

苦参碱抑制大肠癌 HT-29 细胞 环氧化酶-2 表达的研究

黄 建¹ 张鸣杰² 邱福铭¹

摘要 目的 从基因和蛋白水平探讨中药成分苦参碱(matrine)对大肠癌 HT-29 细胞环氧化酶-2(COX-2)表达的影响。方法 分别采用 RT-PCR、Western-blot、ELISA 等方法检测不同浓度苦参碱处理 HT-29 细胞前后 COX-2 mRNA、蛋白及其产物前列腺素 E₂(PGE₂)水平的改变。结果 苦参碱可抑制 HT-29 细胞 COX-2 mRNA、蛋白表达及 PGE₂ 合成水平,但对 COX-1 无影响。当苦参碱 2.0 mg/ml 处理时,COX-2 mRNA 表达在处理后 6h 和 9h 时抑制率均为 100% 细胞培养液 PGE₂ 合成水平在 9h 时抑制率为 63.9% ;COX-2 蛋白表达在 12h 和 24h 时抑制率分别为 48% 和 100%。结论 苦参碱具有选择抑制 HT-29 细胞 COX-2 的基因转录、蛋白表达和功能活性等作用,在一定浓度和时间范围内,表现出时效与量效关系。

关键词 苦参碱 大肠癌 HT-29 细胞系 环氧化酶-2 蛋白表达 基因转录 前列腺素 E₂

Study on Inhibitory Effect of Matrine on Cyclooxygenase-2 Expression in Colon Cancer HT-29 Cell Line
HUANG Jian, ZHANG Ming-jie, QIU Fu-ming *Department of Oncology, The Second Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou (310009)*

Objective To explore the effect of matrine on cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in colon cancer HT-29 cell line at the level of gene and protein. **Methods** Levels of mRNA and protein expression of COX-2, and its synthesized product prostaglandin E₂ (PGE₂) of colon cancer HT-29 cell line were detected by RT-PCR, Western-blot, ELISA respectively before and after treatment of matrine in different concentrations. **Results** Matrine had inhibitory effect on the mRNA and protein expression of COX-2, and synthesis of PGE₂ in colon cancer HT-29 cell line, but had no effect on COX-1. When HT-29 cell line was treated with 2.0 mg/ml of matrine, the inhibitory rate on COX-2 mRNA expression were 100% at 6 hrs and 9 hrs after treatment; the inhibitory rate on PGE₂ synthesis was 63.8% at 9 hrs after treatment; and that on COX-2 protein expression was 48% and 100% 12 hrs and 24 hrs after treatment, respectively. **Conclusion** Matrine has selective inhibitory effect on gene transcription, protein expression and functional activity of COX-2 in HT-29 cell line, which is time-dependent and concentration-dependent within certain range of concentration and acting time.

Key words matrine; colon cancer HT-29 cell line; cyclooxygenase-2; protein expression; gene transcription; prostaglandin E₂

苦参碱(matrine, MAT)是从中药苦参的干燥根中提取的一类活性物质^[1],传统被用在抗炎、抗心律失常等,但最近发现其在抗肿瘤如抑制增殖、诱导分化和凋亡、抗浸润和转移等多个方面也起作用。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是花生四烯酸代谢的关键限速酶,已发现许多肿瘤的发生发展也与 COX-2 表达密切相关,尤其在大肠腺瘤和恶性肿瘤,COX-2 表达

高达 50% 和 80%^[2,3]。关于苦参碱是否影响 COX-2 表达,目前还未见报道。本研究从基因和蛋白水平检测苦参碱对大肠癌 HT-29 细胞系 COX-2 表达的影响,以探讨其抑制 COX-2 表达抗大肠癌的机制,为大肠肿瘤的治疗及化学预防提供理论依据。

材料与方法

1 材料 苦参碱(纯度:99.9%, 20mg/支)购自中国药品生物制品检定所;人大肠癌 HT-29 细胞系由浙江大学肿瘤研究所提供;细胞培养液 McCoy's 5A 购自 Sigma 公司(Catalog No. 30-2007) 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Trizol 液购自

基金项目:浙江省自然科学基金项目青年人才专项基金(No. 8C01055)和浙江省中医药管理局项目(No. 2003C094)

作者单位:1. 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科(杭州 310009) 2. 浙江省湖州市中心医院外科

