

论著 · 实验研究

苦参碱对人横纹肌肉瘤 RD 细胞增殖和凋亡的影响

郭雷 薛天阳 许伟 高吉照

(徐州医学院附属医院儿科,江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 探讨苦参碱(matrine, Mat)对体外人横纹肌肉瘤 RD 细胞增殖和凋亡的影响,以及 Mat 诱导 RD 细胞凋亡的相关机制。**方法** 采用 MTT 比色法检测终浓度为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL Mat 对 RD 细胞的增殖抑制率;流式细胞术检测上述 4 种不同浓度 Mat 对 RD 细胞的凋亡作用;RT-PCR 法检测终浓度为 0.5、1.0 和 1.5 mg/mL Mat 对 RD 细胞 Cyclin D1 及 Survivin mRNA 表达的影响。**结果** 各浓度实验组 RD 细胞的增殖抑制率和凋亡率均高于未经 Mat 处理的对照组(均 $P < 0.01$),且随着药物浓度增加,细胞增殖抑制率逐渐增高,呈剂量依赖性。RT-PCR 检测 Cyclin D1 及 Survivin mRNA 在各组 RD 细胞中均有表达,两者的表达水平在各浓度处理组中与对照组相比均有明显下降($P < 0.01$)。其中 Cyclin D1 在各浓度组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 Survivin 仅在 0.5 mg/mL 和 1.5 mg/mL 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Mat 能明显抑制 RD 细胞的增殖,并诱导其凋亡;其抗肿瘤机制可能与下调 Survivin 和 Cyclin D1 mRNA 的表达有关。 [中国当代儿科杂志,2012,14(10):780-784]

[关键词] 苦参碱;横纹肌肉瘤;Survivin;Cyclin D1;横纹肌肉瘤 RD 细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)10-0780-05

Effects of matrine on the proliferation and apoptosis of human rhabdomyosarcoma RD cells

GUO Lei, XUE Tian-Yang, XU Wei, GAO Ji-Zhao. Department of Pediatrics, The Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Xue T-Y, Email: xuety2006@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of matrine on the proliferation and apoptosis of human rhabdomyosarcoma RD cells *in vitro*, and to explore the mechanism of matrine inducing apoptosis of RD cells. **Methods** MTT assay was used to measure the proliferation inhibition rates of RD cells that were treated with matrine (final concentrations = 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/mL). Flow cytometry was used to evaluate the apoptosis of RD cells treated with the four concentrations of matrine. RT-PCR was used to measure the mRNA expression of cyclin D1 and survivin in RD cells treated with 0.5, 1.0, and 1.5 mg/mL of matrine. **Results** The RD cells treated with various concentrations of matrine showed significantly higher proliferation inhibition rates and apoptotic rates than those that were not treated with matrine ($P < 0.01$), and with increased matrine concentration, the proliferation inhibition rate of RD cells increased gradually, thus exhibiting a dose dependence. The mRNA expression of cyclin D1 and survivin was seen in all RD cells, but was significantly lower in RD cells treated with matrine than in those that were not treated with matrine ($P < 0.01$). There were significant differences in cyclin D1 mRNA level among the RD cells treated with 0.5, 1.0, and 1.5 mg/mL of matrine ($P < 0.05$), while there was significant difference in survivin mRNA level between the RD cells treated with 0.5 and 1.5 mg/mL of matrine ($P < 0.05$). **Conclusions** Matrine can significantly inhibit proliferation and induce apoptosis of RD cells, which may be related to downregulating the mRNA expression of cyclin D1 and survivin.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):780-784]

Key words: Matrine; Rhabdomyosarcoma; Survivin; Cyclin D1; Rhabdomyosarcoma RD cell

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是儿童期最常见的一种软组织肉瘤,约占所有软组织肿瘤的50%,它来源于原始间充质细胞,可发生在身体任何部位,临床表现呈现多样化^[1]。目前多采用手术联合放化疗的综合疗法,手术虽可切除肉眼可见的肿瘤,但不能切除转移的微小病灶;放化疗在杀伤

