

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·05·010

· 基础研究 ·

苦参碱诱导胶质瘤 C6 细胞凋亡及其可能的基因机制

张淑杰, 王新华, 成秉林* (哈尔滨医科大学 附属第一临床医学院, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 探讨苦参碱诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的作用特点和可能的基因作用机制。方法: MTT 法测定不同浓度苦参碱对 C6 细胞增殖的抑制率, 求出 IC_{50} 值; 倒置显微镜及透射电镜观察苦参碱诱导 C6 细胞凋亡的形态学改变; Annexin/FITC 染色流式细胞术检测不同浓度苦参碱诱导 C6 细胞的凋亡率; 实时定量 PCR 芯片 (Real-time PCR Array) 检测苦参碱作用后 C6 细胞凋亡相关基因的差异表达; 免疫细胞化学及 Western blotting 方法检测苦参碱对 C6 细胞 caspase-3 表达的影响。结果: 苦参碱对 C6 细胞增殖的抑制率随着药物剂量的增加 (0.1 ~ 1.0 mg/ml) 而增加 ($P < 0.05$), 其 IC_{50} 为 0.715 mg/ml。倒置显微镜观察显示苦参碱可诱导胶质瘤细胞出现凋亡改变, 透射电镜观察显示苦参碱诱导胶质瘤细胞出现凋亡的超微形态改变, 流式细胞术检测显示胶质瘤细胞的凋亡率随着药物剂量的增加 (0.2 ~ 1.0 mg/ml) 而增大 [(3.56 ± 0.73)% ~ (27.55 ± 1.92)%] ($P < 0.05$)。胶质瘤细胞经苦参碱作用后出现显著表达差异基因共 68 个, 其中 57 个基因表达明显上调, 11 个基因表达明显下调, 其中有 22 个基因与诱导凋亡的死亡受体相关, 15 个基因与线粒体途径有关; ICC 及 Western blotting 检测都显示苦参碱可诱导 C6 胶质瘤细胞 caspase-3 表达的上调 ($P < 0.05$)。结论: 苦参碱能诱导 C6 胶质瘤细胞的凋亡, 其机制与死亡受体途径和线粒体途径的众多基因有关。

[关键词] 苦参碱; 胶质瘤细胞; 凋亡; 基因差异表达; caspase-3

[中图分类号] R739.41; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0451-07

Matrine induces apoptosis of glioma cell C6 and the possible mechanism

ZHANG Shu-jie, WANG Xin-hua, CHENG Bing-lin* (The First Clinical Medical School, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the apoptosis inducing effect of matrine on C6 glioma cells and the related mechanisms. **Methods:** MTT assay was used to examine the inhibition of C6 glioma cell line by matrine at various concentrations and the IC_{50} was calculated. Inverted microscope and TEM (transmission electron microscope) were employed to observe the morphological alterations of C6 glioma cells after exposure to matrine; FCM (Flow cytometry) was used to detect the apoptosis rate of C6 glioma cells; and real-time PCR was used to examine the differential expression of related genes. ICC and Western blotting was used to detect the expression of caspase-3. **Results:** MTT showed that the cell inhibition effect of matrine increased with its concentration (0.1-1.0 mg/ml) ($P < 0.05$), with the IC_{50} being 0.715 mg/ml. Inverted microscope and TEM showed that matrine induced apoptosis of C6 glioma cells. FCM showed that the apoptosis rate increased [(3.56 ± 0.73)% ~ (27.55 ± 1.92)%] with the increase of matrine concentration (0.2 - 1.0 mg/ml) ($P < 0.05$). Real-time PCR showed that matrine induced up-regulation of 58 genes and down-regulation of 11 genes, and 22 of them were related to apoptosis-inducing death receptor, 15 of them to apoptosis-inducing mitochondrial pathway. ICC and Western blotting showed that matrine induced up-regulation of caspase-3 expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** Matrine can induce C6 glioma cell apoptosis and the mechanism might be related to a number of genes involved in death receptor pathway and mitochondrial pathway.

