

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1359-04

苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的机制研究

范临夏^{1,2}, 陶晓南¹, 蔡曦光², 刘 华²(¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸科, 湖北 武汉 430030, ² 甘肃省人民医院呼吸科, 甘肃 兰州 730000)

Pro-apoptotic effect of matrine on A549 cells and its mechanism

FAN Lin-Xia^{1,2}, TAO Xiao-Nan¹, CAI Xi-Guang², LIU Hua²¹Department of Respiratory Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China, ²Department of Respiratory Diseases, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 AIM: To study the inhibitory effect of matrine on the proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells and its mechanism. **METHODS:** MTT assay, electron microscopy, and cell cycle analysis were used to examine the apoptosis in A549 cells. Expression levels of Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins were measured with flow cytometry. **RESULTS:** Matrine exerted anti-proliferative activity on A549 cells in a dose- and time-dependent manner. Typical apoptotic morphological changes of A549 lung adenocarcinoma cells were observed by electron microscope. Cell cycle analysis indicated that S-phase proportion was increased, as well as S/G2 phase was apparently arrested. Bcl-2 protein expression was dramatically decreased ($P < 0.01$) whereas the expression of Bax and caspase-3 was increased in A549 cells after treated by matrine. **CONCLUSION:** Matrine can exert the significant growth-inhibitory effect on A549 cells and induce the cell apoptosis, which is probably related with the downregulation of Bcl-2 expression via changing the permeability of mitochondrial membrane.

【Keywords】 matrine; lung adenocarcinoma; apoptosis; Bcl-2; Bax; caspase3

【摘要】目的 观察苦参碱抑制人肺腺癌细胞 A549 的增殖作用, 并探讨其分子机制. 方法 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法、电子显微镜、细胞周期分析法检测 A549 细胞凋亡, 采用流式细胞术 (FCM) 测定细胞 Bcl-2, Bax 及 caspase-3 蛋白表达水平. 结果 苦参碱对 A549 细胞的增殖具有明显的抑制

作用, 并呈现剂量和时间依赖关系, 电镜观察呈现典型的凋亡形态改变. 细胞周期分析显示细胞增殖发生 S/G2 期阻滞, 苦参碱能显著降低 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 而显著升高 Bax 蛋白表达水平及 caspase-3 活性. 结论 苦参碱可显著抑制 A549 细胞的增殖并诱导其凋亡, 其机制可能与下调 Bcl-2 表达水平改变线粒体膜通透性有关.

【关键词】 苦参碱 肺腺癌 凋亡 Bcl-2 Bax caspase3

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A

0 引言

苦参碱作为中药苦参的主要活性成分, 临床主要用于镇痛、抑菌、抗病毒以及防治肝纤维化. 近年研究显示, 苦参碱具有明显的抗肿瘤作用^[1-2]. 雷怀定等^[3]研究发现苦参碱对体外人肺癌 A549 细胞具有增殖抑制作用, 我们观察苦参碱诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其机制, 为苦参碱用于临床抗肿瘤提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 苦参碱购自宁夏盐池, 配制为 20 g/L 的无菌溶液备用. MTT 购自 Sigma 公司. 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 用 mAb (FITC-conjugated mouse anti-human Bax monoclonal antibody and IgG1 isotype control, FITC-conjugated American Hamster anti-human Bcl-2 monoclonal and American Hamster monoclonal IgG isotype control) 为美国 Caltag 产品. A549 细胞株购自中科院上海细胞生物学研究所. 细胞贴壁生长于含 100 mL/L 小牛血清 (杭州四季青生物工程公司) 的 RPMI 1640 (Gibco BRL 公司) 完全培养基中, 用含 2.5 g/L 胰酶的消化液进行传代, 置 37℃, 50 mL/L CO₂ 孵箱中培养. 实验时选用对数生长期细胞.

