

# 钩吻总碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制

林满遍<sup>1</sup>, 陈亮<sup>1</sup>, 吴水生<sup>2\*</sup>

(1. 福州市中医院, 福州 350001; 2. 福建中医药大学, 福州 350122)

**[摘要]** 目的:探讨钩吻总生物碱提取物(钩吻总碱)促进人结肠癌 HT-29 细胞凋亡的机制。方法:钩吻总碱体外干预 HT-29 细胞 24 h 后,用噻唑蓝(MTT)比色法评估其对细胞增殖的影响,4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色法及流式细胞术(Annexin V-FITC/PI)观察 HT-29 细胞的凋亡情况,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察 HT-29 细胞 B 型淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax),Bcl-2 mRNA 表达情况,利用紫外分光光度法检测含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶-3(Caspase-3)表达量的变化。结果:钩吻总碱可抑制 HT-29 细胞增殖,200 mg·L<sup>-1</sup>钩吻总碱干预 24 h 后,对 HT-29 细胞增殖的平均抑制率达 54.17%。DAPI 染色及流式细胞术(Annexin V-FITC/PI)观察到钩吻总碱可促进 HT-29 细胞凋亡。RT-PCR 观察到钩吻总碱能降低 HT-29 细胞 Bcl-2 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),对 Bax mRNA 表达无明显影响,提高了 Bax/Bcl-2 mRNA 表达( $P < 0.05$ )。利用紫外分光光度法检测到随着钩吻总碱浓度的升高,HT-29 细胞的 Caspase-3 表达呈上升趋势( $P < 0.05$ )。结论:钩吻总碱能有效地抑制 HT-29 细胞的增殖,促进 HT-29 细胞的凋亡,其机制可能与通过 Bax/Bcl-2 途径诱导细胞凋亡相关。

**[关键词]** 钩吻总碱; HT-29 细胞; 细胞凋亡; B 型淋巴瘤-2 相关 X 蛋白; B 型淋巴瘤-2

**[中图分类号]** R735.35;R285.5;R22;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0149-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040149

## Effect and Mechanism of Total Alkaloids of *Gelsmium elegans* on Human Colonic Carcinoma Cells Proliferation and Apoptosis

LIN Man-bian<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>1</sup>, WU Shui-sheng<sup>2\*</sup>

(1. Fuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 350001, China;

2. Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of the total alkaloids of *Gelsmium elegans* (TAG) on the apoptosis of the human colonic carcinoma HT-29 cells. **Method:** The HT-29 cells were treated with TAG for 24 h and the cell proliferation was assessed by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay; 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining experiment and the flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) experiment were used to observe the apoptosis of HT-29 cells. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) test was used to analyze the mRNA expression of B cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax) and Bcl-2 of HT-29 cells after 24 hours' treatment of the TAG. Caspase-3 expression of HT-29 cells was detected by UV Spectrophotometry. **Result:** In the study, it was demonstrated that the TAG had the inhibition against the proliferation of HT-29 cells. The average inhibitory effect (54.17%) was observed after the HT-29 cells were treated with 200 mg·L<sup>-1</sup> of TAG for 24 h. The apoptotic effect of the TAG on HT-29 cells was also confirmed by the DAPI staining experiment and the flow cytometry (Annexin V-FITC/PI) experiment. RT-PCR assay showed that expression of Bcl-2 mRNA was lower in the TAG-treated group than that in control group ( $P < 0.05$ ), but the expression of Bax mRNA was not changed obviously. The mRNA expression level of Bax/Bcl-2 in

**[收稿日期]** 20170730(010)

**[基金项目]** 福州市科技计划项目(2014-S-140-6)

**[第一作者]** 林满遍,主治医师,从事中西医结合肿瘤临床与基础研究,Tel:0591-87663073,E-mail:8818969@qq.com

**[通信作者]** \*吴水生,博士,教授,从事中药药效物质基础与作用机制研究,Tel:0591-22861622,E-mail:wushuishengwss@163.com

TAG-treated group was higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). Caspases-3 expression was increased with the increase of TAG concentration in UV spectrophotometry ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The TAG inhibited the proliferation of HT-29 cells and induced the apoptosis of HT-29 cells, and the mechanism may be associated with activating the Bax/Bcl-2 pathway.

