

· 基础研究 ·

# 槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 生长与侵袭的影响及机制研究

王庆华<sup>1</sup> 韩 玮<sup>2</sup> 陈达飞<sup>3</sup> 高小姣<sup>4</sup> 谢俊杰<sup>2</sup> 任 静<sup>2</sup> 王炳芳<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 分析槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖、凋亡及侵袭的影响及其机制。**方法** 常规培养肝癌细胞 SMMC-7721, 以 0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 mmol/L 槐果碱处理细胞, 采用 MTT、平板克隆形成、流式细胞术及 Transwell 侵袭实验观察细胞增殖能力、凋亡情况及侵袭能力的改变, 采用 Western Blot 检测 Bcl-2、Bax、p-Akt、MMP-3、MMP-9 及 TIMP-3 蛋白表达差异。**结果** 随着槐果碱浓度升高, 抑制率逐渐上升,  $IC_{50}$  为 2.380 mmol/L, 故选 1、2、4 mmol/L 作为干预浓度。槐果碱作用 48 h 后, 随着槐果碱浓度升高, 凋亡率增加, 克隆形成数及侵袭能力显著抑制 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 胞内 Bcl-2、p-Akt、MMP-3 和 MMP-9 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), TIMP-3 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 槐果碱通过调控 Bcl-2、Bax 和 p-Akt 水平抑制 SMMC-7721 生长, 并调控 MMP 家族和 TIMP 家族蛋白抑制细胞侵袭能力。

**关键词** 槐果碱; 肝癌; 生长; 侵袭

The Role and Mechanism of Sophocarpine on the Survival and Invasion of Hepatoma Carcinoma Cell SMMC-7721 WANG Qing-hua<sup>1</sup>, HAN Wei<sup>2</sup>, CHEN Da-fei<sup>3</sup>, GAO Xiao-jiao<sup>4</sup>, XIE Jun-jie<sup>2</sup>, REN Jing<sup>2</sup>, and WANG Bing-fang<sup>1</sup> 1 Gastroenterology Department, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Jiangsu(215300); 2 Medical College, Jiangsu University, Jiangsu(215300); 3 Anesthesiology Department, Kunshan Huaqiao People's Hospital, Jiangsu(215300); 4 Pathology Department, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Jiangsu(215300)

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the role of sophocarpine on proliferation, apoptosis and invasion of SMMC-7721. **Methods** We chose SMMC-7721 for culturing and selected out suitable concentrations (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mmol/L) of sophocarpine according to  $IC_{50}$ . MTT, plate clone formation assay, flow cytometry and Transwell assay were used to examine changes of biological behaviors of SMMC-7721. In addition, Western Blot was also used to determine the protein expression of Bcl-2, Bax, p-Akt, MMP-3, MMP-9 and TIMP-3. **Results** The inhibition rate increased gradually with the increase of sophocarpine concentration. The  $IC_{50}$  of the SMMC-7721 was 2.380 mmol/L. Thus, we selected 1, 2 and 4 mmol/L to treat cells. With the increase of sophocarpine concentration, the number of clone formation was decreased and the apoptosis rate was increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), the levels of Bcl-2, p-Akt, MMP-3 and MMP-9 were decreased, while TIMP-3 increased ( $P < 0.05$ ), the invasive rate was also decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sophocarpine could inhibit the growth of SMMC-7721 via regulating the levels of Bcl-2, Bax and p-Akt, and inhibit the invasion of SMMC-7721 via regulating the levels of MMPs and TIMPs.

**KEYWORDS** sophocarpine; hepatocellular carcinoma; survival; invasion

基金项目: 昆山市科技发展项目 (No.KS1659)

作者单位: 1. 江苏大学附属昆山医院消化内科 (江苏 215300); 2. 江苏大学医学院 (江苏 212000); 3. 昆山市花桥人民医院麻醉科 (江苏 215300); 4. 江苏大学附属昆山医院病理科 (江苏 215300)

