

苦参碱抑制 Akt 信号通路诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡

杨鹏, 张松, 郭舜, 石磊, 韦华梅, 衡宇, 张永强, 张琰*
(第四军医大学唐都医院, 西安 710038)

[摘要] 目的:研究苦参碱对人结肠癌 SW480 细胞的促凋亡作用及其可能的分子机制。方法:噻唑蓝比色法(MTT)测定苦参碱对 SW480 细胞株增殖的影响;Hoechst33258 染色检测苦参碱对 SW480 细胞凋亡的影响,流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测苦参碱对 SW480 细胞中总蛋白激酶 B(Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的干预作用。结果:苦参碱(0.25,0.5,1.0,1.5,2.0 g·L⁻¹)能浓度和时间依赖性地抑制 SW480 细胞增殖。作用 24,48,72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 1.72,1.08,0.67 g·L⁻¹,Hoechst33258 染色和流式细胞术结果显示苦参碱能显著诱导细胞凋亡(P<0.01),随着药物质量浓度的提高,细胞凋亡率逐渐上升。Western blot 检测显示,SW480 细胞加入苦参碱后,胞内总 Akt 的含量无显著变化,但 p-Akt 的生成被显著抑制,凋亡抑制性蛋白 Bcl-2 表达降低,促凋亡蛋白 Bax 表达增高(P<0.05)。结论:苦参碱能够诱导 SW480 细胞凋亡,该药理作用可能与苦参碱对 Akt 信号通路的抑制有关。

[关键词] 苦参碱;结肠癌;凋亡;总蛋白激酶 B 信号通路;B 细胞淋巴瘤-2;Bcl-2 相关 X 蛋白
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0109-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070109
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1358.058.html>
[网络出版时间] 2017-01-09 13:58

Matrine Induces Apoptosis of Human Colon Cancer Cell Line SW480 by Inhibition of Akt Signaling Pathway

YANG Peng, ZHANG Song, GUO Shun, SHI Lei, WEI Hua-mei,
HENG Yu, ZHANG Yong-qiang, ZHANG Yan*

(Tangdu Hospital Affiliated of the Fourth Military University, Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of matrine on the apoptosis of human colon cancer cell line SW480, and to explore its underlying mechanism. **Method:** The effect of matrine on SW480 cell line proliferation was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, its effect on SW480 cell apoptosis was detected by Hoechst33258 staining and flow cytometry was used to determine the apoptosis rate. Protein levels of protein kinase B (Akt), p-Akt, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bax in SW480 cells were detected by Western blot. **Result:** Matrine (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g·L⁻¹) inhibited SW480 cell proliferation in time and dose-dependent manners. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 1.72, 1.08, 0.67 g·L⁻¹ respectively for 24, 48, 72 h. Hoechst33258 staining and flow cytometry showed that matrine could significantly induce apoptosis of SW480 (P < 0.01). The apoptosis rate was gradually increased with the increase of drug concentration. Western blot results showed that after adding matrine in the SW480 cells, the expression levels of p-Akt and Bcl-2 were down-regulated (P < 0.05), while the expression level of Bax was up-regulated and the expression level of total Akt wasn't affected. **Conclusion:** Matrine could induce apoptosis in SW480 cells, which

[收稿日期] 20160715(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403170)

[第一作者] 杨鹏, 硕士, 主管药师, 从事中药药剂与药理研究, Tel:029-84777154, E-mail:ypill@163.com

[通讯作者] *张琰, 硕士, 主任药师, 从事中药药剂与药理研究, Tel:029-84777164, E-mail:sunny51@fmmu.edu.cn

may be related to the inhibition of Akt Signaling Pathway and the related downstream targets.

[Key words] matrine; colon carcinoma; apoptosis; Akt signaling pathway; B-cell lymphoma-2 (Bcl-2);