**[Key words]** *Gelsmium elegans* (TAG); human colon carcinoma HT-29 cells; cell apoptosis; B cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax); Bcl-2

钩吻又名断肠草、大茶药、野葛等,钩吻为剧毒植物,主要分布在我国浙江、福建、广东、广西、贵州、云南等地,内服少量钩吻茎叶即可引起中毒<sup>[1]</sup>。《千金翼方》<sup>[2]</sup>中载:“钩吻味辛,温,有大毒。主金疮乳痈,中恶风,咳逆上气,水肿,杀鬼疰蛊毒,破瘕积,除脚膝痹痛,四肢拘挛,恶疮疥虫,杀鸟兽。”有民间及临床用药利用钩吻治疗食管癌、肝癌、胃癌等恶性肿瘤<sup>[3-4]</sup>。多种天然药物生物碱成分诸如喜树碱、苦参碱、长春碱等具有抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>,也有学者通过实验发现钩吻生物碱成分具有一定抗食管癌、肝癌、胃癌、结肠癌的作用,同样具有抗肿瘤活性<sup>[6-7]</sup>。钩吻含有钩吻素子、钩吻素甲、钩吻素丙、钩吻素丁、钩吻素戊等多种生物碱成分<sup>[8]</sup>,但是钩吻生物碱抗肿瘤作用机制尚不明确。肿瘤的发生与细胞的凋亡障碍密切相关,通过诱导肿瘤细胞凋亡可起到控制肿瘤生长的目的<sup>[9]</sup>,从细胞凋亡途径研究抗肿瘤药物作用机制是目前的热点之一。本研究前期筛选发现钩吻总碱对于人结肠癌细胞 HT-29 的增殖具有较强抑制作用,故而选取 HT-29 细胞为研究对象,利用细胞生物学、形态学及分子生物学的相关方法,从 B 型淋巴瘤细胞瘤-2 (Bax) 相关 X 蛋白/Bcl-2 途径诱导细胞凋亡的角度出发,探讨钩吻总碱抗结肠癌作用的机制。

## 1 材料

**1.1 药物与细胞** 钩吻总碱,由福建中医药大学药学院制备<sup>[10]</sup>。配制前用二甲基亚砜(DMSO)溶液配制成  $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存待用。HT-29 细胞由中国科学院上海细胞库提供(编号 TCHu103)。

**1.2 试剂及仪器** DMEM 高糖培养基,南美胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30081.01, SV30087.02); DMSO 溶液,噻唑蓝(MTT)干粉(美国 Amresco 公司,批号分别为 0321, 0793); 细胞凋亡 DAPI 染色剂试剂盒,Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染凋亡检测试剂盒,含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶-3(Caspase-3)分光光度法检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为 KGA251,

KGA107, KGA203); trizol 试剂,逆转录试剂盒, DreamTaq Green PCR Master Mix(美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 15596-0018, K1621, K1081)。

ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司); RE-2000 型旋转蒸发器(中国上海亚荣生化仪器厂); HF212UV 型细胞培养箱(中国力康公司); IX7 型荧光倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); GST-1 型 PCR 仪(英国 Gstorm 公司); DU650 型核酸检测仪(美国 Beckman 公司); FACSCanto 型流式细胞仪, APC300 型电泳仪, Gel DOC 2000 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 钩吻总碱制备**<sup>[10]</sup> 钩吻购自福建省龙岩市胡蔓藤种植基地,经福建中医药大学中药鉴定教研室黄泽豪副教授鉴定为马钱科植物胡蔓藤 *Gelsmium elegans* 的全草;将钩吻粉碎后用 95% 乙醇浸泡 12 h,提取液过滤后用旋转蒸发器减压回收乙醇,再加 2% 盐酸溶解后,  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取出上清液。同法处理 2 次,合并 2 次上清液并转移至分液漏斗用三氯甲烷萃取,浓氨水碱化水层,再用三氯甲烷萃取,减压回收三氯甲烷后干燥,即得钩吻总碱提取物,得率为 0.352%。

**2.2 HT-29 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养液置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

**2.3 MTT 比色法检测细胞增殖** 取对数生长期的 HT-29 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化并收集细胞,以 DMEM 培养液制成细胞悬液,进行细胞计数后,调整细胞密度为  $6 \times 10^3$  个/mL,分别接种于 96 孔培养板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,常规培养 24 h 后,使细胞贴壁,并同步化。吸弃原培养液,细胞分为钩吻总碱组(钩吻总碱终质量浓度分别为 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),空白组(等体积培养液,与钩吻总碱组中 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组均含有 0.4% DMSO)及溶剂组(等体积培养液),每组各设 6 个复孔,继续培养 24 h 后,取出 96 孔培养板,每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 4 h,然后吸弃各孔中的液体加入

