

苦参碱对食管癌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响*

杜好信 姜杰 耿国军 姚成才 陈隽鹏 张义 陈端扬

(福建中医学院附属厦门中医院 厦门 361009)

摘要:目的:探讨中药提取物苦参碱(Matrine)对食管癌(esophagus carcinoma)细胞系的凋亡诱导作用及其发生机制。方法:体外培养食管癌细胞,用不同浓度的苦参碱对体外培养的食管癌细胞进行干预。分别采用 MTT、免疫细胞化学染色、流式细胞仪检测的方法,观察其对食管癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用;并对凋亡相关 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的变化进行定性检测。结果:经不同浓度的苦参碱处理后的食管癌细胞,其生长受到明显的抑制,细胞凋亡指数随药物浓度增加而明显增加;苦参碱作用组 Bax 表达明显高于对照组。结论:一定浓度的苦参碱能抑制食管癌细胞的增殖,促进其凋亡;其机制可能与调控 Bcl-2、Bax 表达有关。

关键词:苦参碱;食管癌细胞;Bcl-2;Bax

Abstract:Objective: To investigate the effects of Matrine that is active component of Chinese traditional medicine on inducing apoptosis and explore the mechanism of action in human esophagus carcinoma cell line. Methods: Different concentrations of Matrine were used in the culture of esophagus carcinoma cells. Proliferation and apoptosis of esophagus carcinoma cells were observed by ways of MTT, immunocytochemistry, indirect immunofluorescence and flow cytometry quantitative analysis, etc. At the same time, the expression of Bcl-2 and Bax protein were determined by qualitative analysis. Results: Proliferation of esophagus carcinoma cells was inhibited effectively after being treated by different concentrations of Matrine. The rate of apoptosis was increasing with increased concentration of Matrine. The expression of Bcl-2 was decreasing in the experimental groups by two ways. Otherwise, the expression of Bax protein was significantly higher than the control group. Conclusions: Matrine can inhibit proliferation and promote apoptosis of esophagus carcinoma cells effectively, the mechanism may be correlated to the up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2.

Key words:Matrine; esophagus carcinoma cell; Bcl-2; Bax

中图分类号: R 735.1

文献标识码: B

文献编号: 1671-4040(2009)03-0006-02

苦参碱是传统中药,具有抗心律失常、抗炎与抗病毒等作用。新近的研究发现,该药还具有抑制肿瘤细胞增殖与诱导凋亡等生物活性^[1,2]。本研究通过一定浓度的苦参碱对食管癌细胞作用后,观察其对食管癌细胞的凋亡诱导效应,并通过对与凋亡相关的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达变化的检测,探讨苦参碱对食管癌细胞凋亡诱导的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 苦参碱购自江苏连云港,配制为 20g/L 的无菌溶液备用。流式细胞仪为美国产品,食管癌细胞株为厦门大学生命科学学院提供,小牛血清购自杭州四季青生物工程公司,实验时选用对数生长期细胞。

1.2 MTT 法生长曲线测定 取对数生长期的食管癌细胞,消化后制成细胞悬液,调整细胞浓度后培养 24h,加入不同浓度的苦参碱(0.25、0.50、0.75、1.0mg/mL),另设对照组(不加苦参碱)和空白对照组(只加培养基),以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.3 流式细胞仪凋亡检测 不同浓度的苦参碱(0.25、0.50、0.75、1.0mg/mL)分别作用于贴壁生长的食管癌细胞 72h 后,胰酶消化,吹打脱落,使细胞分散良好,处理后上机检查。以不加苦参碱培养 72h 的食管癌细胞作为阴性对照。

