

苦参碱抑制人卵巢恶性畸胎瘤细胞株 PA-1 体外增殖的研究

陈聪德 李响[△] 张浩川 陈肖鸣 李仲荣

摘要 目的 探讨苦参碱(matrine, MAT)对人卵巢恶性畸胎瘤细胞株 PA-1 体外增殖的影响。方法 体外培养人卵巢恶性畸胎瘤细胞株 PA-1, 分组予不同浓度苦参碱作用。MTT 法检测 0.25、0.50、1.0 mg/mL 不同浓度苦参碱对细胞增殖的抑制作用以及药物作用的量效和时效关系; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期; 半定量 RT-PCR 检测 bcl-2/bax mRNA 表达水平的变化。结果 MTT 法显示药物作用后, 细胞有明显的抑制增殖作用, 且呈时间依赖性和剂量依赖性; 流式细胞仪检测不同浓度的苦参碱作用后 PA-1 细胞的凋亡率依次上升, 并与作用时间正相关; 细胞周期结果显示苦参碱对 PA-1 细胞具有明显的 G₁ 期阻滞作用, 且具有剂量依赖性。结论 苦参碱能使 PA-1 细胞 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 的比值下调, 产生 G₁ 期阻滞, 从而调节细胞周期, 最终导致 PA-1 细胞在体外的增殖受到明显抑制。

关键词 苦参碱; PA-1 细胞; 细胞周期; 增殖

Inhibitory Effect of Matrine on Proliferation of Human Ovary Malignant Teratoma Cell Line PA-1 *in Vitro*

CHEN Cong-de, LI Xiang, ZHANG Hao-chuan, et al Department of Pediatric Surgery, Yuying Children Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325027)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of matrine (MAT) on the proliferation of human ovary malignant teratoma cell line PA-1 *in vitro*. **Methods** PA-1 cells allocated in different groups were treated with different concentrations (0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL) of MAT. The inhibitory effect of MAT and its dose- and time-effect relationship were detected with MTT; the apoptosis rate and cell cycle were evaluated by flow cytometry; and the changes of bcl-2/bax mRNA expression in cells were measured using semi-quantitative RT-PCR. **Results** After being exposed to MAT, the PA-1 cell proliferation was decreased in a concentration- and time-dependent manner; cell apoptosis rate raised as the increasing concentration of MAT and acting time; cells retarded at G₁ phase in the cell cycle dose-dependently; and the bcl-2/bax mRNA expression in cells down-regulated significantly. **Conclusion** MAT can dose- and time-dependently inhibit the proliferation of PA-1 cell by reducing bcl-2/bax mRNA ratio to produce a G₁ phase arresting in cell cycle.

KEYWORDS matrine; PA-1 cell; cell cycle; proliferation

苦参碱类生物碱是从中药苦参(*Sophora flavescens* Ait.)的干燥根中提取的一类活性物质^[1], 作为一种传统的中药成分, 在抗炎、抗心律失常方面有重要应用价值, 最近的研究表明其对于肿瘤的防治也有很大影响^[2], 但目前尚无针对畸胎瘤的研究。本实验分别用不同浓度苦参碱, 作用于人卵巢畸胎瘤细胞 PA-1 细胞(PA-1 细胞), 研究其对 PA-1 细胞周期及体外增殖的影响。

材料与方法

1 细胞和细胞培养 PA-1 细胞(ATCC 编号: CRL-1572)购自中国协和医科大学基础医学院, 为 ATCC 细胞库收录。培养基为 MEM, 含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液, 取对数生长期细胞进行试验。

2 主要试剂 MEM 培养基(上海吉泰生物公司), 临用前加入 10% 胎牛血清(美国 GIBCO 公司); 苦参碱(广州明兴制药厂, 批号: 060904-2, 纯度 > 99%, 相对分子量 248.36, 注射剂 10 mg/mL)。四甲基偶氮唑蓝(MTT, 上海华美生物试剂公司)。RT-PCR 引物序列由北京塞百盛生物工程有限公司合成

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(No. Y204463); 浙江省卫生厅重点项目(No. 2004ZD009)

作者单位: 温州医学院附属育英儿童医院外科(浙江 325027)

通讯作者: 陈肖鸣, Tel: 0577-88879007, E-mail: cxm@wzmc.net

[△] 现在中国人民解放军第 180 医院外科

(表 1):

