

● 论 著 ●

苦参碱诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的相关机制研究 *

周美英¹ 魏林珍¹ 王海琳^{1#} 张爱笠² 甄洁玉¹

(1 甘肃省人民医院妇产科 兰州 730000; 2 甘肃中医药大学 兰州 730000)

摘要:目的:观察苦参碱体外诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡效应并对其可能的作用机制进行初步探讨。方法:将不同浓度(0.00、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml)的苦参碱分别作用于体外培养的宫颈癌细胞,在不同时间点(24、48、72 h),采用 MTT 法检测细胞的增殖情况;采用 Annexin-V 和 PI 双染法在流式细胞仪上检测细胞的凋亡率;采用 Western blot 检测细胞中凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达。结果:各组苦参碱对 SiHa 细胞的增殖均有抑制作用,MTT 和流式细胞结果显示,不同浓度的苦参碱对细胞生长抑制率与对照组相比存在明显差异($P<0.05$),呈剂量效应正相关及时间效应正相关。加入 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 后,各组细胞凋亡率与只加苦参碱组相比凋亡率下降。Western blot 检测结果显示 Caspase-3 蛋白水平随苦参碱浓度的提高而增加($P<0.05$)。结论:苦参碱可诱导宫颈癌 SiHa 细胞的增殖,促进其凋亡,其作用机制可能与提高 Caspase-3 活性有关。

关键词:苦参碱;宫颈癌;细胞增殖;细胞凋亡;Z-DEVD-FMK;Caspase-3

Effects of Matrine on Apoptosis of Human Cervical Cancer Cell SiHa and Its Mechanism

ZHOU Mei-ying¹, WEI Lin-zhen¹, WANG Hai-lin^{1#}, ZHANG Ai-li², ZHEN Jie-yu¹

(1Department of Obstetrics and Gynecology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000;

2Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Abstract: Objective: To observe the role of matrine (Mat) induced apoptosis of human cervical cancer SiHa cells and its mechanism. Methods: SiHa cells were exposed to the concentrations of matrine 0.00, 0.25, 0.50, 1.00 and 2.00 mg/ml for 24, 48, 72 h. Cell proliferation was detected by MTT assay. Apoptosis was determined by double stained assay with Annexin-V and PI. Caspase-3 protein level was determined with western blot assay. Results: After SiHa cells were cocultured with matrine in vitro, the cell proliferation was inhibited in time and dose dependent manner. When the SiHa cells were cultured for 24, 48, 72 h by matrine 0.50, 1.00, 2.00 mg/ml, the total apoptosis rate was increased, which had statistical significance compared with control group ($P<0.05$). The addition of the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK, the apoptotic rate and increase of matrine group decreased apoptosis rate. And the caspase-3 protein level increased with the increase of the concentration of matrine ($P<0.05$). Conclusion: Matrine can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SiHa cells in vitro, one of its possible mechanisms is that matrine increasing caspase-3 activity.

Key words: Matrine; Cervical cancer; Proliferation; Apoptosis; Z-DEVD-FMK, Caspase-3

中图分类号:R285.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.08.001

苦参碱(Matrine)是从中药苦参的干燥根中提取出的具有药理作用的一种中草药,其具有抗心率失常、抗动脉粥样硬化、解热镇痛、升高白细胞、抗炎杀菌、治疗乙型肝炎等作用^[1-2]。随着研究深入,发现苦参碱还具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡作用,对鼻咽癌、胃癌、视网膜母细胞瘤、上皮性卵巢癌和大肠癌等都有不同程度的诱导凋亡的作用^[3]。苦参碱抗肿瘤机制较为复杂,具体的凋亡作用机制因细胞种类不同而异。目前,苦参碱对宫颈癌 SiHa 细胞的影响及分子机制尚未见报道。本研究拟观察苦参碱是否具有诱导宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的效应,同时通过观察 Caspase-3 的变化情况,初步探讨苦参碱对 SiHa 细胞的作用机制,为苦参碱治疗宫颈癌的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 宫颈癌细胞株购自于兰州大学第一临床医学院科研中心;苦参碱购自宝鸡市方晟生物开

