

· 实验研究 ·

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

冯晨,唐锁勤,王建文,龙卉,杨光

(中国人民解放军总医院小儿内科,北京 100853)

[摘要] 目的 神经母细胞瘤是4岁以下儿童最常见的恶性实体肿瘤,MYCN基因的高表达导致预后更加恶劣。苦参碱作为中药苦参的重要成分对多种肿瘤有治疗作用,该实验拟应用苦参碱作用神经母细胞瘤细胞(LA-N-5),对肿瘤细胞增殖及MYCN基因mRNA表达受抑制情况进行初步研究,希望可以为神经母细胞瘤的治疗开拓新的思路。方法 以终浓度为0.25 mg/mL,0.50 mg/mL,0.75 mg/mL,1.00 mg/mL苦参碱作用神经母细胞瘤LA-N-5细胞,MTT法检测LA-N-5细胞增殖情况变化,采用SYBR绿色荧光染料I的实时荧光定量RT-PCR检测MYCN基因mRNA表达受抑制情况。结果 苦参碱对LA-N-5细胞增殖的抑制呈明显的剂量、时间依赖性,随剂量的增加,作用时间的延长,抑制效果逐渐加强。1.00 mg/mL作用72 h后肿瘤细胞增殖抑制效率达36.3%,单细胞MYCN基因mRNA表达 9.7 ± 0.35 拷贝,抑制效率达44.6%。结论 应用苦参碱在体外环境作用LA-N-5细胞,可以有效抑制该细胞的增殖、原癌基因MYCN mRNA的表达,为临床上神经母细胞瘤的治疗开拓了新的思路。

[中国当代儿科杂志,2008,10(2):225-227]

[关键词] 苦参碱;神经母细胞瘤;MYCN;荧光定量RT-PCR;细胞株

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0225-03

Matrine inhibits the proliferation of neuroblastoma LA-N-5 cell and MYCN mRNA expression

FENG Chen, TANG Suo-Qin, WANG Jian-Wen, LONG Hui, YANG Guang. Department of Pediatrics, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China (Tang S-Q, Email: suoqin@yahoo.com)

Abstract: Objective Neuroblastoma is the most common malignant solid tumor in children under 4 years. Amplification of MYCN oncogene is associated with advanced-stage disease, rapid tumor progression, resistance to treatment, and poor outcome. Matrine has the anti-tumor activity. This study was designed to investigate the effects of matrine on LA-N-5 cell line proliferation and MYCN gene mRNA expression. **Methods** Neuroblastoma LA-N-5 cells were treated by 0.25, 0.50, 0.75 or 1.00 mg/mL matrine. MTT was used to measure the levels of the proliferation of LA-N-5 cells cultured with different concentrations of matrine. MYCN gene mRNA expression in LA-N-5 cells was measured using real time RT-PCR with SYBR GREEN I fluorescence. **Results** The proliferation of LA-N-5 cells was obviously inhibited by matrine in a dose- and time-dependent manner. Matrine of 1.00 mg/mL treatment for 72 hrs produced a best effect, with an inhibitory rate of LA-N-5 cell proliferation of 36.3% and an inhibitory rate of MYCN gene mRNA expression of 44.6%. **Conclusions** Matrine may inhibit the growth of neuroblastoma cells and down-regulate MYCN mRNA expression. It may be promising as a new drug for treatment of neuroblastoma. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):225-227]

Key words: Matrine; Neuroblastoma; MYCN; Quantitative RT-PCR; Cell line

苦参碱作为临床上常用的抗肿瘤中药苦参的重要成分,其临床应用越来越引起人们的关注,新近的研究也证实苦参碱对实体肿瘤细胞增殖有较好的体外、体内抑制效果^[1]。神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是起源于神经嵴细胞的恶性肿瘤,发病率在儿童恶性肿瘤中位居第4位^[2]。该肿瘤恶性程度高,晚期病例虽经强烈化疗、放疗及生物治疗4年无