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖活性检测 采用 MTT 比色法, 将细胞密度调整为 1×10^8 /L, 接种于 96 孔培养板 (Costar), 每孔 100 μ L. 实验组分别加入不同浓度 (30, 60, 120, 240 mg/L) 苦参碱, 对照组加入等体积 PBS, 另设培养液对照组, 每组 4 个复孔, 饱和湿度条件下,

收稿日期 2006-11-21; 接受日期 2007-02-01

基金项目: 甘肃省科技攻关项目 (2GS064-A43-020-04-1)

通讯作者 陶晓南. Tel (027) 62492575 Email: taoxn2004@yahoo.com.cn

作者简介 范临夏. 本科, 主治医师. Tel (0931) 8281782 Email: flx_lelele@yahoo.com.cn

37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 分别于 24, 48, 72 h 加入 MTT 10 μL/孔. 继续培养 4 h, 每孔加入 100 mL/L 的 SDS 100 μL 终止培养, 37℃ 过夜, 用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处 A 值, 计算细胞生长抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀). 细胞经 240 mg/L MATRINE 作用 48 h 后用 2.5 g/L 胰酶消化, 收集细胞悬液离心(900 r/min) 5 min, 30 g/L 冷戊二醛固定 48 h, 10 g/L 四氧化锇染色, 经梯度脱水, Epon812 包埋, 超薄切片, 铀铅双染子显微镜(JEM-1230, 日本电子公司) 观察细胞超微结构, 美国 Gatan 公司 CCD 采集系统照相^[4].

1.2.2 细胞周期分析 MATRINE 作用 24, 48 h 后, 收集 A549 细胞, PBS 洗涤, 700 mL/L 冷乙醇固定, PI 染色, FCM(Coulter EPICS XL) 检测细胞周期时相的分布.

1.2.3 流式细胞术分析 A549 细胞经苦参碱作用 12, 24 h, 收集 1 × 10⁶ 个细胞, PBS 洗涤. 加入 FITC 标记的鼠抗人 Bcl-2 mAb, 鼠抗人 Bax mAb 及鼠 IgG1 同型对照后, FCM 分别检测 Bcl-2, Bax 及 caspase-3 蛋白的阳性表达率和平均荧光强度^[5].

统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件包行方差分析. 显著性检验水平为 $\alpha = 0.01$.

2 结果

2.1 苦参碱抑制 A549 细胞增殖作用 A549 细胞经苦参碱作用 24, 48, 72 h 后, 代谢 MTT 的能力明显降低, 显示较强的细胞毒性反应, 且呈剂量-效应、时间-效应依赖关系($r_{24h} = 0.745$, $r_{48h} = 0.976$, $r_{72h} = 0.963$, $P < 0.01$, 表 1) 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别为 108.20, 41.28 和 20.67 mg/L. [根据 A₅₇₀ 值计算药物处理组细胞存活率(fu) 将中效方程 $f = a/fu = (D/IC_{50})^m$ 两边取对数, 得 $\log(f a / fu) = \log(D/IC_{50})^m = m \log D - m \log IC_{50}$. 设 $b = m$, $a = -m \log IC_{50}$, $Y = \log(f a / fu)$, $X = \log D$, 则 $\log IC_{50} = -a/b$ 以药物浓度的对数为因变量, 细胞抑制率与存活率之比的对数为应变量, 作出一回归方程 $Y = bX + a$. 利用该方程求出中效浓度 IC₅₀ 用回归方程求 IC₅₀].

2.2 苦参碱诱导的 A549 细胞凋亡作用 经相同浓度苦参碱分别处理 A549 细胞 12, 24 及 48 h 后, 电镜下观察到线粒体肿胀及内质网扩张等现象, 核内出现染色质凝集并边集、核碎裂等凋亡的形态学改变(图 1).

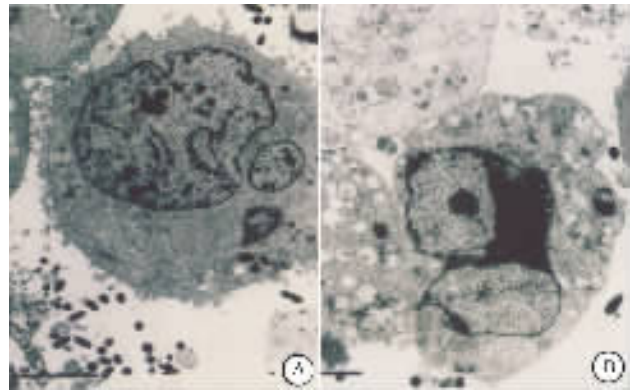
2.3 苦参碱对 A549 细胞周期分布的影响 经 60 mg/L, 120 mg/L 的苦参碱作用 24 h 后 S 期细胞所占比例为 32.3%, 24.0% 48 h 后为 42.8%, 57.0%,

