

苦参碱抑制神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖作用研究

高晓红¹,徐伟²,李文杰³,马汉伟⁴,白银亮^{1*}

(1. 兰州大学第二医院药学部,兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院神经外科,兰州 730030;
3. 郑州大学药学院,郑州 450001; 4. 兰州大学第二医院小儿内科,兰州 730030)

[摘要] 目的:观察苦参碱对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖的影响,并探讨其作用机制。方法:取对数生长期 SK-N-SH 细胞,用磺酰罗丹明 B(SRB)法检测苦参碱(0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹)作用 24,48,72 h 后 SK-N-SH 细胞的增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期,Western blot 检测半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-9 和 Caspase-3 蛋白的表达。结果:苦参碱对 SK-N-SH 细胞增殖具有明显抑制作用,且表现出剂量和时间依赖性。0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹ 苦参碱作用 24,48,72 h 后 SK-N-SH 细胞的抑制率分别为(19.06±3.17)%,(30.18±3.02)%,(38.55±6.12)%;(45.12±4.02)%,(60.45±5.51)%,(71.38±7.91)%;(58.91±4.36)%,(73.44±8.17)%,(88.37±4.57)%。流式细胞仪检测对照组及各浓度组凋亡率分别为(2.45±0.49)%,(12.56±2.21)%,(19.44±4.32)%,(30.12±3.35)%,与对照组比较,苦参碱组的凋亡率均显著性增高(P<0.001);细胞周期结果显示苦参碱作用 SK-N-SH 细胞 48 h 后 G₀/G₁ 期细胞明显增多(P<0.01),S 期细胞明显减少(P<0.01)。苦参碱可显著上调 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达(P<0.01,P<0.01)。结论:苦参碱对神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖具有抑制作用,这种作用与其阻滞细胞周期和激活 Caspase-9 和 Caspase-3 表达进而诱导产生细胞凋亡有关。

[关键词] 苦参碱;人神经母细胞瘤;凋亡;半胱天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0196-04

[doi] 10.11653/syfy2013230196

[收稿日期] 20130706(005)

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项项目(lzujby-2013-46)

[第一作者] 高晓红,副主任医师,从事中药药理学研究,Tel:0931-8942355,E-mail:gxhong0616@163.com

[通讯作者] * 白银亮,Tel:0931-8942491,E-mail:lzuby1@163.com

- [3] Li-Sha Zhu, Xin-Chao Ma, Shu-Ying Han, et al. Effect of total flavones of buckwheat leaf on blood lipid and lipid peroxides [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004, 8(25): 5178.
- [4] 韩淑英,王志路,储金秀,等. 荞麦花叶黄酮对 2 型糖尿病大鼠胰岛抵抗及肝组织 PTP1B 的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3114.
- [5] 白静,姜妍,韩婷,等. 荞麦花叶黄酮对 2 型糖尿病 C₅₇ 小鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1876.
- [6] 李才. 人类疾病动物模型的复制[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 345.
- [7] Pedrini M, Massuda R, Fries G R, et al. Stress, inflammatory markers and factors associated in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Psychiatr Res, 2012, 46(6): 819.
- [8] 周才杰,黄鸣清,陈长青,等. 丹酚酸 B 改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 233.
- [9] Alice P S Kong, Kai-Chow Choi, Gary TC Ko, et al. Associations of overweight with insulin resistance, β -cell function and inflammatory markers in Chinese adolescents[J]. Pediatric Diabetes, 2008, 9(5): 488.
- [10] Frank C Huvers, Calin Popa, Mihai G Netea, et al. Improved insulin sensitivity by anti-TNF α antibody treatment in patients with rheumatic diseases[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(4): 558.
- [11] Krane V, Winkler K, Drechsler C, et al. Association of LDL cholesterol and inflammation with cardiovascular events and mortality in hemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(5): 902.
- [12] 李彩蓉,蔡飞,黎荣,等. 二苯乙烯苷对糖尿病大鼠肾小球系膜细胞增殖及分泌炎症因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 13.
- [13] 张永鹏,刘静,靳国印,等. 糖平煎对 2 型糖尿病大鼠炎症细胞因子的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 235.