病生存率也仅29.2%^[3]。大量研究显示在决定预后的因素中MYCN基因占据重要地位,MYCN基因超量表达时,预后不良;反之,MYCN基因一般表达时预后较好^[4]。探索新的药物治疗神经母细胞瘤,尤其是抑制神经母细胞瘤患儿MYCN基因高表达是该病治疗的热点问题之一。针对神经母细胞瘤细胞LA-N-5超量表达MYCN基因mRNA的特点^[5],

[收稿日期]2007-08-07;[修回日期]2007-08-30

[作者简介]冯晨,男,硕士,主治医师。主攻方向:儿童血液、肿瘤疾病。

[通讯作者]唐锁勤,教授,解放军总医院小儿内科,邮编:100853。

本实验拟应用苦参碱作用体外培养的 LA-N-5 细胞,观察其对 LA-N-5 细胞增殖以及 *MYCN* 基因 mRNA 表达的抑制效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 由美国洛杉矶儿童医院 Stuart Elliott Siegel 教授惠赠。采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养、传代。实验用对数生长期细胞,台盼蓝拒染率在 95% 以上。

1.1.2 主要试剂和仪器 苦参碱(山西振东金晶制药有限公司惠赠), MTT (Sigma 公司, 美国)、TRIZOL REAGENT (Life Technology 公司, 美国)、M-MLV 逆转录酶 (Life Technology 公司, 美国), PCR 试剂 (TaKaRa 公司, 日本), PCR 产物纯化柱 (Q-Bio gene 公司, 美国), SYBR GREEN I 染料 (Molecular Probes 公司, 美国), iCycler 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国), Multiskan MK3 型酶标仪 (上海雷勃分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 苦参碱对 LA-N-5 细胞增殖的抑制效果的检测 取对数生长期细胞悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 200 μL (含 1×10^4 细胞),置 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h 后吸净培养上清液,用 RPMI 1640 冲洗 1 次。实验组分别加入终浓度为 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1.00 mg/mL 的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配置的苦参碱溶液 200 μL,每检测时间点每组 5 个复孔;对照组仅加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 200 μL。37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。分别于加药后 24、48、72 h 后,每孔加入 0.22 μm 的微孔滤器除菌后的浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,孵育 4 h,小心吸弃孔内上清,加入 DMSO 200 μL/孔,充分震荡 10 min,在酶标仪上 490 nm 波长下测定各孔光吸收值。苦参碱对 LA-N-5 细胞的抑制率用 (A 对照组 - A 用药组) / A 对照组 × 100 % 表示。

1.2.2 苦参碱对 LA-N-5 细胞 *MYCN* 基因 mRNA 表达的抑制效果的检测 取对数生长期细胞悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,接种于 24 孔细胞培养板,每孔 500 μL (含 5×10^4 细胞),置 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h,吸净培养上清液,用 RPMI 1640 冲洗 1 次。实验组分别加入终浓度为

0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1.00 mg/mL 的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配置的苦参碱溶液 500 μL,每组 4 个复孔;对照组仅加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 500 μL。37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,于培养 72 h 后 TRIZol 提取每组各孔总 RNA,逆转录后备用。

