

苦参碱抑制人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株增殖和促凋亡的实验研究

种 铁¹, 牛建强¹, 王子明¹, 余军军¹, 黄 晨²

(1. 西安交通大学第二医院泌尿外科, 陕西 西安 710004; 2. 西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 观察苦参碱对体外人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株增殖及细胞凋亡的影响, 探讨苦参碱诱导 GRC-1 细胞株凋亡的作用机制。方法: 应用不同浓度的苦参碱分别作用于人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株 24、48、72、96 h。采用 MTT 法观察苦参碱对 GRC-1 细胞株的细胞毒作用; 透射电镜和流式细胞术观察、检测苦参碱诱导的细胞凋亡; 免疫细胞化学技术检测苦参碱对 GRC-1 细胞株 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。结果: 不同浓度的苦参碱对 GRC-1 细胞株均有一定的增殖抑制作用, 且呈量效和时效关系。苦参碱能明显诱导 GRC-1 细胞株凋亡。经苦参碱作用后, GRC-1 细胞株 Bcl-2 蛋白表达明显减弱而 Bax 蛋白表达明显增强。结论: 苦参碱对体外人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株有一定的增殖抑制作用, 其机制可能与调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值以诱导细胞凋亡相关。

[关键词] 苦参碱; 肾肿瘤; 细胞凋亡

[中图分类号] R737.11 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)04-0388-04

Effects of matrine on proliferation and apoptosis of human renal cell carcinoma cell line GRC-1

Tie CHONG¹, Jian-Qiang NIU¹, Zi-Ming WANG¹, Jun-Jun SHE¹, Chen HUANG²

(1. Department of Urology, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province 710004, China; 2. Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Xi'an Jiaotong University, Ministry of Education, Xi'an, Shaanxi Province 710004, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of matrine on proliferation and apoptosis of human renal cell carcinoma cell line GRC-1 in vitro, and to explore its mechanism. Methods: The human renal cell carcinoma cell line GRC-1 was treated with matrine of different concentrations for 24, 48, 72 and 96 h respectively. The MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effects of matrine on GRC-1 cells. The transmission electron microscope and flow cytometry were utilized to observe and detect the apoptosis of GRC-1 cells induced by matrine. The expression levels of Bcl-2 and Bax proteins were evaluated by streptavidin-biotin-peroxidase method. Results: The matrine of different concentrations all have cytotoxic effects on GRC-1 cells, with obvious dose- and time-dependent effects. The apoptosis induced by matrine was confirmed in GRC-1 cells. With intervention of matrine (1.5g/L) for 12 h, the expression level of Bcl-2 in GRC-1 cells was decreased while the expression level of Bax was increased as compared with those in the untreated group. Conclusion: The proliferation-inhibiting effects of matrine on human renal cell carcinoma cell line GRC-1 may be related to down-regulating the ratio of Bcl-2/Bax protein expression and promoting the apoptosis.

KEY WORDS matrine; kidney neoplasms; apoptosis

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于膀胱癌而位居泌尿系统常见肿瘤的第二位。肾癌具有先天耐药的特性,对化疗和放疗均不敏感,因此手术是目前治疗肾癌唯一而有效的手段。但临床统计发现,20%~30%的肾癌患者因就诊时已发生淋巴结转移或静脉侵犯而失去了手术切除的机会,即使能够手术切除,术后仍有20%~40%的患者出现复发和转移^[1],对这些患者目前仍缺乏有效的治疗方法。近年来,中医中药在癌症治疗中的作用日益受到重视。苦参碱是从苦参、苦豆子等豆科槐属植物中提取的一种活性物质。最近有研究发现,苦参碱对肿瘤细胞株 HepG2、AGS、HT-29 均有抑制增殖和诱导细胞凋亡的作用^[2~4],应用苦参碱治疗人体其他系统的恶性肿瘤亦取得了较好的疗效^[5,6]。但苦参碱对肾癌是否具有治疗作用,目前尚缺乏相关的实验和临床报道。本实验通过观察不同浓度苦参碱对体外人肾癌细胞系 GRC-1 的作用,初步探讨苦参碱治疗肾癌的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株 人肾颗粒细胞癌细胞系 GRC-1 细胞株(由北京医科大学泌尿研究所提供),取自西安交通大学第一医院分子生物学中心,在常规 37℃、5% CO₂ 及完全饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 主要试剂 苦参碱由西安鸿生生物技术有限公司惠赠,纯度>98%。优级新生牛血清,购自兰州民海生物工程有限公司,批号 No. 2005517。RPMI1640 培养基,购自美国 Gibco 公司,批号 No. 1285082。膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉(Annexin-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin-FITC/PI)双标记染色试剂,购自深圳晶美生物工程有限公司,批号 No. 20050610。Bcl-2 抗体(批号 No. 10205)和 Bax 抗体(批号 No. H0105)均为美国 Santa Cruz 公司产品。链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-biotin-peroxidase method, SP)鼠二抗试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 No. 51182001。