通讯作者:黄建 Tel: 0571-87784556 E-mail: hjys@zju.edu.cn

GIBCO 公司 (Catalog No. 15596-018); Rnase inhibitor 购自宝生物工程有限公司 (code No. D2310A); M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司 (Catalog No. M1701); OligdT 及 COX-1、COX-2、 β -actin 的引物均由上海生物工程公司合成; Taq 酶购自 Promega 公司 (Catalog No. M1661S); 前列腺素 E₂ (PGE₂) ELISA 试剂盒购自 Cayman 公司 (Cayman Chemical Co, Catalog No. 514010); COX-2 鼠单抗购自 Cayman 公司 (Cayman Chemical Co, Catalog No. 160112), 羊抗鼠 IgG (H + L) 二抗购自北京中山生物技术有限公司 (Catalog No. ZB2305); ECL 试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司 (Lot 0306)。

2 方法

2.1 细胞培养与药物处理 人大肠癌细胞系 HT-29 在含有 10% 的新生小牛血清, 青链霉素各 100 U/ml 的 McCoy '5A 培养液中, 37℃、饱和湿度、5% 的 CO₂ 条件下常规培养, 每 3~4 天换液传代培养。收集对数期生长的细胞, 用 McCoy '5A 培养液调整细胞浓度为 5×10^5 /ml, 接种于 6 孔板中, 常规条件培养 1 天使其贴壁。将苦参碱加入各孔中并用培养液调整各孔的 MAT 浓度分别为 0、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 mg/ml, 按培养 3、6、9、12、24 h 5 个时间段分批收集细胞用于提取总 RNA 和总蛋白, 收集培养液测定 PGE₂ 的含量。

2.2 COX-2 基因表达测定 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法, Trizol 法提取细胞总 mRNA。

COX-2 引物: sense 为 5'-CAG CAC TTC ACG CAT CAG TT-3',

antisense 为 5'-TCT GGT CAA TGG AAG CCT GT-3' (大小 755 bp);

COX-1 引物: sense 为 5'-CCT TCA ATG AGT ACC GCA AGA G-3',

antisense 为 5'-GTG TGG CCG TCT TGA CAA TGT-3' (306 bp);

β -actin 引物: sense 为 5'-TCG ACA ACG GCT CCG GCA-3', antisense 为 5'-CGT ACA TGG CTG GGG TGT -3' (375 bp)。

逆转录后 PCR 扩增条件为 95℃ 变性 30 s; 55℃ 复性 20 s; 72℃ 延伸 20 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 应用图像分析仪对扩增条带作半定量扫描分析。

2.3 细胞培养液 PGE₂ 测定 采用酶联免疫法 (ELISA 法), 按试剂盒说明书操作。

2.4 COX-2 蛋白表达检测 采用蛋白电泳免疫印迹实验 (Western-blot 法) 检测; 蛋白提取液煮沸法提

取细胞总蛋白, 用 Lowry 法测定各样品的浓度, 每个样品上样 30 μ g, SDS-PAGE 蛋白电泳并将蛋白转至 PVDF 膜 (pharmacia 公司) 上; 分别采用 COX-2 一抗 (鼠单抗) 和二抗 (羊抗鼠 IgG) 检测蛋白表达, ECL 液温浴 2 min, X 线片曝光显影; 用激光光密度图像扫描仪测定信号条带的吸光值。

3 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件行 *t* 检验。

结 果

1 苦参碱对 HT-29 细胞系 COX-1、COX-2 mRNA 表达的影响 不同浓度 (0.5~2.0 mg/ml) 苦参碱处理 HT-29 细胞的 5 个时间段 (3、6、9、12、24 h), 其中 3 个时间段 (3、12、24 h) COX-2 mRNA 的表达不受浓度梯度影响 (图 1 a、d、e); 而在 6、9 h 两个时段, COX-2 mRNA 的表达抑制随苦参碱的浓度增高而明显, 当 2.0 mg/ml 苦参碱处理时, COX-2 mRNA 几乎不表达 (图 1 b、c)。

将 COX-2 条带的亮度值与 β -actin 条带作比较, 得到半定量的 R 值并绘制出时效曲线, 各个浓度的苦参碱在不同时段内对 COX-2 mRNA 表达影响的变化为: 在 3~9 h 时段, 每个浓度的苦参碱对 COX-2

