

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.004

苦参碱对鼻咽癌细胞凋亡及凋亡相关基因 p53 的表达研究 *

谢 貌¹ 石书婧¹ 王仁君² 唐 军¹ 朱美婵¹ 唐安洲^{1△}

(1 广西医科大学第一附属医院 广西 南宁 530021; 2 四川宜宾市第一人民医院 四川 宜宾 644000)

摘要 目的: 探讨苦参碱对体外培养的人鼻咽癌细胞增殖、凋亡及凋亡相关基因 p53 mRNA 和蛋白表达的影响,初步探讨苦参碱诱导人鼻咽癌细胞凋亡的可能机制。**方法:** 采用 MTT 法检测不同浓度苦参碱(0、0.25、0.5、1、1.5、2 mg/ml)对 CNE1、CNE2 细胞增殖的影响;采用荧光定量 PCR 法检测这些浓度的苦参碱处理 48 h 后 CNE2 细胞 p53 mRNA 的变化;Western Blot 检测其蛋白的变化情况。**结果:** MTT 结果显示苦参碱具有抑制 CNE1、CNE2 细胞体外增殖作用,其抑制率存在浓度、时间依赖性。荧光定量 PCR 及 Western Blot 检测结果显示,苦参碱抑制 CNE2 细胞 p53 mRNA 和蛋白的表达,且亦呈浓度依赖性。**结论:** 苦参碱抑制 CNE2 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,呈现浓度、时间依赖性,其作用与抑制 CNE2 细胞中 p53 基因和蛋白的表达密切相关。

关键词: 苦参碱;鼻咽癌细胞;细胞凋亡;p53

中图分类号: 285.5;R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)18-3414-04

Effects of Matrine on the Apoptosis and the Apoptosis-Related-Gene p53 Expression in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line in Vitro*

XIE Mao¹, SHI Shu-jing¹, WANG Ren-jun², TANG Jun¹, ZHU Mei-chan¹, TANG An-zhou^{1△}

(1 Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi, 530021, China; 2 Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, First people's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, 644000, China)

ABSTRACT Objective: This study aims to evaluate the effects of matrine on human nasopharyngeal carcinoma cell line proliferation, apoptosis and apoptosis-related-gene p53 expression *in vitro* and explore the mechanism of conceivable apoptosis promoted by matrine. **Methods:** *In vitro* experiments, MTT assay was used to detect the effect of matrine on CNE2 cell proliferation. The expression levels of p53 gene were detected by real-time PCR and western blot analysis. **Results:** MTT results showed that matrine inhibited CNE2 cells proliferation in a dose and time-dependent fashion. The expression of p53 mRNA was significantly decreased in a dose-dependent fashion ($P < 0.01$). The expression of p53 protein was inhibited in a dose-dependent fashion ($P < 0.01$). **Conclusion:** Matrine inhibits CNE2 cells proliferation and induces apoptosis in a dose- and time-dependent fashion, and the decreasing expression of p53 mRNA and protein may closely relate to the mechanism.

Key words: Martine; NPC cell; Apoptosis; p53

Chinese Library Classification: 285.5; R739.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)18-3414-04

前言

鼻咽癌是我国南方地区最常见头颈部恶性肿瘤之一。当前鼻咽癌主要的治疗方式是以放疗为主联合化疗的综合治疗,然而,常规的放化疗会引起较严重的并发症^[1]。苦参碱(Matrine)是从中药苦参中提取的一种生物碱类活性成分,研究发现苦参碱及氧化苦参碱有清热燥湿、保肝降酶、抗炎、强心降压等作用,同时其还具有抑制胃癌、肝癌、肺癌、白血病、乳腺癌、鼻咽癌等肿瘤细胞的生长,并诱导其凋亡^[2-4]。本实验拟通过观察苦参碱对人鼻咽癌细胞凋亡及凋亡相关基因 p53 的影响,初步探讨苦