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	正向引物	反向引物	产物长度 (bp)
人 β -actin	5'-TCC ACAACGGTCGGCAT-3'	5'-AAGGTGCTGTCATAGTTTC-3'	241
人 bcl-2	5'-GAGATATGCGCCGAAGA-3'	3'-GTGTTGGCTCTGTTGGTTT-5'	526
人 bax	5'-TTTGCTTCAGGTTTCATCC-3'	3'-CAGTTGAAGTTCGCTCAGA-5'	437

3 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期的 PA-1 细胞,0.05%胰酶消化,以 2×10^4 /mL 的细胞密度接种于平底 96 孔培养板,加入经生理盐水稀释的苦参碱,浓度分别为 0.25、0.50、1.00 mg/mL,每浓度设 5 个复孔,空白对照组为生理盐水加培养液,调零孔为培养液。分别孵育 24、48、72 h,每 24 h 取出一个培养板,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,孵育 4 h,弃上清,每孔加二甲基亚砜 150 μ L,37 $^{\circ}$ C 振荡 10 min,用免疫酶标仪(波长 570 nm)测定吸光度(A)值。全部实验重复 3 次,取平均值。根据 A 值计算抑制率。公式如下:各药物浓度组的生长抑制率(%)=(1-实验孔平均 OD 值/空白对照孔平均 OD 值) $\times$ 100% [2]。

4 流式细胞术检测细胞凋亡 用胰酶常规收集 0.25、0.50、1.00 mg/mL 浓度苦参碱及生理盐水空白对照组处理 24 h 的 PA-1 细胞各 1.5×10^5 ,1 000 r/min 离心 5 min,室温,弃上清,PBS 洗 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,室温,弃上清,加入 195 μ L buffer 结合缓冲液,混匀,加入 5 μ L Annexin V FITC 避光 15 min,PBS 洗 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,室温,弃上清,加入 190 μ L buffer 结合缓冲液,混匀后,加入 10 μ L PI(碘化丙啶液)立即上机检测。结果重复 3 次。

5 流式细胞术检测细胞周期 用胰酶常规收集 0.25、0.50、1.00 mg/mL 浓度苦参碱及生理盐水空白对照组处理 24 h 的 PA-1 细胞各 2.5×10^5 ,PBS 洗 2 次,离心 1 000 r/min,5 min 室温,弃上清,加 250 μ L 胰酶 buffer,轻摇,置室温 10 min,加 250 μ L 胰酶抑制剂和 RNA 酶 buffer 轻摇,置室温 10 min,后加预温置 4 $^{\circ}$ C 的 PI 到每管中,轻摇,避光置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 10 min,300 目尼龙网过滤后上机检测。每个样本检测 2×10^4 个细胞,数据经计算机处理分析得出细胞周期各时相比例。

6 半定量 RT-PCR 检测 bcl-2/bax mRNA 表达水平的变化 收集各苦参碱组及空白对照组细胞,按 Invitrogen 公司提供的 Trizol 总 RNA 分离试剂盒说明提取 RNA。以 β -actin 为内参照,目的基因的 PCR 产物条带灰度 Volume 之比作为反映目的基因 mRNA 水平的相对指标。

7 统计学处理 本实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,多组比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度苦参碱作用不同时间后细胞生长抑制率比较(表 2) MTT 结果说明苦参碱可抑制 PA-1 细胞的生长,且其抑制作用在一定条件下(0.25、0.50、1.00 mg/mL 范围内作用 24、48、72 h)随着药物作用时间的延长和药物浓度的升高,抑制作用越明显,呈现明显的时间-剂量依赖性($P < 0.01$),但浓度达到 1.0 mg/mL,且药物作用 48 h 以上时,组间细胞抑制率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度苦参碱作用不同时间细胞生长抑制率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/mL)	n	抑制率		
			24 h	48 h	72 h
空白对照	—	5	0.063 $\pm$ 0.011	0.065 $\pm$ 0.027	0.072 $\pm$ 0.020
苦参碱	0.25	5	0.124 $\pm$ 0.025*	0.307 $\pm$ 0.036*	0.525 $\pm$ 0.026* Δ
苦参碱	0.50	5	0.211 $\pm$ 0.033*	0.572 $\pm$ 0.044* Δ	0.968 $\pm$ 0.012* Δ
苦参碱	1.00	5	0.553 $\pm$ 0.041*	0.936 $\pm$ 0.013* Δ	0.972 $\pm$ 0.008