1.4 免疫细胞化学染色 将对数生长期的食管癌细胞 6 瓶(细胞数 $>1 \times 10^5$ / 瓶)随机分为对照组和

实验组,每组 3 瓶。实验组用含 0.75mg/mL 苦参碱的培养基培养,对照组正常培养,48h 后终止培养。随机从对照组和实验组各取 1 瓶细胞,用 0.2%胰酶消化后收集细胞,做细胞涂片。行 Bcl-2 和 Bax 免疫细胞化学染色,并分别设立阴性与阳性对照。结果为 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞为胞质染为黄色或棕黄色,阴性细胞均不着色。通过染色强弱,观察 2 种蛋白表达改变的趋势。

1.5 统计学处理 统计分析应用 SPSS10.0 软件,计量资料用 $(\bar{X} \pm S)$ 表示, t 检验做显著性比较, $P < 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 苦参碱对食管癌细胞形态变化的影响 实验组细胞在加药后 24h,倒置显微镜下观察,可见大部分细胞由梭形变为不规则形,胞体增大,胞内可见大小不等的空泡样结构,细胞核边移,但大部分细胞膜尚完整,尤以 1.0mg/mL 组细胞形态变化最明显,并且细胞数量与对照组比较明显减少,同时有许多细胞漂浮,不贴壁。

2.2 苦参碱抑制食管癌细胞生长曲线 食管癌细胞经 4 种不同浓度的苦参碱处理后,细胞生长受到明显抑制,以 1.0mg/mL 组的抑制作用最强。

2.3 细胞凋亡率测定 对照组凋亡指数为 4.21%,不同浓度(0.25、0.50、0.75、1.0mg/mL)实验组分别为 9.27%、11.10%、24.40%和 27.47%。随药物浓度增加,细胞凋亡指数呈上升趋势。

* 福建省医学创新课题(编号 2007-CXB-13)

2.4 免疫细胞化学染色结果 Bcl-2 染色显示: 对照组细胞质浓染呈棕黄色, 实验组与对照组相比, 细胞质着色明显减弱, 呈淡黄色, 个别细胞甚至呈阴性; Bax 染色显示: 对照组细胞质染色呈淡黄色, 实验组与对照组相比, 细胞质着色则明显增强, 黄染加重。

3 讨论

食管癌是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一, 显著的地域性分布差异是食管癌流行病学的突出特征, 中国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家。尽管国内外医学工作者经过几十年的探索实践, 在食管癌的防治方面取得很大的成绩, 但食管癌的具体发病机制仍然不十分清楚, 以手术、化疗、放疗为主的综合治疗手段仍不尽如人意, 食管癌的预后仍较差, 虽然早期食管癌术后 5 年生存率可高达 80%~95%, 但中晚期病人仅为 10% 左右^[1], 后者也正是临床最多见的。中药苦参碱作为生物调节剂, 具有长效、持久、副作用少等特点, 容易为广大患者所接受, 可能会成为肿瘤治疗的一条新途径。文献报道, 一定浓度的苦参碱在体外可诱导胃腺癌 SGC-7901 细胞、肺癌 A549 细胞和肝癌 HepG2 细胞凋亡, 且其诱导凋亡的作用随苦参碱的浓度增加而增加^[4]。进一步的研究证明, 苦参碱诱导肿瘤细胞凋亡与其调控凋亡相关基因 Bcl-2 与 Bax 的表达有关^[5]。体外 0.8g/L 苦参碱处理 3d 就能明显抑制人肝癌细胞株(HepG2)的增殖, 1.5g/L 可明显诱导细胞凋亡^[6]。而 0.2mg/L 浓度的苦参碱作用 72h 就能明显抑制 K562 细胞的增殖^[7]。

本研究用 0.25~1.0mg/L 的苦参碱作用食管癌细胞 1~8d 后, 细胞生长受到明显抑制。从 MTT 的实验结果看, 0.25mg/mL 浓度的苦参碱对食管癌细胞的增殖抑制作用不明显, 而 0.5mg/mL 及更高浓度的苦参碱则可使细胞增殖受到明显抑制, 且随着作用浓度的增高和作用时间的延长, 细胞增殖受抑更为明显, 提示苦参碱对食管癌细胞的增殖有抑制作用, 而且呈时间和浓度依赖性。用不同浓度的苦参碱分别作用食管癌细胞 72h 后, 细胞凋亡率检测

