

苦参碱对 MCF-7 细胞 Fas、VEGF 及端粒酶活性的影响

李海军¹ 王俊明¹ 田亚汀¹ 白美玲¹ 张林西¹ 赵晓霞²

摘要 **目的** 研究苦参碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Fas、VEGF 及端粒酶活性的影响。**方法** 体外培养人乳腺癌 MCF-7 细胞,随机分组,实验组细胞加入苦参碱溶液,对照组或阴性对照组细胞加入等量培养液,阳性对照组细胞加入端粒酶抑制剂莪术油。采用倒置显微镜下观察细胞形态学变化;TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性;免疫细胞化学法检测 MCF-7 细胞中 Fas、VEGF 蛋白表达情况。**结果** 苦参碱对乳腺癌细胞有明显的生长抑制作用和促凋亡作用;不同浓度苦参碱处理 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后,端粒酶活性随苦参碱浓度增加和作用时间延长而逐渐下降,呈剂量—效应正相关和时间—效应正相关;苦参碱能够上调 MCF-7 细胞 Fas 蛋白表达和下调 MCF-7 细胞 VEGF 蛋白表达。**结论** 苦参碱对 MCF-7 细胞具有明显的生长抑制作用和促凋亡作用,可能是通过上调 Fas 蛋白表达、抑制端粒酶活性诱导乳腺癌细胞凋亡及通过下调 VEGF 蛋白表达,抑制肿瘤血管形成等实现的。

关键词 苦参碱;乳腺癌;MCF-7 细胞株;Fas;VEGF;端粒酶活性

Effect of Matrine on Fas, VEGF, and Activities of Telomerase of MCF-7 Cells LI Hai-jun¹, WANG Jun-ming¹, TIAN Ya-ting¹, BAI Mei-ling¹, ZHANG Lin-xi¹, and ZHAO Xiao-xia² 1 Department of Pathology, Faculty of Forensic Medicine, Hebei North College, Hebei (075000), China; 2 First Ophthalmology Department, Fourth Hospital of Zhangjiakou City, Hebei (075000), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of matrine on Fas, VEGF, and activities of telomerase of MCF-7 cells. **Methods** *In vitro* cultured human breast cancer MCF-7 cells were randomly divided into the experimental group and the control group. The matrine solution was added in cells of the experimental group. Equal volume of culture medium was added in cells of the control group or the negative control group. Zedoary Turmeric Oil, the telomerase inhibitor was added in cells of the positive control group. Morphological changes were observed under an inverted microscope. The telomerase activity was detected by TRAP-ELISA. Expressions of Fas and VEGF protein were detected by immunocytochemical assay. **Results** Matrine obviously inhibited the growth and induced apoptosis of breast cancer cells. MCF-7 cells were treated by matrine of different concentrations at 24, 48, and 72 h, the telomerase activity gradually decreased along with increased matrine concentration and prolonged action time, showing dose-effect and time-effect positive relations. Matrine could up-regulate Fas protein expression and down-regulate VEGF protein expression of MCF-7 cells. **Conclusion** Matrine showed obvious effect in inhibiting the growth of MCF-7 cells and promoting the apoptosis, which might be achieved by up-regulating the expression of Fas protein, inhibiting telomerase activity induced apoptosis of breast cancer cells, down-regulating the expression of VEGF protein, and inhibiting the tumor vascular formation.

KEYWORDS matrine; breast cancer; MCF-7 cell line; Fas; VEGF; telomerase activity

苦参碱(matrine, MAT)是从苦参、苦豆子等豆科

槐属植物中提取的一种重要生物活性碱,近来发现,苦参碱对肝癌、肺癌、胃癌、大肠癌等多种癌细胞具有较强的抑制作用和促凋亡作用^[1-4]。目前,有关苦参碱诱导乳腺癌细胞凋亡等相关报道却较为少见。本实验采用体外实验的方法,观察苦参碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Fas、VEGF 及端粒酶活性的影响,探讨苦参碱抗乳腺癌可能的作用机制,现报道如下。

基金项目:2012 年度河北省科技支撑计划项目(No. 12277748)

