

· 基础研究 ·

小檗碱干预食管癌细胞基因表达及
剪切作用研究

刘学俊 马俊华 吴耀松 尹素改 周 凌 陈玉龙 任闪闪

摘要 **目的** 观察小檗碱对食管癌细胞生长影响,探讨其作用机制。**方法** 于 37 ℃,5%CO₂培养箱常规培养食管癌细胞株 EC-9706 和 ECa-109,设对照组、小檗碱组(12.5、25、50、100、200 mg/L),MTT 法检测小檗碱对细胞生长的抑制作用;Trizol 法抽提总 RNA,基因表达谱芯片检测细胞基因表达,RT-qPCR 检测部分差异基因及包含内含子的 β -tubulin 和 Actin 表达片段。**结果** 小檗碱可抑制管癌细胞株 EC-9706 和 ECa-109 生长,IC₅₀ 值分别为 12.33、49.63 mg/L;小檗碱干预后得到差异基因 1 782 个,下调基因数占差异基因比率为 78.84%。这些基因主要参与剪切子、癌通路、核糖体等信号通路。与对照组比较,小檗碱组 SF3B3、SNRPD1、NCBP1 mRNA 表达降低($P < 0.01$),包含内含子的 β -tubulin 和 Actin mRNA 表达片段增加($P < 0.01$)。**结论** 小檗碱可抑制食管癌细胞生长,干预多个肿瘤相关基因表达,可通过干预剪切体相关基因影响 RNA 成熟。

关键词 小檗碱;食管癌细胞;基因表达谱芯片;差异基因;剪切体

Effects of Berberine on Gene Expression and Splicing in Esophageal Carcinoma Cells LIU Xue-jun, MA Jun-hua, WU Yao-song, YIN Su-gai, ZHOU Ling, CHEN Yu-long, and REN Shan-shan
Molecular Biology Laboratory, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou (450036)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of berberine on the growth of esophageal cancer cells and explore its mechanism. **Methods** Esophageal carcinoma cells lines EC-9706 and ECa-109 were cultured with conventional method at 37 ℃, 5% CO₂ incubator, which was divided into the control group and berberine group (12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L), inhibition of drugs on cell growth was tested by MTT assay. And the total RNA was extracted by Trizol, gene expression was detected by gene expression microarray, and the part differential genes and beta-tubulin and Actin gene expression fragments included introns detected by RT-qPCR. **Results** Berberine could inhibit EC-9706 and ECa-109 cancer cell growth, the IC₅₀ values for two cell lines was 12.33 mg/L and 49.63 mg/L respectively. There were 1 782 differential genes, and down regulated genes accounted for 78.84% of all differentially expressed genes. These genes mainly participated in the spliceosome, cancer pathway, ribosome pathway. Compared with the control group, the expressions of SF3B3, SNRPD1, and NCBP1 mRNA decreased in the berberine group($P < 0.01$). **Conclusion** Berberine can inhibit the growth of esophageal cancer cells, interfere with the expression of several tumor related genes, and affect RNA maturation via the intervention of spliceosome related genes.

KEYWORDS berberine; esophageal cancer cells; gene expression microarray; differential gene; spliceosome

食管癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率居各类恶

性肿瘤的第 5 位,死亡率居第 4 位,五年生存率不到 15%。我国每年约有 25 万新诊断的食管癌病例,占全世界食管癌病例数的 50%,并以食管鳞癌为主,河南省林州市是食管鳞癌高发区^[1,2]。小檗碱是黄连主要有效成分,具有一定抗菌、消炎、抗心律失常、降血糖等多重效应,近年来研究表明具有抑制胃癌、肝癌等肿

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81173177)

作者单位:河南中医药大学分子生物实验中心(郑州 450036)

通讯作者:陈玉龙, Tel: 0371-65680206, E-mail: cyl72621@

163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180412.014

瘤细胞生长作用^[3,4]。本研究观察了小檗碱对食管癌细胞生长的抑制作用,并应用基因表达谱芯片技术探讨了其作用机制,报道如下。

材料与方法

1 细胞株 人食管癌 EC-9706 细胞株购于北纳创联生物技术有限公司(货号:BNCC337687),ECa-109 细胞株购于中国科学院上海生科院细胞资源中心(货号:TCHu 69),由河南中医药大学分子生物实验中心所保存、培养、传代。