[Key words] matrine; glioma cell; apoptosis; differential expression of genes; caspase-3

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 451-457]

胶质瘤列于中枢神经系统中致死性肿瘤的首位, 从诊断到死亡的平均时间仅为 1 年, 现行的治疗方法难以收到满意的疗效, 因此寻找对抗胶质瘤的药物迫在眉睫。苦参碱 (matrine) 是清热燥湿类中药苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 所含的主要生物碱

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目 (No. D 2007-39)。Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. D 2007-39)。

[作者简介] 张淑杰 (1969-), 女, 黑龙江省北安市人, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤的中医药治疗

* Corresponding author. E-mail: zhangshujun1974@126.com

成分之一,其结构清楚,属于四环的喹啉啉(quinolizidine)类,分子式 $C_{15}H_{24}N_2O$ ^[1],相对分子质量为 248.36。已有研究^[24]表明,matrine 具有广泛的药理学作用,对多种肿瘤细胞株及移植瘤有较高的抑制率^[5-10],没有明显的毒性反应^[11]。但苦参碱对于胶质瘤的作用及其基因机制研究的报道较少。本课题采用一系列分子生物学技术研究 matrine 对 C6 胶质瘤细胞的致凋亡作用,并以实时定量 PCR 基因芯片等技术分析其可能的基因机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

大鼠 C6 胶质瘤细胞株购自哈尔滨医科大学神经微生物系。苦参碱为陕西慧科植物开发公司产品(No. MA20070302,纯度 98%),四甲基偶氮唑蓝(MTT)为上海华舜生物工程有限公司产品。Annexin V/FITC 试剂盒为深圳晶美公司产品。一抗(caspase-3)为美国 Santa 公司产品(No. sc-7148),二抗兔 SP 免疫组化染色试剂盒为北京中杉金桥生物公司产品(No. SP-9001)。二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG)为美国原装进口,北京中杉金桥生物公司分装(ZB-2301)。Real-time PCR Array 为美国 SuperArray 公司的基因芯片,由上海康成生物工程有限公司提供实验所需的试剂、相关仪器,以及全程的技术服务。

酶标仪为美国(Bio-RAD 550)产品,电镜为日本(1220 型)产品。

1.2 细胞培养

C6 胶质细胞瘤细胞培养于含 100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 高糖型培养液中,在 37 °C、5% 培养箱内培养,细胞长至对数生长期用于实验。

1.3 MTT 法检测苦参碱对 C6 细胞生长的影响

取密度为 5×10^4 /ml 的细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后用 37 °C 预温的培养液冲洗 1 次,加入含不同终质量浓度苦参碱(0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 及 1.0 mg/ml)的培养液,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 24、48、72 h(每浓度点均设 5 个复孔)。每孔加入 20 μl (5 mg/ml) MTT 溶液继续培养 4 h,小心吸出培养液,每孔加入 150 μl DMSO,然后将孔板放置于摇床上,震荡 10 min 后,用酶标仪选择 570 nm 波长测各孔光密度值(D 值),计算细胞生长抑制率。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验

组 D 值/对照组 D 值) × 100%。求出 IC₅₀ 值,用于下一步实验所需的给药浓度。

1.4 倒置显微镜观察细胞形态学改变

取对数生长期细胞,以 5×10^4 /ml 的密度接种于 6 孔板行细胞爬片,细胞贴壁后,用含苦参碱为 0.715 mg/ml(细胞增殖抑制实验中得到的作用 24 h 的 IC₅₀)的培养液培养 C6 细胞,培养 24 h,于倒置显微镜下进行观察。

1.5 透射电镜观察 C6 细胞凋亡的超微结构变化

取对数生长期细胞以 5×10^5 /ml 接种于 25 cm² 培养瓶中,细胞贴壁后,用含苦参碱为 0.715 mg/ml 的培养液培养细胞,培养 24 h 后常规胰酶消化,以 1 000 × g,离心 8 min,弃上清,4 °C PBS 清洗 3 次(1 000 × g,离心 8 min),然后沿管壁缓慢加入 2.5% 戊二醛固定至少 1 h。固定好的细胞团块用 0.1% 磷酸缓冲液反复灌洗,每次灌洗 15 min,再经过 1% 的锇酸固定 1 h,醋酸铀过夜,各级乙醇脱水,氧化丙烯浸泡,树脂包埋,超薄切片机切片(400A),最后置透射电镜下观察细胞超微结构。

1.6 流式细胞仪检测 C6 细胞的凋亡率

收集正常或经药物处理过的细胞约 1×10^6 ,用 4 °C PBS 冲洗离心,然后用 4 °C PBS 1 ml 将细胞悬起。细胞悬液经过滤后,分别加入 2 个试管,每管 100 μl。其中一管作对照管,另一管加入 Annexin V 5 μl、PI 10 μl,暗室作用 15 min 后,两管分别加入缓冲液 400 μl,然后进行检测。