发有限公司(纯度 98%);DMEM 为 Gibco 公司产品;胎牛血清购自 Hyclone 公司;四单甲基偶氮唑蓝(MTT)、DMSO 购自 Sigma 公司;细胞凋亡检测试剂盒(包括 Annexin-V-FITC,PI 等)购自美国 BioLegend 公司;兔抗人 Caspase-3 抗体购自 Sant Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为中山金桥公司产品;Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物配置 将冻存的宫颈癌 SiHa 细胞 37℃快速溶解,常规复苏和传代。细胞接种在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养液中(含 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素),在 37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。细胞贴壁 80%时传代,1 周大约 2 次。苦参碱采用无血清 DMEM 配制浓度为 32 mg/ml 储存液,0.22 μm 一次性过滤器过滤后,-20℃避光保存备用,使用时分别配为终浓度

* 基金项目:国家自然科学基金(编号:H1621);甘肃省自然基金(编号:1208RJZA109)

通讯作者:王海琳,E-mail:wanghailinyx@163.com

为 0.25~2.00 mg/ml 溶液。经前期预试验证实,25 μmol/L 的 Z-DEVD-FMK 不影响肿瘤细胞增殖,但可显著减弱苦参碱诱导宫颈癌细胞的凋亡。

1.2.2 细胞增殖的测定 (MTT 法) 分别取对数生长期 SiHa 细胞,以 5 000 个细胞接种到 96 孔板内,生长 24 h 后,加入不同浓度的苦参碱,分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml,每个浓度设 5 个复孔,同时设置空白对照组、溶剂对照组和调零孔。分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入新鲜配置的 MTT 溶液 20 μl (浓度为 5 g/L),37 ℃ 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μl,水平振荡器振荡 10 min (60 次/min) 后,用 Multiskan MS ELISA reader (Labsystems, Helsinki, Finland) 在 490 nm 处检测吸光度值 (OD 值)。细胞抑制率 (%) = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%,实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞凋亡率 将 1 × 10⁵ 密度的对数生长期宫颈癌 SiHa 细胞,接种进 25 cm² 培养瓶中,培养 24 h 后,弃去旧培养液,实验组分别加入含不同药物浓度的苦参碱 (0.5、1.0、2.0 mg/ml) 干预,对照组加等量培养基。苦参碱作用 24、48、72 h 后,收集对照组和实验组细胞 (数目 1~5 × 10⁶ 个/ml),预冷 PBS 洗涤 2 次,将细胞重悬于 200 μl Binding Buffer 中,加入 10 μl AnnexinV - FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀,室温避光孵育 5 min,流式细胞仪检测凋亡率。另外,用 25 μmol/L Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 处理各组细胞 1 h 后,然后加入不同浓度苦参碱 (0.5、1.0、2.0 mg/ml),24 h 后观察各组凋亡率。流式细胞仪检测凋亡率,实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4 Western blotting 分析 Caspase-3 蛋白的表达 SiHa 细胞经 0.0、0.5、1.0、2.0 mg/ml 浓度苦参碱处理 24 h 后,收集细胞提取蛋白,BCA 法定量,12% SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白上样量为 40 μg,湿法转印至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉溶于 TBST 液中封闭 1 h,一抗 (1 : 500) 4 ℃ 过夜,TBST 洗 5 min,3 次,二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1 h,TBST 洗 5 min,3 次,ECL 系统显影,以 β-actin 为内参照。以上实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析及两个独立样本的 t 检验,实验结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 苦参碱对人宫颈癌细胞增殖的影响 不同浓度的苦参碱作用宫颈癌 SiHa 细胞不同时间后,

MTT 法检测抑制细胞增殖的作用结果见表 1。随着苦参碱浓度的增加和作用时间的延长,SiHa 细胞的数量逐渐减少,呈剂量和时间效应关系。实验结果表明,在 0.25~2.00 mg/ml 浓度范围的苦参碱对宫颈癌 SiHa 细胞具有抑制作用,与空白对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度苦参碱作用后各时点 SiHa 细胞生长抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/ml)	24 h	48 h	72 h
对照组	0.00	0.10 ± 0.09	0.21 ± 0.13	0.30 ± 0.19
苦参碱组	0.25	4.67 ± 0.87*	15.27 ± 2.79*	19.40 ± 3.18*
	0.50	16.71 ± 1.63*	27.99 ± 2.94*	37.27 ± 2.58*
	1.00	35.10 ± 2.82*	54.40 ± 4.16*	69.30 ± 2.17*
	2.00	50.06 ± 1.05*	73.93 ± 0.56*	83.47 ± 0.40*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 苦参碱对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡率的影响 经流式细胞仪检测结果显示,苦参碱诱导 SiHa 细胞凋亡的作用随着作用时间的延长和给药剂量的增加,细胞凋亡率增高,且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中,2.0 mg/ml 的苦参碱作用 72 h 时 SiHa 细胞凋亡率最高为 70.08%。见图 1。0.5、1.0、2.0 mg/ml 的苦参碱作用于 SiHa 细胞 48 h 后,SiHa 细胞凋亡率分别为 (7.42 ± 0.43)%、(22.94 ± 0.83)%、(39.34 ± 0.74)%,空白对照组为 (0.57 ± 0.21)%。见图 2。与空白对照组比较,随着苦参碱浓度的增强细胞晚期凋亡率增高。