1.1.3 主要仪器 POLARstar OPTIMA 多功能微板测试系统,购自德国 BMG LABTEC 公司。FACSCalibur 流式细胞仪,购自美国 BD 公司。PB203-N 电子微量天平,购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法测定苦参碱对 GRC-1 细胞株增殖的影响 取对数生长状态良好的 GRC-1 细胞株,制

备细胞悬液,调整细胞浓度后加入 96 孔板(购自美国 Corning Costar 公司),每孔加入 100 μl 细胞悬液,使每孔细胞数达到 5 × 10³。随后加入苦参碱,使其终浓度分别达到 0.3、0.5、0.8、1.0、1.5 g/L。同时另设调零孔和阴性对照孔。每组设 5 个复孔。于作用 24、48、72、96 h 时,每孔分别加入 5 g/L MTT 20 μl,37℃ 孵育 4 h,弃上清。每孔加入 150 μl 二甲亚砜。振荡使结晶溶解,平板摇床微振荡 20 min。应用 POLARstar OPTIMA 多功能微板测试系统,于波长 490 nm 处测得每孔的吸光度(A),重复测量 3 次。计算细胞生长抑制率(%) = [1 - (A_{苦参碱组} - A_{空白对照组}) / (A_{阴性对照组} - A_{空白对照组})] × 100。

1.2.2 透射电镜下观察 GRC-1 细胞株超微结构

取对数生长期细胞,将终浓度为 1.0 g/L 的苦参碱作用于贴壁生长的 GRC-1 细胞株 48 h 后,用胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀的细胞用 4℃ 预冷的 3% 戊二醛固定 2 h。PBS 液冲洗,1% 锇酸固定 1 h,丙酮梯度脱水,618 环氧树脂包埋,制成超薄切片铜网,经醋酸铀、枸橼酸铅染色后在透射电镜下进行观察。以不加苦参碱培养 48 h 的 GRC-1 细胞株作为空白对照组。

1.2.3 流式细胞术检测 GRC-1 细胞株凋亡 参照张德杰等文献报道^[7],6 孔板中加入细胞悬液,12 h 后细胞完全贴壁。将 1 号孔设为阴性对照,于 2、3、4 号孔内加入苦参碱使终浓度分别达 0.5、1.0、1.5 g/L,作用 12 h 后用胰酶消化,吹打脱落,PBS 液洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加缓冲液 200 μl,取 100 μl 作为参照。各管中分别加入 Annexin-FITC/PI 双标试剂,避光放置 30 min,用 FACSCalibur 流式细胞仪进行检测分析。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 GRC-1 细胞株 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 将无菌盖玻片置于 6 孔板内,加入细胞悬液,培养 24 h,细胞贴壁生长于玻片后,加入苦参碱使终浓度达到 1.5 g/L,另设不加苦参碱为空白对照组,作用 12 h 后,用 90% 乙醇固定玻片 15 min。SP 法按试剂盒说明书进行操作。PBS 液代替一抗作为阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照。结果分析:排除细胞爬片边缘的细胞,于 10 × 10 低倍镜下随机选取 10 个细胞均匀分布的视野,10 × 20 中倍镜下每个视野再随机选 50 个细胞。按染色强度分为 4 个等级:无着色,0 分;淡黄色,1 分;棕黄色,2 分;棕褐色,3 分。按公式 HSCORE = $\sum_{i=0}^3 Pi(i+1)^{i+1}$ ^[8] 计算切片的化学积分,式中 i = 染色强度等级(0、1、2、3),Pi 表示评分为 i 的阳性细胞占切片中所有细胞的百分比。