作者单位:1.河北北方学院法医学系病理教研室(河北张家口 075000);2.张家口市第四医院眼科(河北张家口 075000)

通讯作者:李海军, Tel:18931316135, E-mail:290150304@qq.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 09. 1247

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株及药物 乳腺癌细胞株 MCF-7 由我院实验中心细胞室提供。苦参碱购自北京双鹭药业股份有限公司(批号:20080102),使用前用培养液溶解稀释成所需浓度。莪术油注射液购自苏州长征-欣凯制药有限公司(批号:H20057098),使用前用培养液溶解稀释成所需浓度。

1.2 主要试剂及设备 RPMI-1640 培养液购自凯基生物科技发展有限公司;新生胎牛血清购自天津市川页生化制品有限公司;消化液:0.25%胰酶加 0.02 EDTA 1:3 混合,胰酶购自普京康生物制品有限公司;兔抗人 Fas 抗体、兔抗人 VEGF 试剂盒购自博士德生物工程有限公司;端粒酶 TRAP-ELISA 试剂盒购自北京五洲元业生物工程有限公司;PCR 扩增仪(JK2633)为美国产品;Stat Fax-2100 酶标仪为美国产品;3319 型 CO₂ 培养箱购自美国 Forma 公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养 MCF-7 细胞用含 10% FCS、100 u/mL 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液,在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育,每 24 h 换液、传代,使用前胰酶消化。

2.2 倒置显微镜下观察 设实验组和对照组,随机选取对数期生长的 MCF-7 细胞分成 5 份,实验组分别加入苦参碱溶液使其终浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL,对照组加入与实验组等量的培养液。两组孵育 24 h,胰酶消化后在倒置显微镜下观察。

2.3 TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性 设阴性对照组、阳性对照组和实验组,随机选取对数期生长的 MCF-7 细胞 6 份,并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,实验组分别加入苦参碱溶液使其终浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL,阴性对照组加入与实验组等量的培养液,阳性对照组加入端粒酶抑制剂莪术油溶液使其终浓度为 300 μ g/mL^[5]。将各组接种于 96 孔板内(各设 4 个复孔),分别作用 24、48、72 h 后,按照试剂盒说明书对端粒酶活性进行检测。酶标仪分别测定 450 nm 和 595 nm 的 OD 值,其差值(A450-A595)则代表端粒酶活性。实验重复 30 次。

2.4 免疫细胞化学法检测 MCF-7 细胞中 Fas 蛋白、VEGF 蛋白表达

2.4.1 细胞爬片的制备 随机选取对数期生

长的 MCF-7 细胞胰酶消化、悬浮后,调整细胞浓度为 2×10^4 /mL,置已放入盖玻片的六孔板内,盖玻片细胞生长 2~3 天后,选取细胞生长良好、密度一致的盖片进行分组,实验组分别加入苦参碱溶液使其终浓度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL,对照组加入与实验组等量的培养液,两组孵育 24 h 后进行 4% 多聚甲醛固定 30 min,吸去多聚甲醛,换用 0.01% PBS 缓冲液冲洗、浸泡,每天更换冲洗液避免爬片干燥,备用。

2.4.2 免疫细胞化学检测 各取实验组和对照组细胞爬片均分别滴加稀释后的 I 抗 Fas 及 VEGF 兔抗人单克隆抗体,37 ℃ 恒温箱中孵育 30 min。0.01% PBS 缓冲液洗涤 3 次后分别滴加 II 抗,再次 37 ℃ 恒温箱中孵育 30 min 后 DAB 显色,苏木素、伊红染色,酒精梯度脱水、透明、封片。同时以已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。实验重复 30 次。