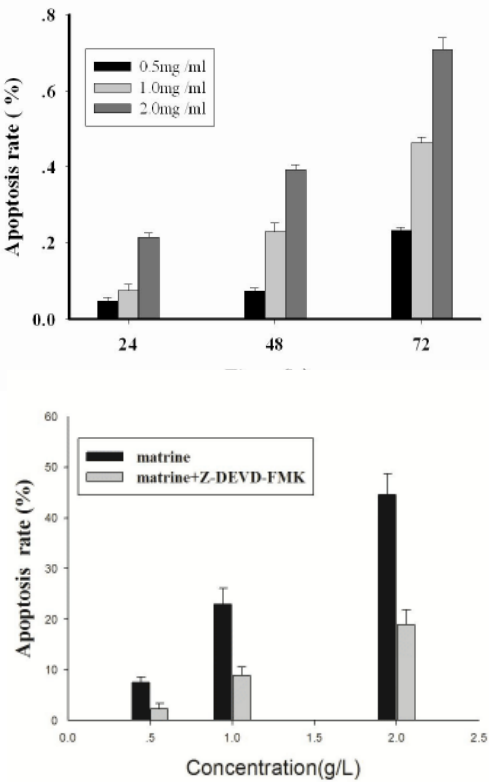
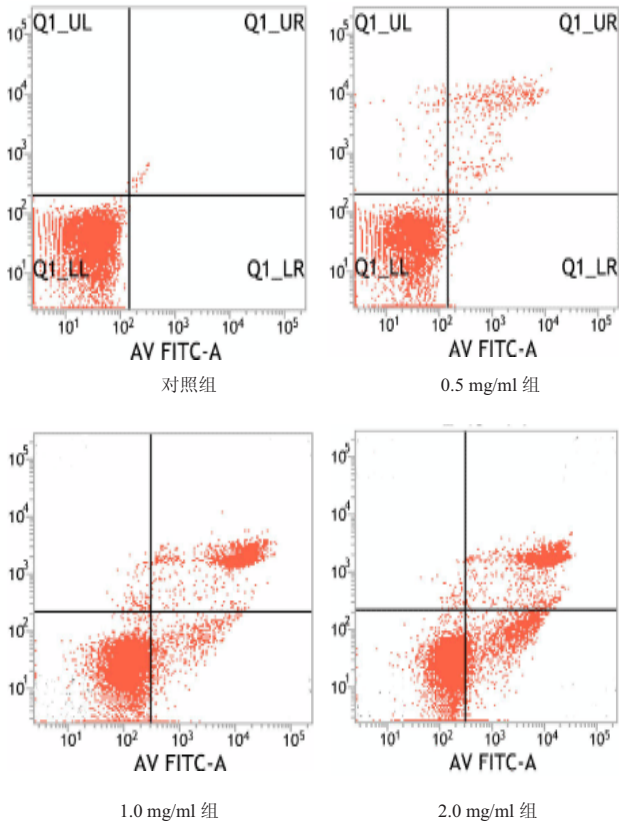


图 1 AnnexinV2FITC/PI 双标法检测苦参碱对宫颈癌细胞凋亡的影响



注：采用 Annexin-V-FITC/PI 双标染色，左下象限为活细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞，左上象限为坏死细胞，可见各浓度处理组细胞凋亡率均高于对照组，且呈剂量依赖性，且随着剂量的增加晚期凋亡所占的比例也在增加。

图 2 苦参碱作用 SiHa 细胞 48 h 流式细胞术检测结果

2.3 苦参碱对 SiHa 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 对不同浓度的苦参碱处理后的 SiHa 细胞进行 Caspase-3 蛋白水平的检测中发现，随着苦参碱浓度的增加，细胞中 Caspase-3 蛋白水平也逐渐增加。见图 3。对 Western blot 结果进行灰度扫描分析后，经 β -actin 内参的校正，结果发现，0.5、1.0、2.0 mg/ml 的苦参碱处理后，细胞内的 Caspase-3 蛋白水平与对照组细胞比较，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 4。

