基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0189-03

苦参碱诱导 Raji 细胞凋亡及其对 Bcl-2 表达的影响

黄 曦[1],陈建斌[1],郭启帅[2],杨泽松[1],刘占术[1],黄宗干[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院血液内科;2.重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察苦参碱(Matrine, Mat)对体外人淋巴瘤 Raji 细胞增殖及细胞凋亡的影响,探讨 Mat 诱导 Raji 细胞凋亡的作用机制。方法:四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法观察 Mat 对 Raji 细胞增殖的影响;流式细胞术检测凋亡率;免疫细胞化学技术检测 Mat 对 Raji 细胞株 Bcl-2 蛋白表达的影响;RT-PCR 法检测 Bcl-2 mRNA 表达。结果:不同浓度的 Mat 对 Raji 细胞均有一定的增殖抑制作用,且呈量效和时效关系;Mat 能明显诱导 Raji 细胞凋亡;免疫细胞化学结果显示 Bcl-2 在实验组中的表达显著低于对照组。RT-PCR 显示 Bcl-2 mRNA 表达明显减弱,且随剂量增加越明显。结论:Mat 能抑制人淋巴瘤 Raji 细胞的增殖,促进细胞凋亡,其作用机制可能与下调 Bcl-2 表达有关。

【关键词】苦参碱;Raji 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

【中图图书分类法分类号】R965.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-15

Effects of matrine in inducing Raji cell apoptosis and on the expression of Bcl-2

HUANG Xi, et al

(*Department of Haematology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of matrine on proliferation and apoptosis of human lymphoma cell line Raji in vitro, and to explore its mechanism. *Methods*: The proliferation inhibition rate of Raji cells was assayed by MTT analysis. Cell apoptosis rate was evaluated by flow cytometry. The expression level of Bcl-2 protein was evaluated by streptavidin-biotin-peroxidase method. The Bcl-2 mRNA expression of Raji cells treated with matrine was assayed by RT-PCR. *Results*: The matrine of different concentrations all had cytotoxic effects on Raji cells, in a dose- and time-dependent manner. The apoptosis induced by matrine was confirmed in Raji cells. Immunocytochemistry assessment showed the expression of Bcl-2 was significantly down-regulated after treated with matrine. The Bcl-2 mRNA expression in Raji cells was decreased after treated by matrine, with a concentration-effect relationship. *Conclusion*: Matrine can inhibit the proliferation of Raji cells significantly.By down-regulating the expression of Bcl-2 and inducing the apoptosis.

【Key words】Matrine; Raji cells; Cell proliferation; Cell apoptosis

苦参碱(Matrine, Mat)是从豆科槐属植物 Mat 或平科植物广豆根中分离出来的一种生物碱,具有抗炎、抗病毒及抗肿瘤等作用,特别是其抗肿瘤作用日益受到人们关注。体外研究[1-4]显示 Mat 对多种肿瘤(包括前列腺癌、神经母细胞瘤、黑色素瘤、胶质瘤、肺癌、胃癌、白血病、多发性骨髓瘤等)细胞具有诱导凋亡的作用。但 Mat 是否具有诱导淋巴瘤凋亡的效应及其具体分子机制如何较少见报道。本实验研究 Mat 对人淋巴瘤细胞系 Raji 细胞凋亡的作用,并观察其对 Raji 细胞中凋亡抑制基因 Bcl-2 表达的影响,初步探讨 Mat 诱导凋亡的分子机制。

作者介绍:黄 曦(1979-),女,硕士,
研究方向:淋巴瘤的基础和临床研究。
通讯作者:陈建斌,男,教授,E-mail:cqchenjianbin2007@126.com。
基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(KJ080321)。