与对照组(23.0%, 31.9%) 比较均增加($P < 0.01$), 且随浓度增高而增多, 以 120 mg/L 苦参碱作用 48 h 时增加幅度较大, 为同期生长的对照细胞的 2 倍, G₂/M 期细胞减少显著, 提示细胞发生 S/G₂ 期阻滞(图 2).

表 1 苦参碱对 A549 细胞增殖的抑制作用($n = 4$, %, $\bar{x} \pm s$)

药物浓度 (mg/L)	生长抑制率		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
30	2.01 ± 1.01	16.36 ± 4.64	35.56 ± 4.09 ^a
60	13.30 ± 1.08 ^a	39.80 ± 3.59 ^a	50.60 ± 2.16
120	18.56 ± 4.09	62.29 ± 2.26 ^b	74.65 ± 8.61
240	36.65 ± 8.87 ^b	80.47 ± 2.27	92.29 ± 0.96 ^b

^a $P < 0.01$ vs 对照; ^b $P < 0.01$ vs 不同浓度组间.



A 肿瘤细胞 B 苦参碱作用 48 h 后, 核染色质边集, 胞质肿胀.

图 1 A549 细胞铀铅双染透射电镜图 TEM × 8000

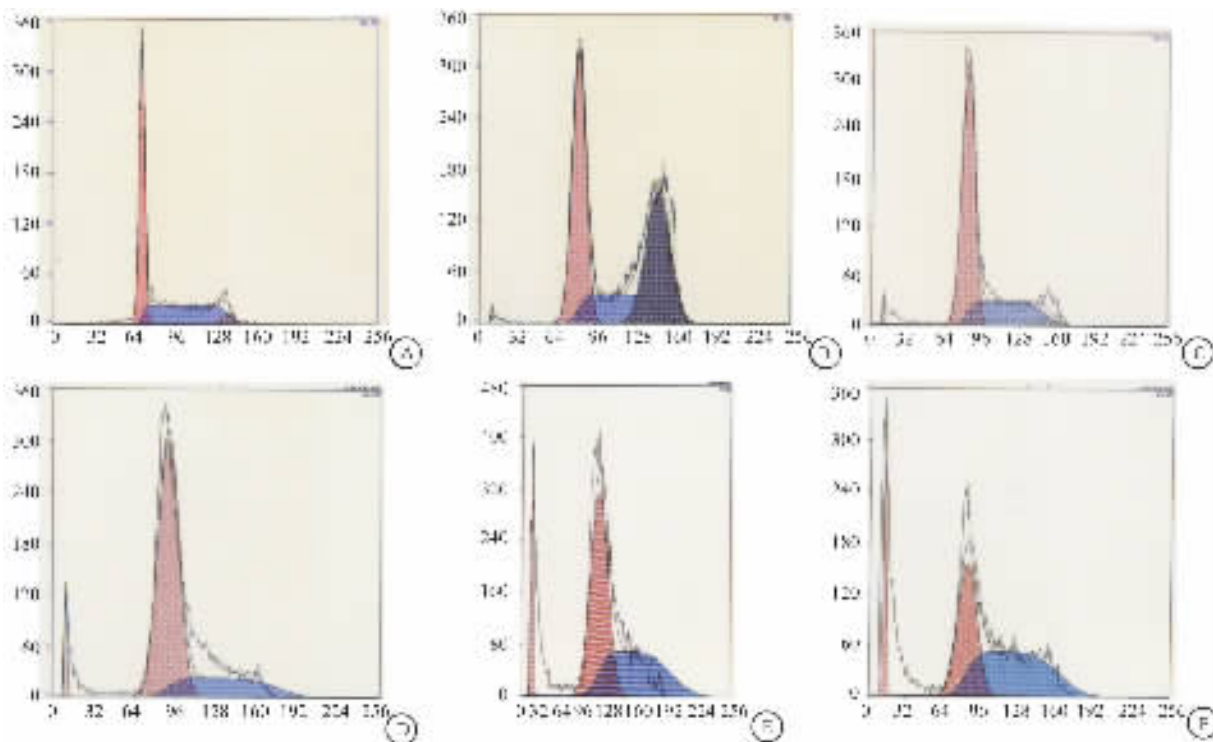
2.4 苦参碱对 A549 细胞 Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达的影响 Bcl-2 蛋白表达在不同浓度苦参碱处理组及不同时间均较对照组降低($P < 0.01$, 表 2), 有显著性差异(可重复实验双因素方差分析), 高剂量苦参碱组降低 Bcl-2 蛋白的作用大于低剂量苦参碱组, Bcl-2 蛋白下调以 120 mg/L 苦参碱作用 24 h 时最明显, 为对照组的 3.2 倍. 苦参碱作用前后 Bax 的表达水平明显升高. Caspase-3 活性呈剂量依赖性升高.

