

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.02.004

血液肿瘤专题 · 论著

苦参碱联合顺铂对人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞 PDCD4 表达的影响

毛玲 薛天阳 许伟

(徐州医学院附属医院儿科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] **目的** 探讨苦参碱对人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞存活及凋亡的影响, 及降低顺铂化疗耐药性的可能作用机制。**方法** 将 SK-NEP-1 细胞分为对照组、5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组、苦参碱组 (0.5、1.0 和 1.5 mg/mL)、苦参碱 (0.5、1.0 和 1.5 mg/mL) 联合 5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组。应用 MTT 比色法检测各组细胞存活率, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, RT-PCR 检测各组细胞的 PDCD4 mRNA 表达。**结果** 各实验组 SK-NEP-1 细胞的存活率均低于对照组 (均 $P<0.01$), 苦参碱组随药物浓度增加, 存活率逐渐降低, 苦参碱联合顺铂组与单药苦参碱组比较, 存活率均明显降低 (均 $P<0.01$)。各实验组 SK-NEP-1 细胞的凋亡率均高于对照组 (均 $P<0.05$), 苦参碱组随药物浓度增加, 凋亡率逐渐增高, 苦参碱联合顺铂组与单药苦参碱组比较, 凋亡率均明显增高 (均 $P<0.01$)。各实验组 PDCD4 mRNA 的表达水平均高于对照组 (均 $P<0.01$), 苦参碱联合顺铂组与单药苦参碱组及顺铂组比较, PDCD4 mRNA 表达均显著提高 (均 $P<0.01$)。**结论** 苦参碱可浓度依赖性地抑制 SK-NEP-1 细胞的增殖并诱导凋亡, 从而提高顺铂化疗的敏感性, 该作用可能与提高细胞内 PDCD4 mRNA 的表达有关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(2): 115-119]

[关键词] 人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞; 苦参碱; 顺铂; 程序性细胞死亡 4; 儿童

Effect of matrine and cisplatin in combination on PDCD4 expression in SK-NEP-1 cells

MAO Ling, XUE Tian-Yang, XU Wei. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Xue T-Y, Email: xuety2006@163.com)

Abstract: Objective Matrine, a major ingredient of sophora, has an anti-tumor activity, capable of suppressing the proliferation and metastasis and promoting apoptosis or differentiation of tumor cells. This study was designed to investigate the effects of matrine on survival and apoptosis of nephroblastoma cell line SK-NEP-1, reduction of drug-resistance of cisplatin and the mechanism(s) underlying these effects. **Methods** SK-NEP-1 cells were treated with matrine and cisplatin at various doses (0.5, 1.0 and 1.5 mg/mL), either each alone or in combination. The viability in treated SK-NEP-1 cells was assessed by MTT colorimetric assay, apoptosis by flow cytometry, and PDCD4 mRNA abundance by RT-PCR. **Results** As compared with the non-treatment control, matrine and cisplatin, regardless of combination and dosage, significantly reduced the viability ($P<0.01$), induced apoptosis ($P<0.01$), and increased PDCD4 mRNA abundance ($P<0.01$), in SK-NEP-1 cells. The above effects of matrine and cisplatin were dose-dependent when they were used alone, and were more pronounced when they were used in combination ($P<0.05$). **Conclusions** Matrine can significantly induce apoptosis and inhibit growth of SK-NEP-1 cells in a dose-dependent manner, thus increasing the chemotherapeutic sensibility of cisplatin. The observed effects of matrine may be a result of increased PDCD4 expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(2): 115-119]