[责任编辑 顾雪竹]

Anti-proliferative Effects of Matrine on Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells

GAO Xiao-hong¹, XU Wei², LI Wen-jie³, MA Han-wei⁴, BAI Yin-liang^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China;

2. Department of Neurosurgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China;

3. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

4. Pediatric Department of Internal Medicine, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China)

[Abstract] Objective: To investigate anti-proliferative effects of matrine on human neuroblastoma SK-N-SH cells and its mechanism. **Method:** Effects of matrine (0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹) on SK-N-SH cell proliferation were tested by SRB assay. Cell cycle and apoptosis of SK-N-SH were measured by flow cytometry. The levels of caspase-3 and caspase-9 within the cells were analyzed by Western blot. **Result:** Matrine inhibited the proliferation of SK-N-SH cells in a dose-and time-dependent manner. The inhibition rate was (19.06 ± 3.17)%, (30.18 ± 3.02)%, (38.55 ± 6.12)%; (45.12 ± 4.02)%, (60.45 ± 5.51)%, (71.38 ± 7.91)%; (58.91 ± 4.36)%, (73.44 ± 8.17)%, (88.37 ± 4.57)% after treated with matrine by 0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹ in 24 h, 48 h and 72 h, respectively. Flow cytometry apoptosis in the control group and each concentration group were (2.45 ± 0.49)%, (12.56 ± 2.21)%, (19.44 ± 4.32)%, (30.12 ± 3.35)%, compared with the control group, the matrine-treated cells showed increased apoptosis rate ($P < 0.001$), increased percentage arrested in G₀/G₁ phase ($P < 0.01$) and decreased S phase cells ($P < 0.01$). Matrine significantly increased the expression of caspase-3 and caspase-9 of SK-N-SH cells. **Conclusion:** Matrine can inhibit the proliferation of SK-N-SH cell and the mechanism may be correlated to cell cycle arrest and apoptosis induced by activation of caspase-3 and caspase-9.

[Key words] matrine; neuroblastoma; apoptosis; caspase

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是一种节后交感神经系统的恶性肿瘤,是婴幼儿最为常见的肿瘤之一,因其发病率和死亡率高、预后差,并有明显家族倾向性等特点而被称为“儿童癌症之王”^[1]。苦参碱作为中药苦参的主要有效成分之一,其在抗肿瘤方面的作用已得到了广泛关注^[2-3]。本实验旨在观察苦参碱对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖的影响,并对其作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 细胞系 人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞由郑州大学药学院提供。SK-N-SH 细胞用含有 10% 优级胎牛血清的 DMEM 培养基培养,培养条件为 5% CO₂ 37 ℃。

1.2 药品及试剂 苦参碱注射液(10 mL:150 mg,山西振东泰盛制药有限公司,批号 120610),DMEM 培养基(HyClone,北京赛默飞生化制品有限公司,批号 SH30243),无线电免疫沉淀裂解液(RIPA,上海碧云天生物技术有限公司,批号 121104),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 120517),胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司,

批号 12112101),巯基罗丹明 B 蛋白染料(SRB,批号 R80043)、碘化丙啶(PI,批号 YY15235)和核糖核酸酶(Rnase,批号 R4875)均购自美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 120526),半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-9,Caspase-3(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 SC-70505,31A1067)。

1.3 仪器 Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD Accuri 公司),二氧化碳培养箱(美国 SIM 公司),Spectra Mr 型全波长酶标仪(美国 DYNEX 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含有 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养基,于 37 ℃,5% CO₂ 条件下培养人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞。2~3 d 消化传代 1 次。所有实验均在细胞的对数生长期进行。

2.2 检测细胞增殖抑制率 取对数生长期 SK-N-SH 细胞,以约 5 × 10³ 个/孔接种于细胞培养板中培养 24 h,加入经 DMEM 培养基稀释成不同质量浓度的苦参碱(0.5,1.0,2.0 g·L⁻¹),另设对照组(只加等体积培养基),每组设 4 个平行孔,于 37 ℃,5%

CO₂ 中分别孵育 24, 48, 72 h 后进行 SRB 染色。用酶标仪在 515 nm 波长处测定吸光度 (A) 并计算各组细胞的增殖抑制率。

2.3 细胞凋亡率检测 取对数生长期 SK-N-SH 细胞, 以约 1×10^5 个/孔接种于细胞培养板中, 5% CO₂, 37 °C 条件下孵育 24 h 后, 加入含不同质量浓度苦参碱 (0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹) 的培养基作用 48 h 后, 消化细胞 (各组 n=4), 离心并收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 按照 AnnexineV-FITC/PI 试剂盒说明操作, 上流式细胞仪检测细胞凋亡率并进行数据分析。