2 药物 盐酸小檗碱(纯度 98%,中国药品生物制品检定所,批号:110713-200911)应用 DMSO 进行溶解,浓度为 20 mg/mL, -20 ℃ 冰箱储存备用。

3 主要试剂及仪器 RPMI Medium 1640(批号:31800-500)、胰蛋白酶消化液(批号:T1320-100)、四甲基偶氮唑蓝 MTT(批号:M8180)均购自北京索莱宝科技有限公司,二甲基亚砜(DMSO Amresco,美国,批号:D8370),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:130823),Trizol Reagent(Life technologies,美国,Cat#15596-018),RNeasy microkit(QIAGEN,德国,Cat#74004),RNase-Free DNaseSet(QIAGEN,德国,Cat#79254)。引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,NCBP1 正引物:5'-GCAGTGGGCTATTGGTGGTT-3';反引物:5'-GGTTTTTGTAGACAGGAGT-CATTTTAA-3'(产物 140 bp)。SF3B3 正引物:5'-CCATCACCTCCACCCACTCT-3';反引物:5'-CTCTGCCAAGGCGTTGATTC-3'(产物 66 bp)。SNRPD1 正引物:5'-TCATTCTGTGGCACCTAC-CC-3';反引物 5'-CCCCATCCCATAAGGACTTT-3'(产物 80 bp)。β-tubulin intron 2 F 5'-CTATAAAC-CTTCCCTTCTGCC AG-3';β-tubulin exon 4 R 5'-CAGGGTATTCTTCTCGCATCTTGCTG-3'(产物 680 bp)。Actin exon 3 F 5'-GGTGGGCATGGGT-CAGAAAGGAT-3';Actin intron 4 R 5'-GGAAAT-GAGGGCAGGACTTAGCTT-3'(产物 1 200 bp)。GAPDH 正引物:5'-TGA CTTC AACAGCGACAC-CCA-3',反引物:5'-CACCTGTGCTGTAGC-CAAA-3'(产物 121 bp)。细胞培养箱(Galaxy170R,Eppendorf,德国),倒置显微镜(Axiovert 25,ZEISS,德国),紫外分光光度计(BioMate5,Thermo Fisher,美国),生物安全柜(SG-603,Bake,美国),酶标仪(ELx800 型,Bio-Tek,美国),定量 PCR(ABI 7900 HT Sequence Detection System,美国),Hy-

bridization Oven(Affymetrix, 645 P/N 00-0331, 220V, 美国),Fluidics Station(Affymetrix, 450 P/N 00-0079, 美国),GeneChip Scanner(Affymetrix, 3000 P/N 00-00212, 美国),芯片(Affymetrix Human Genome U219 array Strip, 美国)。

4 细胞培养方法 食管癌细胞株 Eca109 和 Ec9706 于含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基中,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中静置培养,每 2 天更换 1 次培养液。当细胞处于对数生长期且长满培养瓶底壁大于 80% 时,弃去培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶 37 ℃ 消化 2~3 min,传代。

5 检测指标及方法

5.1 MTT 法检测小檗碱细胞增殖 以 1×10^4 个细胞/孔接种 96 孔培养板,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h。设对照组(为含有与各剂量小檗碱组等浓度 DMSO 的完全培养基)、小檗碱组,每组 4 个复孔,以倍比稀释方法设置计量,计算半数抑制率^[5],小檗碱剂量为 12.5、25、50、100、200 mg/L,继续培养 48 h,去除培养上清,每孔加入 0.5 mg/L 的 MTT 100 μL,继续培养 4 h,小心吸去上清,并加入 150 μL DMSO 溶解紫色沉淀,用酶标仪在波长为 A_{570/630} nm,测定 A(吸收度)值。按公式:抑制率(%) = (1 - 实验孔平均 A_{570/630} 值/对照孔平均 A_{570/630} 值) × 100%。重复 3 次实验。