3 讨论

探讨调控肿瘤细胞凋亡的分子机制是目前肿瘤学研究的重要课题, 以药物诱导肿瘤细胞凋亡也被用于新的抗肿瘤药物的筛选. 苦参碱是一类研究和应用历史比较长的药物, 但其抗肿瘤的作用还处于研究阶段. 我们通过苦参碱对人肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制实验发现 ①苦参碱抑制细胞增长的作用具有周

期性,可使细胞发生 S 期阻滞;②苦参碱可诱导细胞发生凋亡.因此我们就其凋亡途径进行了进一步研

究.结果表明,苦参碱下调 Bcl-2 蛋白的表达水平.



A, B 分别为作用 24、48 h 后的对照组的细胞分布; C, D 分别为 60 mg/L, 120 mg/L 苦参碱作用 24 h 后的细胞分布; E, F 分别为 60 mg/L, 120 mg/L 苦参碱作用 48 h 后的细胞分布.

图 2 苦参碱作用后 A549 细胞的周期分布 (%)

表 2 苦参碱对 A549 细胞蛋白表达的影响

(n=4, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 (mg/L)								
	Bcl-2			Bax			Caspase-3		
	对照	60	120	对照	60	120	对照	60	120
蛋白表达阳性率									
24 h	78.11 ± 2.63	59.60 ± 1.10 ^{bd}	25.13 ± 0.84 ^{bd}	0.19 ± 0.01	5.21 ± 0.17	8.63 ± 0.19 ^{bd}	7.90 ± 0.15	5.12 ± 0.15	16.81 ± 0.34 ^{bd}
48 h	59.15 ± 1.13	45.10 ± 1.68	13.21 ± 0.23 ^{bd}	1.72 ± 0.03	5.86 ± 0.09 ^{bd}	14.20 ± 0.61	9.41 ± 0.20	22.1 ± 0.23 ^{bd}	36.20 ± 0.96
平均荧光强度									
24 h	3.52 ± 0.10	2.52 ± 0.08	2.19 ± 0.07	2.86 ± 0.11	6.91 ± 0.11 ^{bd}	15.67 ± 0.64	3.25 ± 0.07	10.21 ± 0.26	21.82 ± 0.39
48 h	2.26 ± 0.08	1.66 ± 0.02	4.12 ± 0.17	2.11 ± 0.04	10.23 ± 0.15 ^{bd}	23.19 ± 0.73	4.25 ± 0.11	25.30 ± 0.99 ^{bd}	52.32 ± 2.16

^bP < 0.01 vs 对照; ^dP < 0.01 vs 不同浓度组间.

