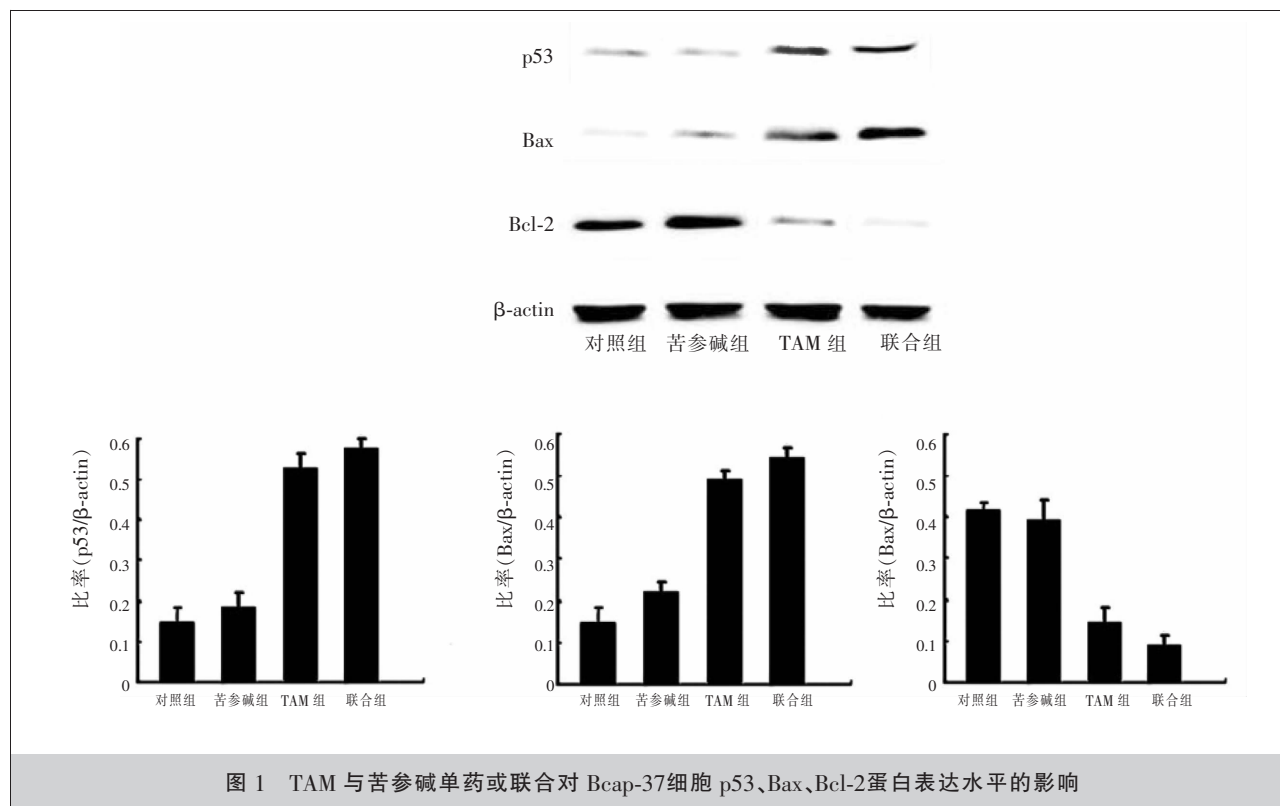
表 2 FCM 检测药物作用 24、48、72h 后各组 Bcap-37 细胞的凋亡率(%)

组别	24h	48h	72h
对照组	2.86±0.31	3.10±0.50	2.97±0.24
苦参碱组	4.78±0.44	6.90±0.19	5.53±0.30
TAM 组	11.22±0.64*	14.84±0.94*	13.10±0.42*
联合组	17.73±0.97* [△]	23.89±1.99* [△]	20.91±0.96* [△]