1.3 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表

示,采用析因设计的方差分析,两样本均数比较采用成组 *t* 检验。

2 结果

2.1 苦参碱对 GRC-1 细胞株增殖的抑制作用

MTT 实验结果显示, GRC-1 细胞株增殖抑制率随苦参碱浓度的增高、作用时间的延长而逐渐升高,呈现明显的量效和时效关系。见表 1。

2.2 苦参碱对 GRC-1 细胞株超微结构的影响 苦参碱作用于 GRC-1 细胞株后,于凋亡 期即凋亡前期,细胞核内染色质高度盘绕并出现空泡结构;凋亡

期,细胞核内染色质高度凝聚、边缘化,细胞核和细胞质发生浓缩、皱缩、碎裂,形成凋亡小体。空白对照组 GRC-1 细胞株细胞器正常,染色质均匀分散、密度一致,核仁大且完整。见图 1。

2.3 苦参碱促进 GRC-1 细胞株凋亡的作用 空白对照组 GRC-1 细胞株细胞凋亡率为 14.41%;苦参碱 0.5、1.0、1.5 g/L 作用 12 h 后 GRC-1 细胞株细胞凋亡率分别为 31.62%、40.42%、55.65%,且以早期凋亡细胞为主。见图 2(右上象限为晚期凋亡细胞,右下象限为早期凋亡细胞,左上象限为坏死细胞,左下象限为正常细胞)。

表 1 苦参碱对人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株增殖的抑制作用

Table 1 Growth-inhibiting effects of matrine on human renal cell carcinoma cell line GRC-1

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

Concentration of matrine	n	Growth-inhibiting rate			
		24 h	48 h	72 h	96 h
0.3 g/L	5	6.3 ± 5.7	8.8 ± 3.2	14.9 ± 12.8	18.4 ± 12.0
0.5 g/L	5	11.5 ± 6.6	12.3 ± 9.6	21.9 ± 6.5	22.4 ± 2.0
0.8 g/L	5	20.5 ± 7.7	23.1 ± 8.1	25.4 ± 9.0	36.2 ± 4.8
1.0 g/L	5	23.6 ± 6.1	25.4 ± 7.4	29.2 ± 9.5	45.8 ± 2.9
1.5 g/L	5	31.6 ± 4.2	32.0 ± 5.5	34.0 ± 4.9	60.2 ± 2.1