采用 SYBR 绿色荧光染料 I 的实时荧光定量 RT-PCR 检测 *MYCN* 基因 mRNA, *MYCN* 基因上游引物 5'-CTCAGTACCTCCGGAGAG-3', 下游引物 5'-GGCATCGTTTGAGGATC-3'; GAPDH 基因上游引物 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 下游引物 5'-GGCATGGAC TGTGTCATGAG-3'。 *MYCN*、GAPDH 反应体系 (总体积 25 μL): 逆转录反应产物 1.0 μL; SYBR 绿色荧光染料 I 0.25 μL; 10 × PCR Buffer (含 MgCl₂ 25 mM) 2.5 μL; dNTP mixture (each 2.5 μmol/L) 1.5 μL; 上、下游引物各 0.5 μL; TaKaRa Taq (5 U/μL) 0.25 μL; 灭菌蒸馏水 18.5 μL。 *MYCN* 反应条件: 95℃ 45 s, 退火: 64℃ 45 s, 延伸: 72℃ 45 s, 检测荧光: 78℃ 5 s; 共 40 个循环, 循环结束后继续于 72℃ 延伸 10 min; GAPDH 反应条件: 变性: 95℃ 25 s, 退火: 58.5℃ 25 s, 延伸: 72℃ 20 s, 检测荧光: 78℃ 5 s; 共 40 个循环, 循环结束后继续于 72℃ 延伸 10 min。美国 Bio-Rad 公司 iCycler 荧光定量 PCR 仪定量标本, 单细胞 *MYCN* mRNA 表达水平用 *MYCN* copies/GAPDH copies 表示; 苦参碱对 LA-N-5 细胞 *MYCN* mRNA 表达的抑制率用 (单细胞 *MYCN* mRNA 对照组 - 单细胞 *MYCN* mRNA 用药组) / 单细胞 *MYCN* mRNA 对照组 × 100 % 表示。

1.2.3 统计分析 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS10.0 统计软件行方差分析检验, 重复 3 次独立实验, 检验水准以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 苦参碱对 LA-N-5 细胞增殖的抑制效果

苦参碱对 LA-N-5 细胞增殖的抑制效果有明显的剂量、时间依赖性, 随剂量的增加, 作用时间的延长, 抑制效果逐渐加强 (图 1)。苦参碱作用 72 h 后, LA-N-5 细胞增殖的受抑制情况, 0.25 mg/mL 组与对照组细胞增殖情况统计学上差异无显著性, 余各组和对照组细胞增殖情况统计学上差异显著 ($P < 0.05$); 同时 0.75 mg/mL, 1.00 mg/mL 组间比较统计学上差异无显著性, 最好抑制率达 36.3% (表 1)。

2.2 苦参碱对 LA-N-5 细胞 MYCN 基因 mRNA 表达的抑制效果

苦参碱作用 72 h 后, LA-N-5 细胞 MYCN 基因 mRNA 表达受抑制情况, 0.25 mg/mL 组 MYCN 基因 mRNA 未见明显的抑制效果, 当浓度提高到 0.75 mg/mL 以上时 MYCN 基因 mRNA 的表达明显降低, 当浓度达到 1.00 mg/mL 时, 单细胞 MYCN 基因 mRNA 仅 9.7 ± 0.35 , 与对照组相比, 抑制率达 44.6% (表 2)。

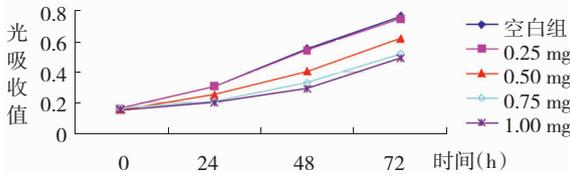


图 1 苦参碱作用下 LA-N-5 细胞的增殖情况

表 1 苦参碱作用 72 h LA-N-5 细胞增殖情况

组别	药物浓度 (mg/mL)	A490	抑制率 (%)
对照组	-	0.757 ± 0.012	-
苦参碱	0.25	0.743 ± 0.020	1.8
	0.50	0.611 ± 0.030^a	19.3
	0.75	0.511 ± 0.012^a	32.3
	1.00	0.482 ± 0.015^a	36.3

a: 与对照组比较, $P < 0.05$

表 2 苦参碱对 LA-N-5 细胞 MYCN 基因 mRNA 表达的抑制效果

组别	药物浓度 (mg/mL)	MYCN 基因 mRNA 表达水平	抑制率 (%)
对照组	-	17.5 ± 0.40	-
苦参碱	0.25	16.6 ± 0.48	5.14
	0.50	13.7 ± 0.46^a	21.7
	0.75	10.1 ± 0.35^a	42.3
	1.00	9.7 ± 0.35^a	44.6

