

· 临床研究 ·

苦参碱对人肺腺癌细胞株A549生长抑制和c-myc、hTERT蛋白表达的影响

陈琼 刘立红 曹宏

【摘要】背景与目的 近年研究发现,端粒酶与人类肿瘤的发生、发展密切相关,并成为肿瘤治疗的共同作用靶点。苦参碱抗肺癌的研究报道对其体外生长抑制作用发生的可能的机制尚未阐明,本研究的目的是探讨苦参碱对肺癌A549细胞生长影响及与端粒酶相关的机制。**方法** MTT法测定苦参碱对A549细胞增殖抑制作用, Hoechst33342-PI 荧光双染法观察细胞凋亡,流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率,免疫细胞化学(SP法)测定c-myc、hTERT蛋白表达的变化。**结果** 苦参碱可明显抑制A549细胞的增殖($P<0.05$),呈一定的时间剂量效应关系;荧光显微镜下看到凋亡细胞核染色质凝聚成团,核碎裂形成凋亡小体;流式细胞术分析:G₀/G₁期细胞比例呈增高趋势,S期细胞比例呈降低趋势,且凋亡率不断增加;处理组细胞c-myc、hTERT蛋白表达减少($P<0.05$),c-myc的AOD值与hTERT的AOD值呈正相关($r=0.633, P<0.01$)。**结论** 苦参碱对A549细胞生长抑制作用可能与下调c-myc、hTERT的蛋白表达有关。

【关键词】苦参碱 端粒酶 肺肿瘤 端粒酶逆转录酶

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.04.029

Effects of matrine on the growth inhibition, c-myc and hTERT protein expression in human adenocarcinoma lung cancer cell line A549

CHEN Qiong*, LIU Lihong[△], CAO Hong[▲]

*Department of Pathology, Chengdu No.2 People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610017, China; [△]Department of Pathology, Hankou Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430012, China; [▲]Department of Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430071, China

Corresponding author: CHEN Qiong, E-mail: chenqiongwjw@163.com

【Abstract】 **Background and objective** It was reported that telomerase was associated with the oncogenesis and progression of cancer, and to be the common targets of cancer therapy. The mechanism of matrine on lung cancer *in vitro* is not clear. We studied the effect of matrine on growth of human lung adenocarcinoma A549 cells and the mechanism related with telomerase. **Methods** MTT was used for measuring A549 cells viability, Hoechst 33342-propidium iodide fluorescent staining for observing apoptotic cells, flow cytometry (FCM) for analyzing cell cycle and apoptosis, and immunocytochemistry for measuring the protein expressions of c-myc and hTERT in A549 cells. **Results** Matrine inhibited the proliferation of A549 cells with a time-dose-dependent manner ($P<0.05$). Hoechst 33342-propidium iodide staining showed apoptotic cells with chromatin condensation and fragmentation of nuclei. FCM analysis indicated elevating rate of cells in G₀/G₁ phase, lowering rate of that in S phase and the highering apoptotic rate. The levels of c-myc and hTERT protein expression in the matrine group was lower than that in the control group ($P<0.05$), and AOD of c-myc showed positive correlation with AOD of hTERT ($r=0.633, P<0.01$). **Conclusion** The inhibitory effect of matrine on A549 cells may be related to the lower expression of c-myc and hTERT.

【Key words】 Matrine Telomerase Lung neoplasms hTERT

约85%的恶性肿瘤组织和细胞均有较高水平的端粒酶活性,而几乎所有人肺癌细胞株及大数肺癌组织均有端粒酶的表达^[1]。靶向端粒酶的抗肿瘤研究日益为人们所重

视。而中药有效成分抗肿瘤具有很多优势:如提高机体免疫作用,增效减毒,毒副作用少,抗肿瘤作用靶点多。近年来,苦参碱抗肿瘤作用得到体外试验证实,研究发现,一定浓度苦参碱可抑制胃癌^[2]、肝癌^[3]和K562细胞^[4],同时发现细胞端粒酶活性下降。但苦参碱抗肿瘤作用的机制尚未完全明了。本实验通过研究苦参碱对人肺腺癌A549细胞生长的影响,初步探讨其机制。

作者单位: 610017 成都,成都市第二人民医院病理科(陈琼); 430012 武汉,武汉市汉口医院病理科(刘立红); 430071 武汉,武汉市中南医院病理科(曹宏)(通讯作者:陈琼, E-mail: chenqiongwjw@163.com)