参碱体外抗肿瘤作用的机制。

1 材料及方法

1.1 细胞株及药物

人鼻咽癌 CNE1 和 CNE2 细胞株购于中南大学湘雅中心实验室,由广西医科大学鼻咽癌实验室传代培养。苦参碱($\geq 98\%$,批号为:20130406)购于陕西昂盛生物医药科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞接种到含浓度为 100 u/ml 青霉

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81241113);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20094503110003)

作者简介:谢貌(1987-),男,硕士研究生,主要从事抗鼻咽癌中药研究,E-mail:xiemaomt@qq.com

△通讯作者:唐安洲,E-mail:anzhoutang@126.com

(收稿日期:2013-12-27 接受日期:2014-01-25)

素和 100 mg/l 链霉素及 10 %胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,37℃、5 % CO₂、饱和湿度培养箱中培养,用 0.25 %含 0.02 %EDTA 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖活性 取对数生长期的 CNE1、CNE2 接种于 96 孔细胞培养板上,接种密度为 3×10^4 孔,37℃、5 % CO₂ 细胞培养箱培养 24 h 后,分别予不同浓度的苦参碱(0、0.25、0.5、1、1.5、2 mg/ml)处理,每浓度点设 6 个复孔,分别于培养 24、48、72 h 后加入 20 μ L 5 mg/ml MTT 继续培养 4h,弃上清,加入 150 μ L DMSO,震荡 10 min,酶标仪 570 nm 测吸光度值(OD),按下式计算细胞生长的抑制率。抑制率 = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) $\times$ 100 %。

1.2.3 荧光定量 PCR 法检测 p53 mRNA 表达 取对数生长期细胞,用 0.25 %胰蛋白酶消化后,接种于 6 孔细胞培养板中培养,接种密度为 5×10^4 孔。实验分组为阴性对照组即空白组,单用培养基培养,不同浓度苦参碱组(0.5、1、2 mg/ml),阳性对照组为顺铂(DDP,浓度为 2 μ g/ml),每组 3 孔,重复 3 次。作用 48 h 时收集细胞,用 Trizol(Invitrogen)提取总 RNA,用逆转录试剂盒 (Fermentas, #K1622,US) 进行逆转。GAPDH 为内参, GAPDH 上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3',扩增产物 138 bp; p53 上游:5'-CGTGTGGAGTATTTGGATGACAGA-3' 下游引物:5'-TGTAAGTGGATGGTGGTACAGTCAGA-3',扩增产物 100 bp。在延伸过程中收集荧光信号,扩增结束后收集溶解曲线。采用 Ct 值比较法(2- $\Delta\Delta$ Ct)分析各组基因表达水平的差异。

1.2.4 Western Blot 检测 p53 蛋白表达 实验组分别有阴性对照组,不同时间(0、24、48、72、96 h)不同浓度(0.5、1、2 mg/ml)苦参碱组,阳性对照组,GAPDH 作为内参。同 1.2.3 处理细胞后,加入含有 5 μ L PSMF 的 RIPA 裂解液 500 μ L,冰上裂解细胞 30 min,4℃ 12000 $\times$ g 离心 15 min,收集细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。予 10 %的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离上述蛋白,根据目的蛋白分子量大小切胶,并将其转至 PVDF 膜上。5 %脱脂牛奶室温封闭 2 h,抗 p53 (Proteintech, 1:1000,USA),HRP 标记 GAPDH (康成,1:10000)4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 PVDF 膜 5 min $\times$ 3 次,HRP 标记山羊抗兔 IgG (CST,1:1000,USA)室温孵育 2 h,TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次,ECL(Thermo,USA)显影,压片。凝胶成像系统(美国 bio-rad 公司)分析结果。Western blot 图片用 Image J 软件采集条带吸光度,取目的条带光密度与内参条带比值为相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多统计学分析采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 苦参碱对鼻咽癌细胞增殖的影响