通讯作者: 王炳芳, Tel: 0512-57576025, E-mail: bingfang@sh163.net

DOI: 10.7661/j.cjim.20180616.029

原发性肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在我国高居第二,严重威胁着人类生命健康<sup>[1]</sup>。槐果碱(sophocarpine)是苦参中分离出来的一种苦参碱类生物碱,其分子式为  $C_{15}H_{22}N_2O$ , 相对分子质量为 246.4, 已被认为具有强烈的抗病毒及杀虫活性<sup>[2,3]</sup>。有研究发现,以槐果碱和美法仑为原料,利用拼合原理制备的 MAT-MEL 对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显增殖抑制作用<sup>[4]</sup>。然而,槐果碱对肝癌侵袭作用的影响报道较少,其作用机制也还未完全被发现。因此,本实验选取肝癌细胞 SMMC-7721,应用槐果碱作用后分析细胞学习性的改变及其机制,为探索新的抗癌药物提供科学依据。

## 材料与方 法

1 细胞 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自复旦 IBS 细胞资源中心(货号:FDCC-HGC280),于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中在 37 ℃、5%  $CO_2$  实验条件下常规培养。

2 主要药物、试剂及仪器 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司(货号:11011-8611);无血清培养基(货号:17504-044)、高糖培养液(DMEM 培养液,货号:SH30022.01B)及胰酶(货号:25200-056)购自美国 Gibco 公司;结晶紫(货号:46364)、二甲基亚砜(DMSO,货号:D2650)和四甲基噻唑蓝(MTT,货号:M2128)购自美国 Sigma 公司;细胞凋亡检测试剂盒(货号:CW2574)及磷酸化酶抑制剂(货号:CW2383)购自北京康为世纪生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 Costar 公司(货号:3402);兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体(货号:bs-0032R)、兔抗人 Bax 多克隆抗体(货号:bs-4564R)、小鼠抗人 Akt 单克隆抗体(货号:bsm-33325M)、小鼠抗人 p-Akt 单克隆抗体(货号:bsm-33281M)、兔抗人 MMP-3 多克隆抗体(货号:bs-0413R)、兔抗人 MMP-9 多克隆抗体(货号:bs-0397R)、兔抗人 TIMP-3 多克隆抗体(货号:bs-0417R)以及小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(货号:bsm-33036M)购自北京博奥森生物技术有限公司;上样缓冲液(货号:P0015)、BCA 蛋白测定试剂盒(货号:P0010)及 RIPA 裂解液(货号:P0013B)购自碧云天生物技术研究。槐果碱购自南京普怡生物科技有限公司,纯度为 98%,先用 DMSO 溶解并配制成浓度为 1 g/mL 的母液 4 ℃ 保存,再将母液按不同浓度滴加于培养基中,配制成细胞处理所需的 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mmol/L,用于作用细

胞进行实验。

倒置显微镜(型号 E100)购自美国 Nikon 公司;细胞流式仪(型号 e126037)购自美国 BD 公司;-80 ℃超低温冰箱(型号 702)购自美国 Thermo Fisher 公司;荧光显微镜(型号 XSP-14C)购自上海精密仪器仪表公司;化学发光仪(型号 CCD-Camera 810)购自德国耶拿分析仪器股份公司。

3 增殖抑制实验 参照参考文献[5],取对数生长期的 SMMC-7721 细胞经消化离心重悬后,调整细胞密度约为  $5 \times 10^4$  个/mL,每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板中,于 37 ℃、5%  $CO_2$  的培养箱中培养过夜,加入每孔 100  $\mu$ L 不同浓度的槐果碱,并设对照组,即加入等体积细胞培养液,每组设 5 个复孔,培养 48 h 后,每孔加入新鲜配制的 50  $\mu$ L 的 MTT 溶液,继续于 37 ℃、5%  $CO_2$  的培养箱中培养 4 h 后弃上清,每孔加 150  $\mu$ L 的 DMSO 充分混匀后于酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度值(OD 值),抑制率 =  $(1 - OD_{\text{给药组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。根据各组抑制率以及  $IC_{50}$ ,选取 4 个浓度组进行以下实验。

4 平板克隆形成实验 参照参考文献[5],取对数生长期的 SMMC-7721 细胞经消化离心重悬后,调整细胞密度约为 50 个/mL,每孔 2 mL 接种于六孔板内,于 37 ℃、5%  $CO_2$  的培养箱中培养过夜,换含有不同浓度槐果碱的新鲜培养基继续培养,每 3 天换液,至第 10 天后肉眼可见细胞集落,终止培养,固定,结晶紫染色。记录并计算克隆集落数量,>50 个细胞为一个集落。

