

苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及 Survivin 基因表达的影响

陈立波*

(吉林工业职业技术学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:探讨苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的分子机制。方法:应用不同浓度的苦参碱作用于人宫颈癌 HeLa 细胞,采用 MTT 法检测细胞增殖;Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期;RT-PCR 和 Western blotting 分析 Survivin 基因表达。结果:苦参碱对 HeLa 细胞的体外增殖具有抑制作用,量效关系显著,与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$),半数抑制浓度(IC_{50})为 $2.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经流式细胞仪检测表明,苦参碱能使 HeLa 细胞 G_0 - G_1 期逐渐增加, G_2 -M 期和 S 期逐渐减少,并且随着剂量的增加,HeLa 细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$)。苦参碱对 HeLa 细胞 Survivin 基因表达有一定的抑制作用($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。结论:苦参碱能有效抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖,诱导其凋亡,其作用机制可能与抑制 Survivin 基因的表达有关。

[关键词] 苦参碱; 宫颈癌; 增殖; 凋亡; Survivin 基因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0235-04

[doi] 10.11653/syfy2013150235

Effects of Matrine on Proliferation, Apoptosis and Survivin Gene Expression in Human Cervical Cancer HeLa Cells

CHEN Li-bo*

(Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[收稿日期] 20130314(005)

[通讯作者] *陈立波, 硕士, 副教授, 从事中药相关教学与研究工作, Tel:0432-64644341, E-mail:jlclb2@163.com

[参考文献]

- [1] 叶勇, 石拓, 邱明义, 等. 小柴胡汤对正常大鼠胃肠激素影响的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(3):144.
- [2] 曹峰, 陈静, 赵博, 等. 不同柴胡用量的小柴胡汤对正常小鼠胃排空和小肠推进功能的影响[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(18):31.
- [3] 吴贵娥. 小柴胡汤古代运用考探[D]. 北京:北京中医药大学, 2005:30.
- [4] 周志申. 浅析小柴胡汤柴胡剂量及其副作用[J]. 陕西中医, 2005, 26(3):266.
- [5] 王宪龄, 申平, 李珍珍. 柴胡黄芩及其不同剂量比例配伍对小鼠小肠推进功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(4):1.
- [6] Lin Ya-Ping, Yi Shou-Xiang, Yan Jie, et al. Effect of acupuncture at Foot-Yangming Meridian on gastric

- mucosal blood flow, gastric motility and brain-gut peptide [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(15):2231.
- [7] Karl Tsim, Hermona Soreq. Acetylcholinesterase: old questions and new developments [J]. Front Mol Neurosci, 2012, 5(2):101.
- [8] 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(1):9.
- [9] 董艳平, 屈克义, 李文胜, 等. 隔山消对功能性消化不良大鼠一氧化氮和胆碱酯酶的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(1):24.
- [10] P R R Gangula, K R Sekhar, S Mukhopadhyay. Gender bias in gastroparesis: is nitric oxide the answer[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(9):2525.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To investigate the effects of matrine on proliferation, apoptosis in human cervical cancer HeLa cells and its possible molecular mechanism. **Method:** HeLa cells were treated with matrine of different concentrations. MTT assay was used to measure the cell proliferative effect. The Annexin V FITC/PI double staining analysis by flow cytometry was used to evaluate apoptotic rate and the cell cycle. RT-PCR and western blotting were performed to detect the expression of Survivin gene. **Result:** Matrine could inhibit the proliferation of HeLa cells *in vitro*, and dose-effect relationship was significant ($P < 0.01$). IC_{50} of HeLa cells was $2.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The flow cytometry test indicated that matrine could make HeLa cells G_0 - G_1 phase gradually increasing, G_2 -M period and S phase reduce gradually, and with the increase of the dose, HeLa cells apoptosis rate increased significantly ($P < 0.01$). Matrine could suppress the expression of Survivin gene ($P < 0.01$), and with the dose-dependent manner. **Conclusion:** Matrine could effectively inhibit proliferation and induce apoptosis of HeLa cells. Its molecular mechanisms might be related to modulating the expression of Survivin.