MTT 结果显示不同浓度的苦参碱对 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖抑制作用呈浓度和时间依赖性,不同浓度不同时间组间细胞生长抑制率如图 1、2 所示。

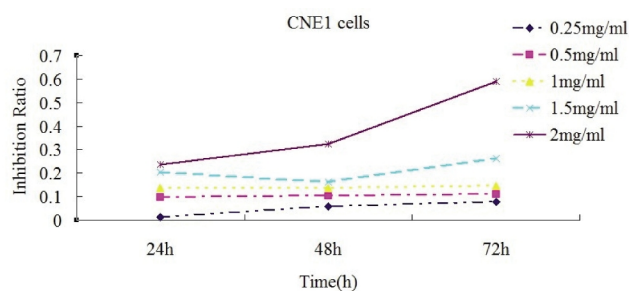


图 1 不同时间浓度苦参碱作用后 CNE1 细胞的生长抑制率

Fig. 1 The growth inhibition ratio of CNE1 cells treated by matrine

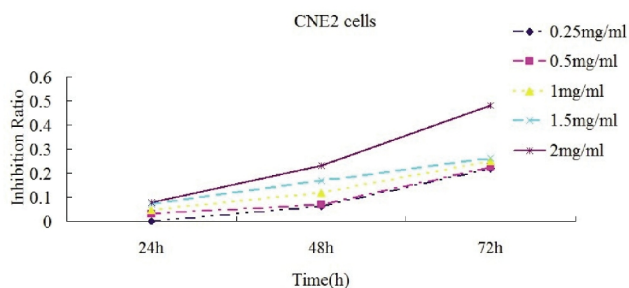


图 2 不同时间浓度苦参碱作用后 CNE2 细胞的生长抑制率

Fig. 2 The growth inhibition ratio of CNE2 cells treated by matrine

2.2 p53 mRNA 相对表达量的检测

图 3 结果显示,1 mg/ml 和 2 mg/ml 浓度的苦参碱能下调 CNE2 细胞 p53 mRNA 的表达,与空白对照组比较,2 mg/ml 浓度组下调 0.458 $\pm$ 0.079 倍($P<0.01$)。而阳性对照组顺铂则是上调 CNE2 细胞 p53 mRNA 的表达,与正常对照组比较,上调 1.380 $\pm$ 0.151 倍($P<0.01$)。

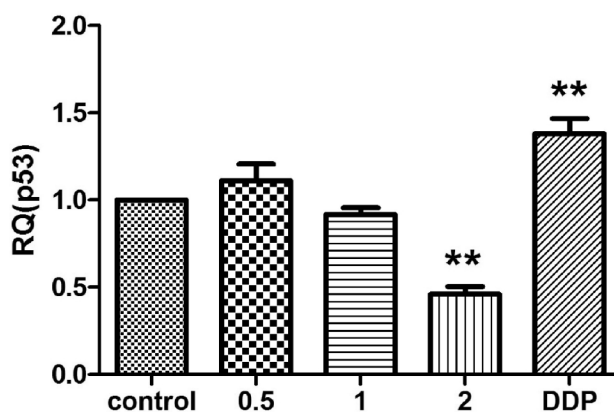


图 3 不同浓度苦参碱对 CNE2 细胞 p53 基因表达量的影响

($\bar{x} \pm s$, n=3; **:P<0.01)

Fig. 3 The impact of matrine on the relative mRNA expression of p53

(mean $\pm$ SD, n=3; **:P<0.01)

2.3 p53 蛋白表达量的检测

为了解苦参碱作用 CNE2 细胞后凋亡相关基因 p53 蛋白表达的情况,我们采用 Western Blot 对不同浓度及不同时间苦参碱处理后的 CNE2 细胞进行 p53 蛋白水平检测。结果如图 4 所示,CNE2 细胞经苦参碱处理后,p53 蛋白表达下降,呈浓度和时间依赖性,阴性对照组蛋白的 p53 相对表达量为 1.220 $\pm$