[收稿日期]2012-04-13;[修回日期]2012-05-10
[作者简介]郭雷,男,硕士,住院医师。
[通信作者]薛天阳,主任医师。

肿瘤细胞的同时,又会无选择地杀伤正常细胞。因此寻找高效低毒的抗肿瘤药物成为治疗 RMS 的迫切问题。苦参碱(matrine, Mat)具有较广的抗癌谱,对多种肿瘤细胞株具有抗癌活性,并且具有疗效好、副作用小、药源丰富等优点,成为近年来研究的热点。但 Mat 对 RMS 的作用报道较少。本实验以体外培养的人 RD 细胞为研究对象,观察 Mat 对 RD 细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其相应作用机制,为临床应用 Mat 治疗 RMS 提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人横纹肌肉瘤 RD 细胞株购自上海中科院细胞库;Mat(纯度≥98%)购自陕西中鑫生物科技有限公司;RPMI 1640 培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)和 Trizol 等试剂购自 Sigma 公司;细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛公司;总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 两步法试剂盒、2×Taq PCR Master Mix、溴化乙锭(EB)等试剂购自北京天根生化科技有限公司;PCR 引物由艾博思生物工程技术服务有限公司合成;自动酶联检测仪(Bio-Rad 公司);FACS 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司);PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RD 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中(含 100 μ/mL 青霉素和 100 μ/mL 链霉素,pH 值 7.2~7.4),于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中传代培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 实验组:细胞贴壁后,分别加入 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL Mat 处理 48 h,每亚组 5 个复孔;空白组:含等量培养基及溶剂,无细胞;对照组:含等量细胞及培养基,无药物。实验重复 3 次。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期的细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10⁵/mL;将细胞接种于 96 孔板,每孔 150 μL,贴壁后各实验亚组分别加入终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL Mat 继续培养 48 h;各孔加入 20 μL 5% MTT 工作液,继续置于培养箱培养 4 h;吸去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 后在 1 h 内于 570 nm 波长处应用酶标仪检测各孔吸光度值(A 值),并计算细胞增

殖抑制率(inhibition rate, IR)(%)=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值×100%。

1.2.4 流式细胞仪术检测 RD 细胞凋亡率 收集对数生长期的细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10⁶/mL;将细胞接种于 6 孔板,每孔 2 mL,贴壁后各实验亚组分别加入终浓度为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL Mat 处理 48 h 后收获细胞,PBS 洗两遍,1000 rpm 离心 5 min,加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞,再加 5 μL Annexin-V-FITC 混匀后,加入 5 μL PI,室温、避光、染色 15 min 后,1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.5 RT-PCR 法检测各组细胞中 Cyclin D1 及 Survivin mRNA 的表达水平 每瓶细胞接种浓度为 1×10⁷/mL,贴壁后各试验亚组经终浓度为 0.5、1.0 和 1.5 mg/mL Mat 处理 48 h 后离心收集细胞,Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA;总体积 20 μL,常规随机引物法合成 cDNA,引物及内参 β-actin 序列见表 1。PCR 反应体系共 25 μL,包括 ddH₂O 12.5 μL、上、下游引物 各 1 μL、cDNA 2 μL 和 Taq 聚合酶 8.5 μL。反应条件为 94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,Survivin、Cyclin D1 及 β-actin 退火温度见表 1,退火时间 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,利用电脑成像统计电泳后泳带密度,以目的基因与 β-actin 扩增产物的灰度值比值表示基因表达水平。

表 1 Survivin、Cyclin D1 及内参 β-actin 的序列

基因	片段长度 (bp)	序列(5'→3')	温度(℃)
Survivin	350	上游: GGACCACCGCATCTCTACAT 下游: GCACCTTCTTCGCACTTTCC	54
Cyclin D1	245	上游: GGAGCTGCTCCTGCTGAACA 下游: TGTGGGGCTCCTCAGGTTCA	59
β-actin	130	上游: CGAAACTACCTTCAACTCCATC 下游: AGTGATCTCCTTCTGCATCCT	54