注:与对照组比较;* $P < 0.01$;与 TAM 组比较;* $P < 0.01$ 。

2.4 Western blot 检测 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达

从图 1 中可以看出,与对照组相比,TAM 组 p53、Bax 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达降低。与 TAM 组相比,联合组 p53、Bax 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达降低。



3 讨论

内分泌治疗是乳腺癌全身治疗的重要手段之一。TAM 是一种雌激素受体调节剂,通过在细胞水平阻断雌激素与其受体结合而起到抗雌激素作用,对绝经前和绝经后乳腺癌患者都具有确切疗效。有研究证实^[4],TAM 能通过调节乳腺癌 MCF-7 细胞的 Bax 和 Bcl-2 水平,从而促进肿瘤细胞的凋亡。苦参碱是从苦参根、苦豆子中提取的一些生物碱等,其分子结构为 $C_{15}H_{24}N_2O$ ^[5,6],苦参碱可抑制多种肿瘤细胞增殖、诱导细胞分化,促进凋亡,并且,与化疗药物联合能显著增强化疗药物的疗效^[5-11],成为抗肿瘤治疗一个新的研究热点。体外实验证实,苦参碱和 TAM 均可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡^[4,12],因此,理论上两者联用存在效果增强的可能。该试验选用低剂量的苦参碱与 TAM 联合使用,旨在排除细胞毒的相加作用,观察苦参碱增强 TAM 的抗肿瘤作用。

该研究发现,不同浓度 TAM 对人乳腺癌 Bcap-37 细胞生长具有明显抑制作用,且随着药物浓度增加、作用时间延长,抑制率也逐渐增加,呈现剂量和时间依赖效应。进一步行克隆形成率实验证实,低剂

量苦参碱与 TAM 联合使用,能显著增强 TAM 对 Bcap-37 细胞的抑制作用,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。通过流式细胞仪检测发现,药物作用 24、48、72h 后,与对照组相比,TAM 组的凋亡率均明显增高,与 TAM 单药组相比,联合组的凋亡率均明显增高 ($P < 0.01$),差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.01$),并以作用 48h 后的细胞凋亡最为明显。

细胞凋亡的发生机制十分复杂,与许多基因表达有密切关系,其中 Bcl-2 家族倍受瞩目,它通过表达的蛋白发挥促进或抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最具代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因,并且 Bax 是 Bcl-2 活性的主要调控因子,是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白。Bcl-2/Bax 是决定凋亡的一个重要因素^[13]。在细胞中,当 Bax 表达量较高时,形成同源二聚体 Bax/Bax,促进细胞凋亡,当 Bcl-2 表达量较高时,形成异源二聚体 Bcl-2/Bax,抑制细胞凋亡^[14,15]。Bcl-2/Bax 比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义,是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[16,17]。细胞死亡是通过 p53 依赖或非依赖两条途径进行调节的,而高效的细胞凋亡必须通过 p53 途径^[18]。p53 基因包括野生型 p53 基因 (wild type p53, wtp53) 和突变型

p53 基因 (*mutant type p53, mtp53*), *wtp53* 基因对细胞凋亡有促进作用, *mtp53* 则可抑制细胞凋亡的发生, 两者均参与细胞凋亡的调节。研究表明, p53 的凋亡调节作用是通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 或 Bcl-xl 等实现的, 通过它们的相互作用调节细胞线粒体的通透性, 从而影响下游的促凋亡基因的功能。p53 活性增高可迅速下调 Bcl-2 基因的表达, 当 p53 基因敲除, Bcl-2 蛋白水平明显增高。基因调节凋亡与其调节 Bcl-2 家族蛋白有明显的相关性, 可能是调节 Bcl-2 家族蛋白的重要因素^[19,20]。与此相符的, 该实验通过 Western blot 检测发现, 与对照组相比, TAM 组 p53、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。与 TAM 组相比, 联合组 p53、Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。因此, 低剂量苦参碱促进 TAM 诱导乳腺癌 Bcap-37 细胞凋亡的机制可能与调节 p53、Bax、Bcl-2 蛋白有关。