[Key words] matrine; cervical cancer; proliferation; apoptosis; Survivin gene

苦参碱(matrine, MAT)是从中药苦参(*Sophora flavescens avescens* Ait)、苦豆子(*S. alopecuroides* L)等豆科槐属植物中提取的喹啉类生物碱,具有抗炎、抗病毒、抗心律失常、抗过敏和抗肿瘤等多种药理活性^[1],对胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤细胞的增殖具有抑制作用,并可诱导其分化、促进其凋亡、抑制其黏附转移^[2-3]。本研究旨在通过体外细胞实验的方法,研究苦参碱对人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用,并初步探讨其可能机制。

1 材料

1.1 细胞株 宫颈癌 HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。用含 10% 胎牛血清、2% 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度条件下半贴壁细胞悬浮培养。

1.2 药物与试剂 苦参碱注射液(纯度 >99.0%,宁夏紫荆花药业股份有限公司,批号 P0110626),RT-PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司),Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司),Survivin 抗体(美国 Santa Cruz 公司),RPMI-1640 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司),MTT、二甲基亚砜、琼脂糖(美国 Sigma 公司),Trizol 总 RNA 抽提试剂(Invitrogen 公司),TaqDNA 聚合酶, Oligod,RNasin(美国 Promage 公司),引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 仪器设备 NAPCO 8000DH 型 CO₂ 培养箱(美国, Thermo 公司), IX-70 型倒置显微镜(Olympus), Forma Class II A2 生物安全柜(美国 Thermo 公司),FACSI01 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司), 128C-400 型酶标仪(奥地利 CliniBi 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 HeLa 细胞制成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μL ,培养 24 h。然后加入苦参碱 100 μL ,使其终质量浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设对照孔和调零孔,每组 6 个复孔。继续培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),再继续培养 4 h。弃去上清液,每孔加二甲基亚砜 200 μL ,振荡摇匀终止反应,使用酶标仪在 490 nm 处测吸光度(A)。计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.2 Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的 HeLa 细胞制成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液,接种于 12 孔培养板中,培养 24 h 后加入苦参碱使其终质量浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养 48 h 后,用 0.05% 胰酶-EDTA 消化,收集 1×10^6 细胞, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4 °C 离心 5 min 弃上清,加入 1 mL 冷 PBS 重悬细胞,再重复离心,弃上清,加入 200 μL 结合缓冲液重悬,再加入 10 μL Annexin V-FITC, 20 μL PI,混匀,室温避光孵育 15 min,加入 300 μL 结合缓冲液,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率并分析细胞周期。

2.3 RT-PCR 检测 Survivin mRNA 的表达 取对数生长期的 HeLa 细胞,培养 24 h,加入苦参碱使其终质量浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养 48 h 后,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,电泳检测 RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板 PCR 扩增 Survivin, β -action 为内参照基因。Survivin 上游引物 5'-CAGATTTGAATCGCGGACCC-3',下游引物 5'-CCAAGTCTGGCTCGTTCTCAG-3'; β -action 上游引物 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物 5'-

CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。反应条件为:首先 94 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物 12 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统观察记录结果。

2.4 Western blotting 检测 Survivin 基因表达 取 0,0.5,1.0,2.0 $g \cdot L^{-1}$ 苦参碱作用 48 h 后的 HeLa 细胞,各收集 1×10^7 个细胞,加入 200 μ L 蛋白裂解液,于 4 °C 裂解 1 h,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 4 °C 离心 20 min 取上清,用考马斯亮蓝蛋白质测定法测定蛋白浓度。取 50 μ g 样品总蛋白变性 10 min 后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜、封闭,加入抗 Survivin 的单克隆抗体 4 °C 孵育 16 h,洗膜 3 次。再加入羊抗鼠二抗,37 °C 孵育 1 h,洗膜 3 次。化学发光显色检测分析结果。对蛋白条带灰度进行相对定量分析,并以 β -action 条带作为参照。