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mat 对 RD 细胞的增殖抑制作用

MTT 法测得各浓度实验组 RD 细胞的增殖抑制

率均高于对照组 ($F = 38.15, P < 0.01$), 且随着药物浓度增加, 细胞增殖抑制率逐渐增高, 呈剂量依赖性。见图 1。

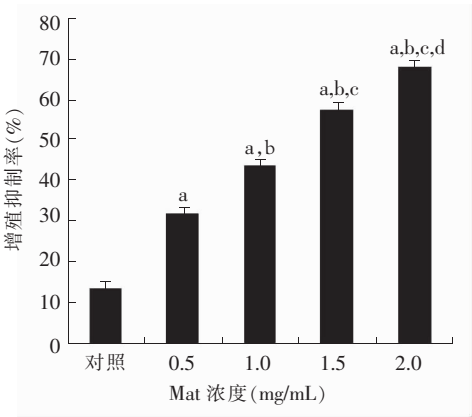


图 1 Mat 对 RD 细胞增殖的影响 ($n = 3$) a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 0.5 mg/mL 组比较, $P < 0.05$; c: 与 1.0 mg/mL 组比较, $P < 0.05$; d: 与 1.5 mg/mL 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 Mat 对 RD 细胞的诱导凋亡作用

流式细胞术检测各浓度 Mat 处理组 RD 细胞的凋亡率均高于对照组 ($F = 50.99, P < 0.01$), 且随着药物浓度增加, 细胞凋亡率逐渐增高, 呈剂量依赖性。见图 2 ~ 3。

2.3 Mat 对 RD 细胞 Cyclin D1 及 Survivin mRNA 表达的影响

RT-PCR 电泳结果显示, Survivin 及 Cyclin D1 mRNA 在各浓度 Mat 处理组 RD 细胞均有表达, 但随着药物浓度的增加电泳条带灰度逐渐降低 (图 4)。对照组中 Survivin 灰度值 (0.38 ± 0.03) 均高于 0.5、1.0、1.5 mg/mL 实验组 (分别为 0.23 ± 0.03 、 0.20 ± 0.05 和 0.09 ± 0.01 , $F = 70.56, P < 0.01$), 组间两两比较, Survivin 灰度值仅在 0.5 与 1.5 mg/mL 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组中 Cyclin D1 灰度值 (0.59 ± 0.06) 亦高于 0.5、1.0、1.5 mg/mL 实验组 (分别为 0.35 ± 0.05 、 0.27 ± 0.02 、 0.05 ± 0.01 , $F = 96.24, P < 0.01$), 且各浓度组间 Cyclin D1 灰度值比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