Key words: SK-NEP-1 cell; Matrine; Cisplatin; Programmed cell death 4; Child

[收稿日期] 2013-08-08; [接受日期] 2013-12-12

[作者简介] 毛玲, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 薛天阳, 男, 主任医师。

肾母细胞瘤 (Wilms' tumor, WT) 是小儿最常见的肾脏恶性肿瘤, 占儿童恶性肿瘤的 6%~7%, 大约 75% 患儿发病年龄小于 5 岁, 平均发病年龄 3.5 岁^[1]。虽然通过手术、放疗及化疗的综合应用, 患儿预后已经有了极大的改观, 但少数患儿由于复发、转移及对化疗药物的不敏感导致死亡。肿瘤的多药耐药是导致化疗失败的原因之一。因此如何降低耐药性, 提高化疗敏感性是目前亟待解决的难题。苦参碱是一种传统中药成分, 其抗肿瘤作用越来越受到关注。研究发现苦参碱对儿童急性淋巴细胞性白血病细胞、神经母细胞瘤 LA-N-5 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞、胃癌细胞、大肠癌 SW480 细胞、乳腺癌细胞等有抑制及杀伤作用, 且有明显的量效及时效关系^[2-6]。程序性细胞死亡 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 基因又称肿瘤性转化抑制剂, 是一种新的抑癌基因, 可以促进肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的增生及侵袭, 并可增加肿瘤细胞对抗癌药物的敏感性。那么, 苦参碱对肿瘤的抑制作用是否与 PDCD4 有关呢? 目前这方面的报道不多。因此本研究通过观察不同浓度苦参碱与固定浓度顺铂对人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞生长的影响, 研究苦参碱抗肿瘤作用及其剂量依赖性, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞购自中国科学院细胞库; Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基及 Hyclone 胎牛血清均购自赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司; 苦参碱 (粉末, 纯度 $\geq 98\%$, 中鑫科技生物有限公司); 顺铂 (江苏豪森药业股份有限公司); 流式试剂盒 (Annexin-V-FITC 试剂盒, 北京宝赛公司); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 试剂 (Sigma 公司); 二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司); TRIzol 液、TIANScrip cDNA 第一链合成试剂盒及 $2 \times$ Taq PCR Master Mix 均购自北京天根生化科技有限公司; PDCD4 mRNA 的引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计及合成; β -actin 由艾博思生物工程技术服务有限公司设计及合成。

1.2 细胞培养

人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞置于含 10% 胎

牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37°C 、5% CO_2 、100% 湿度的培养箱中孵育。每 3、4 d 换液, 7 d 左右传代 1 次, 维持细胞处于对数生长期。

1.3 分组

(1) 对照组: 人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞不经任何处理。(2) 顺铂组: 细胞加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂作用 16 h。(3) 0.5 mg/mL 苦参碱组: 细胞加入 0.5 mg/mL 苦参碱处理 24 h。(4) 1.0 mg/mL 苦参碱组: 细胞加入 1.0 mg/mL 苦参碱处理 24 h。(5) 1.5 mg/mL 苦参碱组: 细胞加入 1.5 mg/mL 苦参碱处理 24 h。(6) 0.5 mg/mL 苦参碱联合顺铂组: 细胞加入 0.5 mg/mL 苦参碱处理 24 h 后, 加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂作用 16 h。(7) 1.0 mg/mL 苦参碱联合顺铂组: 细胞加入 1.0 mg/mL 苦参碱处理 24 h 后, 加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂作用 16 h。(8) 1.5 mg/mL 苦参碱联合顺铂组: 细胞加入 1.5 mg/mL 苦参碱处理 24 h 后, 加入 $5 \mu\text{g/mL}$ 顺铂作用 16 h。(9) 空白组: 无细胞只有相应培养液。

1.4 MTT 法检测 SK-NEP-1 细胞存活率

收集对数生长期 SK-NEP-1 细胞, 制成 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 取其平均数。按上述分组加药处理后, 每孔加 MTT (5 mg/mL) $20 \mu\text{L}$, 培养箱中孵育 4 h, 吸去孔内培养上清液, 每孔加 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡 15 min, 于 1 h 内在酶标仪测其波长 492 nm 的吸光度 (OD 值)。各组同时进行 MTT 检测, 空白组调零, 结果取均值。各组细胞的相对存活率 = $[(\text{实验组吸光度} - \text{空白组吸光度}) / (\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度})] \times 100\%$ 。实验独立重复 3 次。

