

复方苦参注射液诱导胃癌细胞株MGC803增殖抑制和细胞凋亡的实验研究

姜 明 陆 炜 程国兵 王李华

摘要 目的:观察复方苦参注射液在体外抑制人胃癌细胞株MGC803增殖和诱导其凋亡的生物学效应,并对其分子机制作初步探讨。方法:分别采用不同浓度梯度的复方苦参注射液干预胃癌细胞MGC803,通过MTT比色法检测复方苦参注射液对该细胞系生长增殖的影响。TUNEL法分析经1、2、4 mg/mL复方苦参注射液作用24 h后的MGC803细胞凋亡率。Western blot法检测凋亡相关基因Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达情况。结果:复方苦参注射液在体外能明显抑制人胃癌细胞株MGC803的增殖,且呈浓度、时间依赖性($P<0.001$)。TUNEL法检测实验组细胞凋亡率均明显高于未加复方苦参注射液的空白对照组($P<0.05$);Western blot分析表明复方苦参注射液能下调Bcl-2蛋白表达,降低蛋白Bcl-2/Bax比值,并且可以促使Caspase-3原蛋白发热活化($P<0.05$)。结论:复方苦参注射液具有体外抑制胃癌细胞增殖的作用,并能诱导其凋亡,其机制可能与Bcl-2/Bax比值降低导致Caspase-3活化相关。

关键词 复方苦参注射液 胃癌细胞 Caspase-3

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.16.004

Inhibitory Effects of Matrine Injections on the Proliferation and Apoptosis of Human Gastric Cancer Cell Line MGC803

Ming JIANG, Wei LU, Guobing CHENG, Lihua WANG

Correspondence to: Lihua WANG, E-mail: zjuwyk@163.com

Department of General Surgery, Quzhou Hospital, Quzhou 324000, China

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effects and possible mechanisms of matrine injections on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line MGC803. **Methods:** After matrine injections, cell proliferation was determined by the MTT assay. Cell morphology and apoptosis quantity were examined by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The expression levels of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 proteins were observed by Western blot analysis. **Results:** Matrine injections significantly inhibited the proliferation of MGC803 cells in concentration- and time-dependent manners ($P < 0.001$). The number of apoptotic cells in the matrine-treated group was greater than that of the control group ($P < 0.05$). The expression level of Bcl-2 was down-regulated by matrine. With increased matrine concentration, the ratio of Bcl-2 to Bax decreased, consequently accelerating procaspase-3 activation ($P < 0.05$). **Conclusion:** Matrine injections inhibited the growth of MGC803 cells in concentration- and time-dependent manners by inducing apoptosis. This action may be mediated by the down-regulation of Bcl-2/Bax, resulting in Caspase-3 activation.

Keywords Matrine injections; Gastric cancer cell; Caspase-3

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,目前胃镜普查及筛查机制尚不能在我国得到普遍开展的情况下,临床上胃癌的构成中早期胃癌不足10%,对于肿瘤晚期不能手术切除病灶的患者,尤其是老年癌症患者,化疗的不良反应大,而中药治疗在防治胃癌方面有着独特优势。复方苦参注射液由苦参、白茯苓等中药制成,近年来发现复方苦参注射液在抑制肿瘤生长,缩小瘤体以及改善疼痛、发热、乏力等临床不适症状有着良好的作用^[1],其有可能成为目前低毒、高效的抗肿瘤药物。本实验旨在研究复方苦参

注射液在诱导人胃癌细胞株凋亡中的作用,并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

复方苦参注射液为山西振东制药股份有限公司生产;人胃癌细胞株MGC803购自上海细胞库;RPMI 1640培养基(Gibco公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司);鼠抗人 β -actin、鼠抗人Bcl-2、鼠抗人Bax、鼠抗人Caspase-3(Santa Cruz公司);ECL发光试剂盒购自联科生物。

1.2 细胞培养

胃癌细胞株MGC803培养于含10%胎牛血清、青霉素100 $\mu\text{g/mL}$ 、链霉素100 $\mu\text{g/mL}$ 的RPMI 1640培养液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、含5% CO_2 培养箱中,每隔2~3 d传代1次,取指数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT法检测复方苦参注射液处理后MGC803细胞的增殖抑制率