0.046, 2 mg/ml 浓度组的相对表达量为 0.592 ± 0.208 ($P < 0.01$), 2 mg/ml 浓度处理 48 h、72 h 和 96 h 相对表达量分别为 0.544 ± 0.076 ($P < 0.01$)、 0.387 ± 0.086 ($P < 0.01$) 和上调 $0.343 \pm$

0.090 倍 ($P < 0.01$)。而顺铂则是上调 p53 的蛋白表达, 其相对表达量为 2.343 ± 0.486 ($P < 0.01$)。

苦参碱 Matrine

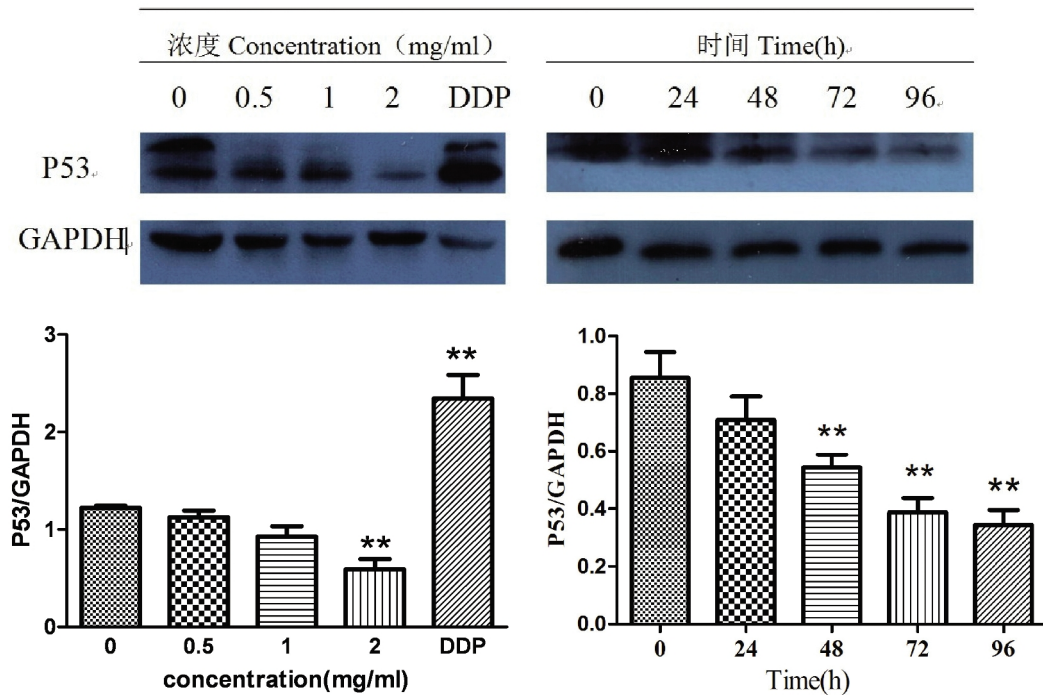


图4 不同时间浓度苦参碱作用后 CNE2 细胞 p53 蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$; **: $P < 0.01$)

Fig. 4 The impact of matrine on the relative protein expression of p53 (mean $\pm$ SD, $n=3$; **: $P < 0.01$)

3 讨论

研究表明,苦参碱可抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡,具有较强的抗肿瘤作用^[5]。在苦参碱对白血病的研究中,苦参碱可以通过线粒体途径和 Akt 通路诱导白血病细胞凋亡^[6]。本研究通过不同浓度苦参碱作用人鼻咽癌细胞 CNE1、CNE2,发现不同浓度苦参碱作用不同的时间有不同程度的抑制作用,随浓度增大和作用时间延长其抑制作用就越强,呈浓度及时间依赖性。与空白对照组相比,苦参碱处理后的 CNE1、CNE2 细胞的凋亡明显增加。由此说明苦参碱在体外能有效抑制鼻咽癌细胞的增殖、并诱导其凋亡。