Survivin 相对含量 = Survivin 灰度值/ β -action 灰度值

抑制率 = 1 - 药物组 Survivin 相对含量/对照组 Survivin 相对含量

2.5 统计学方法 用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 苦参碱不同浓度对 HeLa 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用,并且随着苦参碱浓度的增高,抑制作用也在增强,量效关系显著。各剂量组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$);经 Logit 方法计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 2.60 $g \cdot L^{-1}$ 。见表 1。

表 1 苦参碱对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	A	抑制率/%
对照	-	1.127 \pm 0.065	-
苦参碱	0.5	0.990 \pm 0.049 ¹⁾	12.16
	1.0	0.879 \pm 0.043 ¹⁾	22.01
	1.5	0.734 \pm 0.061 ¹⁾	34.87
	2.0	0.636 \pm 0.047 ¹⁾	43.57

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 苦参碱对 HeLa 细胞周期和凋亡的影响 苦参碱使 HeLa 细胞 G_0 - G_1 期逐渐增加, G_2 -M 期和 S 期逐渐减少,并且随着剂量的增加,HeLa 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 Survivin 基因表达的影响 Western blotting

表 2 苦参碱对 HeLa 细胞周期和凋亡的影响

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	G_0 - G_1 期	G_2 -M 期	S 期	凋亡率/%
对照	-	52.15	19.46	28.39	2.54
苦参碱	0.5	60.14	17.22	22.64	6.87
	1.0	64.71	15.63	19.66	15.66 ¹⁾
	2.0	67.60	14.06	18.34	30.15 ¹⁾

分析随着苦参碱浓度的升高,Survivin 基因表达明显减少,量效关系显著。见图 1。

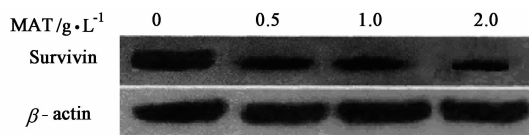


图 1 Western blotting 分析苦参碱对 Survivin 基因表达的影响

3.4 对 HeLa 细胞 Survivin 基因相对含量及抑制率的影响 苦参碱不同浓度对 HeLa 细胞 Survivin 基因均有一定的抑制作用,并且随着苦参碱浓度的增高,抑制作用也在增强,量效关系显著。各剂量组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 苦参碱对 HeLa 细胞 Survivin 基因相对含量及抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot L^{-1}$	相对含量	抑制率/%
对照	-	0.89 \pm 0.06	-
苦参碱	0.5	0.62 \pm 0.07 ¹⁾	30.34
	1.0	0.54 \pm 0.08 ¹⁾	39.33
	2.0	0.37 \pm 0.06 ¹⁾	58.43

4 讨论

宫颈癌是妇科常见恶性肿瘤之一,在我国发病率及病死率均居女性恶性肿瘤的首位,目前仍以手术治疗为主,辅助以放、化疗,但放、化疗对正常机体会产生严重的损伤,因此,寻找高效、低毒的新型抗肿瘤药物势在必行^[4]。苦参碱作为一种生物碱类活性成分,近年来发现其对多种肿瘤细胞的增殖具有抑制作用^[5-7],且毒副作用较小。本实验采用 MTT 比色法观察苦参碱作用 HeLa 细胞 48 h 后的抑制率,结果表明,苦参碱不同浓度对 HeLa 细胞的体外增殖均有一定的抑制作用,并且随着苦参碱浓度的增高,抑制作用也在增强,量效关系显著 ($P < 0.01$),经 Logit 方法计算 IC_{50} 2.60 $g \cdot L^{-1}$ 。提示苦参碱对 HeLa 细胞具有很好的抑瘤潜力,镜下观察细胞发现对照组生长与增殖较快,而加药组增殖明显减慢,但未发现有大量脱落、漂浮的死细胞,进一步证明其抑瘤机制不是细胞毒作用,而是抑制细胞