取对数生长期细胞,调整细胞浓度 $3\times 10^4/\text{mL}$,接种于96孔板,细胞70%~80%融合时,分别加入含终浓度为0.25、0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 复方苦参注射液,设不含复方苦参注射液的胃癌细胞孔板为阴性对照组,含无血清培养液孔板为空白对照组,每组设复孔3个。培养24、48 h后每孔加入无血清培养液180 μL 、MTT 20 μL 继续培养4 h后弃上清,加入DMSO 150 μL /孔,振荡10 min,测定每孔吸光度值(A),计算细胞增殖抑制率(inhibitory rate, IR),绘制生长抑制曲线并计算半数抑制浓度(IC_{50}),实验重复3次。

1.4 TUNEL法检测MGC803细胞凋亡情况

细胞处理同荧光染色法,4%多聚甲醛室温固定30 min,3% H_2O_2 室温处理10 min,加入标记缓冲液20 μL ,取1 μL 的TdT、1 μL 的DIG-d-UTP加入18 μL 标记缓冲液混匀,加入上述20 μL 混合液,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育2 h。0.1M TBS漂洗3次,加50 μL 封闭液,室温湿盒孵育30 min。取抗地高辛抗体1 μL 加封闭液100 μL 混匀,每张玻片加入上液50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育1 h。取0.1 M TBS 100 μL 加入1 μL SABC溶液混匀,每张玻片加入上液50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育1 h。DAB显色10 min,蒸馏水冲洗,苏木素轻度复染,蒸馏水冲洗,浓度梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。结果判定:细胞核染成棕色者为凋亡细胞,计数5个高倍视野下 $>1\,000$ 个细胞,并计算凋亡指数, $\text{AI}=\text{凋亡细胞数}/\text{总细胞数}\times 100\%$ 。

1.5 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

细胞处理同前,设立复方苦参注射液终浓度为1、2、4 mg/mL 的3个实验组,不加复方苦参注射液为阴性对照组。使用含1%PMSF的RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定各个样品的蛋白浓度后用PBS调整蛋白终浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,以12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至PVDF膜上,含5%脱脂奶粉封闭1.5 h,放入相应的鼠抗人Bcl-2、Bax、Caspase-3多克隆抗体(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入碱性磷酸酶标记的二抗(羊抗兔)室温孵育1.5 h,最后滴加ECL液显色,曝光拍照。同时,以细胞蛋白中 β -actin作为内参照,通过与内参照的比较确定Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白相对表达水平。

1.6 统计学方法

统计学处理均采用SPSS 16.0统计软件包分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示并用单因素方差分析和LSD(最小显著差数法)- t 检验进行样本均数间两两比较, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT比色法检测细胞增殖抑制率

分别用0.25、0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 复方苦参注射液处理MGC803细胞24、48 h,计算增殖抑制率。结果显示:1)不同浓度复方苦参注射液对胃癌细胞MGC803增殖抑制率不同($P<0.05$);2)复方苦参注射液不同作用时间对胃癌细胞增殖抑制率不同($P<0.05$)。可见复方苦参注射液体外对MGC803细胞有明显抑制作用,且在一定范围内基本上呈浓度、时间依赖性。作图法求出复方苦参注射液的半数抑制浓度,24 h: $\text{IC}_{50}=2.84\text{ mg/mL}$; 48 h: $\text{IC}_{50}=2.06\text{ mg/mL}$ (图1)。

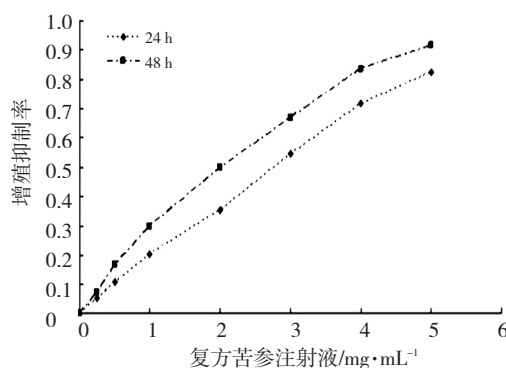


图1 不同浓度复方苦参注射液作用不同时间对MGC803细胞的增殖抑制作用

Figure 1 Different concentrations and different treating periods of matrine injections inhibited the proliferation of MGC803 cells