1.7 实时定量 PCR 芯片检测 C6 细胞凋亡相关基因的差异性表达

应用 TRIZOL 液裂解细胞,进行细胞匀浆,经过两相分离、RNA 沉淀、RNA 清洗后,重新溶解 RNA 沉淀;然后应用 DNase I 消化 RNA 样品,去除其中可能含有的基因组 DNA;RNA 纯化后应用紫外吸收测定法及变性琼脂糖凝胶电泳法进行 RNA 质量检测;最后,逆转录合成 cDNA,进行实时定量 PCR 检测。其数据分析采用 $\Delta\Delta Ct$ 方法。首先计算每个处理组中每个通路相关基因的 ΔCt : $\Delta Ct(\text{group } 1) = \text{average Ct} - \text{average of HK genes' Ct for group } 1 \text{ array}$; $\Delta Ct(\text{group } 2) = \text{average Ct} - \text{average of HK genes' Ct for group } 2 \text{ array}$;然后计算 2 个 PCR Array(或两组)中每个基因的 $\Delta\Delta Ct$: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{组 } 2) - \Delta Ct(\text{组 } 1)$,通常组 1 是对照组,组 2 是实验组;最后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算组 2 与组 1 对应基因的表达差异(差异在 2 倍以上的为差异具有显著性)。

1.8 免疫细胞化学法对 C6 细胞 caspase-3 表达的检测

制备细胞爬片,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定 30

min, 0.1% Triton 透膜 20 min, PBS 冲洗, 以 10% 正常羊血清 37 °C 封闭 30 min, 加入一抗(caspase-3), 稀释比为 1:50, 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤后滴加二抗(兔 SP 免疫组化染色试剂盒), 室温孵育 90 min, PBS 洗 3 次, DAB 试剂盒显色, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 胞质中有棕黄色颗粒为阳性。每张玻片取 8 个视野, 每个视野数 100 个细胞, 计算阳性细胞表达率。

1.9 Western blotting 法检测 caspase-3 的表达

用细胞裂解液裂解细胞后, 取 30 μg 细胞总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 按湿转法将电泳产物转移到 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭 2 h, 滴加一抗(caspase-3), 稀释比为 1:1 000, 4 °C 过夜; TTBS 洗膜 10 min \times 4 次, 滴加二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG) (1:5 000) 37 °C 孵育 2 h; TTBS 洗膜 10 min \times 4 次, 按 ECL 试剂盒说明进行显色。

1.10 统计学处理

采用统计软件 11.5 进行统计。MTT 检测结果采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 方法。应用一元线性回归方法分析抑制率与药物剂量之间的关系, 计算 IC_{50} ; 流式细胞仪检测结果采用秩和检验, 其组间两两比较采用 Nemenyi 法; 免疫细胞化学结果使用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图像分析系统进行定量分析, 计算目的蛋白表达的平均光密度值(mean optical density, MOD), 然后依据上述方法进行统计学分析; Western-blotting 结果通过条带灰度比值对目的蛋白表达进行相对定量, 然后依据上述方法进行统计学分析。

2 结果

2.1 苦参碱对 C6 细胞增殖的抑制

含不同质量浓度苦参碱的培养液对 C6 细胞株的增殖均有抑制作用, 且存在明显的剂量-效应关系(24 h: $R^2 = 0.9658$, $\text{IC}_{50} = 0.715 \text{ mg/ml}$; 48 h: $R^2 = 0.9548$, $\text{IC}_{50} = 0.854 \text{ mg/ml}$; 72 h: $R^2 = 0.9147$, $\text{IC}_{50} = 0.933 \text{ mg/ml}$) (图 1)。此结果表明, 苦参碱在体外能有效抑制 C6 细胞株的增殖, 其作用 24 h 的 IC_{50} 为 0.715 mg/ml。

2.2 倒置显微镜观察苦参碱作用致 C6 细胞形态学改变

正常情况下, C6 细胞株在培养瓶中呈贴壁生长, 细胞呈梭形, 胞质中可见低折光颗粒, 核隐约可见, 圆形, 少数细胞有双核。处于分裂期的 C6 细胞为圆形, 折光性降低, 细胞膜清晰, 可见隐约的细胞