5.2 表达谱基因芯片检测 1×10^6 个细胞/皿种植细胞,于 37 ℃,5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 48 h,弃去旧液,用 4 ℃ PBS 清洗 2 次,置于冰上,Trizol 法抽提总 RNA,电泳质检、纯化。实验样品 RNA 采用 Affymetrix 表达谱芯片配套试剂盒,严格按照标准操作流程对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大、标记和纯化,获得带有生物素(biotin)标记的 cRNA。按照 Affymetrix 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒,在滚动杂交炉中 45 ℃,16 h 滚动杂交,杂交完成后在洗涤工作站进行芯片的洗涤。芯片结果采用 GeneChip Scanner 3000 进行扫描,用 Command Console Software 3.1 读取原始数据,质控合格的数据采用 Gene Spring Software 11.0(Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)进行归一化处理,所用的算法为 MAS5.0。之后应用 BRB-ArrayTools 4.2 进行处理,将 EC9706 和 EC109 组的基因进行倍数检验,得 Geometric mean of intensities(正常/小檗碱) < 0.5 的为下调基因;Geometric mean of intensities(正常/小檗碱) > 2.0 的为上调基因。利用在线的 David 工具 <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>,分析靶基因本体功能和信号通路。

5.3 RT-qPCR cDNA 第一链合成:总 RNA 1 μg , 5x miScript HiFlex Buffer 4 μL , 10 $\times$ miScript Nucleics Mix 2 μL , miScript Reverse Transcriptase Mix 2 μL , H_2O 、RNA template 共 20 μL , 将 PCR 管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存; SYBR Green qPCR: 2 $\times$ SYBR Green PCR buffer 5 μL Forward primer (10 μmol) 0.2 μL , Reverse primer (10 μmol) 0.2 μL , Template 5 ng, ddH₂O, 适量, 总体积 10 μL , 将 PCR 管子置于 PCR 仪中进行反应, 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min 然后 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 接着进行 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。仪器使用 ABI 7900 HT Sequence Detection System。检测每个样品的管家基因, 将目的基因归一化, 以先得到 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{待测基因}} - \text{Ct}_{\text{管家基因}}$, 再转换为原始模板浓度 = $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 。

6 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 19.0 数据统计软件进行单因素方差分析, 应用 Pearson 相关分析检测药物抑制效果剂量依赖关系, 概率法计算半数抑制率, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小檗碱对细胞增殖的影响 (图 1) 小檗碱能抑制食管癌细胞增殖, 并具有剂量依赖性 ($r_{\text{Ec9706}} = 0.904, P = 0.035$; $r_{\text{Eca109}} = 0.981, P = 0.003$)。Ec9706 和 Eca109 细胞株增殖抑制的 IC_{50} 值分别为 12.33、49.63 mg/L。

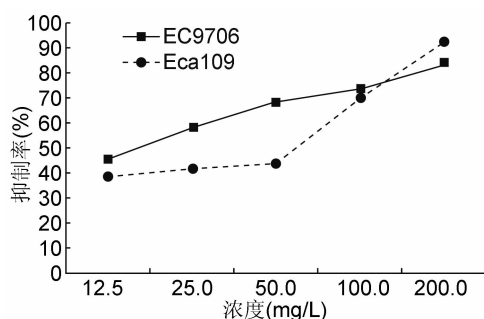


图 1 小檗碱对食管癌细胞增殖抑制作用

2 差异基因数量及其本体功能和信号通路 (图 2) 将正常组和小檗碱组基因进行倍数检验, 得到差异基因 1 782 个, 下调基因有 1 405 个, 占差异基因比率 78.84%; 上调基因有 377 个。本体功能发现, 上调基因参与的主要生物过程为细胞周期、核分裂、DNA 复制、糖代谢及脂肪代谢调节、组蛋白修饰、细胞程序死亡调节等, 参与分子功能主要有核苷酸结合、钙