从理论上讲, TAM 的浓度越高, 对乳腺癌细胞的抑制作用越强, 具有明显的剂量相关性。然而, 长期应用 TAM 可促进子宫内膜癌增生及血栓形成等危险, 临床上使用的 TAM 在避免加重其不良反应的前提下采用的是较低的剂量(20mg/d), 因而, 如果能够提高同等浓度下 TAM 的抗癌活性, 则对提高临床疗效具有一定参考价值。近年来, 很多研究已经表明, 中药提取物苦参碱是一种高效低毒的抗肿瘤药物, 与多种化疗药物联合能显著增强化疗疗效, 并且, 该试验也证实了低剂量苦参碱能促进 TAM 对人乳腺癌 Bcap-37 细胞的抑制作用, 其作用机理与增加 p53、Bax 蛋白表达, 降低 Bcl-2 蛋白水平, 从而诱导细胞凋亡有关。然而, 这种实验结果与人体内药物作用结果是否一致, 目前尚难定论, 该实验只是初步报告, 尚待临床进一步验证。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71-96.
- [2] Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(22):1652-1662.
- [3] 杨名添, 连臻强. 乳腺癌内分泌治疗的进展[J]. 癌症, 2007, 26 (4): 440-444.
- [4] 郑军, 姚榛祥. 三苯氧胺对乳腺癌细胞凋亡和耐受性的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(1):55-57.
- [5] Zhang Y, Zhang H, Yu P, et al. Effects of matrine against the growth of human lung cancer and hepatoma cells as well as lung cancer cell migration [J]. Cytotechnology, 2009, 59(3):191-200.
- [6] Qin XG, Hua Z, Shuang W, et al. Effects of matrine on HepG2 cell proliferation and expression of tumor relevant-proteins in vitro[J]. Pharm Biol, 2010, 48(3):275-281.
- [7] Ma L, Wen S, Zhan Y, et al. Anticancer effects of the Chinese medicine matrine on murine hepatocellular carcinoma cells[J]. Planta Med, 2008, 74(3):245-251.
- [8] Jiang H, Hou C, Zhang S, et al. Matrine upregulates the cell cycle protein E2F-1 and triggers apoptosis via the mitochondrial pathway in K562 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 559(2-3):98-108.
- [9] Yu HB, Zhang HF, Li DY, et al. Matrine inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(3):242-250.
- [10] Yang CL, Liu SS, Ma YG, et al. The influence of intra-operative pleural perfusion with matrine-cisplatin or cisplatin on stromal cell-derived factor-1 in non-small cell lung cancer patients with subclinical pleural metastasis[J]. Med Oncol, 2012, 29(2):574-581.
- [11] 陈伟忠, 曾欣, 林勇, 等. 苦参碱对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及端粒酶活动调控的体外研究[J]. 肿瘤学杂志, 2002, 8(3):168-170.
- [12] Li LQ, Li XL, Wang L, et al. Matrine inhibits breast cancer growth via miR-21/PTEN/Akt pathway in MCF-7 cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(3):631-641.
- [13] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation [J]. Nature, 2003, 423(6938):456-461.
- [14] Parikh N, Koshy C, Dhayabaran V, et al. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein Bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic protein Bcl-xL[J]. BMC Cell Biol, 2007, 8:16.
- [15] 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.
- [16] Cottet S, Schorderet DF. Triggering of Bcl-2-related pathway is associated with apoptosis of photoreceptors in Rpe65 -/- mouse model of Leber's congenital amaurosis [J]. Apoptosis, 2008, 13(3):329-342.
- [17] Bivik CA, Andersson EB, Rosdahl IK. Wavelength-specific effects on UVB-induced apoptosis in melanocytes. A study of Bcl-2/Bax expression and keratinocyte rescue effects[J]. Melanoma Res, 2005, 15(1):7-13.
- [18] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited[J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(4):506-525.
- [19] Moll UM, Marchenko N, Zhang XK. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction [J]. Oncogene, 2006, 25 (34):4725-4743.
- [20] Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331 (3):851-858.