核区, 有时可见处于有丝分裂中、后期的细胞, 可以清楚地观察到染色体呈双排分布。

C6 细胞株在含苦参碱(0.715 mg/ml, 作用 24 h 的 IC_{50}) 的培养液作用 24 h 后, 部分细胞变小变圆, 与临近细胞分离, 失去正常的梭形形态, 细胞伸展性差, 折光性减弱, 轮廓增强, 胞质内可见较多颗粒, 还可见到出芽现象; 且随着苦参碱浓度的升高, 变化的细胞数量越多、越明显, 细胞周围出现游离小体, 核浓缩, 甚至细胞皱缩等细胞凋亡的特征性改变。

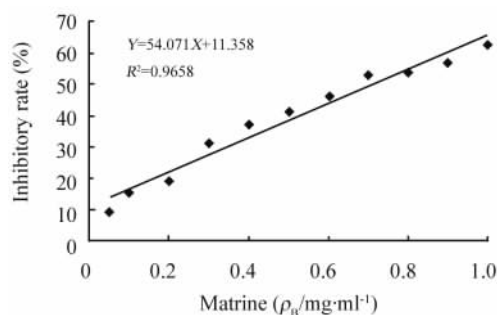


图 1 苦参碱作用 24 h 对 C6 细胞株生长的抑制作用
Fig. 1 Inhibitory effect of C6 glioma cells induced by matrine at various concentrations for 24 h

2.3 透射电镜观察苦参碱作用致 C6 细胞超微结构的改变

通过透射电镜观察细胞发现, 未经苦参碱处理的胶质瘤细胞显示胞膜完整, 表面微绒毛丰富, 细胞器结构正常, 核仁较大, 细胞核异型性明显, 染色质均匀, 常染色质丰富, 核质比小; 胞质中富含细胞器, 杆状线粒体致密, 脊粗大, 基质密度较高, 粗面内质网扩张(图 2A)。在苦参碱(0.715 mg/ml)作用 24 h 后, 细胞呈固缩状态, 体积变小, 表面形成质膜小滴脱落, 胞质内细胞器状态尚可(图 2B); 高倍下核染色质凝集、边集于核膜下, 形成呈新月型、块状或碎裂状改变; 双层核膜结构不清, 模糊增厚, 胞质内游离核糖体发达, 未见解聚, 粗面内质网减少, 线粒体数量稀少, 嵴清晰, 基质密度低(图 2C)。

2.4 流式细胞仪检测不同浓度苦参碱作用后 C6 细胞的凋亡率

分别用含苦参碱质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mg/ml 的培养液处理 C6 细胞 24 h, 然后应用 Annexin V-FITC 染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 结果见图 3、表 1; 其中总凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。结果显示, 苦参碱诱导胶质瘤细胞的凋亡率随着药物剂量的增加而增大, 呈明显的剂量依赖关系。

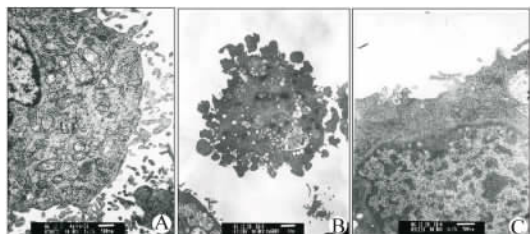


图2 苦参碱(0.715 mg/ml)作用24 h C6细胞超微结构的改变

Fig. 2 Ultrastructural change of C6 cells treated by matrine (0.715 mg/ml) for 24 h

A: Control group (×12 000); B: Matrine group (×6 000); C: Matrine group (×15 000)

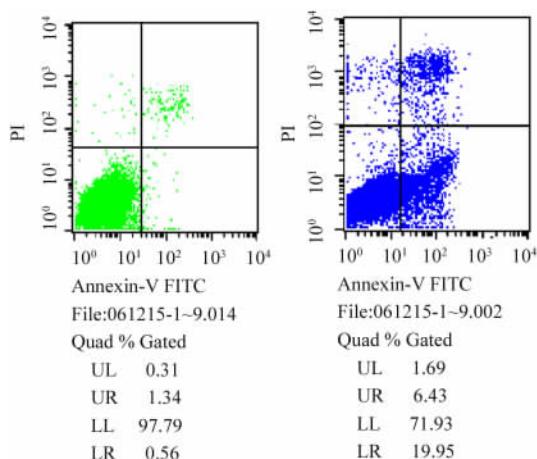


图3 FCM检测苦参碱作用后C6细胞凋亡率的改变

Fig. 3 Apoptosis rate of C6 cells after treatment with matrine by FCM

A: Control group; B: 0.8 mg/ml matrine group

表1 各质量浓度苦参碱对C6细胞株凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Apoptosis rate of C6 cells induced by matrine at various concentrations($\bar{x} \pm s, \%$)