调素结合、磷脂酶活性、转录因子活性、氨基酸转膜转运活性等。下调基因参与的生物过程主要有转录调节、核小体组织、RNA 代谢过程、细胞应激反应、氮复合物代谢调节、大分子复合物组装等, 参与的分子功能有核酸结合结合、转录调节活性、热休克蛋白结合、锌离子结合、非折叠蛋白结合等。上调基因主要参与 KEGG PATHWAY 主要有癌通路、嘧啶代谢、Hedgehog 信号通路、胰岛素信号通路、细胞周期、叶酸生物合成等; 下调基因参与 KEGG PATHWAY 的主要系统性红斑狼疮、剪切体、核糖体和 MAPK 信号通路等。其中发现和剪切子相关差异基因 21 条 (上调 12 条, 下调 9 条)。

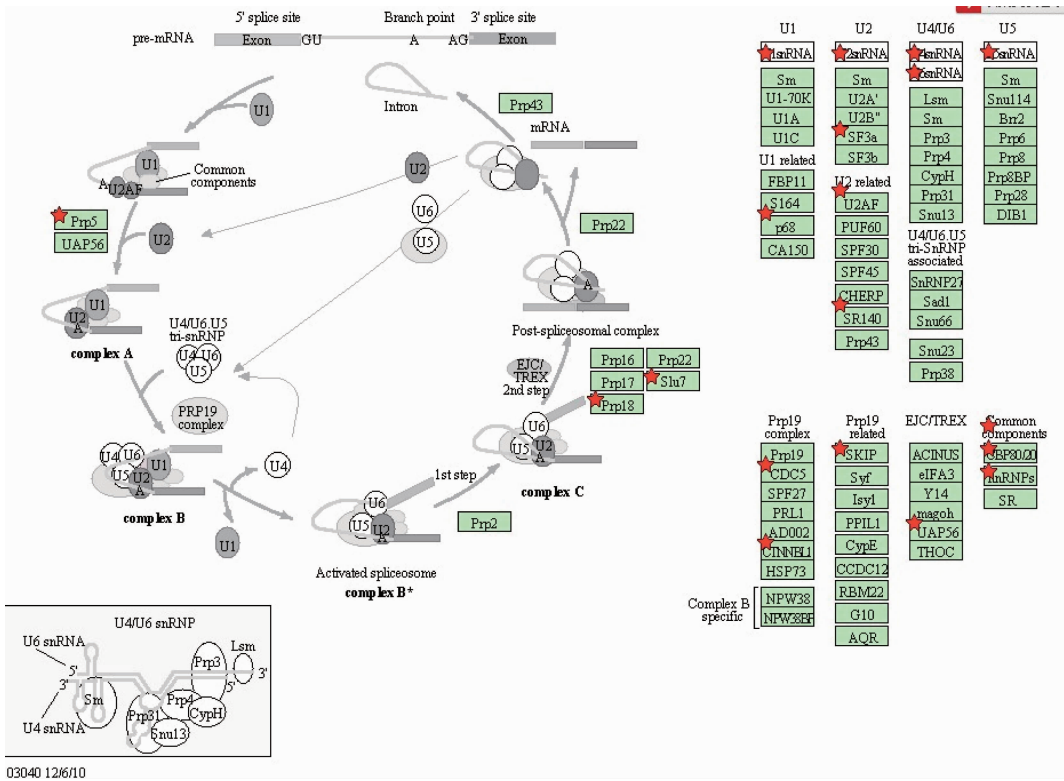
3 两组食管癌细胞剪切子相关基因及含有内含子看家基因转录片段表达比较 (表 1) 与对照组比较, 小檗碱组 Ec9706 和 Eca109 细胞中 SF3B3、SNRPD1、NCBP1 mRNA 表达均下降 ($P < 0.01$)。而含有内含子 β -tubulin 和 Actin mRNA 增加 ($P < 0.01$)。

讨 论

小檗碱为中药黄连主要有效成分, 对多种肿瘤细胞生长具有一定抑制作用^[4,6]。在本研究中, 为了探究小檗碱对食管癌生长的影响, 以国内报道常应用的食管癌鳞癌细胞株 Ec9706 和 Eca109 作为研究对象, 这两个细胞为中国人所建立, Ec9706 来源于高分化鳞癌, Eca109 为低分化鳞癌, 比较能够代表中国人常见食管癌病理类型^[7]。结果发现, 小檗碱对这两个细胞株生长都有很好的抑制作用, 且具有剂量依赖性, 其中对 Ec9706 作用更强, 说明作为低分化鳞癌细胞株的 Eca109 细胞对药物敏感性更低, 在其他研究也有类似现象^[8]。