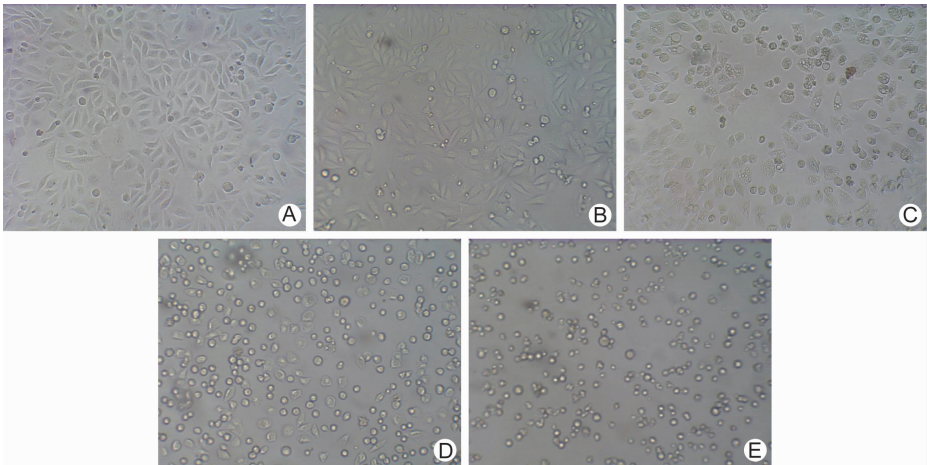
2.4.3 结果判断 免疫组织化学染色图像处理:用 OLYMPUS-BH-2 显微镜拍照,以乳腺癌 MCF-7 细胞浆内和细胞膜出现棕黄色颗粒视为阳性细胞,每张切片随机选择 5 个高倍视野拍照。对照组及各浓度组用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分别测定 Fas、VEGF 蛋白的平均积分光密度。

3 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 倒置显微镜下观察结果(图 1) 对照组 MCF-7 细胞透亮,核大,位于细胞中心,胞浆呈梭形或多突起形,突起较长。实验组乳腺癌细胞出现不同程度突起短缩、胞浆减少,逐渐变圆,随药物浓度的提高改变更加明显。胞浆内可见大小不等的空泡,尤其 0.50 mg/mL 苦参碱组最为明显。细胞核固缩、碎裂,呈圆形、卵圆形或肾形,被挤向细胞一侧,实验各组均见细胞膜局部向外膨出——出芽现象,2.00 mg/mL 苦参碱组中出芽细胞更为多见,有的呈现典型的玫瑰花环状。提示苦参碱对乳腺癌细胞有明显的生长抑制作用和促凋亡作用。

2 苦参碱对 MCF-7 细胞端粒酶活性的影响(表 1) 不同浓度苦参碱组作用 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后,端粒酶活性在各时间段均随苦参碱浓度的增加而逐渐下降,与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),呈剂量—效应正相关;阳性对照组与阴性



注:A 为对照组; B 为 0.25 mg/mL 苦参碱组; C 为 0.50 mg/mL 苦参碱组; D 为 1.00 mg/mL 苦参碱组; E 为 2.00 mg/mL 苦参碱组; 下图同

图 1 不同浓度苦参碱作用 MCF-7 细胞倒置显微镜下观察结果 (×100)

表 1 苦参碱对 MCF-7 细胞端粒酶活性的影响

组别	n	端粒酶活性(OD 值, $\bar{x} \pm s$)			F 值	P 值
		24 h	48 h	72 h		
阴性对照	30	3.742 ± 0.042	3.413 ± 0.074 [▲]	3.123 ± 0.029 ^{▲○}	11.22	<0.05
阳性对照	30	2.718 ± 0.430 [△]	2.435 ± 0.516 ^{△▲}	2.207 ± 0.273 ^{△▲○}		
0.25 mg/mL 苦参碱	30	3.179 ± 0.089 ^{*△}	2.612 ± 0.057 ^{*△▲}	2.381 ± 0.059 ^{*△▲○}		
0.50 mg/mL 苦参碱	30	2.910 ± 0.058 ^{*△}	2.374 ± 0.049 ^{△▲}	1.917 ± 0.146 ^{*△▲○}		
1.00 mg/mL 苦参碱	30	2.655 ± 0.056 [△]	2.019 ± 0.072 ^{*△▲}	1.469 ± 0.041 ^{*△▲○}		
2.00 mg/mL 苦参碱	30	2.149 ± 0.053 ^{*△}	1.542 ± 0.054 ^{*△▲}	0.535 ± 0.053 ^{*△▲○}	7 008.72	<0.05
F 值		254.90	246.45	1 328.33		
P 值		<0.05	<0.05	<0.05		