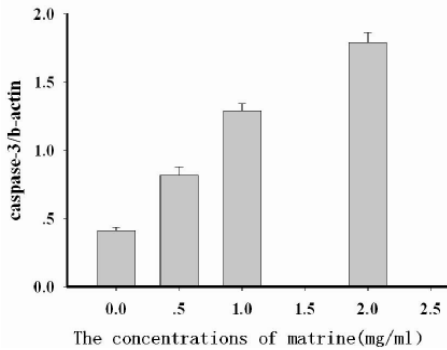
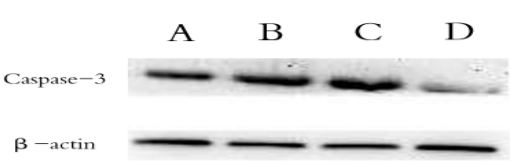


图 3 不同浓度的苦参碱处理后的 SiHa 细胞进行 Caspase-3 蛋白水平的检测



注：A：0.5 mg/ml 的苦参碱处理 24 h 的 SiHa 细胞组；B：1.0mg/ml 的苦参碱处理 24 h 的 SiHa 细胞组；C：2.0 mg/ml 的苦参碱处理 24 h 的 SiHa 细胞组；D：SiHa 细胞空白组。

图 4 不同浓度的苦参碱处理后的 SiHa 细胞进行 Caspase-3 蛋白水平的检测 (β -actin 内参的校正)

3 讨论

宫颈癌是位居第二位危害妇女健康的恶性肿瘤，化疗是当前主要治疗手段之一。然而由于化疗药物的毒副作用及耐药性的产生，寻求新的高效、低毒的抗肿瘤药物成为科研工作者面临的新挑战。研究证实苦参碱对体内多种肿瘤具有明显抑制作用且未发现明显的不良反应，逐渐成为研究的焦点。

本研究发现不同浓度苦参碱 (0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml) 作用于宫颈癌 SiHa 细胞 24、48、72 h 后，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。进一步应用流式细胞仪检测细胞凋亡，结果显示分别用苦参碱 0.5、1.0、2.0 mg/ml 作用于 SiHa 细胞 24、48、72 h 后，抑制率具有时间剂量依赖性。0.5、1.0、2.0 mg/ml 的苦参碱作用于 SiHa 细胞 48 h 后，与对照组相比细胞晚期凋亡率明显增加，可见苦参碱诱导 SiHa 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晚期凋亡，发挥其抗肿瘤作用。

目前，大多数学者认为凋亡相关基因的激活与肿瘤的增殖受抑相关，其中以 Caspase 家族最为关注^[4-5]。Caspase 为半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶的简称，是一组具有相似氨基酸序列的半胱氨酸蛋白酶，迄今已发现 16 个成员^[6-7]。所有的 Caspase 均以无活性的酶原形式存在，一经激活将产生 Caspase 级联反应，最终导致细胞凋亡^[8]。Caspase 蛋白酶在组织分布及降解已知底物的功能上彼此有重叠现象，但在不同细胞或同一细胞受不同刺激诱发凋亡过程中，激活的 Caspase 不尽相同。但普遍认为该家族成员 Caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡中的关键蛋白酶^[9]。激活的 Caspase-3 能使许多与细胞结构、细胞周期及 DNA 修复等有关的蛋白或激酶失活，从而使细胞凋亡。本研究结果显示，0.5、1.0、2.0 mg/ml 苦参碱分别作用 SiHa 细胞 24 h，结果显示与对照组相

比,随着药物浓度的增加,宫颈癌细胞 Caspase-3 蛋白表达量也增加($P<0.05$),提示在苦参碱作用组中 Caspase-3 高表达,可使肿瘤细胞对凋亡更敏感,更易发生凋亡,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。流式细胞术结果显示苦参碱作用 24 h 后,不同浓度实验组细胞凋亡率均高于对照组($P<0.05$),而用 Caspase-3 特异性抑制剂 Z-DEVD-FMK 预处理,均可使细胞凋亡率下降。进一步证实,苦参碱可通过激活 Caspase-3 的表达诱导 SiHa 细胞凋亡,发挥其抗肿瘤作用。