Bax

苦参碱是中药苦参、山豆根、苦豆子的主要活性成分之一^[1]。现代药理学研究表明,苦参碱不仅具有抗肝纤维化^[2]、抗心律失常^[3]、抗炎^[4]、免疫调节^[5]等多种药理作用^[6],而且苦参碱对包括肺癌^[7]、肝癌^[8]、宫颈癌^[9]在内的众多肿瘤,具有显著的抗肿瘤活性^[10-11]。近年来,我国结肠癌的发病率逐年升高,药物治疗是重要治疗手段^[12-13]。目前,关于苦参碱对结肠癌的抗肿瘤作用研究已取得部分进展。体外研究表明,苦参碱能够通过细胞周期阻滞^[14],抑制端粒酶活性^[15]等途径抑制 HT29, SW1116 等结肠癌细胞的生长。另有研究表明,与正常组织比较,人结肠癌组织中蛋白激酶 B(Akt) 相关蛋白显著高表达, Akt 活化是结肠癌发生发展的重要因素,而 Akt 信号通路又是调节细胞周期阻滞和端粒酶活性重要的上游信号通路之一,因此研究苦参碱对 Akt 信号通路的干预作用具有重要意义^[16-17]。目前关于苦参碱对 SW480 结肠癌细胞的抑制作用及其作用机制研究尚无文献报道。本实验研究了苦参碱对体外培养人结肠癌 SW480 细胞的促凋亡作用,并通过测定凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 及上游 Akt, 磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt) 蛋白水平的变化,探讨其通过干预 Akt 信号通路,抗肿瘤作用的可能机制,为进一步开发苦参碱作为新型结肠癌治疗药物提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株人结肠癌 SW480 细胞株,由第四军医大学生物技术中心提供。

1.2 试剂 苦参碱(陕西天之润生物科技有限公司,批号 2012815,纯度 > 98%);胎牛血清,RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 1662775,1120708);四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 C208A);氨丁三醇盐酸吐温缓冲液(TBST,自制);Hoechst 染色试剂盒,AnnexinV-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司,编号分别为 C0003, C1063); β -肌动蛋白(β -actin), Bcl-2, Bax 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 SC-47778, A1502, F5087p);p-Akt(ser473)抗体(美国 CST 公司,批号 4060S);Akt 抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR59504-

42)。

1.3 仪器 Heal Force HF90 型细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司);Infinite M200 Pro 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);IX53 型荧光倒置显微镜, DP73 型影像采集系统(日本 Olympus 公司);Epics XL·MCL 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司);Mini-PROTEANTetra System 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人结肠癌 SW480 细胞,使用含 100 U·mL⁻¹青霉素,10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中常规培养,0.25%胰蛋白酶消化传代,细胞生长至对数生长期时,取生长状态良好的细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测苦参碱对 SW480 细胞增殖的影响

取对数生长期的 SW480 细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁴ 个/mL,按 200 μ L/孔接种于 96 孔板上,24 h 后细胞贴壁,更换培养基。苦参碱组加入新鲜配制的含苦参碱的培养液 200 μ L,使其终质量浓度为 0.25,0.5,1.0,1.5,2.0 g·L⁻¹,每组设 6 个复孔,同时设置空白组和调零孔。空白组加入等量的 RPMI-1640 培养液。分别培养 24,48,72 h,实验终止前 4 h,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L,继续培养 4 h,弃去培养上清液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μ L 避光室温下震荡 10 min。酶标仪 490 nm 下测定每孔吸光度 A。按照公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 = (1 - A_{苦参碱组}/A_{空白组}) × 100%。再按 Bliss 法求出半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 Hoechst33258 染色观察苦参碱对 SW480 细胞凋亡的影响 对数生长期的 SW480 细胞消化成单细胞悬液,以 1 × 10⁴ 个/mL 接种于装有消毒玻片的培养皿中,培养 48 h 后,更换培养基。苦参碱组加入苦参碱使终质量浓度为 0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹,另设空白组加入等量的 RPMI-1640 培养液。在 5% CO₂ 饱和湿度 37 °C 培养箱中培养 48 h 后,弃上清,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,4%多聚甲醛室温固定 60 min, PBS 洗涤 3 次,加 10 mg·L⁻¹ Hoechst33258 染色液 1 mL 避光染色 20 min。荧光显微镜下紫外光激发观察细胞核的改变。

2.4 AnnexinV-FITC/PI 法检测苦参碱对 SW480

细胞凋亡的影响 对数生长期的细胞消化成单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,取 6 mL 接种于 25 mL 培养瓶中。细胞贴壁后分为 4 组,各组加入新鲜配制的含苦参碱终质量浓度为 0,0.5,1.0,2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液,培养 48 h 后,收集细胞,用 PBS 制成细胞悬液,加入 AnnexinV-FITC 5 μL 及 PI 10 μL 染色液,轻轻混匀,避光孵育 10 min,进行流式细胞仪检测,Novoexpress 软件分析细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测苦参碱对 SW480 细胞 Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响