细胞凋亡是指由基因调控的细胞自主的有序的死亡,肿瘤的发生、发展及消退与细胞凋亡异常有着密切的关系^[7]。大多数的抗肿瘤药物均能诱导肿瘤细胞凋亡^[8]。细胞凋亡的发生和调控机制比较复杂,p53 是参与调控细胞凋亡的重要基因^[9],P53 基因主要分为野生型和突变型两种。野生型 p53 基因对肿瘤的作用机制主要是通过 p53 蛋白参与调节细胞周期的调控、DNA 修复、细胞分化、细胞凋亡等发挥抗肿瘤生物学作用,野生型 p53 基因通过上调 p21、MDM2、GADD45 等基因在 DNA 损伤所致的 G1/S 停滞中起重要作用^[10-12];而突变型 p53 由野生型 p53 突变而来的,突变型 p53 不仅是失去野生型 p53 原本的抑癌能力,反而还增强其致癌性及抗凋亡、耐抗癌治疗、抑制 p63、p73 等能力^[13,14],导致肿瘤生长增殖、浸润转移、克隆选择

和化疗失败^[15]。目前相关研究已证实,乳腺癌、鼻咽癌、肺癌等^[16-18]恶性肿瘤中均发现了突变型 p53 表达,同时有研究还证实突变型 p53 还是胃癌等多种肿瘤化学耐药的重要分子标志^[19]。我们通过对苦参碱处理后的 CNE2 细胞进行荧光定量 PCR 和 Western blot,检测 p53 的表达,发现 CNE2 细胞经苦参碱作用后,p53 mRNA 的表达随浓度的增高呈下降趋势,同时 Western blot 结果也显示随苦参碱作用浓度的增加及作用时间的延长,p53 的蛋白表达水平也呈下降趋势;而阳性对照组顺铂的 p53 mRNA 及 p53 蛋白表达均是升高的。由此,我们考虑苦参碱作用 CNE2 细胞是其导致突变型 p53 的表达下降,抑制 CNE2 细胞生长,诱导其凋亡;顺铂则是通过引起野生型 p53 的表达升高,抑制 CNE2 细胞生长,诱导其凋亡的。相关文献也证实^[20],顺铂是通过激活“p53 途径”,诱导野生型 p53 基因强烈表达抑制骨肉瘤 U2-OS 细胞生长,导致其凋亡。

综上所述,我们认为苦参碱可能是通过下调突变型 p53 基因和蛋白的表达,抑制鼻咽癌细胞生长,并诱导其凋亡,从而发挥体外抗肿瘤的作用。这为进一步深入探讨苦参碱抑制鼻咽癌细胞增殖,诱导其凋亡机制的研究提供依据。而苦参碱具体是通过何种途径调控 p53 基因和蛋白表达,是否通过介导 MAPK 和 AKT 等细胞转导通路的活化来发挥其抗肿瘤作用,目前仍未清晰,尚需我们继续进一步研究探讨。

参考文献(References)