5 流式细胞凋亡检测 槐果碱处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后,经消化离心、重悬洗涤后,加入流式细胞术缓冲液重悬各组细胞后,每组加入 Annexin-FITC 及 PI 凋亡染色试剂液,轻轻混匀后避光孵育 15 min,然后上机进行流式细胞凋亡检测。总凋亡率(A 值) = 早期凋亡( $A_1$ ) + 晚期凋亡率( $A_2$ )。

6 Transwell 侵袭实验 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞经消化离心后,种于六孔板内,药物处理 48 h 后收集各组细胞。于上室的聚碳酸酯膜上加入 3.9  $\mu$ g/ $\mu$ L 的 Matrigel,置 37 ℃ 约 30 min 聚合成凝胶。预热同时,用无血清培养基重悬各组细胞,调整细胞密度约为  $5 \times 10^6$  个/mL,每个小室内加 100  $\mu$ L。将小室放入 24 孔板,每孔内含有 200  $\mu$ L 新鲜培养基,继续培养 48 h 后取出小室,擦去上层细胞与胶,下层细胞固定,结晶紫染色后,100 倍镜下随机选取 10 个视野,记录并计算穿孔细胞数量。

7 Western Blot 检测 Bcl-2、Bax、Akt、p-Akt、MMP-3、MMP-9、TIMP-3 蛋白表达 取各组处理 48 h

的细胞加入适量细胞裂解液,提取上清,定量,加上样缓冲液,煮沸,于 SDS-PAGE 胶上电泳,再将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭,加入一抗(稀释比例均为 1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,TBST 充分洗涤后加对应二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,上机曝光。以  $\beta$ -actin 作为内参对照,用 Quantity One 软件分析蛋白表达量,各目的蛋白相对蛋白表达量为目的蛋白灰度值与对应  $\beta$ -actin 灰度值之比。

**8 统计学方法** 所有结果数据均采用 SPSS 20.0 软件和 Graphpad 6.0 软件进行统计学分析,各实验重复 5 次,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,方差不齐时采用 Tamhanes T2 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 各组 SMMC-7721 细胞增殖抑制率比较(图 1)** 随着作用浓度的升高,槐果碱对肝癌细胞增殖抑制作用增高,其中  $IC_{50}$  为 2.380 mmol/L,因此,选用的 4 个参考浓度为:0、1、2、4 mmol/L。

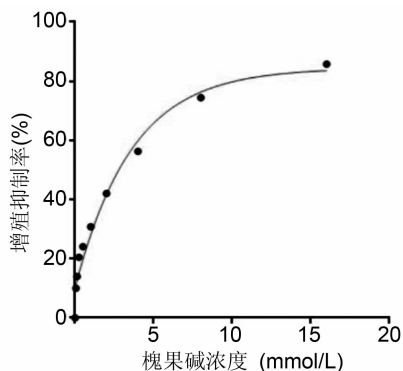
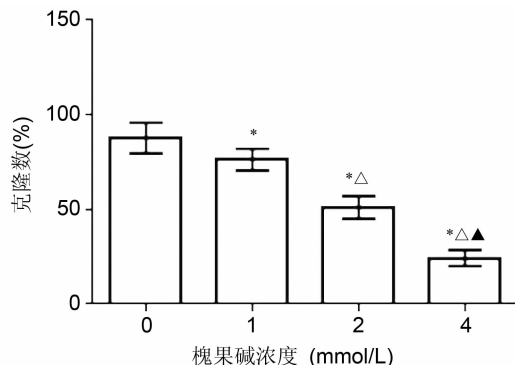


图 1 各组 SMMC-7721 细胞增殖抑制率比较

**2 各组 SMMC-7721 细胞克隆数比较(图 2)** 随着作用浓度的升高,肝癌细胞克隆形成数量明显下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),并具有浓度依赖性( $r = 0.98$ ,  $P < 0.05$ )。