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肺腺癌细胞株A549, 购自武汉大学医学院肿瘤研究所; 以RPMI1640培养液(含10%灭活小牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素)培养, 生长于37 °C、5%CO₂培养箱内。

1.2 试剂与仪器 苦参碱注射液(商品名: 斯巴德康) 10 g/L, 5 mL/支, 临用前用培养液配制; RPMI 1640培养基, Gibco公司; 小牛血清, 三利公司; 胰蛋白酶, Amersco公司; MTT、PI、RNA酶、Hoechst33342、DMSO, Sigma公司; 兔抗人hTERT多克隆抗体H-231, 鼠抗人C-myc单克隆抗体, Santa Cruz公司; 荧光酶标仪, Tecan 公司; 倒置相差荧光显微镜, Leica公司; 流式细胞仪, Becton Dickinson公司。

1.3 MTT法 消化制备细胞悬液 1×10^5 /mL, 在96孔板中, 每孔加100 μ L细胞悬液, 培养24 h贴壁。换液, 加入含不同浓度药物的培养液, 每孔100 μ L, 每一浓度设4个平行孔, 苦参碱终浓度为0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L。继续培养24 h、48 h、72 h。每孔加20 μ L MTT (5 mg/mL), 放回培养箱, 继续孵育4 h。弃上清, 每孔加入150 μ L DMSO, 轻微振荡15 min, 使结晶充分溶解, 空白对照孔调零, 20 min内, 选择490 nm波长, 在自动荧光酶标仪上测定各孔的吸光度值(A)。实验重复3次, 取平均值。计算细胞增殖抑制率: 抑制率% = $(1 - \text{实验组A值}/\text{对照组A值}) \times 100\%$ 。

1.4 Hoechst33342-PI荧光双染法观察A549细胞凋亡 细胞生长于含有盖玻片的培养皿中, 施加处理因素48 h, 分对照: 培养液, 苦参碱: 终浓度为1.5 g/L。向培养皿中加入用0.01 MPBS溶解的Hoechst33342, 终浓度为10 μ g/mL, 37 °C反应10 min。继续加入用0.01 M PBS溶解的PI, 使它的终浓度为10 μ g/mL, 4 °C反应20 min。4%多聚甲醛固定细胞10 min。取出盖玻片, 在载玻片上50%甘油封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 流式细胞仪分析A549细胞周期和细胞凋亡 消化制备细胞悬液 1×10^5 /mL, 每孔加2 mL于6孔板, 24 h细胞贴壁后换液, 加入苦参碱(终浓度为0.5 g/L、1.0 g/L、1.5 g/L、2.0 g/L), 继续培养48 h。消化贴壁细胞, 与上清一起, 1000 rpm离心8 min, 去上清, 用冷PBS洗1次, 再次离心去上清。用管中残存PBS轻轻吹打细胞, 制成细胞悬液, 加入预冷的70%乙醇1 mL, 4 °C过夜。离心去上清, 每管加入100 μ L RNA酶(1mg/ml), 混匀, 37 °C水浴30 min, 置冰上2 min终止RNA酶消化。每管加入PI染液900 μ L (1 mg/mL), 室温下避光30 min。流式细胞仪检测。

1.6 免疫细胞化学检测A549细胞hTERT、c-myc蛋白表达

的变化 细胞爬片制备后按免疫细胞化学SP法, 细胞爬片入双蒸水浸泡5 min, 滴加1% Triton-PBS溶液10 min, 再依次滴加3% H₂O₂、封闭羊血清、1:100一抗(阴性对照以0.01 M PBS液代替一抗)、生物素标记的二抗、链酶亲和素-过氧化物酶溶液、新鲜配制的DAB显色液, 苏木素染细胞核, 常规脱水、透明、封片。阳性细胞为胞浆或/和核染为黄色或棕黄色, 阴性细胞不着色。以自动图像分析系统检测阳性细胞的平均光密度值。

1.7 统计学处理 采用SPSS12.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用方差分析和SNK-*q*检验。