注:与阳性对照组同期比较,* $P < 0.05$;与阴性对照组同期比较,[△] $P < 0.05$;与本组 24 h 比较,[▲] $P < 0.05$;与本组 48 h 比较,[○] $P < 0.05$

对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),并随作用时间的增加对端粒酶的抑制作用增强($P < 0.05$);苦参碱组与阳性对照组比较,除 24 h 时间段 1.00 mg/mL 苦参碱组和 48 h 时间段 0.50 mg/mL 苦参碱组与阳性对照组比较,差异无统计学意义外($P > 0.05$),其余各时间段苦参碱各浓度组与阳性对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 苦参碱对 MCF-7 细胞 Fas、VEGF 蛋白表达的影响(图 2、3,表 2) 不同浓度苦参碱处理 MCF-7 细胞 24 h 后,乳腺癌细胞 Fas、VEGF 蛋白阳性表达在细胞浆内和细胞膜上呈棕黄色颗粒,随苦参碱浓度的增高 Fas 蛋白在 MCF-7 细胞中表达的数量逐渐增多,棕黄色颗粒颜色也逐渐加深;阳性目标平均积分光密度值呈上升趋势,不同浓度组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随苦参碱浓度的增高 VEGF 蛋白在 MCF-7 细胞中表达的数量则逐渐减少,棕黄色颗粒颜色也逐渐变淡;阳性目标平均积分光密度值呈

下降趋势,不同浓度组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乳腺癌细胞 Fas 蛋白与 VEGF 蛋白表达呈负相关($r = -0.9057$)。

讨 论

端粒(telomere)是存在于染色体末端的 DNA 重复序列,其长度随细胞的每一次复制逐渐缩短。细胞复制一定次数后,短缩的端粒使染色体相互融合,导致细胞死亡。端粒酶是端粒专一的逆转录酶,能以自身 RNA 组分为模板合成 TTAGGG 重复序列,并将其加到正在复制的染色体末端以弥补端粒的丢失,而使细胞寿命延长甚至获得永生^[6]。近年来研究发现,端粒酶活性在许多肿瘤细胞中都存在异常增高,有人发现端粒酶在乳腺癌中 85.2% 表现阳性,有淋巴结转移的 93.2% 端粒酶阳性,高于无淋巴结转移的乳腺癌 77.3%,并认为端粒酶活化在乳腺癌的发生过程中起重要作用^[7],抑制端粒酶活力有可能阻止肿瘤细胞

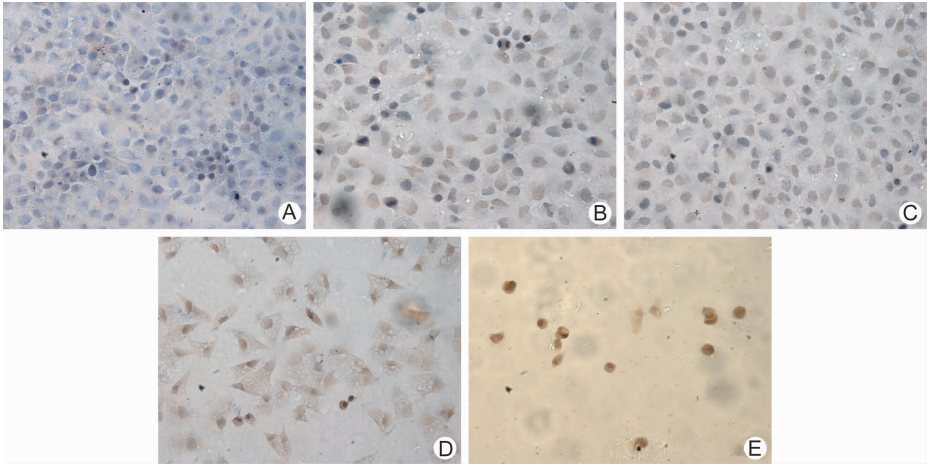


图2 苦参碱处理后 MCF-7 细胞中 Fas 蛋白的表达 (SP 法×400)