为了进一步分析小檗碱对食管癌细胞生长抑制的作用机制, 本研究应用 Affymetrix 公司基因表达谱芯片 HG-U219 Array 进行检测, 该芯片所含有 36 000 转录本, 代表 20 000 条基因。为了研究药物在等效状态下对两个细胞株的作用, 在药物剂量上, 两个细胞株应用各半数抑制率剂量进行干预。差异基因判断时, 采用两个细胞株同一基因表达数量的平均值, 计算其在干预组和对照组的比率。

结果发现, 小檗碱可抑制食管癌细胞株多个生物过程和细胞功能的基因表达, 比如抑制细胞周期相关基因多达 97 个, 说明它可以通过干预细胞周期抑制食管癌细胞增殖; 已有研究表明是小檗碱可以使前列腺癌、鼻咽癌、乳腺癌等周期阻滞^[9-11]。小檗碱还可抑



注:红色为差异基因

图 2 剪切子相关差异基因

表 1 两组食管癌细胞剪切子相关基因及含有内含子看家基因转录片段表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别		<i>n</i>	SF3B3 ($\times 10^{-3}$)	SNRPD1 ($\times 10^{-3}$)	NCBP1 ($\times 10^{-3}$)	β -tubulin ($\times 10^{-5}$)	Actin ($\times 10^{-5}$)
Ec9706	对照	3	1.30 $\pm$ 0.65	2.50 $\pm$ 0.87	0.57 $\pm$ 0.09	5.68 $\pm$ 1.32	0.31 $\pm$ 0.10
	小檗碱	3	0.30 $\pm$ 0.13 *	0.27 $\pm$ 0.10 *	0.10 $\pm$ 0.06 *	14.43 $\pm$ 2.68 *	1.38 $\pm$ 0.11 *
Eca109	对照	3	1.68 $\pm$ 0.60	2.60 $\pm$ 0.52	0.63 $\pm$ 0.19	4.87 $\pm$ 0.96	1.12 $\pm$ 0.42
	小檗碱	3	0.33 $\pm$ 0.17 *	0.45 $\pm$ 0.18 *	0.20 $\pm$ 0.08 *	29.45 $\pm$ 3.74 *	1.87 $\pm$ 0.66 *

注:与对照组比较, **P* < 0.01

制组蛋白修饰、DNA 复制相关基因,说明它可以干预食管癌细胞 DNA 复制和转录,从而抑制它生长。氨基酸转运、糖和脂肪代谢相关基因,提示小檗碱可以干预食管癌细胞能量代谢。在临床中,小檗碱可用于糖尿病的治疗,说明有影响物质能量代谢的可能^[12],已有研究也发现,小檗碱可干预某些肿瘤细胞的物质能量代谢^[13,14]。小檗碱抑制癌症相关通路基因多达 50 个,其中 NFKB1、E2F2、E2F3、STAT5B、FOXO1 等是和肿瘤生长密切相关的转录因子,而 PDGFA、BMP2 为生长因子,IGF1R、TGFR1、FGFR3、CSF2RA 为生长因子受体,AKT2、AKT1、SOS1、MAPK9 为通路蛋白激酶,由此说明小檗碱对细胞作用于多个靶点。另外,小檗碱对嘧啶代谢、细胞周期、Hedgehog 信号通路等相关基因都有抑制作用。

小檗碱可干预细胞剪切体相关基因多达 21 条。剪切体主要是由小分子的核 RNA 和蛋白质组成,前体信使 RNA 由多个内含子和外显子间隔形成,必须通过剪接体的作用去除内含子、连接外显子之后才能转变为成熟的信使 RNA,从而翻译成蛋白发挥生理效应,RNA 前切的异常与肿瘤发生、发展相关,并成为肿瘤治疗的靶点^[15,16]。由此说明小檗碱可干预细胞信使 RNA 成熟,这也可以解释差异基因中小檗碱可抑制基因表达比率高达 78.84% 的原因,因为表达谱基因芯片探针为针对基因转录的外显子,抑制了剪切就抑制成熟 RNA 数量。