注:与空白对照组同期比较,* $P < 0.01$;与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.01$;与本组 48 h 比较, $\Delta P < 0.01$ 。

2 不同浓度苦参碱作用 PA-1 细胞 24 h 细胞凋亡率比较(表 3) 苦参碱作用 24 h 后对 PA-1 细胞有明显的诱导凋亡作用,且凋亡率与药物浓度成正比,有统计学意义($P < 0.05$)。

3 不同浓度苦参碱作用 PA-1 细胞 24 h 后细胞周期比较(表 3) 各组均未出现亚二倍体凋亡峰,空白对照组中 G_2/G_1 比值为 2.00,苦参碱处理组细胞周期的分布发生了明显的变化,主要表现为:24 h 后的 G_0-G_1 期细胞所占百分比明显增加,苦参碱组与空白对照组一一对应比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),各苦参碱组间比较差异也均有统计学意义($P < 0.05$),而 G_2-M 期所占细胞比例无明显梯度改变。以上结果提示:苦参碱使 PA-1 细胞阻滞于 G_0-G_1 期,干扰 DNA 合成,降低 S 期比例,从而发挥其抗 PA-1 细胞的效应,而且这一作用具有剂量依赖性。

表 3 不同浓度苦参碱作用 PA-1 细胞 24 h 的细胞凋亡率及细胞周期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/mL)	n	细胞凋亡率 (%)	细胞周期 (%)		
				G_0-G_1 期	S 期	G_2-M 期
空白对照	—	5	5.45 $\pm$ 0.60	43.04 $\pm$ 0.24	46.60 $\pm$ 0.27	10.36 $\pm$ 0.51
苦参碱	0.25	5	15.66 $\pm$ 5.34*	60.00 $\pm$ 0.81*	37.43 $\pm$ 2.98*	2.57 $\pm$ 1.42
苦参碱	0.50	5	35.90 $\pm$ 4.81** $\Delta\Delta$	66.78 $\pm$ 0.91** $\Delta\Delta$	30.79 $\pm$ 3.35** $\Delta\Delta$	2.44 $\pm$ 1.39
苦参碱	1.00	5	42.69 $\pm$ 11.58** $\Delta\Delta$	71.78 $\pm$ 2.19** $\Delta\Delta$	24.63 $\pm$ 5.79** $\Delta\Delta$	3.59 $\pm$ 1.87

注:与空白对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与苦参碱 0.25 mg/mL 组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

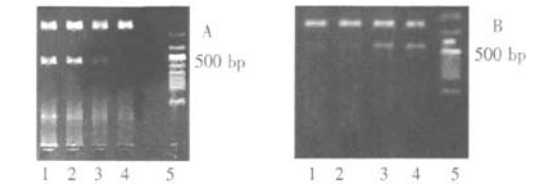
4 不同浓度苦参碱作用 PA-1 细胞 24 h 后 bcl-2 与 bax 基因半定量分析结果比较(表 4,图 1) 各浓度

的苦参碱处理组及空白对照组细胞都有等量的 β -actin 扩增,而 bcl-2 扩增结果却不同,空白对照组的表达量较高,随着苦参碱浓度的递增 bcl-2 表达量依次下降。bax 扩增结果也不同,空白对照组表达量较低,随着苦参碱浓度的递增 bax 表达量依次上升。

表 4 不同浓度苦参碱作用 PA-1 细胞 24 h bcl-2 与 bax 基因半定量分析结果 (OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/mL)	n	bcl-2/ β -actin	bax/ β -actin
空白对照	—	5	1.204 $\pm$ 0.027	0.187 $\pm$ 0.008
苦参碱	0.25	5	1.062 $\pm$ 0.019	0.334 $\pm$ 0.010
苦参碱	0.50	5	0.523 $\pm$ 0.012*	0.967 $\pm$ 0.018*
苦参碱	1.00	5	0.257 $\pm$ 0.011*	1.142 $\pm$ 0.019*

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$



注:1 为空白对照组;2 为 0.25 mg/mL 苦参碱作用组;3 为 0.50 mg/mL 苦参碱作用组;4 为 1.00 mg/mL 苦参碱作用组;5 为 Marker;A 为 bcl-2 mRNA;B 为 bax mRNA