DMSO 浓液 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 振荡混匀, 并于室温放置 10 min, 使结晶充分溶解并混匀, 用酶标仪于 570 nm 处测定各组吸光度  $A$ , 抑制率 =  $[1 - (A_{\text{钩吻总碱组}} - A_{\text{溶剂组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{溶剂组}})] \times 100\%$ 。以上实验进行 3 次。

**2.4 DAPI 染色法观察 HT-29 细胞凋亡** 将取对数生长期的 HT-29 接种于 6 孔培养板中, 细胞分为钩吻总碱组 (钩吻总碱 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 空白组 (加等体积培养液), 每孔 2 mL 培养液, 常规培养 24 h 后, 使细胞贴壁, 并同步化。吸弃原培养液, 每孔用 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DAPI 染色液 500  $\mu\text{L}$  漂洗后, 弃去染色液, 每孔再加 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DAPI 染色液 500  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育染色 15 min, 弃去染色液, 每孔加甲醇 500  $\mu\text{L}$  漂洗, 弃去甲醇溶液, 用荧光倒置相差显微镜观察细胞凋亡情况。

**2.5 Annexin V-FITC/PI 检测 HT-29 细胞凋亡** 按 2.4 项下常规培养 HT-29 细胞 24 h, 再用钩吻总碱干预培养 24 h 后, 吸弃原培养液, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集, 收集总数约为  $1 \times 10^6$  个细胞。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞 2 次。弃去 PBS 洗涤液, 加入 Binding Buffer 500  $\mu\text{L}$  使细胞呈悬浮状态, 后加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$  混匀后, 再加入 Propidium Iodide 5  $\mu\text{L}$ , 轻摇混匀, 室温下避光反应 5 min, 用流式细胞仪进行检测, 实验重复 3 次。

**2.6 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测 Bax, Bcl-2 mRNA 表达** 取对数生长期的 HT-29 细胞胰酶消化后, 取  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养液, 常规培养 24 h 后。吸弃原培养液, 细胞分为钩吻总碱组 (钩吻总碱终质量浓度分别调整为 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及空白组 (加等体积的培养液), 继续培养 24 h。弃去培养液, 用 trizol 法提取总 RNA。取总 RNA (根据浓度计算体积) 1  $\mu\text{g}$ , 利用逆转录试剂盒进行逆转录反应 (参照相关试剂盒说明书)。PCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ) 为 cDNA 第一链产物 1  $\mu\text{L}$ , DreamTaq Green PCR Master Mix (2  $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  上游引物 0.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下游引物 0.2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.6  $\mu\text{L}$ 。上述反应体系振荡混匀后置于 PCR 仪中进行循环扩增。扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 58  $^{\circ}\text{C}/(56^{\circ}\text{C})$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 持续 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min。取每组 PCR 产物各 5  $\mu\text{L}$  在琼脂糖凝胶 (1.5%) 电泳 30 min 后, 用凝胶成像系统扫描、分析, 以 Bax, Bcl-2 与内参  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 积分吸光度  $IA$  比值进行分析, 实验重复 3 次。具体引物

序列 (由上海捷瑞公司设计及合成) 及退火温度见表 1。

表 1 PCR 引物序列、退火温度

Table 1 PCR primer sequence and annealing temperature

引物	序列	长度 /bp	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$
$\beta$ -actin	上游 5'-GTGTGACGTGGACATCCGCA-3'	20	58
	下游 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'	23	
Bax	上游 5'-TGTCGCCCTTTTCTACTTTGGCC-3'	22	58
	下游 5'-TCACCCAACCACCTGGTCTT-3'	21	
Bcl-2	上游 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAG-3'	21	56
	下游 5'-CATCCCAGCCTCCGTTATCC-3'	20	