1 材料与方法

1.1 材料

Raji 细胞由重庆医科大学儿科研究所惠赠。Mat 注射液购自辽宁玉皇药业有限公司(批准文号:国药准字 H20083501,产品批号:08091611,5 ml:50 mg);四氮甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒为上海碧云天公司产品;SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为武汉博士德公司产品;总 RNA 提取试剂盒为北京天根生物公司产品;RT-PCR 两步法试剂盒为 TaKaRa 公司产品;RPMI1640 为 Gibco 公司产品,胎牛血清购自杭州四季清公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Raji 细胞置于含 10%的胎牛血清 RPMI1640 培养基,37℃、5%CO_2 饱和湿度孵育箱培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2　MTT 检测细胞的增殖抑制率　取对数生长期的 Raji 细胞，实验前用台盼蓝拒染法确保细胞拒染率在 97%以上，调整细胞数为 1.25×10^5 个 /ml，取 160 μl 接种于 96 孔板中（2×10^4 个 /孔），每个浓度设 5 个复孔，分别用不同浓度的 Mat 处理细胞。①空白对照组：只加完全培养液；②实验组：分别加入 Mat 注射液，使终浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/ml。分别培养 24、48、72 h 后，每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl，继续培养 4 h，以 2 000 r/min，离心 10 min，吸去上清，每孔加入 DMSO 100 μl 于振荡器上振摇，待蓝色晶体完全溶解后，在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度值（OD 值），并按公式计算细胞抑制率。细胞抑制率 =（1- 实验组平均 OD 值 /空白对照组平均 OD 值）×100%。

1.2.3　流式细胞仪测定细胞凋亡　Raji 细胞按 1.25×10^5 个 /ml 接种于 6 孔培养板，24 h 后分别换含 0.4、0.8 mg/ml Mat 的培养液，对照组为不含药物的培养液。共同培养 48 h，离心（1 000 r/min，5 min），弃上清，PBS 洗 2 次，取（5 ~ 10）$\times10^4$ 个重悬的细胞后按 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作，置流式细胞仪上测定每个样本中的凋亡细胞所占比率。

1.2.4　免疫组化检测 Bcl-2 蛋白表达　细胞生长对数期开始加药。实验设计 2 组：空白对照组和 0.8 mg/ml Mat 组，培养 48 h 后，PBS 洗 2 次，以 1.25×10^5 个 /ml 浓度接种培养于载玻片（用 0.1 g/L 多聚赖氨酸处理），自然晾干后，用 4%的多聚甲醛固定 30 min，PBS 冲洗 2 min × 3 次，自然晾干后按照 SP 试剂盒说明书进行免疫细胞化学实验，最后 DAB 显色，在光镜下观察两组细胞的染色强度。

1.2.5　RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达　空白对照组及 0.4、0.8 mg/ml Mat 组培养 48 h，收集各组细胞 1×10^6 个，Trizol 法提取细胞总 RNA，用紫外分光光度计测量的 RNA 浓度和纯度，并取上述提取的总 RNA 样本 5 μl 经 2.0 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的质量。取 1 μl RNA 为模板，逆转录合成 cDNA，再以 cDNA 为模板，进行 PCR 反应。反应体系 50 μl，反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 40 s，共 35 个循环；最后 72℃延伸 7 min。利用 Primer 5.0 设计 bcl-2 引物：上游引物：5'-CGCTGGGAGAACAGGGTA -3'，下游引物：5'-GGGCTGGGAGGAGAAGAT-3'，扩增片段长度为 151 bp；内参 β-actin 上游引物：5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3'；下游引物：5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'，扩增片段长 285 bp。2.0 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果采用 Quantity One 软件进行灰度值分析。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行方差分析和 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　Mat 对 Raji 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测显示，0.4 ~ 2.0 mg/ml 浓度 Mat 作用组的 OD 值较对照组明显降低，其差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。随着 Mat 浓度的增加和作用时间的延长，抑制作用逐渐增强。Mat 对 Raji 细胞的生长抑制作用呈时间、剂量依赖性。Mat 作用 Raji 细胞 48 h 后的 IC50 为 0.871 2 mg/ml。

2.2　Mat 对 Raji 细胞凋亡的影响

空白对照组 Raji 细胞 48 h 早期凋亡率为 1.90%；Mat0.4、0.8 mg/ml 作用 48 h 后 Raji 细胞早期凋亡率分别为 6.05%、13.04%，随着 Mat 浓度的增加细胞早期凋亡率逐渐增多。见图 1（右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞，右下象限为早期凋亡细胞，左上象限为细胞收集过程中出现的损伤细胞，左下象限为正常细胞）。

2.3　Mat 对 Raji 细胞中 Bcl-2 表达的影响

免疫细胞化学染色结果显示：Bcl-2 在细胞中呈强阳性表达，棕黄色颗粒定位于细胞浆及核膜，与对照组相比，经 Mat 处理后的细胞中 Bcl-2 表达明显减弱。见图 2。