2.4 细胞周期检测 细胞按 2.3 方法加入苦参碱 (各组 n=4) 作用 48 h 后, 消化细胞, 离心收集细胞, 制成细胞悬液。加入 70% 冷乙醇, 4 °C 静置固定 24 h, 离心除去固定液, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入 RNA 酶和 PI 染色液, 室温避光孵育 30 min, 待均匀后用流式细胞仪进行周期检测并用 Flowjo 7.6.1 Min 软件进行数据分析。

2.5 caspase-9, caspase-3 蛋白表达检测 苦参碱处理 SK-N-SH 细胞 48 h 后, 采用含 PMSF 的 50 mmol·L⁻¹ RIPA 裂解液提取蛋白, 并用 BCA 法对所提蛋白进行定量, 规定上样量为 30 μg。Caspase-9 和 Caspase-3 抗体稀释浓度为 1:200, β-actin 抗体稀释浓度为 1:3 000, 其他均参考文献方法^[4]。

2.6 数据处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 并使用 LSD-t 检验进行组间均数的多重比较, P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SK-N-SH 细胞增殖的影响 苦参碱 (0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹) 作用 24, 48, 72 h 后对 SK-N-SH 细胞增殖具有显著性抑制作用 (各 P < 0.001), 且表现出明显的剂量和时间依赖性。见表 1。

3.2 对 SK-N-SH 细胞凋亡率的影响 苦参碱呈剂量依赖地增加 SK-N-SH 细胞凋亡率 (P < 0.001), 与对照组相比, 0.5, 1.0, 2.0 g·L⁻¹ 苦参碱显著增加细胞凋亡率 (均 P < 0.01), 见表 1。

3.3 对 SK-N-SH 细胞周期的影响 苦参碱作用 SK-N-SH 细胞 48 h 后 G₀/G₁ 期细胞比例明显升高 (P < 0.01), S 期细胞明显减少 (P < 0.01), G₂/M 期细胞则没有明显变化。结果表明, 苦参碱将 SK-N-SH 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。见表 2。

3.4 对 SK-N-SH 细胞 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 苦参碱可显著性上调 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达 (P < 0.01, P < 0.01)。与对照组相比, 各浓度苦参碱组 Caspase-9 蛋白表达均明显升高, 而 0.5 g·L⁻¹ 苦参碱对 Caspase-3 蛋白表达没有明显影响。见图 1。

表 1 苦参碱对 SK-N-SH 细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	抑制率/%			凋亡率/%
		24 h	48 h	72 h	
对照	-	0	0	0	2.45 ± 0.49
苦参碱	0.5	19.06 ± 3.17 ²⁾	45.12 ± 4.02 ³⁾	58.91 ± 4.36 ³⁾	12.56 ± 2.21 ²⁾
	1.0	30.18 ± 3.02 ²⁾	60.45 ± 5.51 ³⁾	73.44 ± 8.17 ³⁾	19.44 ± 4.32 ²⁾
	2.0	38.55 ± 6.12 ²⁾	71.38 ± 7.91 ³⁾	88.37 ± 4.57 ³⁾	30.12 ± 3.35 ³⁾

注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001 (表 2 同)。

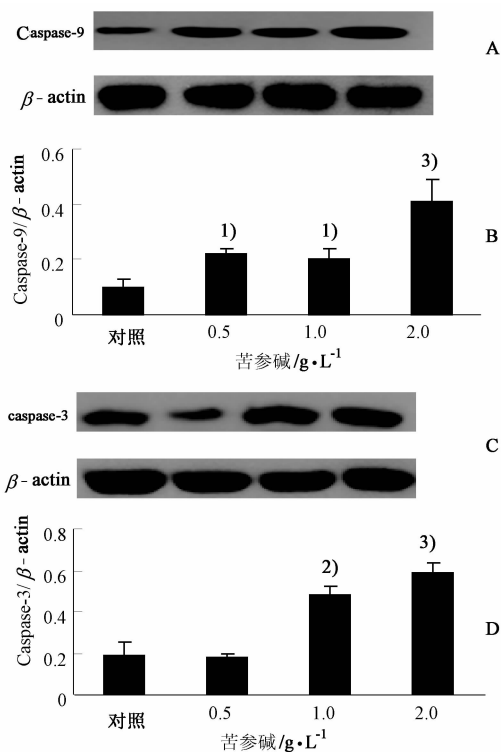
表 2 苦参碱对 SK-N-SH 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	-	36.52 ± 4.21	43.51 ± 5.32	19.95 ± 1.79
苦参碱	0.5	40.31 ± 3.07 ¹⁾	39.01 ± 4.25 ¹⁾	20.28 ± 4.65
	1.0	48.04 ± 7.21 ²⁾	31.99 ± 2.36 ²⁾	20.01 ± 3.56
	2.0	53.96 ± 6.63 ²⁾	25.01 ± 3.23 ³⁾	21.54 ± 2.24