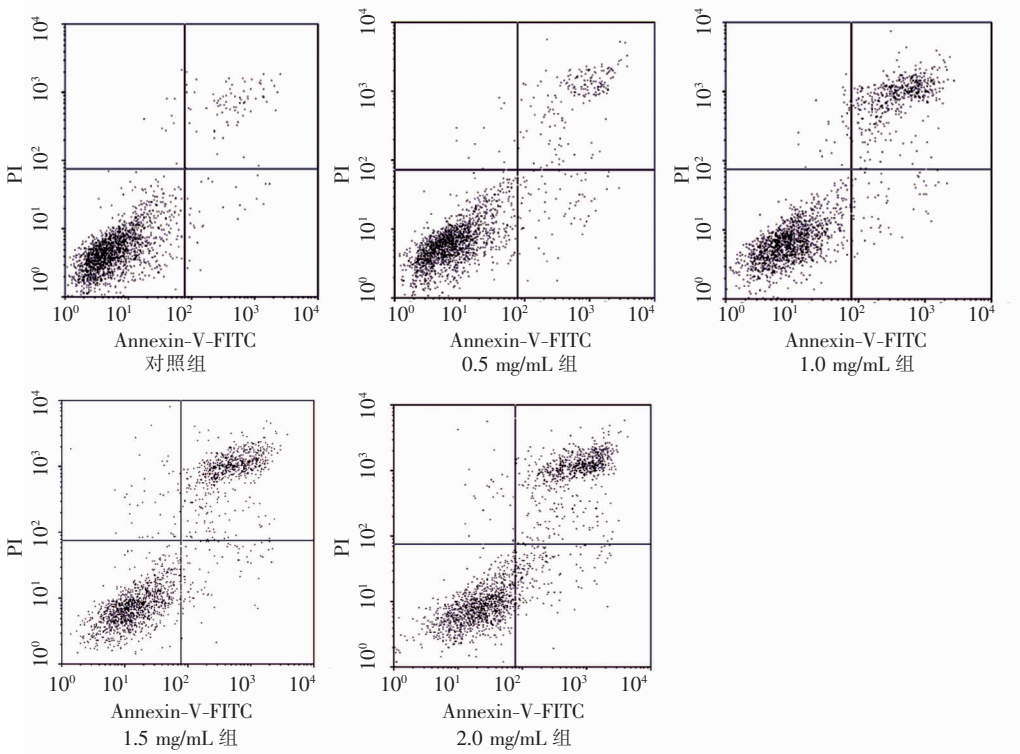


图 2 各组流式细胞术检测结果 采用 Annexin-V-FITC/PI 双标染色, 左下象限为活细胞, 右下象限为早期凋亡细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞, 左上象限为坏死细胞, 可见各浓度 Mat 处理组细胞凋亡率均高于对照组, 且呈剂量依赖性。

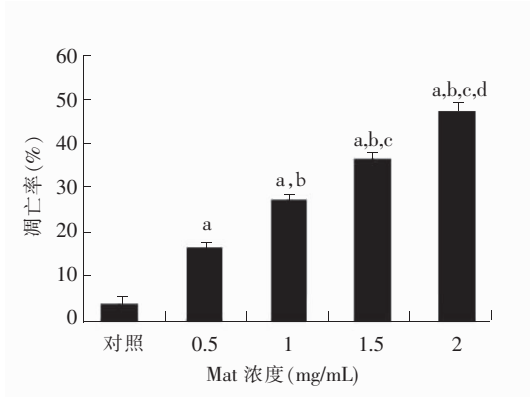


图3 Mat对RD细胞凋亡的影响($n=3$) a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与0.5 mg/mL组比较, $P<0.05$;c:与1.0 mg/mL组比较, $P<0.05$;d:与1.5 mg/mL组比较, $P<0.05$ 。

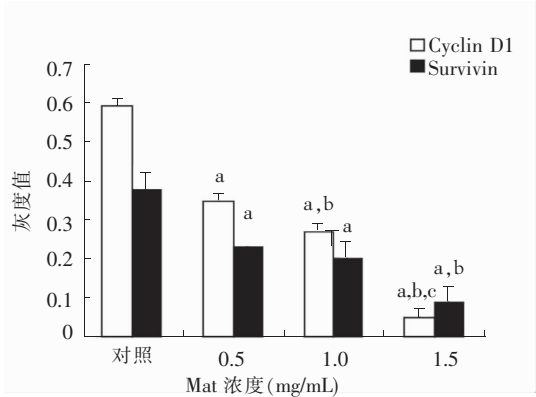


图5 各组细胞Cyclin D1及Survivin mRNA的表达情况($n=3$) a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与0.5 mg/mL组比较, $P<0.05$;c:与1.0 mg/mL组比较, $P<0.05$ 。