2.4　*Mat 对 Bcl-2 mRNA 表达的影响*

Mat0.4、0.8 mg/ml 组 Bcl-2 mRNA 表达量（151 bp）较对照组明显降低，与内参 β-actin（285 bp）的相对表达量明显下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3。

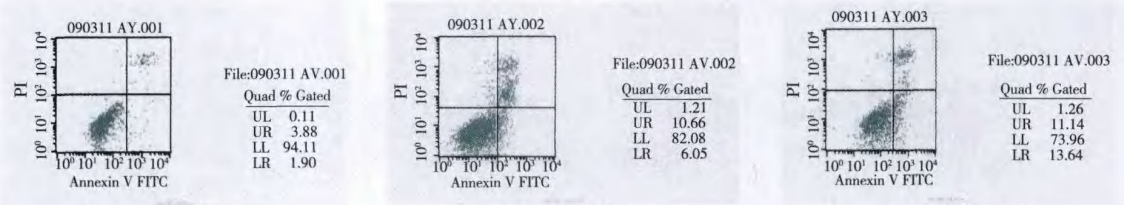
3　讨　论

正常细胞通过增生和凋亡来维持自身稳定，若失去平衡，则可导致疾病发生。肿瘤的发生与促凋亡相关基因表达减弱和（或）抗凋亡相关基因表达增强有关[5]。Mat 是从传统中草药中提取出的活性成分，体外研究显示 Mat 调节肿瘤细胞中某些促凋亡基因和抗调亡基因表达水平可能是其抗肿瘤的机制之一。如 Mat 抑制白血病 K-562 细胞抗凋亡基因 Survivin 的表达[6]；Mat 作用人肾癌 GRC-1 细胞后抑制抗凋亡

表 1　不同浓度 Mat 对 Raji 细胞增殖的影响（n=5，$\bar{x}\pm s$）

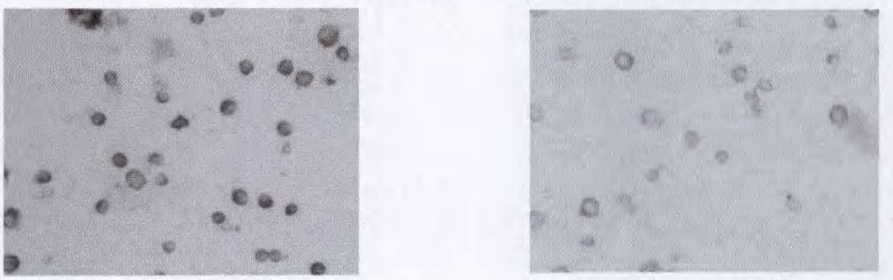
组别	浓度（mg/ml）	OD 值			抑制率（%）		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	—	0.826 7 ± 0.015 9	1.088 3 ± 0.048 2	1.351 9 ± 0.062 9	—	—	—
Mat 组	0.4	0.801 9 ± 0.010 8△	0.793 9 ± 0.010 2△	0.904 8 ± 0.022 7△	6.99	27.05	33.08
Mat 组	0.8	0.702 9 ± 0.014 6△	0.589 2 ± 0.023 2△	0.539 5 ± 0.013 9△	14.96	45.86	60.01
Mat 组	1.2	0.532 9 ± 0.018 3△	0.423 4 ± 0.021 8△	0.351 4 ± 0.021 8△	35.54	61.09	74.01
Mat 组	1.6	0.504 6 ± 0.019 9△	0.374 2 ± 0.014 7△	0.301 8 ± 0.010 8△	38.96	65.61	77.68
Mat 组	2.0	0.479 8 ± 0.012 7△	0.342 7 ± 0.011 3△	0.272 6 ± 0.013 0△	41.96	68.51	79.84