4 讨论

研究表明苦参碱具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、抗心血管疾病、抗呼吸系统疾病等多种药

理作用^[5]。目前, 其抗肿瘤作用更是备受关注, 苦参碱能够抑制肿瘤细胞增殖, 诱导分化, 诱导凋亡, 抑制肿瘤转移, 具有调控免疫功能等^[6]。有学者研究表明, 苦参碱能够抑制神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖, 并诱导其产生凋亡^[7-8], 但对其作用机制研究较少。本实验采用 SK-N-SH 细胞模型观察了苦参碱对 SK-N-SH 细胞增殖的影响, 结果发现, 苦参碱能够有效抑制 SK-N-SH 细胞增殖, 这与文献报道结果一致。细胞周期检测结果显示苦参碱能够增加 G₀/G₁ 期细胞数, 减少 S 期细胞数, 可见苦参碱能够将 SK-N-SH 细胞增殖周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 从而发



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$

图1 苦参碱对 SK-N-SH 细胞 Caspase-9 (A, B) 和 Caspase-3 (C, D) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

挥抑制 SK-N-SH 细胞增殖的作用。

同时,我们发现苦参碱能够诱导 SK-N-SH 细胞产生凋亡,其中高浓度苦参碱组凋亡率高达 $(30.12 \pm 3.35)\%$ 。众所周知,细胞凋亡是受细胞内源性基因、酶类及信号传导途径调控的一个级联式激活过程,其中,半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspases)在此整个过程中起着至关重要的作用,而且人体细胞中 Caspases 的超表达和激活均可引起细胞凋亡。Caspase-9 也称 ICE-LAP6,可与细胞色素 C 和 Apaf1 形成复合物被激活,并进一步激活细胞凋亡过程中最关键酶 Caspases-3,从而触发凋亡级联反应^[9-11]。因此 Caspase-9 是凋亡信号传导过程中重要的上游 Caspase,而 Caspases-3 则是细胞凋亡的关键执行者。本研究发现,苦参碱对 Caspase-9 和 Caspase-3 表达均有上调作用,能够激活凋亡级联反应。因此,笔者认为苦参碱诱导 SK-N-SH 细胞凋亡与激活 Caspase-9 和 Caspase-3 密切相关。

总之,苦参碱对神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖具有抑制作用,这种作用与其阻滞细胞周期和激活 Caspase-9 和 Caspase-3 表达进而诱导产生细胞凋亡有关。鉴于神经母细胞瘤的巨大危害以及目前对其没有彻底有效的治疗药物,苦参碱的抗神经母细胞瘤作用无疑为神经母细胞瘤的治疗提供了一种思路和实验依据。

[参考文献]

- [1] 钟晓丹,张瑜,叶霞,等. 儿童神经母细胞瘤临床特征与治疗反应评估[J]. 中华小儿外科杂志,2011,32(10):791.
- [2] 陈晓峡,向小庆,叶红,等. 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.
- [3] 马悦,张启伟,王智民,等. 复方苦参注射液研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):342.
- [4] Zhang Q, Ma Y, Cheng Y F, et al. Involvement of reactive oxygen species in 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in human neuroblastoma cells [J]. Cancer Letters,2011,313(2):201.
- [5] 李屹,张丽楠,杨磊. 苦参碱药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志,2012(5):423.
- [6] 杨泽松,牟君,陈建斌,等. 苦参碱通过 MAPK 信号转导通路促进 U937 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志,2009,34(12):1553.
- [7] 闫晓方,薛天阳,许伟,等. 不同浓度苦参碱对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞存活率及凋亡率的影响[J]. 中国医药科学,2011(9):19.
- [8] 罗娟,许伟,薛天阳,等. 苦参碱对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的作用机制[J]. 实用儿科临床杂志,2012(3):190.
- [9] Fiandalo M V, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis [J]. Exp Oncol, 2012,34(3):165.
- [10] Zornig M, Hueber A, Baum W, et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis [J]. Biochim Biophys Acta,2001,1551(2):F1.
- [11] Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances [J]. Experimental Oncology,2012,34(3):255.

[责任编辑 聂淑琴]