Matrine ($\rho_B/mg \cdot ml^{-1}$)	Apoptosis rate at early stage	Apoptosis rate at later stage	Total apoptosis rate
Control	0.57 ± 0.12	1.33 ± 0.31	1.87 ± 0.47
0.2	1.18 ± 0.25*	1.93 ± 0.42	3.56 ± 0.73*
0.4	4.86 ± 0.64**	2.37 ± 0.57*	6.93 ± 0.47**
0.6	9.52 ± 1.29**	4.01 ± 0.33*	13.56 ± 1.40**
0.8	14.59 ± 1.06**	5.27 ± 0.45*	22.74 ± 1.87**
1.0	18.88 ± 1.58**	6.35 ± 0.14*	27.55 ± 1.92**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.5 实时定量PCR芯片检测苦参碱作用后C6细胞中差异表达的凋亡相关基因

实时定量PCR芯片检测到苦参碱作用后C6细胞出现68个基因有差异表达,其中表达明显上调(表达上调2倍以上)的有57个基因;表达明显下调(表达下调2倍以上)的有11个基因(表2)。以上这些表达明显差异的基因根据结构和功能特点划分主要包括调控细胞程序性死亡的Bcl-2家族、TNF配体家族、TNF受体家族、CIDE Domain家族、IAP家族、Caspase家族、CARD家族、IGF家族、TRAF家族、BNIP家族、DNA损伤检测/P53-ATM通路相关基因以及一些原癌基因等(表3)。其中与诱导凋亡死亡受体途径相关的基因有22个,与线粒体途径有关的基因有15个。

2.6 苦参碱作用致C6细胞中caspase-3蛋白表达的ICC检测结果

免疫细胞化学检测结果显示,对照组细胞中caspase-3表达呈弱阳性(图4A),而苦参碱处理的细胞caspase-3表达呈强阳性(图4B)。此结果经图像系统处理后显示,苦参碱处理组细胞中caspase-3的表达量为(44.33 ± 9.06),明显高于对照组中caspase-3表达量的(29.83 ± 7.39) ($P < 0.05$)。

2.7 苦参碱作用致C6细胞中caspase-3蛋白表达改变的Western blotting结果

图5显示应用Western blotting方法检测苦参碱处理前后C6胶质瘤细胞caspase-3蛋白的表达,苦参碱处理组细胞caspase-3的蛋白表达量为(1.06 ± 0.18),明显高于对照组中蛋白表达量(0.72 ± 0.10) ($P < 0.05$)。

3 讨论

苦参碱为中药苦参中的有效成分,具有多种抗肿瘤作用靶点,其中的靶点之一为诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[5,7,10]。细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡过程,又称I型程序性细胞死亡,其可以被多种生理性、病理性因素刺激诱发,对多细胞生物体发育、组织稳态、肿瘤监视、免疫系统功能等的维持有着重要的意义^[12]。细胞生长失去控制,分化或者凋亡受阻是恶性肿瘤形成的主要原因。肿瘤细胞存在自发的细胞凋亡,这种细胞凋亡过程受药物、放射线、细胞因子、激素、基因编程等调节。细胞凋亡与肿瘤的发生、发展、消退有密切关系,诱导细胞凋亡可能是抑制肿瘤生长的机制之一。近年研究发现,放疗等多种抗肿瘤治疗的部分机制都与诱导凋亡有关。

表 2 苦参碱作用 24 h 后 C6 细胞出现的凋亡相关基因的表达差异
 Tab. 2 Different expressions of apoptosis relative genes in C6 cells after treatment with matrine for 24 h