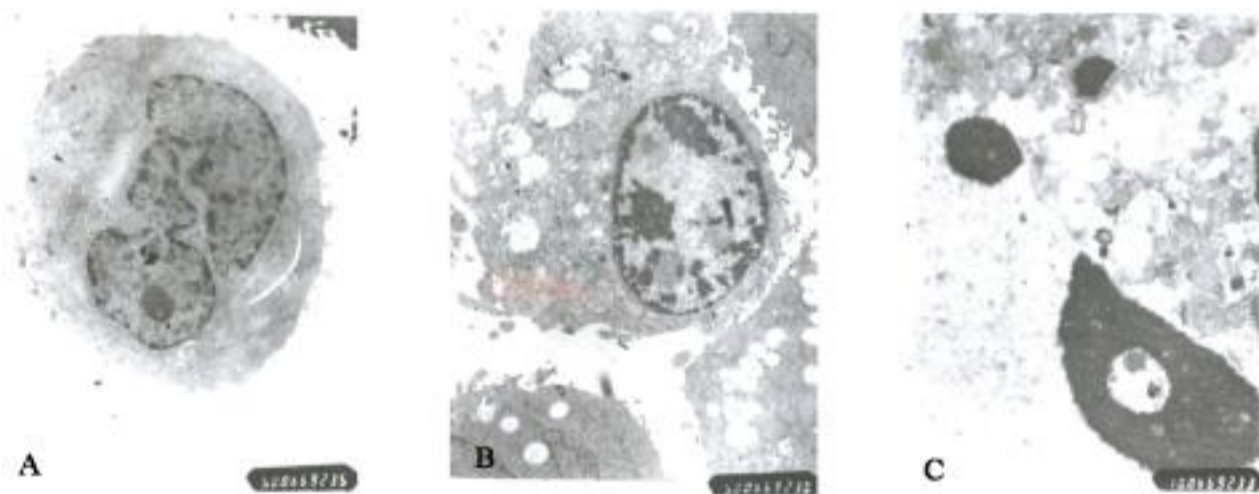


图 1 透射电镜下各组人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株的超微结构

Figure 1 Ultrastructure of human renal cell carcinoma cell line GRC-1 in different groups detected by transmission electron microscope

A: Untreated group; B: Matrine (1.0 g/L)-treated group (phase of apoptosis); C: Matrine (1.0 g/L)-treated group (phase of apoptosis).

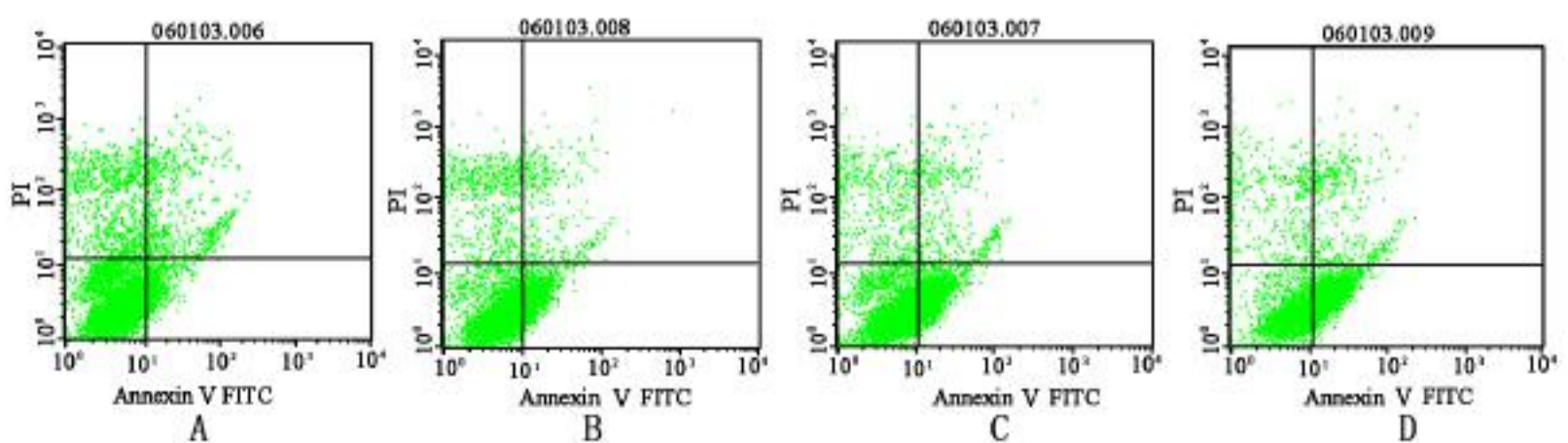


图 2 各组人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株 Annexin -FITC PI 双标记染色及流式细胞术检测结果

Figure 2 Classification percentage of human renal cell carcinoma cell line GRC-1 in different groups by Annexin -FITC PI staining assay and flow cytometry

A: Untreated group; B: Matrine (0.5 g/L)-treated group; C: Matrine (1.0 g/L)-treated group; D: Matrine (1.5 g/L)-treated group.