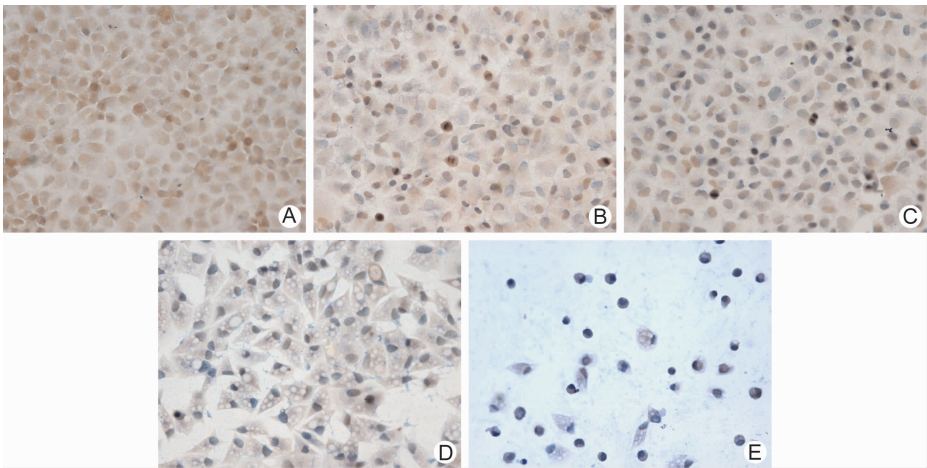


图3 苦参碱处理后 MCF-7 细胞中 VEGF 蛋白的表达 (SP 法×400)

表2 Fas、VEGF 蛋白阳性表达目标平均
积分光密度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas	VEGF
对照	30	22 715.65 ± 3 094	77 986.46 ± 6 941
0.25 mg/mL 苦参碱	30	26 580.72 ± 4 163 *	56 725.37 ± 4 967 *
0.50 mg/mL 苦参碱	30	26 700.86 ± 3 816 *	44 826.67 ± 4 013 *
1.00 mg/mL 苦参碱	30	45 010.03 ± 4 547 *	32 201.56 ± 3 874 *
2.00 mg/mL 苦参碱	30	48 113.63 ± 6 248 *	5 073.83 ± 684 *
F 值		206.05	1 066.57
P 值		<0.05	<0.05

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

恶性增殖,这种特性使端粒酶成为当今肿瘤研究的热点。本研究发现苦参碱能够促进 MCF-7 细胞凋亡,并随苦参碱浓度的增加及作用时间的延长端粒酶活性逐渐降低,也就是说苦参碱对端粒酶的抑制作用存在剂量一效应和时间一效应的正相关。这有可能说明,苦参碱能够有效抑制端粒酶活性,并有可能通过抑制端粒酶活性而诱导乳腺癌细胞凋亡。

Fas 蛋白是存在于细胞表面的 I 型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员之一^[8]。Fas 介导的细胞凋亡通常由 Fas 与其配体 FasL 结合所触发,FasL 分子以同三聚体形式和 3 个 Fas 分子交联形成死亡诱导信号复合体,与 Caspase- 8 的前体 FLICE 相互作用,经蛋白酶水解后活化,活化的 Caspase- 8 形成异四聚体,并剪切 Procaspase- 3 等蛋白,释放并活化 Caspase- 3,诱导细胞凋亡^[9]。肿瘤的生长有赖于血管的形成,如无新生血管生成提供营养,肿瘤细胞就不能继续生长。研究发现,VEGF 是目前发现最强的血管活性因子,可由肿瘤细胞本身和炎细胞(主要是巨噬细胞)产生。VEGF 与血管内皮细胞和成纤维细胞表面的血管生成因子受体结合,促进血管内皮细胞分裂、增殖及毛细血管出芽,形成新生毛细血管,进而促进肿瘤持续生长、肿瘤基质形成。