- [1] Agulnik Mark, Epstein Joel B. Nasopharyngeal carcinoma: current

- management , future directions and dental implications [J]. Oral oncology, 2008, 44 (7): 617-627
- [2] 陈晓峡, 向小庆, 叶红. 苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 361-364
- Chen Xiao-xia, Xiang Xiao-qing, Ye Hong. Progress of Research and Application in Tumors of Matrine and Oxymatrine [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(11): 361-364
- [3] 马悦, 张启伟, 王智民, 等. 复方苦参注射液研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 342-345
- Ma Yue, Zhang Qi-wei, Wang Zhi-min, et al. Advance in Study on Compound Kushen Injection [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(23): 342-345
- [4] 李春炎, 杨兵, 曲洪浩, 等. 氧化苦参碱对 K562 肿瘤细胞增殖的影响[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(4): 645-647
- Li Chun-yan, Yang Bing, Qu Hong-hao, et al. Effects of oxymatrine on the proliferation of K562 cells[J]. Progress In Modern Biomedicine, 2009, 9(4): 645-647
- [5] 熊小春, 安春妹. 苦参碱抗肿瘤研究概况[J]. 中国医药导报, 2009, 6(33): 10-12
- Xiong Xiao-chun, An Chun-mei. An overview in the anti-tumor research on Matrine[J]. China Medical Herald, 2009, 6(33): 10-12
- [6] Zhang S, Zhang Y, Zhuang Y, et al. Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation[J]. PloS one, 2012, 7(10): e46853
- [7] Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy[J]. Integrative Biology, 2011, 3(4): 279-296
- [8] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death [J]. Science, 1998, 281(5381): 1317-1322
- [9] Lehen ' kyi V ' yacheslav, Shapovalov George, Skryma Roman, et al. Ion channels and transporters in cancer . 5 . Ion channels in control of cancer and cell apoptosis [J]. American journal of physiology. Cell physiology, 2011, 301(6): 1281-1289
- [10] Jin Yan, Wei Yong, Xiong Lei, et al. Differential regulation of survivin by p53 contributes to cell cycle dependent apoptosis[J]. Cell research, 2005, 15(5): 361-370
- [11] Vousden Karen H , Lane David P. p53 in health and disease[J]. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007, 8(4): 275-283
- [12] Choi S, Myers J N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy [J]. Journal of dental research, 2008, 87(1): 14-32
- [13] Deppert W. Mutant p53: from guardian to fallen angel[J]. Oncogene, 2007, 26(15): 2142-2144
- [14] Freed-Pastor W A, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins [J]. Genes & Development, 2012, 26(12): 1268-1286
- [15] Sigal A, Rotter V. The Oncogenic Activity of p53 Mutants [M]. The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer. Springer US, 2005: 199-223
- [16] 孙丽梅, 王鲁建, 宋敏, 等. 乳腺癌组织突变型 p53 和抑癌基因 PTEN 表达及其临床意义的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(6): 430-433
- Sun Li-mei, Wang Lu-jian, Song Min, et al. Expressions of mutated p53 and tumor suppressor gene PTEN in breast cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention And Treatment, 2008, 15(6): 430-433
- [17] 江华, 李彦华, 张朋. nm 23 和 p53 蛋白在鼻咽癌组织中的表达及其意义[J]. 华西医学, 2007, 22(4): 717-718
- Jiang Hua, Li Yan-hua, Zhang Peng. Expression of nm23 and p53 Proteins in Nasopharyngeal Carcinoma and Its Clinical Significance [J]. West China Medical Journal, 2007, 22(4): 717-718
- [18] 周承志, 徐军, 谭荻, 等. 肺癌组织中突变型 p53 蛋白与肿瘤耐药蛋白表达治疗及预后影响的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(1): 27-30
- Zhou Cheng-zhi, Xu Jun, Tan Huo, et al. Expressions of mutant p53 protein and tumor drug resistance proteins in lung cancer and their clinical significance [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention And Treatment, 2008, 15(1): 27-30
- [19] Satomi Daisuke, Takiguchi Nobuhiro, Koda Keiji, et al. Apoptosis and apoptosis-associated gene products related to the response to neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer[J]. International journal of oncology, 2002, 20(6): 1167-1171
- [20] 詹平, 戴闽. 顺铂损伤 U2-OS 细胞诱导细胞周期阻滞、凋亡及 p53、bcl-2、c-myc 基因表达的实验研究[J]. 江西医学院学报, 2009, 49(2): 37-43
- Zhan Ping, Dai Min. Apoptosis and Growth Arrest Induced by Cisplatin in U2-OS Cells Reflect DNA Damage Recognition Associated with the Expression of p53, bcl-2, c-myc [J]. Acta Academiae Medicinae Jiangxi, 2009, 49(2): 37-43