2 结果

2.1 苦参碱对A549细胞增殖的影响 本实验中, MTT法显示, 不同浓度苦参碱对A549细胞的增殖均有抑制作用, 其作用呈一定的时间剂量效应关系(图1)。各处理组与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 Hoechst33342-PI荧光双染法观察A549细胞凋亡 参照文献, 正常细胞呈蓝色均匀荧光, 死细胞呈红色均匀荧光, 凋亡细胞呈蓝色不均匀荧光, 核染色质凝集成团, 核碎裂。对照组可见大量呈蓝色均匀荧光的活细胞(图2A), 苦参碱处理48 h, 见到核呈波纹状或呈折缝样, 染色质高度凝聚的早期凋亡细胞和核碎裂产生凋亡小体的晚期凋亡细胞(图2B、2C), 以及呈红色均匀荧光的死细胞(图2D)。

2.3 细胞周期和细胞凋亡率的分析 流式细胞术显示(表1), A549细胞在苦参碱作用下, G₀/G₁期细胞比例呈增高趋势, 而S期细胞比例呈降低趋势, 各处理组与对照组比较差异均有显著性($P < 0.05$)。同时G₂/M值未见明显变化。不同浓度苦参碱处理A549细胞, 在G₀/G₁期峰前均有凋亡峰的出现, 且凋亡率呈增高趋势, 尤以1.5 g/L以上浓度时为显著($P < 0.01$)。

2.4 苦参碱对c-myc、hTERT表达的影响 免疫细胞化学显示(图3A-D), 肺腺癌A549细胞c-myc蛋白阳性表达位于胞核, 在对照组胞核呈棕褐色, 而处理组胞核呈棕黄色; hTERT蛋白阳性表达主要位于胞浆, 少数位于胞核, 对照组表达呈深棕黄色, 处理组表达呈棕黄色。处理组AOD值与对照组AOD值比较明显降低($P < 0.05$)(表2), 直线相关分析, c-myc的AOD值与hTERT的AOD值呈正相关($r = 0.633, P < 0.01$)。

3 讨论

苦参碱是从中药苦参的干燥根中提取的一种活性物

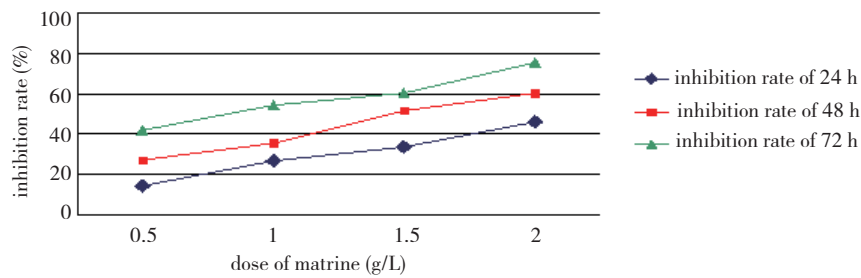


图1 苦参碱对A549细胞作用的时间-浓度-抑制率曲线

Fig 1 The time-dose-inhibition rate curve of A549 cell treated with matrine

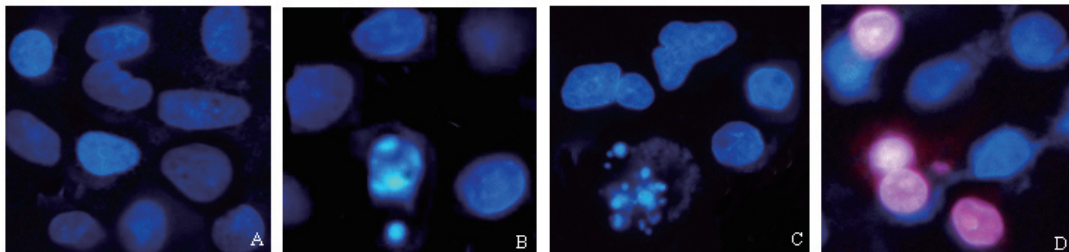


图2 HO/PI荧光双染法观察细胞凋亡

- A: 正常细胞呈蓝色均匀荧光 (HO/PI染色, ×400);
- B: 凋亡细胞呈蓝色不均匀荧光, 核染色质凝聚成团, 核破碎 (HO/PI染色, ×400);
- C: 凋亡细胞核呈折缝样, 核碎裂产生凋亡小体 (HO/PI染色, ×400);
- D: 死细胞呈红色均匀荧光 (HO/PI染色, ×400)