2.4 苦参碱对 GRC-1 细胞株 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 与空白对照组比较,经苦参碱作用后 GRC-1 细胞株 Bcl-2 蛋白表达减弱,胞浆棕黄色颗粒减少;Bax 蛋白表达增强,胞浆棕黄色颗粒明显增加。见表 2。

表 2 苦参碱对人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Table 2 Expressions of Bcl-2 and Bax proteins in human renal cell carcinoma cell line GRC-1 in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Bcl-2 protein	Bax protein
Untreated	10	2.765 ± 0.020	2.467 ± 0.060
Matrine (1.5 g/L)-treated	10	2.655 ± 0.005	2.699 ± 0.020
t		12.84	10.82
P		< 0.01	< 0.01

3 讨论

体外实验证实,不同肿瘤细胞对苦参碱的敏感性不同。0.5 g/L 浓度的苦参碱作用于肝癌 HepG2 细胞株 24 h 的生长抑制率为 10.7%,随着作用时间的延长,生长抑制率 > 50%^[2]。0.5 g/L 浓度的苦参碱作用于胃癌 AGS 细胞株 72 h 的生长抑制率可达 68.6%^[3]。本实验采用 0.3~1.5 g/L 浓度的苦参碱分别作用于 GRC-1 细胞株 24、48、72、96 h。结果表明,随着苦参碱浓度的升高和作用时间的延长,苦参碱对 GRC-1 细胞株的生长抑制作用也逐渐增强。1.0 和 1.5 g/L 浓度的苦参碱作用于 GRC-1 细胞株 96 h 的生长抑制率可分别高达 45.8% 和 60.2%。由此可见,苦参碱对体外 GRC-1 细胞株具有明显的增殖抑制作用,且呈现量效和时效关系。

本研究结果还显示,1.0 g/L 浓度的苦参碱作用于 GRC-1 细胞株 48 h 后,GRC-1 细胞株呈现典型的细胞凋亡特征性变化。同时,随着苦参碱浓度的增加,GRC-1 细胞株凋亡率亦呈上升趋势,且以早期凋亡细胞为主,提示苦参碱可诱导 GRC-1 细胞株凋亡,从而抑制 GRC-1 细胞株的增殖。

bcl-2/Bax 是 bcl-2 基因家族中的重要成员,在

细胞凋亡中起重要作用。当 Bcl-2 蛋白表达增强时,细胞凋亡受到抑制;反之,当 Bax 蛋白表达占优时,细胞易于在诱导剂的作用下发生凋亡^[9]。与空白对照组比较,1.5 g/L 浓度的苦参碱作用于 GRC-1 细胞株 24 h 后 Bcl-2 蛋白表达减弱而 Bax 蛋白表达增强。提示,苦参碱诱导的 GRC-1 细胞株凋亡可能与 Bcl-2/Bax 蛋白表达比值下降相关。

通过以上研究,我们认为苦参碱能明显抑制体外肾癌细胞系 GRC-1 细胞株的增殖及诱导细胞凋亡。

[参考文献]

- Amato RJ. Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. *Ann Oncol*, 2005, 16(1): 7-15.
- 司维柯,李鹏,王源,等.苦参碱抗人肝癌细胞株 HepG2 的作用及其机制研究. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*, 2003, 24(5): 288-290.
- 曾晖,胡梅洁,张曙,等.苦参碱体外对胃癌细胞的杀伤作用. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(1): 38-40.
- 彭彦辉,郝玉宾,史迎钦,等.苦参碱对肠癌 HT-29 细胞株增殖的抑制作用及其机制. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(11): 1353-1354.
- 赵亚群,尚辉辉,吴忠琪,等.以顺铂为主方案加复方苦参注射液治疗晚期非小细胞肺癌. *中国肺癌杂志*, 2005, 8(1): 63-65.
- 梁建新,曾文铤,朱科伦,等.苦参碱联合介入化疗栓塞治疗中晚期肝癌疗效观察. *广州医药*, 2005, 36(3): 45-47.
- 张德杰,黄世林,陈楠楠,等.补骨脂素加长波紫外线照射对白血病 K562 细胞的杀伤作用. *中西医结合学报*, 2005, 3(6): 480-483.
- Harrington DJ, Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis. *J Pathol*, 1999, 187(2): 242-248.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.

[收稿日期] 2006-03-14