Unigene No.	Gene symbol	Fold change	Unigene No.	Gene symbol	Fold change
Hs. 523309	<i>BAG3</i>	-11.24	Hs. 408312	<i>TP53</i>	10.56
Hs. 469658	<i>BCL2L11</i>	-10.85	Hs. 443577	<i>TNFRSF21</i>	10.63
Hs. 552567	<i>APAF1</i>	-7.84	Hs. 138378	<i>CASP4</i>	11.47
Hs. 410026	<i>BCL2L2</i>	-6.92	Hs. 193516	<i>BCL10</i>	13.74
Hs. 249129	<i>CIDEA</i>	-6.06	Hs. 368982	<i>CASP2</i>	14.03
Hs. 103755	<i>RIPK2</i>	-4.89	Hs. 503704	<i>BIRC2</i>	14.22
Hs. 412707	<i>HPRT1</i>	-4.63	Hs. 244139	<i>FAS</i>	14.32
Hs. 550061	<i>BRAF</i>	-3.89	Hs. 521456	<i>TNFRSF10B</i>	14.32
Hs. 159428	<i>BAX</i>	-3.32	Hs. 510528	<i>TRAF3</i>	14.62
Hs. 522506	<i>TRAF2</i>	-3.07	Hs. 525622	<i>AKT1</i>	14.83
Hs. 150107	<i>BIRC6</i>	-2.14	Hs. 86131	<i>FADD</i>	15.35
Hs. 241570	<i>TNF</i>	2.04	Hs. 643120	<i>IGF1R</i>	15.56
Hs. 494901	<i>TNFSF8</i>	2.19	Hs. 1116	<i>LTBR</i>	16.00
Hs. 380277	<i>DAPK1</i>	2.23	Hs. 377484	<i>BAG1</i>	16.22
Hs. 642693	<i>CIDEB</i>	2.66	Hs. 646490	<i>BNIP2</i>	16.45
Hs. 591834	<i>TNFRSF10A</i>	3.32	Hs. 484782	<i>DFFA</i>	16.68
Hs. 632486	<i>MCL1</i>	3.34	Hs. 279594	<i>TNFRSF1A</i>	17.15
Hs. 8375	<i>TRAF4</i>	3.58	Hs. 485139	<i>BAK1</i>	17.39
Hs. 2490	<i>CASP1</i>	3.71	Hs. 38533	<i>CRADD</i>	17.39
Hs. 389452	<i>CASP6</i>	4.5	Hs. 370254	<i>BAD</i>	18.13
Hs. 478275	<i>TNFSF10</i>	4.56	Hs. 534255	<i>B2M</i>	18.38
Hs. 5353	<i>CASP10</i>	5.54	Hs. 486542	<i>BCLAF1</i>	18.64
Hs. 472860	<i>CD40</i>	5.58	Hs. 141125	<i>CASP3</i>	18.64
Hs. 513667	<i>NOL3</i>	5.86	Hs. 81791	<i>TNFRSF11B</i>	18.77
Hs. 499094	<i>PYCARD</i>	7.46	Hs. 523968	<i>TP53BP2</i>	18.77
Hs. 431048	<i>ABL1</i>	7.52	Hs. 546356	<i>RPL13A</i>	18.77
Hs. 405153	<i>NOD1</i>	7.52	Hs. 390736	<i>CFLAR</i>	19.43
Hs. 516966	<i>BCL2L1</i>	7.73	Hs. 462529	<i>TNFRSF25</i>	21.41
Hs. 144873	<i>BNIP3</i>	8.11	Hs. 460996	<i>TRADD</i>	23.59
Hs. 356076	<i>BIRC4</i>	8.57	Hs. 446146	<i>CARD8</i>	25.11
Hs. 131226	<i>BNIP3L</i>	8.57	Hs. 591054	<i>BID</i>	26.35
Hs. 329502	<i>CASP9</i>	8.75	Hs. 145726	<i>BNIP1</i>	28.84
Hs. 80409	<i>GADD45A</i>	9.45	Hs. 9216	<i>CASP7</i>	29.86
Hs. 194726	<i>BAG4</i>	9.78	Hs. 127799	<i>BIRC3</i>	85.63

表 3 苦参碱作用后 C6 细胞出现表达差异基因的分类

Tab. 3 Classification of differentially expressed genes in C6 cells after treatment with matrine