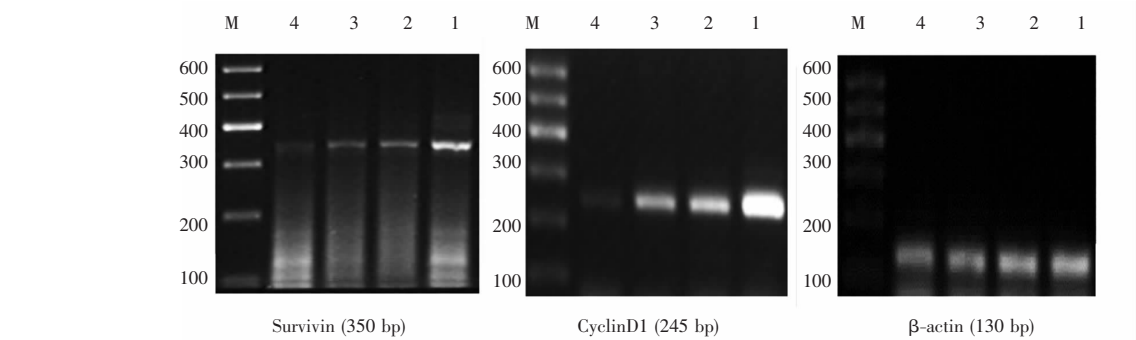


图4 各组细胞Cyclin D1及Survivin mRNA表达电泳图 M:Marker; 1:对照组;2:0.5 mg/mL组;3:1.0 mg/mL组; 4:1.5 mg/mL组。

3 讨论

Mat是从中药苦参的干燥根中提取的一类四环喹啉类生物碱,其分子式为 $C_{15}H_{24}N_{20}$ 。现代药理研究表明Mat具有广泛的药理作用,如抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、抗心律失常等^[2]。近年来,Mat的抗肿瘤作用受到极大关注和研究。体外研究显示,Mat对多种肿瘤细胞(包括白血病、肝癌、肺癌、胃癌、神经母细胞瘤等)具有抗癌作用,其抗肿瘤机制包括抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞分化和凋亡,逆转肿瘤细胞耐药性等^[3-6]。但Mat对RD细胞的作用及机制鲜有报道。

本实验应用0.5、1.0、1.5和2.0 mg/mL浓度Mat作用于体外培养的RD细胞48 h后,MTT结果显示不同浓度Mat对RD细胞增殖均有明显抑制作用($P<0.01$),且这种抑制作用呈剂量依赖性;流式细胞术结果显示不同浓度实验组细胞凋亡率均高于对照组($P<0.01$),且随药物浓度的增加而升高,提示Mat能诱导RD细胞凋亡,并且诱导细胞凋亡作用与药物浓度呈正相关。

细胞增殖和凋亡是细胞生物学行为的两个方面,两者间动态平衡是维持机体稳态的一个重要方式,两种过程都受到精细的调节。肿瘤的发生即为两者失衡所致,且与促凋亡相关基因表达减弱和/或抗凋亡相关基因表达增强有关^[7]。Mat调节肿瘤细胞中某些凋亡基因表达水平可能是其抗肿瘤机制之一。Cyclin D1是细胞周期调节的正性调控因子,其含量及活化程度在细胞增殖周期节点G1/S转换过程中起限速作用,其过度表达可导致细胞周期调控异常,从而发生肿瘤^[8-9]。Survivin是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,是迄今发现最强的凋亡抑制因子,其选择性表达于多种常见的恶性肿瘤,而在癌旁正常组织和成人正常组织中不表达,在肿瘤细胞凋亡调控中起重要作用^[10-11]。Shin等^[12]发现Survivin主要通过间接或直接抑制caspase-3和caspase-7的活性而发挥抗凋亡作用。

Cyclin D1和Survivin在肿瘤中的研究比较广泛,但在RMS中报道较少。本实验采用RT-PCR方法检测其在RD细胞中的表达,结果显示Cyclin D1和Survivin mRNA在RD细胞中均有表达,经0.5、