1.5 流式细胞仪检测 SK-NEP-1 细胞的凋亡率

收集对数生长期 SK-NEP-1 细胞, 制成 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液, 接种于六孔板, 按上述分组加药, 每组 3 个样本, 实验独立重复 3 次。各实验组同时进行流式细胞检测, 细胞用 4°C 预冷的 PBS 洗两遍并离心 (1000 rpm/min 、10 min) 后, 加 Binding Buffer $200 \mu\text{L}$ 悬浮细胞, 加 Annexin V-FITC $10 \mu\text{L}$, 避光室温反应 15 min 后, 再加 Binding Buffer $300 \mu\text{L}$ 及 PI $5 \mu\text{L}$ 混匀, 于 1 h 内在流式细胞仪上检测。

1.6 RT-PCR 法检测 PDCD4 mRNA 的表达

收集对数生长期 SK-NEP-1 细胞, 制成

1×10^4 /mL 细胞悬液接种在 50 mL 细胞培养瓶中,按上述分组加药,每组 3 个样本,实验独立重复 3 次。各实验组同时进行 RT-PCR 检测。TRIzol 液提取细胞总 RNA,具体操作按说明书进行,紫外分光光度计(A260/A280)检测 RNA 纯度及完整性,按说明书步骤逆转录 mRNA 为 cDNA。PDCD4 引物:上游序列(5'→3') AAAGGCGACTAAGGAAAACTCATC;下游序列(5'→3') GCCTATCCAGCAACCTTCCCT,片段长度为 129 bp。 β -actin 引物:上游序列为(5'→3') CGAAACTACCTTCAACTCCATC;下游序列为(5'→3') AGTGATCTCCTTCTGCATCCT,片段长度为 130 bp。反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,58℃(PDCD4)/56℃(β -actin)退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 5 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,通过密度分析测定目的基因产物与内参照基因产物的比率,半定量分析目的基因的表达。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测各组细胞存活率

各实验组 SK-NEP-1 细胞的存活率均低于对照组(均 $P < 0.05$),苦参碱组随药物浓度增加,存活率逐渐降低。苦参碱联合顺铂组与相同浓度单药苦参碱组比较,存活率均明显降低(均 $P < 0.05$)。苦参碱联合顺铂组与顺铂组比较,存活率均明显降低(均 $P < 0.01$)。见表 1。

2.2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

各实验组 SK-NEP-1 细胞的凋亡率均高于对照组(均 $P < 0.05$),苦参碱组随药物浓度增加,凋亡率逐渐增高。苦参碱联合顺铂组与相同浓度单药苦参碱组比较,凋亡率均明显增高(均 $P < 0.01$)。苦参碱联合顺铂组与顺铂组比较,凋亡率均明显增高(均 $P < 0.01$)。见表 1 和图 1。

表 1 各组细胞存活率及凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞相对存活率 ($n=6$)	细胞凋亡率 ($n=3$)
对照组	90.4 $\pm$ 6.5	5.2 $\pm$ 1.2
苦参碱 0.5 mg/mL 组	73.8 $\pm$ 2.3 ^a	8.9 $\pm$ 1.7 ^a
苦参碱 1.0 mg/mL 组	66.5 $\pm$ 3.5 ^{a,b}	12.4 $\pm$ 1.2 ^{a,b}
苦参碱 1.5 mg/mL 组	57.5 $\pm$ 3.7 ^{a,b}	16.9 $\pm$ 2.5 ^{a,b}
顺铂组	64.0 $\pm$ 1.7 ^a	12.1 $\pm$ 2.6 ^a
苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组	45.7 $\pm$ 3.3 ^{a,b,c,e}	27.1 $\pm$ 0.5 ^{a,b,c,e}
苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组	36.1 $\pm$ 1.4 ^{a,c,e,f}	34.1 $\pm$ 1.0 ^{a,c,e,f}
苦参碱 1.5 mg/mL+ 顺铂组	29.6 $\pm$ 0.6 ^{a,b,c,d,e,f,g}	39.9 $\pm$ 1.1 ^{a,b,c,d,e,f,g}
F 值	31.38	20.04
P 值	<0.01	<0.05