收集经 0,0.5,1.0,2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦参碱作用 48 h 的 SW480 细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次后,蛋白裂解液冰上裂解 1 h,离心收集上清液,测定样品蛋白浓度。蛋白定量后分别取蛋白 20 μg 加入上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转膜、封闭,分别加入 Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2 一抗溶液(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗溶液(1:5 000)孵育 2 h 后,ECL 试剂盒显影检测,化学发光仪器分析。实验重复 3 次。

2.6 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 苦参碱对 SW480 细胞增殖的影响

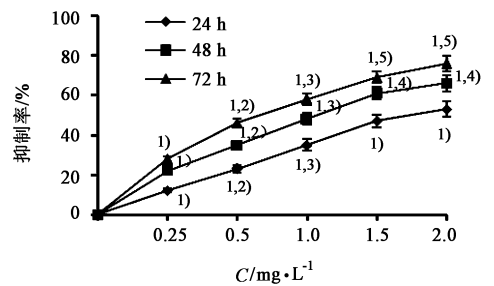
与空白组比较,随着苦参碱质量浓度的提高,以及给药时间的延长,各苦参碱组 SW480 细胞生长抑制率不断提高($P < 0.05$),表明苦参碱对 SW480 细胞的增殖具有抑制作用,并且该作用具有剂量和时间依赖性。培养 24,48,72 h 各时间点苦参碱抑制 SW480 细胞增殖的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 1.72, 1.08, 0.67 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 1。

3.2 苦参碱对 SW480 细胞凋亡的影响

不同质量浓度苦参碱处理 SW480 细胞 48 h 后,Hoechst33258 荧光染色检测细胞核变化。空白组细胞核普遍淡染,与空白组比较,苦参碱组部分细胞核呈现浓缩致密荧光,表明 SW480 细胞出现凋亡,并且随苦参碱质量浓度的提高,浓染致密细胞核数量逐渐增多,表明随着苦参碱浓度的提高,SW480 细胞的凋亡增加。见图 2。

3.3 苦参碱对 SW480 细胞凋亡的影响

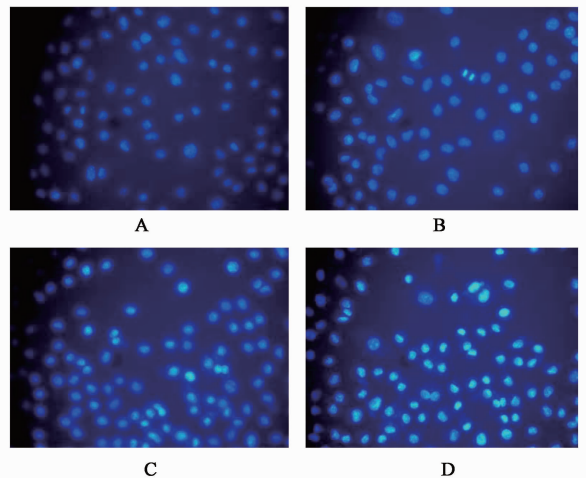
不同质量浓度的苦参碱处理 SW480 细胞 48 h 后,与空白组



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与同时时间点苦参碱 0.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较²⁾ $P < 0.05$;与同时时间点 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$;与同质量浓度 24 h 组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与同质量浓度 48 h 组比较⁵⁾ $P < 0.05$

图 1 苦参碱对 SW480 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.1 Effect of matrine on proliferation of SW480 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A. 空白组;B 苦参碱 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. 苦参碱 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. 苦参碱 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 3,4 同)

图 2 苦参碱诱导 SW480 细胞凋亡的作用(Hoechst 33258, $\times 200$)

Fig.2 Effect of matrine on apoptosis of SW480 cells (Hoechst 33258, $\times 200$)