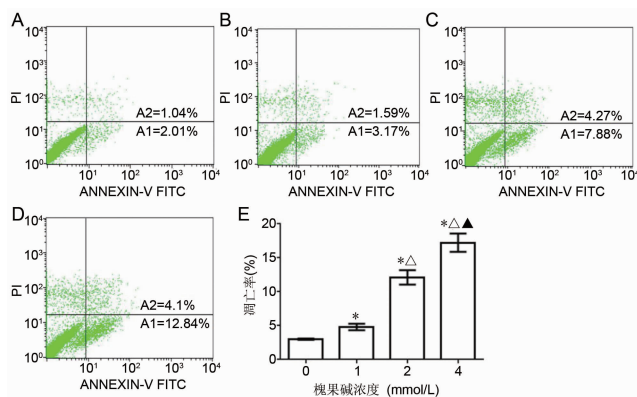
**3 各组 SMMC-7721 细胞凋亡情况比较(图 3)** 各组细胞凋亡率随着槐果碱浓度的升高而增加( $P < 0.01$ )。

**4 各组 SMMC-7721 细胞 Bcl-2、Bax、Akt 及 p-Akt 蛋白表达比较(图 4)** Bcl-2 水平与 p-Akt 水平均随槐果碱浓度的升高而递减( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。槐果碱作用后, Bax 蛋白水平明显高于 0 mmol/L 组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。



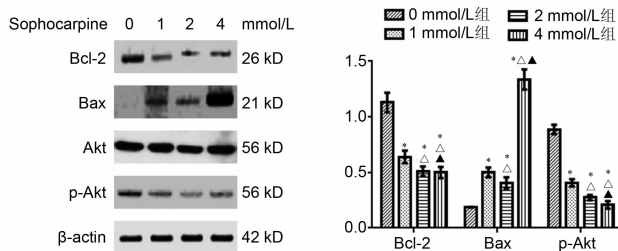
注:与 0 mmol/L 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 1 mmol/L 组比较, $\Delta P < 0.01$ ;与 2 mmol/L 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

图 2 各组 SMMC-7721 细胞克隆数比较



注:A-D 为流式细胞术结果;A 为 0 mmol/L 组;B 为 1 mmol/L 组;C 为 2 mmol/L 组;D 为 4 mmol/L 组;E 为不同浓度处理后凋亡率比较;与 0 mmol/L 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 1 mmol/L 组比较, $\Delta P < 0.01$ ;与 2 mmol/L 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

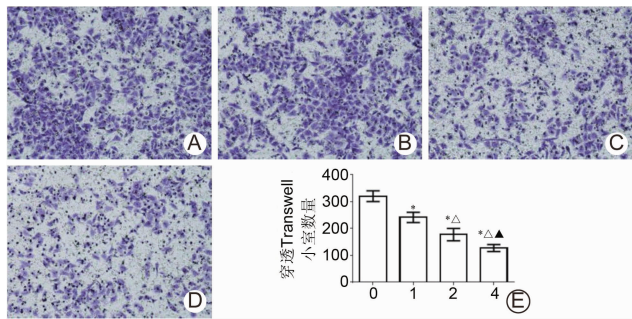
图 3 各组 SMMC-7721 细胞凋亡情况



注:A 为 Bcl-2、Bax、Akt 及 p-Akt 蛋白表达条带;B 为 Bcl-2、Bax、Akt 及 p-Akt 蛋白表达比较;与 0 mmol/L 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 1 mmol/L 组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与 2 mmol/L 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

图 4 各组 SMMC-7721 细胞 Bcl-2、Bcl-2、Akt 及 p-Akt 蛋白表达比较

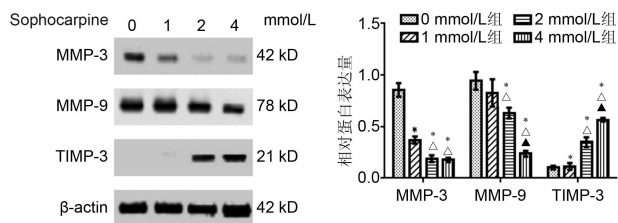
**5 各组 SMMC-7721 细胞侵袭能力比较(图 5)** 随着作用浓度的升高,肝癌细胞穿透 Transwell 小室数量明显减少,侵袭能力随浓度升高而降低( $r = 0.92$ ,  $P < 0.01$ )。



注: A-D 为各组 Transwell 侵袭实验结果(结晶紫染色,  $\times 100$ ); A 为 0 mmol/L 组; B 为 1 mmol/L 组; C 为 2 mmol/L 组; D 为 4 mmol/L 组; E 各组穿透细胞数量比较; 与 0 mmol/L 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 1 mmol/L 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 2 mmol/L 组比较,  $\blacktriangle P < 0.01$