a: 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

苦参碱是中药苦参的主要成分。新近大量的研究证实, 苦参碱具有较好的抗肿瘤作用, 并在结肠癌、肝癌、骨肉瘤等多种肿瘤中得到应用。其机制在于^[6]: ①抑制肿瘤细胞的增殖; ②诱导肿瘤细胞分化和促进肿瘤细胞凋亡; ③抗肿瘤细胞的粘附和浸润转移; ④抑制肿瘤细胞耐药。这些作用得益于其对肿瘤细胞端粒酶、细胞周期蛋白、CD44 等粘附因子的抑制。本实验证实苦参碱对神经母细胞瘤同样有较好的体外抑瘤作用, 细胞增殖抑制率达到 36.3%。

MYCN 基因位于 2 p23-24, 为 MYC 原癌基因家族的成员^[7]。MYC 原癌基因具有很强的致癌潜能, 它在许多组织细胞中表达, 但 MYCN 表达仅限于胚

胎发育中^[8]。在多种肿瘤遗传学的改变, 包括基因放大、染色体移位等产生 MYC 基因表达的失控。动物实验表明在小鼠 MYCN 基因纯合子去除导致胚胎死亡, 而转基因大鼠模型中过度表达 MYCN 导致肿瘤, 提示 MYCN 在胚胎和肿瘤发生发展中发挥重要作用。已有研究证实^[9]苦参碱可以抑制肿瘤细胞 c-myc, c-jun, H-ras, p21 等原癌基因的表达, 目前尚未有对 MYCN 基因抑制的研究。本实验证实苦参碱对神经母细胞瘤细胞 LA-N-5 细胞系 MYCN 基因 mRNA 的表达有 44.6% 的抑制作用, 其作用后 MYCN mRNA 表达的降低, 是对肿瘤细胞增殖抑制的分子基础之一。

本实验采用的细胞系 LA-N-5 是从人神经母细胞瘤骨髓转移细胞中分离得到的细胞株, 恶性度高^[10]。应用苦参碱在体外环境对该细胞系取得了较好的抑制效果, 为临床上神经母细胞瘤的治疗开拓了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 马玲娣, 张彦, 文世宏, 何於娟, 刘小珊, 康格非, 等. 苦参碱抗肿瘤作用及其机制的初步研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(5): 434-437.
- [2] Kravka JM, Li L, Bielawski J, Obeid LM, Ogretmen B. Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 419(2): 110-119.
- [3] 唐锁勤, 黄东生, 王建文, 冯晨, 杨光. 大剂量化疗造血干细胞移植治疗 VI 期神经母细胞瘤的长期疗效研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 93-96.
- [4] Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas [J]. N Engl J Med, 1985, 313(18): 1111-1116.
- [5] 冯晨, 唐锁勤, 王建文, 刘立真, 高晓宁, 龙卉. 荧光定量 RT-PCR 检测神经母细胞瘤细胞 MYCN 基因 mRNA 的表达 [J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(2): 47-50.
- [6] 周卫芬. 苦参生物碱抗肿瘤作用及机制研究的新进展 [J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(2): 15-18.
- [7] Mukherjee B, Morgenbesser SD, DePinho RA. Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutants [J]. Genes Dev, 1992, 6(8): 1480-1492.
- [8] Reynolds CP, Wang Y, Melton LJ, Einhorn PA, Slamon DJ, Maurer BJ. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide [J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 35(6): 597-602.
- [9] 何於娟, 蒋纪恺, 欧一衡, 刘北忠, 刘小珊, 张彦, 等. 苦参碱对 K562 细胞早期原癌基因表达的影响 [J]. 癌症, 2002, 21(4): 369-372.
- [10] Reynolds CP, Wang Y, Melton LJ, Einhorn PA, Slamon DJ, Maurer BJ. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide [J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 35(6): 597-602.

(本文编辑: 吉耕中)