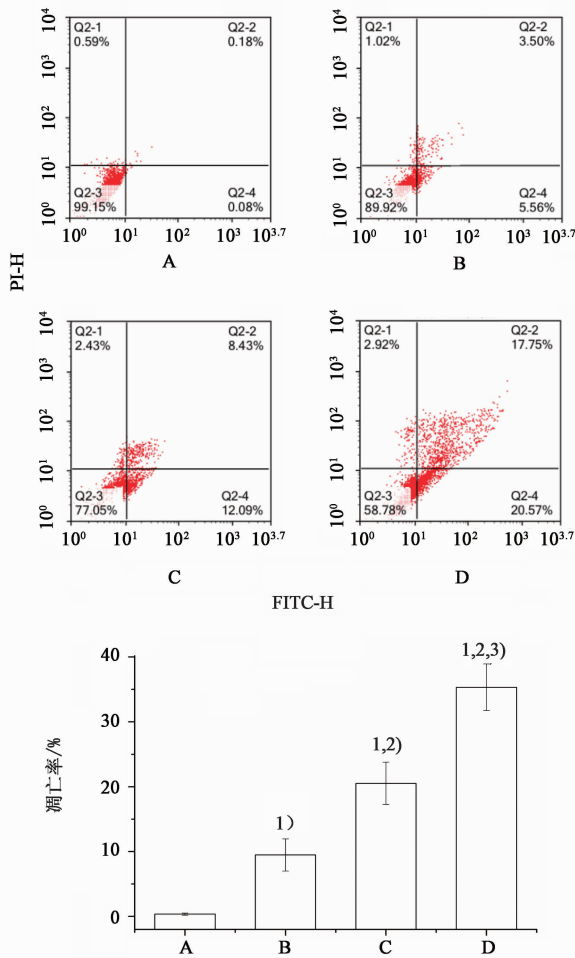
比较,苦参碱各组 SW480 细胞总凋亡率显著升高($P < 0.01$),且该作用具有剂量依赖性($P < 0.01$)。见图 3。

3.4 苦参碱对 SW480 细胞 Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2 蛋白含量的影响

不同质量浓度的苦参碱处理 SW480 细胞 48 h 后,与空白组比较,苦参碱(1.0, 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)组抗凋亡蛋白 Bcl-2 含量明显降低($P < 0.05$),促凋亡蛋白 Bax 含量明显升高($P < 0.05$),同时苦参碱各组中 p-Akt 蛋白含量均明显降低($P < 0.05$),苦参碱对上述蛋白的调节作用具有明显的剂量依赖性($P < 0.05$),但对总 Akt 的含量无显著影响。见图 4。

4 讨论

Hoechst 33258 荧光染色及流式细胞术实验均

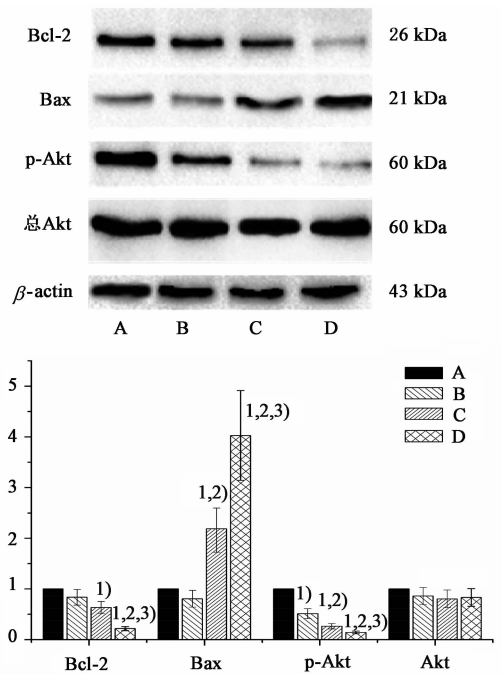


与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与苦参碱 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与苦参碱 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.01$

图 3 苦参碱对 SW480 细胞 48 h 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of matrine on apoptosis rate of SW480 cells for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表明,苦参碱能够通过促进细胞凋亡,明显抑制人结肠癌 SW480 细胞的生长。Bax 和 Bcl-2 是线粒体途径凋亡的关键蛋白,二者相互协调发挥作用,其中 Bax 促进细胞凋亡,Bcl-2 抑制细胞凋亡。Western blot 结果表明,苦参碱能够浓度依赖性地抑制 SW480 细胞中 Bcl-2 蛋白表达,促进 Bax 蛋白表达,表明苦参碱促进 SW480 细胞凋亡的机制属于经线粒体途径的内源性促凋亡作用。该结果与其他结肠癌细胞株的报道结果一致^[18-19]。

Akt 信号通路的过度激活是结肠癌细胞重要的存活机制^[20-21],并位于 Bcl-2 和 Bax 的上游。本研究首次证明,苦参碱调节 SW480 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白异常表达的同时,显著抑制了 Akt 蛋白的活化(磷酸化),并且该作用具有浓度依赖性。因此苦参碱促进 SW480 细胞内源性凋亡的机制可能在于其能抑制上游存活信号 Akt 信号通路的激活,该结论