图 5 各组 SMMC-7721 细胞侵袭能力比较

6 各组 SMMC-7721 细胞 MMP-3、MMP-9、TIMP-3 蛋白表达比较(图 6) MMP-3 与 MMP-9 水平随槐果碱浓度的升高而递减( $P < 0.05$ ), TIMP-3 蛋白水平随槐果碱浓度的升高而增加( $P < 0.05$ )。



注: A 为 MMP-3、MMP-9、TIMP-3 蛋白表达条带; B 为 MMP-3、MMP-9、TIMP-3 表达比较; 与 0 mmol/L 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 1 mmol/L 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 2 mmol/L 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$

图 6 各组 SMMC-7721 细胞 MMP-3、MMP-9、TIMP-3 蛋白表达比较

## 讨 论

乙型和丙型肝炎病毒感染以及黄曲霉素是肝癌发病相关的关键因素<sup>[6]</sup>。苦参具有强烈的抗病毒活性,能够有效地抗击乙肝病毒<sup>[7,8]</sup>。槐果碱提炼于苦参,是一种苦参碱类生物碱,具有抗乙肝病毒的功效<sup>[9]</sup>。有文献报道,槐果碱具有抑制肝癌细胞增殖的作用<sup>[4]</sup>。因此,本研究在以往研究的基础上,进一步研究槐果碱抑制肝癌细胞生长与侵袭的作用及机制。

本研究选取肝癌细胞 SMMC-7721 作为研究对象,通过 MMT 法筛选出 3 个适宜浓度,1、2、4 mmol/L 处理 SMMC-7721,以未处理组为对照组,进行比较。结果发现:槐果碱作用 SMMC-7721 细胞后,细胞增殖能力受到明显抑制,并且呈现浓度依赖

性,细胞凋亡率随着槐果碱浓度的升高而增加;不同浓度槐果碱作用 SMMC-7721 细胞后, Bcl-2 水平与 p-Akt 水平均随槐果碱浓度的升高而递减;随着槐果碱浓度的升高,肝癌细胞 Transwell 穿透数量逐级递减,侵袭能力受到明显抑制,同时 MMP-3 与 MMP-9 水平均随槐果碱浓度的升高而递减, TIMP-3 蛋白水平均随槐果碱浓度的升高而增加。提示槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 具有抑制生长,促进凋亡以及抗侵袭的作用。

Bcl-2 家族在调节细胞凋亡中起到关键作用, Bcl-2 和 Bax 蛋白都是 Bcl-2 家族的重要成员。Bcl-2 蛋白能够通过抑制谷胱甘肽外泄,降低胞内的氧化还原电位,主要起到抗凋亡的作用<sup>[10]</sup>; Bax 是一种与 Bcl-2 同源的水溶性相关蛋白,其功能与 Bcl-2 相反,其过表达可拮抗 Bcl-2 的保护效应,起到了促进细胞凋亡的作用<sup>[10]</sup>。本研究中发现槐果碱作用 SMMC-7721 细胞后, Bcl-2 水平受到明显抑制,而 Bax 水平明显升高,提示槐果碱参与调控 Bcl-2 家族因子从而促进肝癌细胞的凋亡。Akt 又称 PKB,其 Ser473 位点在受到 PDK1 作用后发生磷酸化,从而激活下游一系列因子,并在促进癌细胞增殖与生长中起到重要作用<sup>[11]</sup>。本研究发现槐果碱作用 SMMC-7721 细胞后, p-Akt 水平明显下降,提示槐果碱可能参与抑制 Akt 信号通路来抑制肝癌细胞的增殖。现已发现 MMP 家族 26 个成员, MMP-3 和 MMP-9 是在癌细胞侵袭运动中具有关键作用的两个因子<sup>[12]</sup>。TIMP-3 能对 MMP 家族多个成员起到拮抗的作用,以致癌细胞侵袭运动受到明显抑制<sup>[13]</sup>。在侵袭实验中可见槐果碱有明显的抑制肝癌细胞侵袭能力的作用,其机制很可能是槐果碱促进肝癌细胞 TIMP-3 分泌,以及拮抗和抑制 MMP-3 和 MMP-9 蛋白的表达。以往的文献对于槐果碱抗肿瘤方面的研究较少,有文献表明槐果碱衍生物氧化槐果碱能够通过体外培养的 SW480 肠癌细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞阻滞于 G0/G1 期,同时上调 Caspase-3、抑制 Bcl-2 的表达,达到抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用,并且该作用呈一定的时间和剂量依赖性<sup>[14,15]</sup>。