注: a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与苦参碱 0.5 mg/mL 组比较, $P < 0.05$; c 为与苦参碱 1.0 mg/mL 组比较, $P < 0.05$; d 为与苦参碱 1.5 mg/mL 组比较, $P < 0.01$; e 为与顺铂组比较, $P < 0.01$; f 为与苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组比较, $P < 0.01$; g 为与苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 各组细胞 PDCD4 mRNA 表达

各实验组 PDCD4 mRNA 的表达水平均高于对照组(均 $P < 0.01$)。苦参碱组随药物浓度增加, PDCD4 mRNA 表达水平逐渐增加($P < 0.01$)。苦参碱联合顺铂组与相同浓度单药苦参碱组比较, PDCD4 mRNA 表达均显著提高(均 $P < 0.01$)。联合顺铂组与顺铂组比较, PDCD4 mRNA 表达水平均明显升高(均 $P < 0.01$)。见表 2 和图 2。

表 2 各组细胞 PDCD4 mRNA 表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	PDCD4 mRNA 表达
对照组	0.30 $\pm$ 0.04
苦参碱 0.5 mg/mL 组	0.45 $\pm$ 0.03 ^a
苦参碱 1.0 mg/mL 组	0.56 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
苦参碱 1.5 mg/mL 组	0.72 $\pm$ 0.02 ^{a,b,c}
顺铂组	0.58 $\pm$ 0.01 ^a
苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组	0.66 $\pm$ 0.03 ^{a,b,c}
苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组	0.81 $\pm$ 0.02 ^{a,b,c,e,f}
苦参碱 1.5 mg/mL+ 顺铂组	0.85 $\pm$ 0.02 ^{a,d,e,f,g}
F 值	30.83
P 值	<0.01

注: a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与苦参碱 0.5 mg/mL 组比较, $P < 0.01$; c 为与苦参碱 1.0 mg/mL 组比较, $P < 0.01$; d 为与苦参碱 1.5 mg/mL 组比较, $P < 0.01$; e 为与顺铂组比较, $P < 0.01$; f 为与苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组比较, $P < 0.01$; g 为与苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组比较, $P < 0.01$ 。