发现, 在药物浓度为 0.25mg/L, 即有明显的细胞凋亡发生, 随药物浓度的增加, 细胞凋亡率呈上升趋势; 并且在药物浓度为 0.75mg/L 时, 凋亡率已达 24.40%。由此提示, 苦参碱在体外具有抑制食管癌细胞生长增殖、诱导凋亡的作用, 且这一作用随药物作用的浓度增加而增加。根据生长曲线计算, 苦参碱对食管癌细胞的半数有效量在 0.837mg/L 左右。研究结果显示, 苦参碱能下调食管癌细胞的 Bcl-2 表达, 同时上调 Bax 的表达, 2 种蛋白比例发生明显变化, 与司维柯等^[8]研究结果相同。结合细胞凋亡率检测结果推测, 苦参碱诱导食管癌细胞凋亡可能与其改变凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 的表达有关。

以上结果提示: 苦参碱在体外对食管癌的生长增殖有明显抑制作用, 同时诱导该细胞凋亡, 是一种很有希望的抗癌中药。其作用机制可能与苦参碱调控食管癌细胞的凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 的表达有关, 不是单纯的细胞毒性坏死。随着分子生物学技术的不断发展, 特别是基因芯片和蛋白芯片技术的发展, 必将对苦参碱类抗肿瘤机制^[9]的研究起到很大的推动作用, 而针对这些机制的研究定会开发出新型的与苦参碱类抗肿瘤作用同一分子靶点的药物, 这将为肿瘤的治疗开辟一条新途径。

参考文献

- [1]陈伟忠,林勇,谢渭芬.苦参碱抗肿瘤机制的研究进展[J].肿瘤, 2002,8(1):4-6
- [2]Lai P,He XW,Jiang Y,et al.Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant sophora flavescens ait by molecularly imprinted solid-phase extraction [J].Anal Bioanal Chem,2003,375(2):264
- [3]王立东,郑树.食管癌研究的历史回顾和哲学思考[J].医学与哲学, 2001,22(9):1-5
- [4]王源,司维柯,李鹏,等.苦参碱及氧化苦参碱抑制 A-549 细胞增殖及诱导细胞凋亡的比较研究 [J]. 第三军医大学学报,2004,26(9):778-780
- [5]范临夏,陶晓南,蔡曦光,等.苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的机制研究 [J].第四军医大学学报,2007,28(15):1359-1362
- [6]司维柯,肖桃元.苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J].世界华人消化杂志,2001,9(2):185
- [7]李旭芬,张苏展.苦参碱对 K562 细胞端粒酶 hTERT-mRNA 表达及其酶活性影响作用的研究[J].癌症,2001,20(4):391
- [8]梁玉刚.苦参素的药理作用研究进展[J].中国药房,2005,16(6):465-466

(收稿日期: 2009-01-06)

(上接第 5 页)

3 讨论

腹水超滤浓缩腹腔内回输可以治疗各种原因所致的顽固性腹水, 对呼吸困难等症状明显者可即刻见到症状改善, 较利尿剂使用等内科治疗见效迅速。因大量腹水造成尿素氮、肌酐升高患者, 当行腹水超浓缩治疗后即可见到尿素氮、肌酐下降, 对预防肝肾综合征起到一定作用, 因此, 本项治疗对缓

解病情、延长生命有积极作用。

腹水超滤浓缩为无菌密闭式操作, 操作简单易行, 治疗中无副作用。治疗后偶见腹痛与腹压下降、肠蠕动增加有关, 服解痉药症状即可缓解。腹水超滤浓缩腹腔内回输是一种安全、可靠、简单易行的治疗各种病因所致顽固性腹水的有效方法, 应在临床推广使用。

(收稿日期: 2008-12-24)