Type	Gene
Bcl-2 families	<i>BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L1, BCL2L11, BCL2L2, BCLAF1, BID, HRK</i>
TNF ligand family	<i>TNF, TNFSF8, TNFSF10, FAS</i>
TNF receptor family	<i>TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF25, FADD, LTBR, MCL1, CD44</i>
CIDE Domain family	<i>CIDEA, CIDEB, DFFA, DAPK1, CRADD</i>
IAP family	<i>BIRC2, BIRC3, BIRC4, BIRC6</i>
Caspase family	<i>CASP1, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP7, CASP9, CASP10</i>
CARD family	<i>CARD8, NOL3, PYCARD</i>
IGF family	<i>IGF1R</i>
TRAF family	<i>TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRADD</i>
BNIP family	<i>BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L</i>
DNA/P53-ATM	<i>GADD45A, TP53, TP53BP2</i>
Proto-oncogene	<i>ABL1, AKT1, BRAF</i>
Other	<i>APAF1, CFLAR, RIPK2, B2M, HPRT1, RPL13A, NOD1</i>

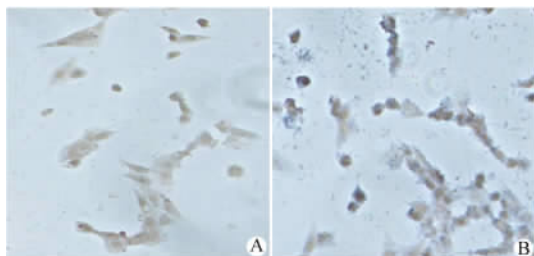


图 4 免疫细胞化学方法检测苦参碱作用后 C6 细胞中 caspase-3 表达的变化

Fig. 4 Change of caspase-3 expression in C6 cells after treatment with matrine by ICC

A: Control group (×200); B: Matrine group (×200)

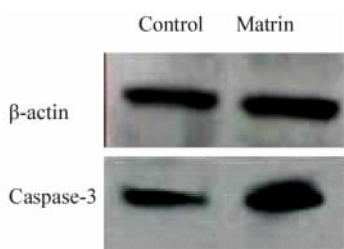


图 5 Western blotting 检测苦参碱作用后 C6 细胞中 caspase-3 表达的改变

Fig. 5 Expression change of caspase-3 in C6 cells after treatment with matrine as detected by Western blotting

本研究通过 MTT 检测、FCM 检测、细胞的形态

学观察以及采用电镜等手段,证实苦参碱可显著抑制胶质瘤细胞的增殖、诱导其凋亡,并呈明显的剂量-效应关系。同时,经苦参碱处理后,部分 C6 细胞出现细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻,细胞皱缩、体积缩小,细胞核染色质浓缩、边缘化,染色质 DNA 断裂;部分细胞器、核糖体和核碎片被细胞膜包裹形成凋亡小体,从细胞表面出芽脱落,最后被具有吞噬功能的细胞如巨噬细胞、上皮细胞等吞噬,完全符合细胞凋亡的形态学表现。有研究表明,苦参碱可以诱导胃癌细胞 MKN45^[10]、白血病细胞 K562^[7]及 U937^[5]的凋亡。本研究结果与这些文献报道实验结果一致。

凋亡主要由两个经典途径所诱导:外在的死亡受体途径和内在的线粒体途径^[13-14]。本研究实时定量 PCR 芯片结果显示,经苦参碱(0.715 mg/ml)处理 24 h 后,与死亡受体途径相关的基因中 22 个基因表达发生明显改变,其中的 TNFRSF25、TRADD 及 CARD8 的基因表达水平上调比例达 20 倍以上;与线粒体途径相关的基因^[15]中 15 个基因表达发生明显改变,其中 BID 的基因表达水平上调达 26.35 倍。最近一些观点^[16]认为,对 Bcl-2 蛋白的中和作用不足以导致细胞凋亡,因为 Bax 本身不是很活跃,它需要 BH3-only 蛋白如 Bim 和 Bid 的直接激活。

无论是凋亡的死亡受体途径还是线粒体途径,最终都要经过胱天蛋白酶(caspases)的级联活化,

才能引起凋亡。因此,将胱天蛋白酶的级联活化称作凋亡的执行阶段^[17],其中,将 caspase-3 称作凋亡的执行者。本研究实时定量 PCR 芯片结果显示,经苦参碱(0.715 mg/ml)处理 24 h 后,caspases 家族中有 8 个基因表达发生明显改变,其中,caspase-2、caspase-3、caspase-4 及 caspase-7 的基因表达水平上调比例达 10 倍以上。另外,本研究通过免疫细胞化学、Western blotting 等方法对苦参碱处理前后 C6 细胞中 caspase-3 蛋白的表达水平进行了检测。实验证实,经苦参碱处理后,C6 胶质瘤细胞中 caspase-3 蛋白表达显著上调,两种方法的检测结果与 PCR 芯片的结果均保持一致。本实验结果说明,苦参碱诱导胶质瘤细胞凋亡是通过死亡受体途径及线粒体途径调节多个与凋亡相关基因的表达,最终引起凋亡的执行者-caspase-3 表达的上调来实现的。