图 1 不同浓度的苦参碱作用 24 h 对 PA-1 细胞 bcl-2 mRNA 及 bax mRNA 表达的影响 (琼脂糖凝胶电泳)

讨 论

苦参碱是从豆科槐属植物苦豆子、苦参根中分离得到的生物碱,因其具有抗炎症、抗肿瘤、抑制细胞增殖及耐药逆转等生物学活性而受到关注^[3]。国内有不少学者将其作用于肿瘤细胞株上^[4-6],但目前尚未发现有人研究其对恶性畸胎瘤细胞的作用。

本实验应用 MTT 比色法观察苦参碱对 PA-1 细胞的影响,与空白对照相比,大剂量的苦参碱 (0.25、0.50、1.00 mg/mL) 不仅具有抑制 PA-1 细胞增殖的作用,还能明显诱导其凋亡甚至坏死。流式细胞术结果显示,其呈现剂量依赖性和时间依赖性。

正常细胞周期主要由 G₁、S、G₂ 和 M 期组成。G₀ 期是暂时脱离细胞周期不进行增殖的时期。G₁-S 相和 G₂-M 相转换处各有一个节点,通过对这两个节点的控制可调控细胞周期的进程,使不同的细胞周期事件在时间和空间上相互协调^[7]。本实验结果表明,与空白对照组相比,随着苦参碱浓度的增加,G₀-G₁ 期占细胞周期的比例增加,表明苦参碱主要作用于 PA-1 细胞的 G₁/S 节点,使细胞停滞于 G₁ 期。

本研究发现苦参碱诱导 PA-1 细胞凋亡时 bcl-2 表达强度降低,并具有浓度依赖性,同时,也发现了 bax 的

表达随着药物浓度及凋亡指数的增加而增加,且有浓度依赖性,这些都提示了 bcl-2 和 bax 在 PA-1 细胞凋亡的发生发展中同样具有调节作用。提示苦参碱作用 PA-1 细胞后使其 bcl-2 和 bax 基因的表达发生了变化,出现 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 的比值下调,可能一方面诱导细胞发生凋亡,另一方面调节细胞周期,产生 G₁ 期阻滞,最终导致 PA-1 细胞在体外的增殖受到明显抑制,为以后恶性畸胎瘤临床药物治疗提供了一定的参考价值。

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[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375 (2):264-269.

[2] Sood AK, Buller RE. Drug resistance in ovarian cancer: from the laboratory to the clinic[J]. Obstet Gynecol, 1998, 92(2):312-319.

[3] 陈鸿雁,王驰,余晓燕,等.常用抗肿瘤药物对 KBV200 耐药细胞株增殖抑制作用及苦参碱的耐药逆转研究[J].第三军医大学学报,2006,28(11):1231-1233.

Chen HY, Wang C, Yu XY, et al. Inhibitory effect of 5 chemotherapeutic agents on KBV200 cell line and reverse effect on multidrug resistance of matrine[J]. Acta Acad Med Milit Tertiae, 2006, 28(11):1231-1233.

[4] 司维柯,潘静,陆华,等.苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J].世界华人消化杂志,2001,9(2):185-189.

Si WK, Pan J, Lu H, et al. Study on matrine in inhibiting proliferation of HepG2 cell and the relation between its dosage and inhibiting style[J]. World Chin Dig, 2001, 9(2):185-189.

[5] 彭彦辉,郝玉宾,史迎钦,等.苦参碱对肠癌 HT-29 细胞株增殖的抑制作用及其机制[J].中华实验外科杂志,2005,22(11):1353-1354.

Peng YH, Hao YB, Shi YQ, et al. Mechanism of matrine in suppressing HT-29 cell line proliferation[J]. Chin J Exp Surg, 2005, 22(11):1353-1354.

[6] 喻巍,李彬,任若瑾,等.苦参碱对人视网膜母细胞瘤细胞生长与端粒酶活性影响的实验研究[J].中华眼科杂志,2006,42(7):594-599.

Yu W, Li B, Ren RJ, et al. The effects of matrine on cell proliferation and telomerase activity in retinoblastoma cells in vitro[J]. Chin J Ophthalmol, 2006, 42(7):594-599

[7] Israels ED. The cell cycle[J]. Stem Cell, 2001, 19 (1):88-91.

(收稿:2009-04-09 修回:2010-03-03)