2.2 TUNEL检测结果

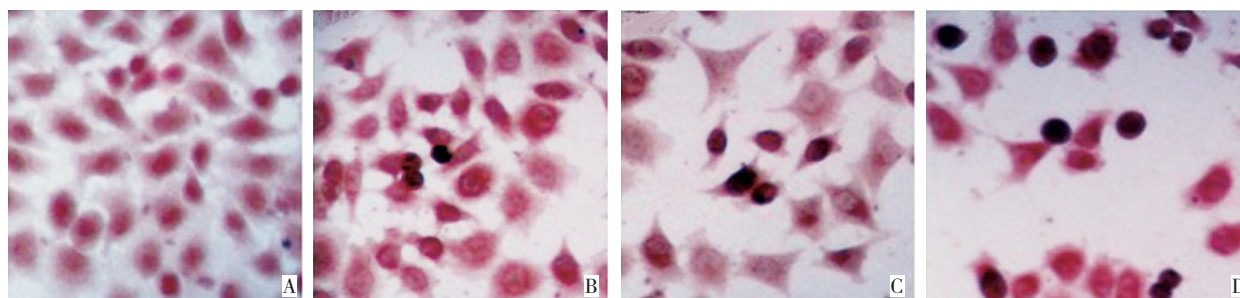
实验结果显示阴性对照组细胞呈多边形,染色质呈颗粒状,蓝色淡染,经复方苦参注射液处理后的MGC803细胞明显变小,染色质呈团块状、边聚核固缩被染成棕褐色呈凋亡的形态改变(图2)。结果显示对照组细胞凋亡率为 $(2.73\pm 0.39)\%$,1、2、4 mg/mL 复方苦参注射液处理24 h后细胞凋亡率分别为 $(8.25\pm 0.98)\%$ 、 $(19.27\pm 0.68)\%$ 、 $(36.48\pm 0.91)\%$,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 各实验组细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达情况

Western blot法分析检测各组实验细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达情况,复方苦参注射液3个浓度处理组Bcl-2蛋白表达明显下降、Bax蛋白表达

均有所增强, Bcl-2/Bax 明显下降, 处理组中 Caspase-3 原蛋白条带变细并且可见到蛋白裂解产物, 表

明复方苦参注射液能促进 Pro-caspase-3 的活化(图 3), 其差异有统计学意义($P<0.05$)。



A: 阴性对照组; B: 1 mg/mL 处理组; C: 2 mg/mL 处理组; D: 4 mg/mL 处理组

图2 TUNEL法检测不同浓度复方苦参注射液处理MGC803细胞24 h后细胞凋亡情况($\times 400$)

Figure 2 The number of apoptotic MGC803 cells in cells treated with different concentrations of matrine injections were observed by TUNEL assay at 24h (magnification $\times 400$)

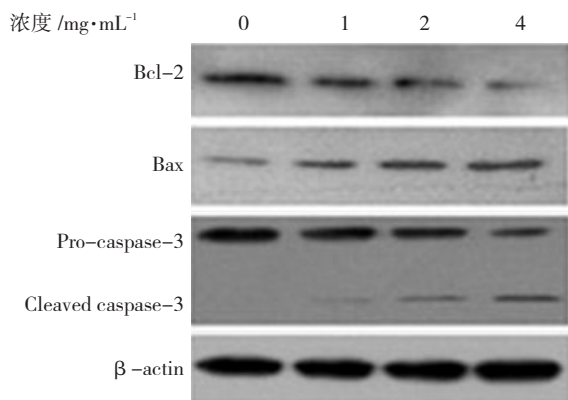


图3 不同浓度复方苦参注射液对MGC803细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白的影响

Figure 3 The expression level of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in cells treated with different concentrations of matrine injections were observed by Western blot assay