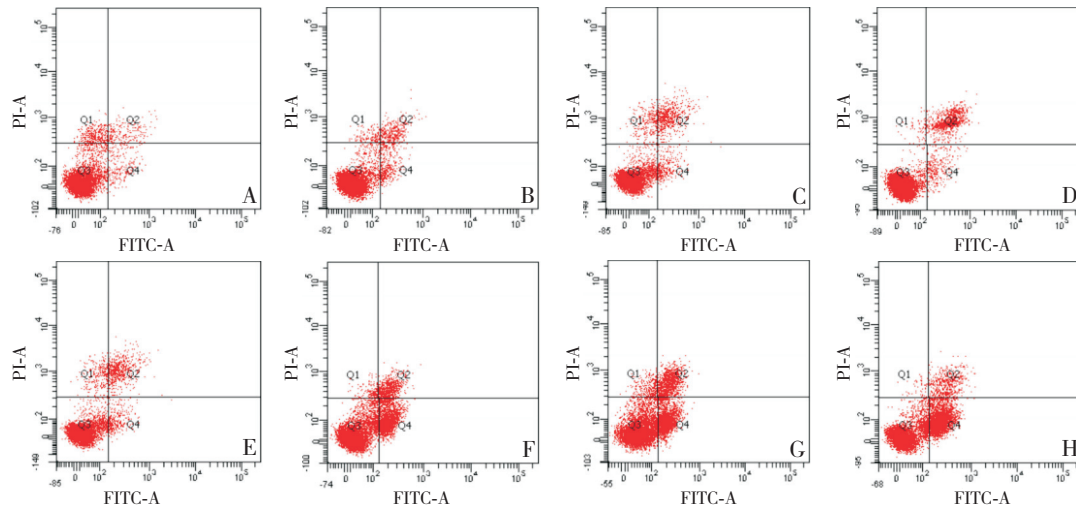


图1 流式细胞仪检测 SK-NEP-1 细胞的凋亡 A: 对照组; B: 苦参碱 0.5 mg/mL 组; C: 苦参碱 1.0 mg/mL 组; D: 苦参碱 1.5 mg/mL 组; E: 顺铂组; F: 苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组; G: 苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组; H: 苦参碱 1.5 mg/mL+ 顺铂组。图中左上象限表示机械损伤的细胞; 右上象限表示晚期凋亡以及继发坏死的细胞; 左下象限表示存活细胞; 右下象限表示早期凋亡细胞。

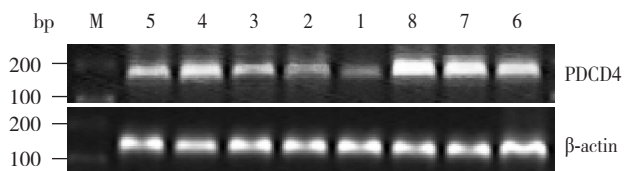


图2 RT-PCR 检测 SK-NEP-1 细胞中 PDCD4 mRNA 表达 M: Marker; 1: 对照组; 2: 苦参碱 0.5 mg/mL 组; 3: 苦参碱 1.0 mg/mL 组; 4: 苦参碱 1.5 mg/mL 组; 5: 顺铂组; 6: 苦参碱 0.5 mg/mL+ 顺铂组; 7: 苦参碱 1.0 mg/mL+ 顺铂组; 8: 苦参碱 1.5 mg/mL+ 顺铂组。

3 讨论

苦参碱化学名为苦参啶-15-酮 (Matddin-15-one), 化学分子式为 $C_{15}H_{24}N_{20}$, 是中药苦参的主要活性成分之一, 在体内外对多种肿瘤细胞有抑制及杀伤作用, 包括抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡, 可逆转多药耐药, 且有明显的量效和时效关系^[7]。虽然化疗仍是目前治疗肿瘤的主要手段之一, 但传统化疗药物毒副作用大, 以及肿瘤的多药耐药, 高侵袭和转移的特征, 是目前化疗成功的障碍。苦参碱这种新型高效低毒抗肿瘤中药, 对体外肿瘤细胞除抑制及杀伤, 诱导细胞分化与凋亡, 抑制肿瘤转移, 调节肿瘤细胞宿主免疫等作用外^[8], 还能逆转多药耐药, 提高传统化疗药物敏感性, 使临床抗肿瘤治疗取得更好的疗效^[9]。但苦参碱联合顺铂抗 SK-NEP-1 细胞作用鲜有报道。

细胞增殖和凋亡是细胞生物学行为的两个重要方面, 两者间动态平衡是维持机体稳态的一个重要方式, 苦参碱调节肿瘤细胞中某些基因表达水平可能是其抗肿瘤机制之一。有研究报道, MYCN 基因, 为 MYC 原癌基因家族成员之一, 具有很强致癌潜能^[10], 神经母细胞瘤 LA-N-5 细胞高表达 MYCN 基因 mRNA, 苦参碱作用体外培养的 LA-N-5 细胞, 抑制 MYCN 基因 mRNA, 从而有效抑制该细胞增殖, 实现其抗肿瘤作用^[4]。抑癌基因也称为抗癌基因, 在被激活情况下它们具有抑制细胞增殖作用, 但在一定情况下被抑制或丢失后可减弱甚至消除抑癌作用的基因。肾母细胞瘤中 PDCD4 mRNA 及蛋白与癌旁正常对照组织相比明显下调。肿瘤恶性程度越高, 瘤组织中 PDCD4 蛋白表达下调越明显, PDCD4 mRNA 和蛋白可作为评价肾母细胞瘤生物学行为的参考指标^[11-12]。