**2.7 紫外分光光度法检测 Caspase-3 表达** 取对数生长期的 HT-29 细胞胰酶消化后, 取  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养液, 常规培养 24 h。吸弃原培养液, 细胞分为钩吻总碱组 (钩吻总碱终质量浓度为 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及空白组 (加等体积培养液), 继续培养 24 h。弃去培养基, 胰酶消化后, 收集约  $5 \times 10^5$  个细胞。在收集的沉淀细胞中加入预冷 Lysis Buffer 50  $\mu\text{L}$ , 吹打振荡均匀, 离心, 取上清液, 测蛋白浓度。吸取细胞裂解上清 50  $\mu\text{L}$ , 体积不满 50  $\mu\text{L}$  的则用 Lysis Buffer 补足。加入含 DTT 0.5  $\mu\text{L}$  的 2  $\times$  Reaction Buffer 50  $\mu\text{L}$ 。再加入 Caspase-3 Substrate 5  $\mu\text{L}$ , 并于 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 4 h。用酶标仪在 405 nm 波长下测定其  $A$ , 通过比较相对  $A (A_{\text{各实验组}} - A_{\text{溶剂组}})$  来确定钩吻总碱诱导 HT-29 细胞 Caspase-3 表达程度, 实验重复 3 次。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 钩吻总碱对于 HT-29 细胞增殖的影响** 与空白组相比较, 钩吻总碱对 HT-29 细胞增殖具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。随着钩吻总碱浓度的逐渐增加, 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  钩吻总碱干预 24 h 后, 对 HT-29 细胞增殖的平均抑制率达到 54.17%, 表现出明显的量效关系。见表 2。

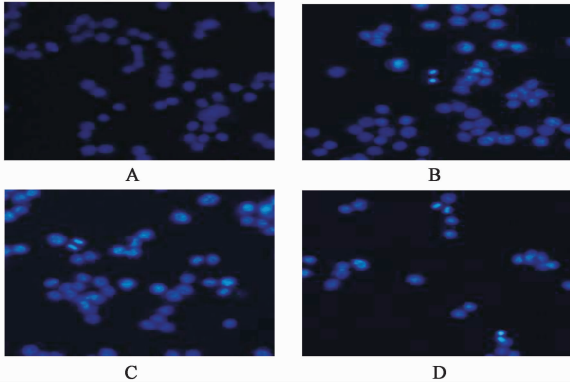
**3.2 钩吻总碱对于 HT-29 细胞凋亡的影响** DAPI 染色后, 空白组 HT-29 细胞染色较浅且均匀, 细胞核形态清晰。钩吻总碱组经钩吻总碱干预后的细胞出现蓝色荧光, 细胞核边缘不规则, 核小体碎片增加, 随着药物剂量的增加, HT-29 细胞的数量逐渐减少, 提示钩吻总碱可抑制 HT-29 细胞增殖, 并促进 HT-29 细胞凋亡。见图 1。

表 2 钩吻总碱干预 24 h 对 HT-29 细胞增殖的影响

Table 2 Effect of TAG on HT-29 cells proliferation

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$A(\bar{x}\pm s, n=3)$	抑制率/%
溶剂	-	$0.107\pm 0.002$	-
空白	0	$0.251\pm 0.009$	-
钩吻总碱	50	$0.228\pm 0.003^{1)}$	15.97
	100	$0.203\pm 0.009^{1)}$	33.33
	200	$0.173\pm 0.010^{1)}$	54.17

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ (表 3~5 同)。



A. 空白组; B~D. 钩吻总碱(50, 100, 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )组(图 2 同)

图 1 钩吻总碱对 HT-29 细胞凋亡的影响(DAPI,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of TAG on HT-29 cells apoptosis(DAPI,  $\times 200$ )

**3.3 钩吻总碱对于 HT-29 细胞凋亡的影响** 与空白组相比,钩吻总碱组 HT-29 细胞凋亡率明显增加( $P<0.05$ )。见表 3。并且随着钩吻总碱浓度的增加凋亡率逐渐升高,钩吻总碱  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  干预 24 h 后,平均凋亡率达 29.73%,表明钩吻总碱具有明显促进 HT-29 细胞凋亡的作用。

表 3 钩吻总碱对 HT-29 细胞凋亡率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of TAG on apoptosis rate of HT-29 cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	0	$12.23\pm 2.07$
钩吻总碱	50	$16.06\pm 3.55^{1)}$
	100	$20.54\pm 4.14^{1)}$
	200	$29.73\pm 9.12^{1)}$

**3.4 钩吻总碱对于 HT-29 细胞 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,随着钩吻总碱质量浓度的升高,Bax mRNA 表达无明显变化,Bcl-2 mRNA 表达逐渐降低( $P<0.05$ ),Bax/Bcl-2 mRNA 表达逐渐升高( $P<0.05$ )。见图 2,表 4。