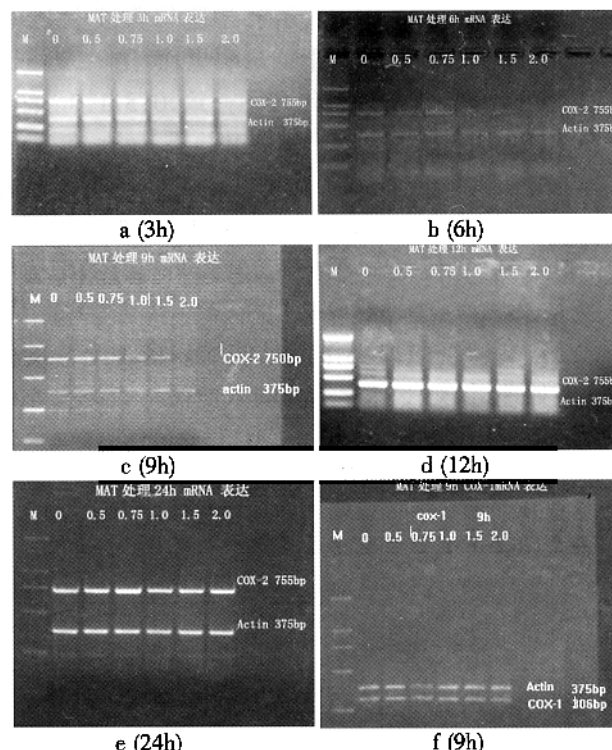


图 1 不同浓度苦参碱对 HT-29 细胞 COX-1 和 COX-2 mRNA 表达的影响

注: a、b、c、d、e 分别为不同浓度苦参碱 (0.5、0.75、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml) 处理 HT-29 细胞 3、6、9、12、24 h 时 COX-2 mRNA 表达, f 为苦参碱处理 9 h 时 COX-1 mRNA 表达

mRNA 表达一致表现为抑制,而在 9~24h 时段,COX-2 表达水平又有上升;0.5~2.0 mg/ml 各组对 COX-2 mRNA 表达抑制率分别为 42.1%、43.3%、46.5%、51.2% 和 100% (见图 2),其中 0.5~1.5mg/ml 各组间比较抑制率差异无显著性($P>0.05$)但 2.0mg/ml 苦参碱组与前 4 组抑制率比较差异有显著性($P<0.05$)。苦参碱对 HT-29 细胞 COX-1 mRNA 的表达无影响(见图 1f)。

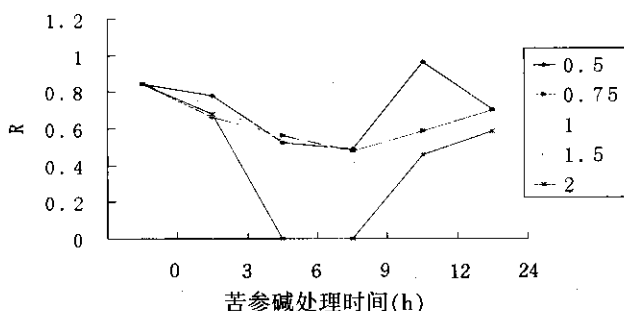


图 2 不同浓度苦参碱处理 HT-29 细胞后 COX-2 mRNA 表达时间变化曲线($n=3$)

注:R=COX-2/ β -actin 吸光度比值,各浓度曲线单位:mg/ml

2 细胞培养液中 PGE₂ 水平的变化 不同浓度苦参碱处理 HT-29 细胞 3、6、9、12、24h 5 个时段中,各个浓度苦参碱在 3~9h 时段内,细胞培养液中 PGE₂ 水平均下降,大多在 9h 时下降最明显 而在 9~24h 时段里,PGE₂ 合成水平曲线走行不一致,0.5、1.0mg/ml 苦参碱处理组的 PGE₂ 水平呈上升趋势 而 0.75、1.5、2.0mg/ml 组的 PGE₂ 水平则呈先继续下降后又上升的趋势,但各浓度组每个时间点的 PGE₂ 浓度均低于空白对照组(见图 3)。0.5~2.0 mg/ml 组的抑制率分别为 38.2%、60.5%、45%、85.6% 和 63.9%,1.5 mg/ml 苦参碱组的抑制作用最明显。将各个浓度的苦参碱处理组 PGE₂ 水平变化时效曲线与 COX-2 mRNA 表达变化作比较,发现除了 0.5mg/ml 苦参碱处理组外,两组曲线的走向趋势基本相似。