为了验证小檗碱对剪切体干预作用,本研究应用定量 PCR 对剪切体 3 个基因 SF3B3、SNRPD1、NCBP1 进行了检测,发现小檗碱可以明显降低它们的表达,此与芯片结果一致,有研究发现 SF3B3 高表

达和乳腺癌预后密切相关^[17]。由于剪切功能失常后导致非成熟 RNA 增多,为了进一步说明小檗碱干预了剪切体,本研究还对看家基因 β -tubulin 和 Actin 非成熟 RNA 进行了检测,以 β -tubulin 第 2 个内含子序列正向,第 4 个外显子序列为反向引物;Actin 第 3 个外显子序列为正向,第 4 个内含子序列为反向为引物进行定量 RT-PCR。结果发现,小檗碱可以导致非成熟 β -tubulin 和 Actin RNA 增多,提示小檗碱的确能够干预细胞剪切体的功能。

总之,小檗碱可以抑制食管癌细胞生长,干预多个肿瘤相关基因表达,并可通过干预剪切体相关基因影响 RNA 成熟。

利益冲突:本研究为团队成员合作完成,不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma [J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2499-2509.
- [2] 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 939-943.
- [3] 李波, 朱维良, 陈凯先. 小檗碱及其衍生物的研究进展[J]. 药学报, 2008, 43(8): 772-787.
- [4] Ortiz LM, Lombardi P, Tillhon M, et al. Berberine, an epiphany against cancer[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12349-12367.
- [5] 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC50 的计算方法[J]. 安徽医药, 2007, 11(9): 834-835.
- [6] Wang J, Yang S, Cai X, et al. Berberine inhibits EGFR signaling and enhances the antitumor effects of EGFR inhibitors in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 76076-7608.
- [7] 韩亚玲, 魏芳, 徐昕, 等. 人食管鳞癌细胞系 EC9706 的建立及其比较基因组杂交分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(6): 455-457.
- [8] 田芳, 宋敏, 许培荣, 等. 姜黄素阻断 NF- κ B 信号通路促进食管鳞癌细胞凋亡的体外研究[J]. 癌症, 2008, 27(6): 566-570.
- [9] Wang Y, Liu Q, Liu Z, et al. Berberine, a genotoxic

- alkaloid, induces ATM-Chk1 mediated G2 arrest in prostate cancer cells [J]. Mutat Res, 2012, 734(1-2): 20-29.
- [10] Wang C, Wang H, Zhang Y, et al. Berberine inhibits the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells via an Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-dependent mechanism [J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2109-2120.
- [11] Barzegar E, Fouladdel S, Movahhed TK, et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines [J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(4): 334-342.
- [12] Jia Y, Xu B, Xu J. Effects of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics of berberine in rats [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 510-515.
- [13] Tan W, Li N, Tan R, et al. Berberine interfered with breast cancer cells metabolism, balancing energy homeostasis [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2015, 15(1): 66-78.
- [14] Fan LX, Liu CM, Gao AH, et al. Berberine combined with 2-deoxy-d-glucose synergistically enhances cancer cell proliferation inhibition via energy depletion and unfolded protein response disruption [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(11): 5175-5178.
- [15] Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, Maas MJ, et al. Pre-mRNA splicing in cancer: the relevance in oncogenesis, treatment and drug resistance [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2015, 11(5): 673-689.
- [16] Lee SC, Abdel-Wahab O. Therapeutic targeting of splicing in cancer [J]. Nat Med, 2016, 22(9): 976-986.
- [17] Gökmen-Polar Y, Neelamraju Y, Goswami CP, et al. Expression levels of SF3B3 correlate with prognosis and endocrine resistance in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Mod Pathol, 2015, 28(5): 677-685.

(收稿: 2017-03-30 在线: 2018-05-14)

责任编辑: 赵芳芳