Fig 2 Showing normal and apoptotic cells with HO/PI staining

- A: Showing normal cells with even-distributed blue fluorescence. HO/PI staining, ×400;
- B: Showing apoptotic cells with uneven blue fluorescence, chromatin condensation and fragmentation of nuclei. HO/PI staining, ×400;
- C: Showing apoptotic cells with uneven blue fluorescence, creased nuclei and apoptotic body. HO/PI staining, ×400;
- D: Showing dead cells with even red fluorescence. HO/PI staining, ×400

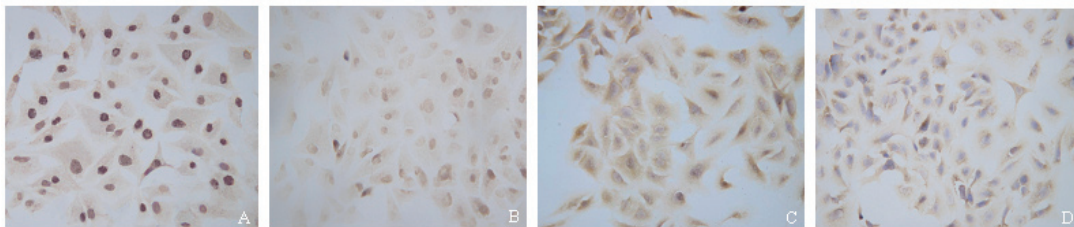


图3 苦参碱对c-myc、hTERT表达的影响

- A: 对照组c-myc蛋白表达于胞核, 呈棕褐色 (SP法, ×200);
- B: 处理组c-myc蛋白表达于胞核, 呈棕黄色 (SP法, ×200);
- C: 对照组hTERT蛋白主要表达于胞浆, 胞核有少量表达, 呈深棕黄色 (SP法, ×200);
- D: 处理组hTERT蛋白主要表达于胞浆, 胞核有极少量表达, 呈棕黄色 (SP法, ×200)

Fig 3 The effects of matrine on expression of c-myc and hTERT

- A: Expression of c-myc protein in control group (SP method, ×200);
- B: Expression of c-myc protein in matrine group (SP method, ×200);
- C: Expression of hTERT protein in control group (SP method, ×200);
- D: Expression of hTERT protein in matrine group (SP method, 200)

质, 作为一种传统的中药成分有广泛的药理作用, 其抗炎, 抗心率失常, 抗病毒作用已经广泛应用于临床。苦参碱对许多肿瘤细胞的增殖有抑制作用, 并可诱导细胞凋亡。本

实验MTT法显示苦参碱浓度在0.5 g/L-2.0 g/L之间时, 与对照组相比, 对A549细胞增殖的抑制作用显著 ($P < 0.05$), 呈一定的时间剂量效应关系; 流式细胞仪分析表明A549细

表1 苦参碱对A549细胞周期及细胞凋亡的影响(%)

Tab 1 The influence of matrine on the cell cycle and cell apoptotic rate of A549 cells (%)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apoptotic rate
Control	61.20	32.35	6.45	0.70
0.5 g/L	71.70 [*]	21.00 [*]	7.30	1.03
1.0 g/L	73.50 [#]	18.30 [#]	8.20	9.09 [*]
1.5 g/L	75.10 [#]	16.50 [#]	7.40	22.70 [#]
2.0 g/L	77.15 [#]	14.25 [#]	8.60	28.10 [#]

Compared with control group, ^{*}P<0.05, [#]P<0.01

表2 c-myc、hTERT表达的平均光密度(AOD)值

Tab 2 The average OD value of c-myc、hTERT

Group	c-myc	hTERT
Control	0.176±0.023	0.079±0.005
Matrine	0.045±0.011 [*]	0.023±0.006 [*]

Compared with control group, ^{*}P<0.05

胞在苦参碱作用下,进入G₀/G₁期细胞增多,S期细胞减少,G₂/M期细胞无明显变化,细胞凋亡率随药物浓度升高而不断增加,本实验的结果与王源等^[5]的报道较一致。另外通过Hoechst33342-PI荧光双染法,在荧光显微镜下观察到细胞凋亡的典型形态学变化。