**3.5 钩吻总碱对于 HT-29 细胞 Caspase-3 表达的影响** 与空白组比较,随着钩吻总碱浓度的升高,Caspase-3 表达量逐渐增高( $P<0.05$ )。见表 5。

#### 4 讨论

结肠癌是一种高发恶性肿瘤<sup>[11]</sup>,其发病与遗传

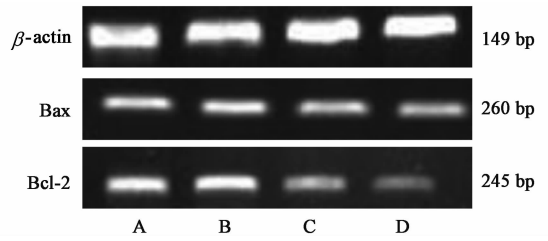


图 2 钩吻总碱干预 24 h 后 HT-29 细胞 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of mRNA expression of Bax, Bcl-2 of HT-29 cells after 24 hours' treatment with TAG

表 4 钩吻总碱对 HT-29 细胞 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of TAG on Bax, Bcl-2 mRNA expression of HT-29 cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/Bcl-2
空白	0	$0.563\pm 0.201$	$0.182\pm 0.137$	$2.916\pm 1.889$
钩吻总碱	50	$0.601\pm 0.188$	$0.106\pm 0.098^{1)}$	$7.896\pm 5.060^{1)}$
	100	$0.582\pm 0.162$	$0.041\pm 0.026^{1)}$	$15.499\pm 8.691^{1)}$
	200	$0.612\pm 0.213$	$0.029\pm 0.008^{1)}$	$23.124\pm 6.914^{1)}$

表 5 钩吻总碱干预 24 h 对 HT-29 细胞 Caspase-3 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of TAG on Caspase-3 expression of HT-29 cells after 24 hours' treatment( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	A
空白	0	$0.112\pm 0.029$
钩吻总碱	50	$0.171\pm 0.028^{1)}$
	100	$0.223\pm 0.032^{1)}$
	200	$0.298\pm 0.050^{1)}$

因素、环境因素、饮食及生活习惯等均密切相关,其发病涉及到多个因素、多个阶段及不同基因与蛋白的变化。细胞凋亡是机体维持稳定的重要保护机制之一,细胞凋亡的减少也是肿瘤发生的一个关键因素。Bcl-2 属原癌基因,位于线粒体膜,可抑制许多因素引起的细胞凋亡,通常在正常组织中低表达,而在肿瘤组织中常表达较高,肿瘤细胞的存活可能有赖于 Bcl-2 的细胞保护作用,Bcl-2 高表达时可导致肿瘤对于某些治疗不敏感;Bax 主要位于细胞浆,当受到凋亡刺激时,从细胞浆移动到线粒体外膜,通过插入线粒体膜与位于线粒体内膜的腺苷酸转移载体结合形成复合物,导致线粒体跨膜电位下降,刺激促凋亡分子细胞色素 C,凋亡诱导因子的释放,从而促发线粒体的凋亡通路,而 Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体,可阻碍 Bax 的促凋亡作用,抑制细胞色素 C 和凋亡诱导因子的释放<sup>[12-13]</sup>。Bcl-2/Bax 异常升高可见于多种肿瘤之中,Bax/Bcl-2 决定了细胞是否凋亡<sup>[14]</sup>,药物治疗肿瘤的一个重要机制是诱导肿瘤

细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。李柱虎等<sup>[16]</sup>通过实验证明 Bcl-2 表达可影响结肠组织的恶变程度,从而影响结肠癌的发生发展。Caspase-3 蛋白是执行细胞凋亡的下游关键蛋白,多种触发细胞凋亡的因素都通过其介导的信号传导通路导致细胞凋亡,在细胞中一般以非活化的酶原形式存在,可由细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子结合,激活 Caspase-9,进一步激活 Caspase-3,进而导致细胞凋亡<sup>[17]</sup>。