1.0 和 1.5 mg/mL 浓度 Mat 作用后,两者的表达水平与对照组相比均有明显下降($P < 0.01$)。其中 Cyclin D1 在各浓度组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 Survivin 仅在 0.5 mg/mL 和 1.5 mg/mL 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。当 Mat 浓度达 2.0 mg/mL 时,RD 细胞中未检测到 Cyclin D1 和 Survivin mRNA 表达,分析原因可能为 2.0 mg/mL 浓度的 Mat 抗 RD 细胞作用强,诱导细胞凋亡。

综上所述,Mat 能明显抑制 RD 细胞增殖,并可诱导其凋亡,其机制可能与下调 Cyclin D1 和 Survivin 的表达有关,为临床上应用 Mat 治疗 RMS 提供了一定的理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States 1975-2005[J]. Cancer, 2009, 115(18): 4218-4226.

[2] Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection; a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(3): 538-544.

[3] Chen K, Hu Z, Wang T, Guo H, Ye Z. Inhibitory effect of matrine on the expression of PSA and AR in prostate cancer cell line LNCaP[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(6): 697-699.

[4] Liu XY, Fang H, Yang ZG, Wang XY, Ruan LM, Fang DR, et al. Matrine inhibits invasiveness and metastasis of human malignant melanoma cell line A375 in vitro[J]. Int J Dermatol, 2008, 47(5): 448-456.

[5] 冯晨,唐锁勤,王建文,龙卉,杨光. 苦参碱抑制神经母细胞瘤 LA-N-5 细胞增殖及 MYCN 基因 mRNA 的表达[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(2):225-227.

[6] Li HJ, Xia HB. Regulation of tumor angiogenesis and tumor therapy[J]. J Mod Oncol, 2008, 16(7): 1245-1248.

[7] Donskow-Schmelter K, Doligalska M. Apoptosis, a protective mechanism for pathogens and their hosts[J]. Wiad Parazytol, 2005, 51(4):271-280.

[8] Udhayakumar G, Jayanthi V, Devaraj N, Devaraj H. Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in H. pylori-induced gastric cancer[J]. Mol Carcinog, 2007, 46(9): 807-817.

[9] Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M, Sasiadek MM. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue[J]. J Laryngol Otol, 2004, 118(9): 676-680.

[10] Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks[J]. Cell Cycle, 2009, 8(17): 2708-2710.

[11] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(7): 553-562.

[12] Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase -3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.

(本文编辑:万静)

· 消息 ·

《儿科药科学杂志》2013 年征订启事

《儿科药科学杂志》由重庆医科大学儿童医院与中国药学会儿科药学专业组主办的目前我国儿科药科学领域唯一的专业性学术刊物。国际标准连续出版物号:ISSN 1672 - 108X,国内统一连续出版物号:CN 50 - 1156/R。《儿科药科学杂志》是中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊,儿科学类核心期刊,被国内主要的文献数据库全文收藏,被美国化学文摘(CA)收录。

辟有专家论坛、论著(基础研究、儿科临床药理、儿科药物治疗学、儿科临床药理学、儿科药物制剂与分析)、临床(药事)管理与规范、综述、经验交流、编者·作者·读者等栏目。《儿科药科学杂志》是指导我国儿科药物研究和临床合理用药,提高儿科临床药物治疗水平的重要的科技期刊。以全国儿童(科)医院、妇幼保健院(所、站)、综合医院儿科的医学、药学工作者及基层医务人员,全国从事儿童药品研究、开发、生产、流通的相关人员及医药院校师生、药事管理人员等为主要读者对象。

本刊为月刊,大 16 开 64 页,铜版纸精美印刷,每月 10 日出版,每册定价 9.00 元,全年 108.00 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:78 - 133。未及时订阅者,可直接向编辑部订购。编辑部地址:重庆市渝中区中山二路 136 号重庆医科大学儿童医院内《儿科药科学杂志》编辑部,邮编:400014,电话:(023)63633143;传真:023 - 63626877;E - mail:ymjd2003@163.com。儿科药科学杂志投稿网址:http://www.ekyzx.com。欢迎订阅和投稿!