3 讨论

复方苦参注射液又称岩舒注射液, 系以苦参碱、氧化苦参碱、白茯苓等多种生物碱为主的多味中草药经现代技术加工制成。具有保护机体免疫系统、防治化疗不良反应、治疗恶性胸腔积液、缓解肿瘤患者疼痛、提高肿瘤患者生存质量等多种临床用途^[2]。

研究表明, 细胞增殖过盛和凋亡抑制被认为是肿瘤发生、发展的关键。目前临床上发现应用很多的抗肿瘤药物均可诱导肿瘤细胞凋亡, 诱导凋亡是其抗肿瘤的重要机制^[3-7]。肿瘤细胞对化疗药物产生的耐药性是影响化疗效果的重要原因之一, 许多学者把研究方向转向中药, 试图寻找高效低毒多靶点的中药制剂。近年来, 研究发现复方苦参注射液能诱导实体肿瘤凋亡而倍受关注^[8]。

细胞凋亡的启动、发展过程中, 有多种蛋白质、

癌基因和抑癌基因参与, 调控机制十分复杂, 其中 Bcl-2 家族在细胞凋亡中起着重要的作用。Bcl-2 是抑制凋亡基因, 属于癌基因家族成员, 被看作是细胞凋亡调控的最后通路之一。通过多种途径抑制凋亡的发生: 可抑制细胞色素 C 的释放, 还可释放死亡促进因子(DPF), 阻止凋亡刺激所引发的 DNA 损伤后激活凋亡机制的信号到达其靶位, 从而中断凋亡感应子和效应子阶段的联系, 阻止细胞凋亡^[9]。同属一个家族的 Bax 基因与 Bcl-2 基因相反^[10], 当凋亡刺激因素存在时, 线粒体膜上的 Bax 表达增高, 活化 Caspase-9, 进而活化 Caspase-3, 从而引起细胞凋亡。本研究结果显示, 经 1~4 mg/mL 的复方苦参注射液作用 24 h 后, 人胃癌细胞株 MGC803 中 Bcl-2 蛋白明显减低, Bax 蛋白表达明显升高, Bcl-2/Bax 明显下降, 且同复方苦参注射液作用后细胞凋亡率呈负相关。因此, 提示复方苦参注射液可减少 Bcl-2 蛋白的表达, 提高增加 Bax 蛋白的表达, 降低 Bcl-2/Bax, 这可能是其诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一。

在细胞凋亡中存在着不同的死亡信号传导途径^[11], 而 Caspase-3 则可能是细胞凋亡下游的关键执行者。有研究表明, 细胞凋亡的某些特征性标志, 如染色体凝聚和 DNA 片段化等, 均与 Caspase-3 有着直接的关系^[12]。Bcl-2 不仅抑制 Caspase-3 的活化, 还可能参与抑制 Caspase-3 的合成; 另一方面, Bcl-2 不仅作用于 Caspase-3 的上游, 还是 Caspase-3 的直接底物。本实验用 Western blot 法分析了各组细胞中 Caspase-3 蛋白表达情况并显示: 复方苦参注射液浓度 1~4 mg/mL 处理组与胃癌细胞组相比, Caspase-3 酶原蛋白条带逐渐变细并且可见到蛋白裂解产物(cleaved caspase-3)逐渐增多, 表明复方苦参注射液能促进 Caspase-3 酶原蛋白 Pro-caspase-3 的活化。

综上所述,复方苦参注射液可抑制人胃癌细胞的生长并能诱导凋亡,其作用机制可能与下调 Bcl-2/Bax 的比值、促使 Caspase-3 的活化相关。越来越多的实验资料揭示复方苦参注射液在肿瘤治疗和预防上有良好的前景,这必将对今后肿瘤的基础研究及临床治疗产生重大的影响。因复方苦参制剂中含有大量生物碱及黄酮类物质,且中药在体内亦可诱导多种细胞因子,因此探讨复方苦参制剂中的诱导细胞凋亡成分有待进一步研究。凋亡与细胞周期的调控是一个非常复杂的过程,受到多种细胞因子和肿瘤相关基因的控制,这需要进一步在肿瘤细胞的分子及基因水平进行研究以便真正能够将苦参开发成为一种新型的高效低毒的抗肿瘤药物,为人类攻克肿瘤这一顽症作出贡献。