以往研究发现,槐果碱能够抑制人红白血病细胞 K562 的增殖,并诱导其发生凋亡<sup>[16]</sup>。本研究从体外细胞水平不仅发现槐果碱作用肝癌细胞 SMMC-7721 后抑制其增殖,促进凋亡及抑制侵袭,还深入分析槐果碱可能调控 Bcl-2 家族、MMP 家族等蛋白的表达水平来实现这些生物学习性的改变。然而,这些体外研究结果还需进一步的裸鼠荷瘤实验来证实。

综上所述,槐果碱能够通过下调肝癌细胞 SMMC-

7721 内 Bcl-2 和 p-Akt 的水平上调 Bax 水平达到抑制癌细胞增殖能力和促进凋亡的作用;同时,槐果碱能够通过促进肝癌细胞 TIMP-3 分泌,以及拮抗和抑制 MMP-3 和 MMP-9 蛋白的表达,共同达到抑制肝癌细胞 SMMC-7721 侵袭能力的效果。因此,本研究细胞实验初步证实槐果碱抗肿瘤作用,并分析了主要机制是槐果碱参与调控 Bcl-2 家族、Akt 信号通路以及 MMP 家族和 TIMP 家族。

利益冲突:本研究不存在任何利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 张明发,沈雅琴.苦参碱类生物碱抗病毒的临床药理作用研究进展[J].抗感染药学,2018,15(2):185-191.
- [2] 张明发,沈雅琴.苦参碱类生物碱抗乙型肝炎病毒的临床药理作用研究进展[J].抗感染药学,2018,15(1):1-6.
- [4] 赵秀梅,张娜,张桂贤,等.苦参碱-美法仑复合物 MAT-MEL 的合成及其体内外抗肿瘤活性的研究[J].华西药学杂志,2016,31(4):339-341.
- [5] 袁建良,胡永伟,丁厚中. Bcl-3 在人乳腺癌组织中的表达及对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与凋亡的影响[J].江苏大学学报(医学版),2016,26(5):400-404.
- [6] 魏矿荣,彭侠彪,梁智恒,等.全球肝癌流行概况[J].中国肿瘤,2015,24(8):621-630.
- [7] 刘欣,素智敏.苦参抗乙肝病毒的作用机制研究[J].中国生化药物杂志,2015,35(4):67-69.

- [8] 岳维建.苦参素联合抗乙肝免疫核糖核酸治疗慢性乙肝 30 例[J].山东医药,2004,44(29):57-58.
- [9] 聂红明,王灵台,陈建杰,等.槐果碱体外对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBsAg HBeAg 的影响[J].辽宁中医杂志,2006,33(11):1478-1479.
- [10] 任丽平,李先佳,金少举.基于 caspase-3/bcl-2/bax 信号通路的槐定碱诱导胰腺癌细胞株 capan-1 凋亡机制研究[J].中国现代应用药学,2017,34(3):325-328.
- [11] 隋华,付晓伶,潘树芳,等. PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 通路调控 ABCB1/P-gp 介导的人结肠癌细胞多药耐药的研究[J].中国癌症杂志,2014,24(2):106-111.
- [12] Zhang M, Dai C, Zhu H, et al. Cyclophilin A promotes human hepatocellular carcinoma cell metastasis via regulation of MMP3 and MMP9 [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1-2): 387-95.
- [13] 贺占坤,沈杰威. MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 TIMP-1 评价膝关节骨性关节炎的临床研究[J].重庆医学,2013,42(32):3872-3874.
- [14] 资源,赵文键,程庆,等.氧化槐果碱对人乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(2):174-177.
- [15] 张绪慧,梁磊,蔡长青,等.氧化槐果碱对人结肠腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J].广东医学,2015,36(5):660-664.
- [16] 曹东旭,元英进.槐果碱对人红白血病 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J].天津科技大学学报,2006,21(4):33-36.

(收稿:2017-10-15 在线:2018-07-14)

责任编辑:赵芳芳