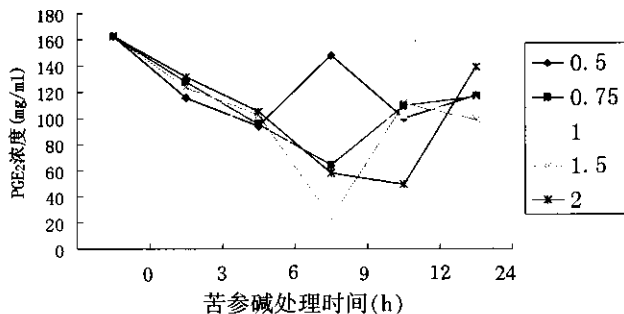


图 3 不同浓度苦参碱处理 HT-29 细胞后培养液中 PGE₂ 浓度时间变化曲线($n=3$)

万方数据

3 苦参碱对 HT-29 细胞系 COX-2 蛋白表达的影响 0.5~2.0mg/ml 苦参碱浓度处理 HT-29 细胞 12h 的抑制率分别为 4%、44%、40%、50% 和 48%,可见除 0.5mg/ml 组外,其余各组的 COX-2 蛋白表达抑制率相近(见图 4.1)。而 2.0 mg/ml 组在 3、6、9、12、24h 5 个时段处理 HT-29 细胞,发现 3~9h 时段内 COX-2 蛋白表达水平渐升高,而在 9~24h 时段内 COX-2 蛋白表达水平则明显下降,尤其在 24h 时 COX-2 蛋白几乎不表达(见图 4.2)。将 2.0mg/ml 苦参碱处理组 COX-2 蛋白表达变化的时效曲线与 COX-2 mRNA、PGE₂ 的变化作比较,发现前者与后两组的曲线走向相反。

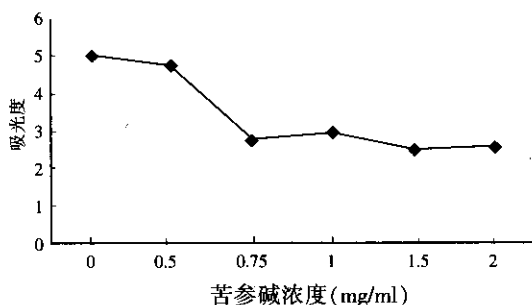


图 4.1 不同浓度苦参碱作用 12h 时 COX-2 蛋白表达量效曲线($n=3$)

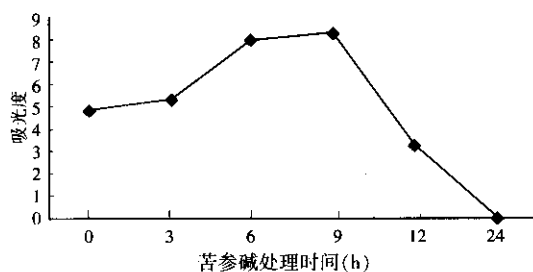


图 4.2 2.0mg/ml 苦参碱处理后 COX-2 蛋白表达时效曲线($n=3$)

讨 论

苦参碱为一类具有抗炎、抗病毒及抗肿瘤等作用的中药成分。Zhang 等发现低浓度苦参碱可诱导红白血病 K562 细胞分化,高浓度时则使细胞凋亡^[4]。另有研究证明苦参碱可使实体瘤细胞系如胃癌和肝癌细胞发生凋亡^[5,6],明显减少用二乙基亚硝胺(DEN)喂饲大鼠诱发肝癌的癌结节数目和大小^[7],还抑制 H-22 细胞系小鼠皮下移植瘤^[8],表明其具有一定的肿瘤化学预防作用,但有关报道未涉及苦参碱抗大肠肿瘤和肿瘤化学预防作用的分子机制。

COX-2 与结肠癌和直肠癌发生发展的关系已被

大量的流行病学和实验研究结果所证实:COX-2 及其表达产物 PG 在人类和裸鼠的大肠腺瘤和上皮恶性肿瘤中有过度的表达;服用阿司匹林或其他 COX-2 合成抑制剂如用消炎痛超过 10~15 年的人群,可减少结、直肠癌发生的相对危险性 40%~50%^[9];COX-2 基因敲除裸鼠可明显减少结、直肠癌的发生^[2],提示 COX-2 与消化系肿瘤特别是大肠癌的发生相关,并可能是药物预防大肠癌发生的一个重要分子靶点。但由于非甾体类消炎镇痛药(NSAIDs)因同时抑制 COX-1 引起的不良反应使其大量应用受到限制^[9,10]。选择性 COX-2 抑制剂如西乐葆(Celecoxib)等具有和传统的 NSAIDs 相同的功效,虽对 COX-1 的抑制作用较小而并发症较少,但仍不能完全避免,且可能有其他不良反应。因此从传统的天然中药材中选择可特异抑制 COX-2 表达的药物成了大肠癌化疗预防的重要选择。