增殖。

细胞凋亡是一种维持机体自身平衡所必须的生理性细胞自杀过程,有研究表明肿瘤的发生、发展及恶化不仅与细胞的增殖分化异常有关,还与其凋亡障碍有关^[8]。本研究采用 Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪检测发现,苦参碱作用 48 h 后,HeLa 细胞凋亡率随着苦参碱剂量的增加而明显升高,而对照组细胞只发生了自然凋亡。同时其细胞周期分布也明显改变,停滞于 G₀-G₁ 期的细胞比例明显增加,而进入 G₂-M 期和 S 期的细胞比例明显下降,并且这种阻滞效应具有一定的剂量依赖性。提示苦参碱对 HeLa 细胞的增殖抑制作用可能是通过改变细胞周期的分布,使多数细胞停滞于细胞分化期即 G₁ 期,阻止细胞向 S 期转化实现的,从而减少了 DNA 合成和有丝分裂并促进其分化。

Survivin 是近年来发现的抗凋亡作用最强的细胞调节因子之一^[9],可直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性,从而阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程,其过度表达可能是肿瘤发生、发展及预后不良的主要因素^[10]。另外,Survivin 还参与了细胞有丝分裂的调节和胞质分裂过程,其表达与细胞周期分布密切相关,于 G₂-M 期表达量最大,于 G₁-S 期表达量最小^[11-12]。本研究选择 Survivin 作为研究靶点,用不同浓度的苦参碱作用于 HeLa 细胞株上,采用 Western blotting 分析 Survivin 基因的表达,结果表明,随着苦参碱浓度的升高,Survivin 基因表达明显减少,量效关系显著,这与流式细胞仪检测的细胞周期分布结果相符。本研究推测,苦参碱可能通过改变 HeLa 细胞的周期分布,使停滞于 G₀-G₁ 期(此期 Survivin 基因表达量最小)的细胞比例明显增加,而进入 G₂-M 期(此期 Survivin 基因表达量最大)的细胞比例明显下降,从而抑制了细胞凋亡通路中 Survivin 基因的表达,进而解除对 Caspase 的抑制而活化细胞凋亡信号转导通路,这可能是苦参碱诱导 HeLa 细胞凋亡的机制之一。

[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.
- [2] 周娟,倪松石,胥素琴. 苦参碱对人肺腺癌 A549 细胞增殖及 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(3):25.
- [3] 郭启帅,黄曦,李少林. 苦参碱诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8):1104.
- [4] 李丹,张蔚,李福敏,等. 苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞的作用[J]. 武汉大学学报:医学版, 2008, 29(1):28.
- [5] 王景洁,何安兵,付美霞,等. 复方苦参注射液对肝癌细胞 survivin 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(21):1770.
- [6] 李海军,赵晓霞,白美玲,等. 苦参碱对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及线粒体跨膜电位的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8):2042.
- [7] 彭燕,韩凌,孙静,等. 氧化苦参碱对结肠癌 LoVo 细胞 c-myc, PSMD9, CDK4mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):220.
- [8] Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, et al. Adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in lu-65 human lung cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(1):210.
- [9] Jha Kumkum, Shukla Mridula, Pandey Manoj. Survivin expression and targeting in breast cancer[J]. Surgical Oncology, 2012, 21(2):125.
- [10] 谭寒星,黄利鸣,王艳林,等. 天花粉蛋白对子宫颈癌 HeLa 细胞 Survivin 基因的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11):2702.
- [11] 梁宪梅,夏春波. 半枝莲提取物对肺癌 A549 细胞生存素蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):155.
- [12] Wang K, Jiang G J, Wei L, et al. Survivin is a critical regulator of spindle organization and chromosome segregation during rat oocyte meiotic maturation [J]. Zygote, 2010, 4(1):1.

[责任编辑 聂淑琴]