参考文献

- 1 陈南江,李 杭,谭师生.复方苦参注射液联合紫杉醇治疗老年晚期非小细胞肺癌临床观察[J].上海中医药杂志,2006,40(9):22-23.
- 2 徐迎春.复方苦参注射液治疗肿瘤的临床研究概况[J].现代中西医结合杂志,2005,14(17):2352-2353.
- 3 马向涛,余力伟,王 杉,等.趋化因子受体 CXCR4/CXCL12 信号转导通路与胃癌淋巴结转移关系的研究[J].中国肿瘤临床,2007,34(10):544-549.
- 4 Gongora C, Candeil L, Vezzio N, et al. Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(6):

822-832.

- 5 Salman H, Bergman M, Djaldetti M, et al. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines[J]. Biomed Pharmacother, 2007, 61(6): 366-369.
- 6 王承党,刘 霞,陈滢珊.胃癌细胞株 SGC-7901 生长抑素 2 型受体表达和外源性生长抑素类似物的影响[J].中国肿瘤临床,2008,35(2): 109-112.
- 7 Shafae Z, Schmidt H, Du W, et al. Cyclopamine increases the cytotoxic effects of paclitaxel and radiation but not cisplatin and gemcitabine in Hedgehog expressing pancreatic cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 58(6): 765-770.
- 8 司维柯,高利宏,刘 斌,等.苦参碱诱导人肝癌细胞分化、凋亡时对 G1 细胞周期调节因子的调控[J].癌症,2001,20(8):848-851.
- 9 Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(1): 63-67.
- 10 Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid,Bax,and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. Cell, 2002, 111(3): 331-342.
- 11 邓立力,邓洪滨,吕慧芳,等.STAT3 和 p38 在胃癌组织中的表达及意义[J].中国肿瘤临床,2008,35(4):202-205.
- 12 Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.

(2011-03-11 收稿)

(2011-05-24 修回)

(杨红欣校对)

(上接第 937 页)

以及侵袭运动能力等恶性表型方面的变化。研究结果显示利用腺病毒 M4 沉默卵巢癌细胞系 OV2008 中的 Stat3 后,OV2008 的增殖能力以及侵袭运动能力明显降低,本研究还发现沉默 Stat3 后能明显促进 OV2008 细胞的凋亡。以上研究结果表明,沉默 Stat3 能降低卵巢癌细胞系 OV2008 的恶性表型,预示 Stat3 可作为卵巢癌基因治疗的一个新的分子靶点。

参考文献

- 1 Min H, Weihong Z. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in epithelial ovarian carcinoma[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2009, 35(5): 918-925.
- 2 Costantino L, Barlocco D. STAT3 as a target for cancer drug discovery[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(9): 834-843.
- 3 Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 1630-1635.
- 4 Devarajan E, Huang S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases[J]. Curr Mol Med, 2009, 9(5): 626-633.
- 5 Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4: 97-105.

- 6 Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STATs as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors[J]. Cell Res, 2008, 18(2): 254-267.
- 7 张真发,马建群,孙 楠,等.非小细胞肺癌中 STAT3 与 MAPK 的表达及临床意义[J].中国肿瘤临床,2004,31(20):1167-1170.
- 8 Rosen DG, Mercado-Urbe I, Yang G, et al. The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis[J]. Cancer, 2006, 107(11): 2730-2740.
- 9 贾文娟. STAT3、cyclin D1 在妇科肿瘤中的研究进展[J].蚌埠医学院学报,2009,34(2):182-185.
- 10 Huang M, Page C, Reynolds RK, et al. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells[J]. Gynecol Oncol, 2000, 79(1): 67-73.
- 11 Silver DL, Naora H, Liu J, et al. Activated signal transducer and activator of transcription(STAT)3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3550-3558.

(2010-12-30 收稿)

(2011-05-19 修回)

(张侃校对)