△：$P<0.05$，与对照组比较



A. 对照组　　B. Mat 0.4 mg/ml 组　　C. Mat 0.8 mg/ml 组

图 1　Annexin V-FITC/PI 双标记染色检测不同浓度 Mat 处理 Raji 细胞后的细胞凋亡结果



A. 对照组中 Bcl-2 蛋白的表达（SP × 400）　　B. 处理组中 Bcl-2 蛋白的表达（SP × 400）

图 2　Mat 作用 Raji 细胞前后 Bcl-2 蛋白表达的免疫细胞化学染色结果



M. Marker（DL 2000）；1. 对照组；2. 0.4 mg/ml Mat 组；3. 0.8 mg/ml Mat 组

图 3　不同浓度 Mat 对 Raji 细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平

基因 Bcl-2 表达而上凋促凋亡基因 Bax 表达[7]。Bcl-2 基因（即 B 细胞淋巴瘤 /白血病 -2 基因）是一种原癌基因，其蛋白定位于细胞的线粒体膜、核膜和内质网膜上，具有抑制凋亡的作用。Bcl-2 可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡[8]，其过度表达能增强细胞对大多数细胞毒因素的抵抗力[9]。本实验选用 Mat 作用于淋巴瘤 Raji 细胞株，来研究 Mat 诱导 Raji 细胞凋亡和对 Bcl-2 表达的影响。

本实验显示 0.4 ~ 2.0 mg/ml 的 Mat 对 Raji 细胞均有明显抑制作用，且随着浓度的增加和作用时间延长，Mat 对 Raji 细胞的生长抑制作用也逐渐增强。Mat 对体外 Raji 细胞具有明显的增殖抑制作用，且呈现时间、剂量依赖性。利用 Annexin V-FITC/PI 双标记染色及流式细胞术检测显示 Mat 可诱导 Raji 细胞凋亡，对照组与 Mat0.4、0.8 mg/ml 组作用 Raji 细胞 48 h 后早期凋亡率分别为 1.90%、6.05%、13.04%。从免疫细胞化学染色的结果可以看出 Bcl-2 蛋白在 Raji 细胞中高表达，棕黄色颗粒定位于细胞浆和核膜。而在经过 Mat 处理后的细胞中，Bcl-2 的表达显著降低，提示 Mat 能抑制 Raji 细胞中 Bcl-2 的表达。我们应用 RT-PCR 的方法检测 0.4、0.8 mg/ml 浓度 Mat 组处理 Raji 细胞 48 h 后 Bcl-2 mRNA 的表达变化，发现与对照组比较 Bcl-2 mRNA 表达明显下降。提示 Mat 的促凋亡作用可能与其抑制 Bcl-2 表达有关。

综上所述，Mat 可明显抑制 Raji 细胞增殖，随着药物浓度增加和作用时间延长，细胞增殖受抑更明显，对 Raji 细胞增殖抑制作用呈时间、剂量依赖性；一定浓度 Mat 可诱导人组织淋巴瘤 Raji 细胞发生凋亡；下调 Bcl-2 的表达可能是 Mat 诱导 Raji 细胞发生凋亡的作用机制之一，但 Mat 是通过何种机制来抑制 Bcl-2 的表达仍需要作进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Chen K, Hu Z, Wang T, et al. Inhibitory effect of matrine on the expression of PSA and AR in prostate cancer cell line LNCaP[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(6): 697-699.

[2] Feng C, Tang S Q, Wang J W, et al. Matrine inhibits the proliferation of neuroblastoma LA-N-5 cell and MYCN mRNA expression[J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2008, 10(2): 225-227.

[3] Liu X Y, Fang H, Yang Z G, et al. Matrine inhibits invasiveness and metastasis of human malignant melanoma cell line A375 in vitro[J]. Int J Dermatol, 2008, 47(5): 448-456.

[4] Witzig T E, Kaufmann S H. Inhibition of the phophatidylinositol 3 kinase/mamm-alian target of rapamycin pathway in bematologic malignancies[J]. Curr Treat Options Oncol, 2006, 7(4): 285-294.

[5] Donskow-Schmelter K, Doligalska M. Apoptosis, a protective mechanism for pathogens and their hosts[J]. Wiad Parazytol, 2005, 51(4): 271- 280.

[6] 王林中，邹典定，赵东赤. 苦参碱诱导 K-562 细胞凋亡与 Survivin 基因表达的相关性研究[J]. 实用中医内科杂志，2005, 19(2): 108.

[7] 种　铁，牛建强，王子明，等. 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[J]. 中西医结合学报，2006, 4(4): 388-391.

[8] Adams J M, Huang D C, Strasser A, et al. Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005, 70: 469-477.

[9] Zhang X F, Li B X, Dong C Y, et al. Apoptosis of human colon carcinoma HT-29 cells induced by ceramide[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(22): 3581-3584.

（责任编辑：关蕴良）