在凋亡的进程中,从线粒体释放 CytoC 到胱天蛋白酶级联活化的过程中凋亡抑制蛋白家族(apoptosis inhibitory protein, IAPs)起着重要的调节作用^[18]。但本实验中其家族成员表达水平不是下调而是上调,特别是 BIRC3,上调比例达到 85.63。此结果与 IAP 家族在凋亡过程中的作用^[19]截然相反,是否是由于一系列有关凋亡的信号大范围、大水平的扩大,特别是 Smac 的大量释放产生拮抗作用,而引起 IAP 家族成员反馈性的上调,需要在今后的研究工作中去证实。

综上所述,苦参碱抑制胶质瘤细胞增殖、诱导胶质瘤细胞凋亡的作用是肯定的,它诱导凋亡的作用可能是通过多途径、多水平、多基因基础上来实现的,特别是通过诱导 caspases 家族中 caspase-3 的表达上调来实现的。

[参 考 文 献]

- [1] Li Y, Wang B, Zhou C, *et al.* Matrine induces apoptosis in angiotensin II-stimulated hyperplasia of cardiac fibroblasts: effects on Bcl-2/Bax expression and caspase-3 activation[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 101(1): 1-8.
- [2] Liu J, Zhu M, Shi R, *et al.* Radix *Sophorae flavescens* for chronic hepatitis B: a systematic review of randomized trials[J]. *Am J Chin Med*, 2003, 31(3): 337-354.
- [3] Long Y, Lin XT, Zeng KL, *et al.* Efficacy of intramuscular matrine in the treatment of chronic hepatitis B[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(1): 69-72.
- [4] Zhu XH, Qiu YD, Shi MK. Effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells in rat orthotopic liver transplantation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(2): 169-174.
- [5] Liu XS, Jiang J, Jiao XY, *et al.* Matrine-induced apoptosis in leukemia U937 cells: involvement of caspases activation and MAPK-independent pathways[J]. *Planta Med*, 2006, 72(6): 501-506.
- [6] Jiang H, Hou C, Zhang S, *et al.* Matrine upregulates the cell cycle protein E2F-1 and triggers apoptosis via the mitochondrial pathway in K562 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559(2-3): 98-108.
- [7] Chui CH, Lau FY, Tang JC, *et al.* Activities of fresh juice of *Scutellaria barbata* and warmed water extract of radix *sophorae tonkinensis* on anti-proliferation and apoptosis of human cancer cell lines[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(2): 337-341.
- [8] Hu MJ, Zeng H, Wu YL, *et al.* Synergistic effects of matrine and 5-fluorouracil on tumor growth of the implanted gastric cancer in nude mice[J]. *Chin J Dig Dis*, 2005, 6(2): 68-71.
- [9] Zhang L, Wang T, Wen X, *et al.* Effect of matrine on HeLa cell adhesion and migration[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 563(1-3): 69-76.
- [10] Luo C, Zhu Y, Jiang T, *et al.* Matrine induced gastric cancer MKN45 cells apoptosis via increasing pro-apoptotic molecules of Bcl-2 family[J]. *Toxicology*, 2007, 229(3): 245-252.
- [11] Zhu XH, Qiu YD, Shi MK. Effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells in rat orthotopic liver transplantation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(2): 169-174.
- [12] Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis [J]. *Leukemia*, 2004, 18(7): 1176-1199.
- [13] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626-629.
- [14] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing[J]. *Cell Signal*, 2004, 16(2): 139-144.
- [15] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [16] Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly[J]. *Mol Cell*, 2005, 17(4): 525-535.
- [17] Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2002, 7(4): 313-319.
- [18] Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead[J]. *Cell*, 2005, 121(5): 671-674.
- [19] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis[J]. *Cell*, 2005, 120(2): 237-248.

[收稿日期] 2008-07-04

[修回日期] 2008-08-26

[本文编辑] 郁晓路