本研究观察到钩吻总碱可抑制 HT-29 细胞增殖,表现出明显量效关系,同时 DAPI 染色,Annexin V-FITC/PI 证实钩吻总碱可促进 HT-29 细胞凋亡,RT-PCR 检测发现钩吻总碱可下调 Bcl-2 mRNA 表达,提高了 Bax/Bcl-2。同时紫外分光光度法检测发现钩吻总碱可促进 HT-29 细胞 Caspase-3 的表达。Bax, Bcl-2, Caspase-3 是介导细胞凋亡的重要因子,由此本课题组推测出钩吻总碱促进 HT-29 细胞凋亡可能与 Bax/Bcl-2 途径有关,为钩吻抗肿瘤作用提供一定理论依据。另有研究发现钩吻总碱能抑制人脐静脉内皮细胞增殖及迁移<sup>[18]</sup>,提示钩吻总碱可能从抑制血管新生的途径抑制肿瘤细胞的增殖。同时有研究表明钩吻可提高外周血红细胞、白细胞、血小板及骨髓有核细胞的数量,具有血液保护作用<sup>[19-20]</sup>。目前用于治疗肿瘤的化疗药物极易导致耐药性,而且可能造成骨髓抑制,影响血红蛋白、血小板、白细胞生成。中药治疗恶性肿瘤具有多靶点的特点,可通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞迁移等多种途径起到抗肿瘤作用<sup>[21]</sup>。“以毒攻毒”是中医临床治疗恶性肿瘤的一大特色,毒性中药常通过细胞毒及诱导细胞凋亡的作用起到抗肿瘤效应,斑蝥、全蝎、砒霜等有毒中药都有报道用于治疗恶性肿瘤<sup>[22]</sup>。钩吻也是大毒之药,其毒性限制了在临床的直接应用,但钩吻具有抗肿瘤、止痛、血液保护、增强免疫等作用<sup>[23]</sup>,如能对其相关作用机制进一步研究,并加以提取、开发、利用制成抗肿瘤相关药物,将对肿瘤患者大有裨益。

#### [参考文献]

[1] 陈冀胜. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 371-376.  
[2] 唐·孙思邈. 千金翼方[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2010: 60.  
[3] 李德森, 杨樱, 王英豪, 等. 钩吻民间应用调查及不同动物水解其毒性实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(11): 23-26.  
[4] 陆建敏, 齐子荣, 刘国廉, 等. 钩吻碱注射液对肿瘤细

胞增殖能力的影响[J]. 癌症, 1990, 9(6): 472-477.  
[5] 曹明哲, 季宇彬, 辛国松, 等. 天然植物中生物碱类抗肿瘤药物研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(7): 59-61.  
[6] 黄静, 苏燕评, 俞昌喜, 等. 钩吻生物碱化合物体外抗消化系统肿瘤的活性[J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 197-200.  
[7] 黄静, 许盈, 俞昌喜, 等. 钩吻生物碱化合物抗肿瘤效应及其诱导凋亡作用[J]. 海峡药学, 2014, 26(10): 19-23.  
[8] 王宇, 李跃伟, 孙志良, 等. 钩吻化学成分与药理作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2016, 35(6): 27-29.  
[9] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展[J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13-14.  
[10] 杨樱, 邱丽莉, 许文, 等. 闽产钩吻根总生物碱半数致死量的实验研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 40-42.  
[11] 李宝国. 结肠癌诊治的回顾与展望[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(13): 2124-2126.  
[12] 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 103-105.  
[13] 陈英, 黄小民. 红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠的 Bax/Bcl-2 表达及其比值的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 159-162.  
[14] LIN J M, CHEN Y Q, WEI L H, et al. Hedyotis diffusa Willd. extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells [J]. Intern J Oncol, 2010, 37(5): 1331-1338.  
[15] 迟德彪, 雷林生, 金宏, 等. 钩吻素子体外诱导人结肠腺癌 LoVo 细胞凋亡的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 911-913.  
[16] 李柱虎, 林贞花, 朴美花, 等. 结肠癌及其癌前病变中 Bcl-2, Bax 蛋白的表达与细胞凋亡的关系[J]. 延边大学医学学报, 2001, 24(4): 252-255.  
[17] 江志敏, 谢德荣, 姚和瑞, 等. Caspase-3 在结肠癌中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(6): 335-337.  
[18] 陈亮, 杨樱, 卢伊, 等. 钩吻总碱对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移的影响[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(4): 41-43.  
[19] 王坤, 肖健, 黄燕, 等. 钩吻对小鼠造血功能的影响[J]. 广西中医药, 2000, 23(6): 48-50.  
[20] 王坤, 肖艳芬, 余晓玲, 等. 钩吻对小鼠急性辐射损伤的保护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(2): 111-112.  
[21] 程海波, 沈政洁, 孙东东, 等. 抗肿瘤中药对肿瘤微环境的干预作用评述[J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1343-1350.  
[22] 王晓雪, 周则卫. 中药以毒攻毒抗肿瘤作用研究进展[J]. 医药导报, 2008, 27(11): 1364-1366.  
[23] 王坤, 杨柯. 钩吻的药理研究及临床应用现状[J]. 广西中医学院学报, 2001, 4(4): 124-126.

[责任编辑 张丰丰]