本实验发现,不同浓度苦参碱处理 MCF-7 细胞后,乳腺癌细胞 Fas 蛋白表达明显增高,并随苦参碱

浓度的增加 Fas 蛋白表达也逐渐增高($P < 0.05$)。与之相反,乳腺癌细胞 VEGF 蛋白表达则明显降低,并随苦参碱浓度的增加 VEGF 蛋白表达也逐渐降低($P < 0.05$)。因此,本研究认为,苦参碱有可能通过某种途径激活或增强了 Fas 蛋白活性,触发一系列级联反应,进而诱导乳腺癌细胞凋亡。同时,苦参碱能够抑制 VEGF 的活性,抑制新生毛细血管的生成,进一步抑制乳腺癌细胞的生长、浸润和转移。本研究发现,乳腺癌细胞 Fas 蛋白和 VEGF 蛋白表达呈负相关,提示苦参碱可能通过多种或某种途径在激活肿瘤坏死因子受体 Fas 的同时下调 VEGF 蛋白表达,或者上调 Fas 蛋白后,进而触发 VEGF 蛋白的下调。

综上所述,苦参碱能够通过多种途径抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长,可能通过激活或上调 Fas 蛋白受体、抑制端粒酶活性诱导乳腺癌细胞凋亡,通过下调 VEGF 蛋白表达,抑制肿瘤血管形成,进而抑制乳腺癌细胞增殖。激活 Fas 蛋白受体,抑制端粒酶活性及 VEGF 蛋白表达,有望成为临床治疗乳腺癌的新靶点。苦参碱可能兼具多重攻击这些新靶点的功能,产生联合、协同的效果,诱导乳腺癌细胞凋亡和抑制其生长,苦参碱极有可能成为临床治疗乳腺癌更加有效的化疗药物之一。

参 考 文 献

[1] Wu XZ, Xie GR. Induced differentiation of hepatocel-

lular carcinoma by natural products[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2008, 5(4): 325-331.

- [2] Wang Y, Zhang Z, Garbow JR, et al. Chemoprevention of lung squamous cell carcinoma in mice by a mixture of Chinese herbs[J]. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2009, 2(7): 634-640.
- [3] Dai ZJ, Gao J, Ji ZZ, et al. Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(1): 91-96.
- [4] 周喜汉,韦星,黄赞松,等. 苦参碱诱导人结肠癌 SW1116 细胞凋亡及机制探讨[J]. 山东医药, 2008, 48(43): 19-20.
- [5] 石嵘,姜立,周珏宇,等. 莜术油对乳腺癌 MCF-7 细胞端粒酶活性及 DNA 损伤反应的调控作用[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 350-354.
- [6] 任妮丽,吴方毅,吴宏杰,等. 重组人干扰素 α -2b 对乳腺癌 MCF-7 细胞端粒酶活性的影响[J]. 湖北医药学院学报, 2011, 30(1): 29-31.
- [7] 陈亚民,宋蔚青. 乳腺癌相关生物学预后因子的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(10): 2107-2109.
- [8] 赵明玄,汪静,邓敬兰,等. 放射性碘标记 RC-160 对 A549-hSSTR2 细胞受体内化及杀伤作用的研究[J]. 中华核医学杂志, 2007, 27(2): 73-76.
- [9] 肖钟迪,张玉成,梁春林,等. 放射性 ^{125}I 粒子植入对裸鼠人乳腺癌细胞移植瘤的抗肿瘤作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2011, 37(2): 275-278.

(收稿:2013-02-07 修回:2013-06-08)

第八次全国中西医结合男科学术会议在开封召开

第八次全国中西医结合男科学术会议于 8 月 23—25 日在古都开封举行。本次会议由中国中西医结合学会男科专业委员会主办,河南省中医院和河南省中西医结合男科专业委员会共同承办。本次大会收到专题报告课件 30 个,论文 391 篇,其中男性不育 120 篇,前列腺疾病 87 篇,性功能障碍 90 篇,男性杂病 77 篇,不孕不育 77 篇。本次会议的主题为“传承创新特色疗法,建设中国特色男科”,与会专家交流了男科领域近年来的最新技术和中医特色疗法,从而推进我国男科事业又好又快发展。本次会议专题报告内容丰富,热点讨论新颖,精彩纷呈,讨论集聚了国内著名专家的观点,也活跃了学术交流的气氛,与会代表的积极参与,获得了预期效果。

(本刊讯)