端粒酶由三个主要亚单位构成:端粒酶RNA组分(hTR)、端粒酶相关蛋白(TP1)及端粒酶逆转录酶(hTERT)。hTERT是端粒酶催化亚单位,与端粒酶活性呈正相关。细胞永生化和肿瘤形成中hTERT基因的表达是端粒酶激活所必需,是限速因子^[6]。几乎所有人肺癌细胞株及大多数肺癌组织均有端粒酶的表达^[7]。研究发现,在许多肿瘤细胞中c-myc表达与hTERT的表达水平相平行,c-myc可能通过激活hTERT的表达而导致肿瘤发生^[8,9]。有报道在苦参碱处理的K562细胞中,细胞生长抑制,端粒酶活性下降,c-myc基因表达抑制,P21和P53表达增加^[10]。苦参碱能明显抑制人胶质瘤细胞株U251的增殖并对原癌基因c-myc的表达具有抑制作用^[11]。本实验免疫细胞化学法检测显示,苦参碱对A549细胞c-myc、hTERT的蛋白表达均有抑制作用(P<0.05),提示苦参碱对细胞生长的抑制作用与c-myc、hTERT的表达抑制有关。

端粒酶的活性在正常人体细胞中不表达或低表达,针对端粒酶设计的端粒酶抑制剂,将有可能成为一类特异性高、对正常细胞毒副作用少的理想抗肿瘤药物。目前中药对端粒和端粒酶作用的研究处于起始阶段,相关机制有待阐明。进一步探讨苦参碱对肺癌细胞的作用机制,有其必要性。

参 考 文 献

- Lee JC, Jong HS, Yoo CG, et al. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer*, 1998, 21(2): 99-103.
- Li FE, Zhu LQ, Ye HJ, et al. Matrine-induced apoptosis and effect on telomerase activity in human gastric carcinoma cells SGC-7901. *China Journal of Modern Medicine*, 2005, 15(12): 1809-1812. [李伏娥, 朱陵群, 叶红军, 等. 苦参碱诱导人胃癌细胞凋亡及对端粒酶活性的影响. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(12): 1809-1812.]
- Chen WZ, Lin Y, Xie WF, et al. Regulation of telomerase activity and cell cycle by matrine in hepatoma cells in vitro. *Acad J Sec Med Univ*, 2002, 23(5): 498-500. [陈伟忠, 林勇, 谢渭芬, 等. 苦参碱对肝癌细胞端粒酶活性调控及细胞周期的影响. *第二军医大学学报*, 2002, 23(5): 498-500.]
- Li XF, Zhang SZ, Zheng S, et al. Effects of matrine on hTERT-mRNA expression and telomerase activity in K562 cells. *Chin J Cancer*, 2001, 20(4): 391-393. [李旭芬, 张苏展, 郑树, 等. 苦参碱对K562细胞端粒酶hTERT-mRNA表达及其酶活性影响作用的研究. *癌症*, 2001, 20(4): 391-393.]
- Wang Y, Si WK, Li p, et al. Effects of matrine and oxymatrine on the proliferation and the apoptosis of A549 cells. *Acad J Thi Med Univ*, 2004, 26(9): 778-780. [王源, 司维柯, 李鹏, 等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制A549细胞增殖及诱导细胞凋亡的比较研究. *第三军医大学学报*, 2004, 26(9): 778-780.]
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, et al. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*, 1998, 58(18): 4168-4172.
- Lee JC, Jong HS, Yoo CG, et al. Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung cancer*, 1998, 21(2): 99-103.
- Greenberg RA, Hagan RCO, Deng HY, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*, 1999, 18 (5): 1219-1226.
- Wek M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human T reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 1999, 232 (1): 97-106.
- Zhang LP, Jiang JK, Joe T. Expression of oncogene and protein regulating cell cycle progression and its significance in leukemia cell line by matrine. *Chin J Clin Oncol*, 2001, 28(5): 347-350. [张莉萍, 蒋纪恺, Joe Tam. 苦参碱对白血病细胞癌基因和细胞周期调控蛋白表达的影响. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(5): 347-350.]
- Deng H, Deng HM, Huang F, et al. Inhibition of proliferation and influence of Proto-oncogene expression by matrine in U251 cells. *Chin Pharmacol Bull*, 2004, 20(8): 893-896. [邓惠, 罗焕敏, 黄丰, 等. 苦参碱对U251 胶质瘤细胞的增殖抑制和原癌基因表达的影响. *中国药理学通报*, 2004, 20(8): 893-896.]

(收稿: 2008-01-07 修回: 2008-07-06)

(本文编辑 李博)