综上所述,苦参碱能抑制 SiHa 细胞的增殖而诱导凋亡,呈剂量时间依赖性。应用 Caspase-3 特异性抑制剂 Z-DEVD-FMK 预处理后,细胞凋亡率有所下降,但还存在凋亡。表明苦参碱能明显诱导体外培养宫颈癌细胞的凋亡,该作用可能通过激活 Caspase-3 的表达,除 Caspase-3 外,可能尚有其它凋亡通路被激活,值得进一步探讨。

参考文献

[1]张丽华,陈邦恩,潘明佳.苦参碱药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(6):1000-1003
[2]杨钰萍,沈祥春.氧化苦参碱药理作用的研究进展[J].中国医院药学杂志,2009,29(5):405-407
[3]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
[4]Lo MY,Kim HT.Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition[J].Journal of Orthopaedic Research,2004,22(5):1120-1125
[5]Liang CZ,Zhang JK,Shi Z,et al.Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2 [J].Cancer Chemother Pharmacol,2012,69(2):317-331
[6]Marks N,Berg MJ.Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration [J].Neurochem Int,1999,35(3):195-220
[7]Leist M,Jaattela M.Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2(8):589-598
[8]Degtarev A,Boyce M,Yuan J.A decade of caspases [J].Oncogene,2003,22(53):8543-8567
[9]Lakhani SA,Masud A,Kuida K,et al.Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis [J].Science,2006,311(5762):847-851

(收稿日期:2016-06-23)

韩氏针法配合中药治疗前列腺增生引起排尿困难 16 例

万春根

(江西省新建县中医院针灸科 新建 330100)

关键词:前列腺增生;排尿困难;韩氏针法;中药

中图分类号:R697.3

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2016.08.002

笔者自 2013 年至今对 16 例因前列腺增生引起排尿困难症患者,采用韩氏针法配合舒肝散结中药进行治疗,在临床上取得了满意疗效。现报道如下:

1 临床资料

1.1 一般资料 16 例患者均在本院经检查确诊,均属前列腺增生引起的排尿困难,年龄 52~78 岁,病程 1~8 年。排除有慢性前列腺炎病史、反复发作尿路感染、前列腺或膀胱癌患者以及做过前列腺或膀胱手术者。

1.2 治疗方法

1.2.1 韩氏针法 (1)器具:采用苏州医疗用品厂生产的华佗牌毫针;艾条。(2)操作方法及步骤:患者俯卧于治疗床上,针刺点局部常规消毒皮肤,取 5 寸毫针,60° 刺入秩边穴,针尖向内侧会阴部进针,进针深度 3~3.5 寸,以针感向会阴部生殖器放射为佳,小幅度提插捻转 1 min,留针 20 min,期间每隔 4 min 作小幅度插捻转 1 min,强度以患者能忍受为宜,起针;嘱患者仰卧,常规消毒进针点,取 2.5 寸毫针,直刺中极穴,以针感向会阴部放射为佳,取 2 cm 艾条 1 个,点燃插入柄上,灸 2 壮。1 次/d,治疗 5 次,休息 2 d,7 d 为 1 个疗程。

1.2.2 中药治疗 采用舒肝散结方(自制)治疗。药物组成:柴胡 10 g,丹参 15 g,赤芍 15 g,当归 15 g,生牡蛎 30 g,玄参 15 g,川贝母 3 g,夏枯草 15 g,海藻 15 g,昆布 15 g,海浮石 15 g,川牛膝 10 g。生牡蛎、海浮石先煎半小时,川贝母研末冲服。1 剂/d,7 d 为 1 个疗程。

1.3 治疗结果 16 例患者中,13 例采用本疗法治疗 1 个疗程后,昼夜尿频次数明显减少且排尿顺畅,残余尿量减少;1 例患者因年岁太高,体质虚弱,针刺无针感而无效;2 例患者因恐惧针刺,忍受不了针感放射而终止治疗。坚持治疗病例 1 个月后复查 B 超,前列腺体积均有不同程度缩小,其中 4 例反复阳痿情况得到很大程度改善。

2 典型病例

涂某,男,72 岁,2014 年 10 月 5 日初诊。患者前列腺肥大已有 5 年,间断性插管导尿,此次因尿闭 6 h,家属决定送外科手术,因入院后导尿管插入未成功,于是请针灸科会诊。查体:下腹胀痛拒按,痛苦呻吟,立即采用韩氏针法,针刺双侧秩边穴,进针 3 寸时,患者会阴部产生强烈针感,小幅度提插捻转 1 min,每间隔 4 min 作小幅度提插捻(下转第 40 页)