Bcl-2 家族的成员包括: Bcl-2/Bax, Bcl-xl/Bcl-xs, Bak 等, 它们相互作用, 参与细胞凋亡的调控, 其中以 Bcl-2/Bax 的作用尤为重要^[6]. Bcl-2 蛋白是抗凋亡的因素, 它能抑制许多因素引起的细胞凋亡. Bax 过量表达则抑制 Bcl-2 功能而促进细胞凋亡^[7-8]. 体内 Bcl-2 和 Bax 以二聚体形式发挥作用, 若 Bcl-2 同聚体形成则细胞存活, 而当 Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体时则抑制 Bcl-2 的抗凋亡功能, 因此认为 Bcl-2 与 Bax 之间的比值决定了细胞是否接受诱导凋亡的信号, 决定着接受凋亡刺激后的生死. Bcl-2

家族诱导细胞凋亡的机制还有: ①作用于 PTP 相关蛋白, 阻止 PTP 开放, 维持 $\Delta\Psi_m$; ②抑制 Ros 诱导细胞凋亡. ③通过趋化 Caspase 至细胞内的膜结构上 (可能就是线粒体膜) 来阻断凋亡^[9]. 药物所致的 Bcl-2 蛋白的水平降低可引起线粒体内膜通透性的改变及随后的线粒体的释放反应 (细胞色素 C 由线粒体膜间隙进入胞质)^[10], 细胞色素 C 能与 Apaf-1 和 Caspase9 形成一个复合体, 在 dATP, ATP 存在下活化 Caspase-3, Caspase-6 及 Caspase-7 等成员, 使凋亡进行下去^[11]. 在本实验中, Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白

表达水平的规律性变化表明线粒体途径可能是苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的机制之一。

【参考文献】

[1] 刘伟,唐金花,王亚娣. 苦参的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006 17(5) 829-830.

[2] Metcalfe C, Thompson SG, Cowie MR, et al. The use of hospital admission data as a measure of outcome in clinical studies of heart failure[J]. Eur Heart J 2003 24 105-107.

[3] 雷怀定,刘先军,涂明利,等. 苦参碱对体外人肺腺癌 A549 细胞的抑制作用[J]. 实用医学杂志 2006 22(5) 1717-1720.

[4] 张慧芳,张煦,范临兰. 鬼臼毒衍生物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡[J]. 第四军医大学学报 2006 27(16) 1516-1518.

[5] Baffa LC, Scarfi S, Mariani MR, et al. Dihydrotestosterone as a selective cellular/nuclear location vector anti-gene peptide nucleic acid in prostatic carcinoma cells[J]. Cancer Res 2002 60(8) 2258-2262.

[6] 钟声,徐永健,张珍祥. CC10 在苦参碱诱导的肺癌细胞凋亡中的表达[J]. 华中科技大学学报·医学版 2006 35(1) 124-127.

[7] Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science 1998 281 1322-1323.

[8] Dinsdale D, Lee JC, Dewson G, et al. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis[J]. Am J Pathol 2004 164 395-407.

[9] Tian X, Zhang FM, Li WG. Antitumor and antioxidant activity of spin labeled derivatives of matrine (GP-1) and congeners[J]. Life Sci 2002 70(20) 2433-2443.

[10] Chen J, Ramos J, Sirisawad M, et al. Motexafin gadolinium induces mitochondrially-mediated caspase-dependent apoptosis[J]. Apoptosis 2005 10(5) 1131-1142.

[11] Ly JD, Grubb DR, Lawen A, et al. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update[J]. Apoptosis 2003 8(2) 115-128.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)15-1362-01

后程立体定向放射治疗中晚期肺癌 65 例

马武,张淑莲,马军,杨晓君

(汉中市 3201 医院肿瘤科 陕西 汉中 723000)