基于苦参碱具有抗炎抗肿瘤的作用,结合 NSAIDs 通过抑制 COX-2 的表达防治大肠癌这一事实,我们推测苦参碱也可能通过抑制 COX-2 表达发挥其抗肿瘤作用,为此我们选择 COX-2 高表达的人大肠癌 HT-29 细胞系进行体外实验研究加以验证。研究发现苦参碱可下调 COX-2 mRNA 表达水平、PGE₂ 的合成及 COX-2 蛋白的表达,但对 COX-1 的表达无明显的抑制作用,因此可能具有特异、低毒、临床应用不良反应较少等优点。同时发现苦参碱浓度在 1.5~2.0mg/ml 时对 COX-2 基因、蛋白表达的抑制作用明显,各浓度苦参碱处理 9h 时,COX-2 mRNA 表达及 PGE₂ 合成水平下降明显,而 COX-2 蛋白表达在用药 9h 后抑制作用才出现,这些结果对于了解掌握苦参碱抗 COX-2 作用的药物动力学特点从而指导苦参碱临床应用有一定的意义。

另外,从 COX-2 mRNA、COX-2 蛋白及 PGE₂ 表达变化的时效曲线来看,COX-2 mRNA 与 PGE₂ 水平变化的时效曲线走行较一致,而与 COX-2 蛋白表达的走行相反。COX-2 mRNA 和蛋白时效曲线的走行不一致可能由于蛋白的合成迟于基因的转录翻译,存在有抑制延迟的现象,说明苦参碱的作用是从基因转录水平上发生。而 COX-2 蛋白和 PGE₂ 时效曲线的走行不一致可能与 COX-1 的代偿性功能增强有关,具体

机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Lai JP, He XW, Jiang Y, et al. Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 2003; 375(2): 264-269.
- 2 Williams CS, Luongo C, Radhika A, et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* 1996; 111(4): 1134-1140.
- 3 Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 172(2): 111-118.
- 4 Zhang LP, Jiang JK, Tam JW, et al. Effects of matrine on proliferation and differentiation in K-562 cells. *Leuk Res* 2001; 25(9): 793-800.
- 5 Liu J, Shen HM, Ong CN. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG(2) cells. *Cancer Letter* 2000; 153(1-2): 85-93.
- 6 曾 晖,胡梅洁,张 曙,等.苦参碱体外对胃癌细胞的杀伤作用.上海第二医科大学学报 2004; 24(1): 38-40.
Zeng H, Hu MJ, Zhang S, et al. Cytotoxicity effect of matrine on gastric cancer cell lines *in vitro*. *J Shanghai Second Med Univ* 2004; 24(1): 38-40.
- 7 罗 明,贺 平,吴孟超,等.苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防作用.肿瘤 2001; 21(4): 239-241.
Luo M, He P, Wu MC, et al. The preventive effect of matrine on rat hepatoma induced by diethylnitrosamine. *Tumor* 2001; 21(4): 239-241.
- 8 林万隆,孙培龙,汪永录,等.苦参素对 H-22 细胞株小鼠皮下移植瘤模型的抑制作用.肝脏 2001; 6(2): 113-114.
Lin WL, Sun PL, Wang YL, et al. The inhibitory effect of matrine on H-22 transplantation hypodermal tumor of subcutaneous in mice. *Liver* 2001; 6(2): 113-114.
- 9 Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Aspirine use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; 121(4): 241-246.
- 10 Fournier DB, Gordon GB. Cox-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. *J Cellular Biochem* 2000; 34(Supple): 97-102.

(收稿 2004-08-10 修回 2004-10-30)

第四届国际传统医学美容学术大会征文通知

经国家中医药管理局批准,由中华中医药学会主办的“第四届国际传统医学美容学术大会”将于 2005 年 6 月在中国召开。承办单位 中国·中华中医药学会中医美容分会《中国医药学报》杂志社。大会除专题报告与论文交流外,还有特色美容新技术现场展示、天然美容养颜产品研发技术研究进展交流(企业专场学术研讨会)及展览,具体征文内容详见本刊 2005 年第 1 期 44 页。