本研究显示, 相对于对照组, 苦参碱在一定浓度范围 (0.5~1.5 mg/mL) 内能抑制 SK-NEP-1 细胞的增殖并诱导凋亡, 具有剂量依赖性。因顺铂毒副作用大, 且易耐药。本研究通过不同浓度苦参碱与固定浓度顺铂联合用药, 发现随着苦参碱浓度的增加, 联合作用组抑制 SK-NEP-1 细胞增殖越明显。联合作用组存活率低于苦参碱、顺铂单药组, 而凋亡率增高。各实验组 SK-NEP-1 细胞的存活率均低于对照组, 苦参碱组随药物浓度增加, 存活率逐渐降低, 联合 0.5 μ g/mL 顺铂共同作

用 SK-NEP-1 细胞后,与相同浓度单药苦参碱组及顺铂组比较,存活率均明显降低。各实验组 SK-NEP-1 细胞的凋亡率均高于对照组,苦参碱组随药物浓度增加,凋亡率逐渐增高,联合 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂共同作用 SK-NEP-1 细胞后,与相同浓度单药苦参碱组及顺铂组比较,凋亡率均明显增高。说明苦参碱与顺铂有协同作用,能提高顺铂的化疗敏感性。同时本研究发现随着苦参碱浓度的增加,PDCD4 mRNA 的表达逐渐增高。与苦参碱、顺铂单药组相比,联合作用组能明显提高 PDCD4 mRNA 的表达,提示苦参碱联合顺铂可能通过提高 SK-NEP-1 细胞 PDCD4 mRNA 的表达来发挥协同作用,抑制细胞增殖诱导凋亡,提高苦参碱对顺铂化疗敏感性,起到抗肿瘤作用。

综上,本研究证实苦参碱与顺铂联合应用,通过上调 PDCD4 mRNA 的表达,来抑制 SK-NEP-1 细胞增殖,诱导凋亡。这可能为进一步研究苦参碱通过其他途径与顺铂发挥协同抗肿瘤作用,奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Wang H, Shen Y, Sun N, et al. Identification and analysis of mutations in WTX and WT1 genes in peripheral blood and tumor tissue of children with Wilms' tumor[J]. China Medical Journal, 2012, 125(10): 1733-1739.
- [2] 覃遵科,殷小成.苦参碱对急性淋巴细胞性白血病细胞 Bcl-2 表达的影响[J].中国当代儿科杂志,2004,6(6): 497-499.
- [3] 冯晨,唐锁勤,王建文,等.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.
- [4] 周炳刚,沈义军,杨涛,等.苦参碱诱导人乳腺癌细胞凋亡逆转耐药及对酸化蛋白激酶 B、Fas、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 -3 表达的影响[J].中华实验外科杂志,2012,29(9): 1856-1857.
- [5] 增辉,胡梅洁,张曙,等.苦参碱体外对胃癌细胞的杀伤作用[J].上海第二医科大学学报,2004,24(1): 38-40.
- [6] 殷飞,赵军艳,姚树坤.苦参碱对肝癌 SMMC-7721 细胞 JAK-STAT 信号通路的影响[J].中草药,2008,39(6): 873-877.
- [7] 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,2012,28(5): 423-424.
- [8] 何礼,尚剑.苦参碱抗肿瘤机制的研究进展[J].中医药信息,2012,29(4): 175-176.
- [9] 孙建红,武建军,连月珍,等.苦参碱联合化疗药物对中晚期肺癌的疗效分析[J].肿瘤药理学杂志,2013,3(1): 48-50.
- [10] Reynolds CP, Wang Y, Melton LJ, et al. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide[J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 35(6): 597-602.
- [11] 崔明宇,于启海,陈海.肾母细胞瘤组织中 PTEN、PDCD4 的表达及意义[J].中华小儿外科杂志,2011,32(9): 645-649.
- [12] Vikhrev PN, Shepelev MV, Korobko EV, et al. Pdcd4 tumor suppressor: properties, functions, and their application to oncology[J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 2010, (2): 3-11.

(本文编辑:王庆红)