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与苦参碱 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与苦参碱 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$

图 4 苦参碱对 SW480 细胞 Bcl-2, Bax, p-Akt, 总 Akt 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of matrine on Bcl-2, Bax, p-Akt and total Akt protein contents of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与苦参碱在结肠癌 LoVo 细胞中的作用一致^[22],表明抑制 Akt 信号通路的激活可能是苦参碱促进各类结肠癌细胞凋亡的共同作用机制。Akt 属于细胞内信号蛋白,Akt 的磷酸化主要受膜蛋白调节^[23],因此,苦参碱抑制 Akt 的磷酸化是否与苦参碱对膜蛋白的调节有关,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 戴五好,钱利武,杨士友,等. 苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 177-180.
[2] 黄亮,陈志良,李亦蕾,等. 甘草甜素联合苦参碱对 TAA 致大鼠肝纤维化的抑制作用[J]. 中药材, 2012, 35(11): 1836-1839.
[3] 许超千,董德利,杜智敏,等. 苦参碱、小檗胺与胺碘酮、RP58866 抗心律失常作用的比较[J]. 药学学报, 2004, 39(9): 691-694.
[4] 刘旭,梁跃辉,赵晓秋,等. 苦参碱类 TNF- α 抑制剂的合成、抗炎活性评价和分子对接研究[J]. 计算机与应用化学, 2016, 33(5): 521-524.
[5] 李军,司维柯,赵宸,等. 苦参碱与氧化苦参碱影响荷瘤小鼠肿瘤生长及其免疫调节作用的研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(27): 2719-2721.
[6] 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.
- [7] 侯歌, 李宁, 马怡辉, 等. 非小细胞肺癌组织 Survivin 和 P-gp 表达与紫杉醇及苦参碱疗效相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(5): 350-353.
- [8] 万旭英, 罗明, 贺平, 等. 苦参碱和氧化苦参碱体外对人肝癌细胞的诱导分化作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 977-979.
- [9] 陈立波. 苦参碱对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡及 Survivin 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 235-238.
- [10] 郭林丰, 童珊珊, 余江南, 等. 苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3409-3412.
- [11] 陈晓峡, 向小庆, 叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 361-364.
- [12] 周总光, 杨烈, 李园, 等. 我国结直肠癌 30 年变迁与应对策略[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(9): 693-696.
- [13] Brenner H, Kloor M, Pox C P. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- [14] 常城, 饶德利, 邱晓明, 等. 苦参碱对人结肠癌 HT29 细胞生长抑制作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(1): 62-65.
- [15] 周喜汉, 韦星, 黄赞松, 等. 苦参碱对结肠癌 SW1116 细胞增殖及端粒酶活性的影响[J]. 中药材, 2009, 32(6): 923-925.
- [16] 张雪群, 高卫, 潘盼, 等. PI3K/AKT 及其相关因子在结肠癌中的表达[J]. 山东大学学报: 医学版, 2016, 54(1): 52-57.
- [17] 林绪涛, 范德军, 何晓生, 等. 结直肠癌预后相关分子生物学指标研究现状[J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(9): 890-894.
- [18] 常城, 胡晓岚. 苦参碱对 HT29 人结肠癌细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国中医急症, 2014, 23(8): 1463-1465.
- [19] CHANG C, LIU S P, FANG C H, et al. Effects of matrine on the proliferation of HT29 human colon cancer cells and its antitumor mechanism[J]. Oncol Lett, 2013, 6(3): 699-704.
- [20] SHEN X, Mula R V, Evers B M, et al. Increased cell survival, migration, invasion, and Akt expression in PTHrP-over expressing LoVo colon cancer cell lines[J]. Regul Pept, 2007, 141(1/3): 61-72.
- [21] Lee M, Park J J, Lee Y S. Adhesion of ST6Gal I-mediated human colon cancer cells to fibronectin contributes to cell survival by integrin beta1-mediated paxillin and Akt activation[J]. Oncol Rep, 2010, 23(3): 757-761.
- [22] ZHANG S, CHENG B, LI H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon cancer LoVo cells by inactivating Akt pathway[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(4): 2101-2108.
- [23] Wani Z A, Guru S K, RAO A V, et al. A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2016, doi: 10.1016/j.fct.2015.11.016.

[责任编辑 张丰丰]