【关键词】肺癌 立体定向 放疗 预后

【中图分类号】R734 【文献标识码】B

1 临床资料 收集 2003-07/2006-05 接受放疗观察的中晚期肺癌 130(男 78 女 52)例,平均年龄 62(33~80)岁,KPS 评分均 >70 分,临床分期为 IIIa~IV 期(1997 年 UICC 分期)。其中鳞癌 78 例,腺癌 43 例,腺鳞癌 9 例,无严重影响治疗计划完成的内科疾病,患者于分期前均行血常规、心电图、肝肾功能、胸部 CT、腹部 B 超、全身骨显像等检查,少数患者行头颅 CT 检查。随机分为实验组和对照组,每组 65 例,均先用直线加速器 6MV-X 线常规外放疗。其原发于上叶者包括原发灶、同侧肺门、中上纵隔淋巴引流区。位于下叶者包括原发灶、同侧肺门、全纵隔淋巴引流区。均予前后对穿野照射 DT40GY/4wk。此后实验组利用上海拓能公司的立体定向放射治疗系统,按放疗要求将患者平放于真空垫体架床内,摆位固定后行 CT 扫描,影像数据经网络到 TPS 工作站,予以三维重建,根据病灶的部位、淋巴结转移的情况勾画出靶区,并勾画出危险器官轮廓,计划靶区为临床所见肿瘤区外放 1.0 cm 设计三维治疗计划,根据剂量体积直方图评价和优化放射治疗计划,最后制作适形铅模,进行立体定向放疗,DT 3.0~4.0 GY/次,1 次/d,5 d/wk,推量至肿瘤区 DT 64~76 GY。对照组避开纵隔和肺门缩野至临床病灶常规外放疗加量至 DT 64~70 GY。另外,对锁骨上下区有淋巴结转移者行常规外放疗 DT 60~70 GY,6~7/wk。结果按 WHO 制定的实体瘤客观疗效评定标准,放射治疗 1~3 mo 后评价疗效。实验组:完全缓解(CR) 12 例,部分缓解(PR) 47 例,稳定(SD) 4 例,进展(PD) 2 例,

有效率(CR+PR) 91%,对照组:CR 8 例,PR 36 例,SD 15 例,PD 6 例(CR+PR) 66%。两组近期疗效有统计学差异($P < 0.01$)。按照急性放射副反应 RTOG 标准评价并发症,实验组:急性放射性食管炎 I~II 度 23 例,III 度 4 例;急性放射性肺炎 I~II 度 13 例,III 度 1 例;白细胞减少症 9 例。对照组:急性放射性食管炎 I~II 度 18 例,III 度 2 例;急性放射性肺炎 I~II 度 10 例,III 度 1 例;白细胞减少症 6 例。两组放射反应无统计学差异($P > 0.05$)。

2 讨论 长期以来常规分割放疗是非手术治疗非小细胞肺癌的标准治疗模式,我们常规外放疗 65 例有效率与庞军等^[1]报道的 65.6% 有效率基本相似,毒副反应亦大致相仿。从报道的资料来看,常规分割放疗近期疗效不尽人意。常规分割放疗肺组织的耐受量仅为 65 GY 左右,根据 Fletcher 估计,要根治一个 5 cm 的肿瘤需要 80~90 GY 甚至 100 GY 的常规放射剂量。另外随着放疗时间的延长,由于肿瘤细胞的加速再增殖,也将造成局部控制率下降。据推测非小细胞肺癌的加速再增殖可能现于常规放疗的中后疗程,而且残存肿瘤细胞增殖可能逐步加速^[2]。随着放疗技术的不断发展,立体定向放射治疗已广泛应用于临床,提高了肿瘤区剂量,减少了正常组织损伤,提高了生存率。于金明等^[3]报道采用后程立体定向放疗其有效率为 86.5%,而我们用同样的方法所得的结果为 90.8%。我们所得的急性放射反应结果也与此类似,也与常规分割放疗的结果^[1]相近。我们认为,后程立体定向放射治疗中晚期非小细胞肺癌近期疗效显著,治疗时间缩短,且放射反应与常规分割放疗基本相同,是中晚期非小细胞肺癌非手术治疗较好的选择。至于其远期疗效及联合化疗综合治疗正在研究之中。

【参考文献】

[1] 庞军,杨炳辉. 超分割放射治疗 57 例非小细胞肺癌的初步观察[J]. 肿瘤研究与临床 2005 17(4) 270.

[2] 沈瑜,糜福顺. 肿瘤放射生物学[M]. 北京:中国医药科技出版社 2002 198-237.

[3] 于金明,于勇华,郭守芳,等. 后程立体定向放射治疗 IIIb 期肺鳞癌 I 期临床试验[J]. 中华放射肿瘤学杂志 2001 10 94-96.

编辑 王睿

收稿日期 2007-05-28; 接受日期 2007-06-26

作者简介:马武,硕士,主任医师,科主任. Tel (0916) 2381929

Email mawu@cscso.org.cn