

苦参碱抗人肝癌 HepG2 细胞的药理作用及其机制的研究进展

张明发, 沈雅琴

上海美优制药有限公司, 上海 201204

摘要: 苦参碱能剂量相关地抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移、侵袭和血管内皮生长因子表达, 能诱导 HepG2 细胞凋亡和分化。苦参碱是 HepG2 细胞的自噬早期诱导剂, 更是自噬晚期抑制剂, 其通过诱导线粒体应激、内质网应激和抑制 ERK 信号通路、人宫颈癌基因-1、Apollon 基因表达和端粒酶活性, 产生抗 HepG2 细胞的作用。

关键词: 苦参碱; 肿瘤; 肝癌; HepG2 细胞

中图分类号: R288.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2020) 02-0349-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.032

Research advances in pharmacologic effects of matrine against HepG2 cells

ZHANG Mingfa, SHEN Yaqin

Shanghai Meiyu Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201204, China

Abstract: Matrine inhibits proliferation, migration, invasion, and expression of vascular endothelial growth factor, and induces apoptosis and differentiation in association with dosage on human hepatoma HepG2 cells. Matrine is a inducer of early stage of autophagy, and is more a inhibitor of late stage of autophagy. Matrine has the effect against HepG2 cells by induction of mitochondria stress and endoplasmic reticulum stress, and inhibition of ERK pathway, expression of human cervical cancer oncogene-1 and Apollon gene, and telomerase activity.

Key words: matrine; tumor; hepatoma; HepG2 cells

苦参碱(matrine)具有广泛的生物活性,如抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节、抗肿瘤、保护肝脏、抗心律失常,还有升高白细胞,抗纤维化以及镇静、镇痛等中枢神经药理作用^[1-10]。苦参碱抗乙型肝炎病毒以及肝脏保护作用已被详细综述^[1-3]。苦参碱在临床上已被广泛用于肝病尤其是病毒性肝炎的治疗^[4-6]。慢性肝炎如果得不到控制可能会演变成肝癌,而目前研究显示苦参碱的毒性低于抗癌化疗药,又有良好的保肝作用,因此有人正在将苦参碱试用于肝癌的治疗和复发的预防。

笔者已经综述了苦参碱抗肝癌药理作用及临床应用研究进展^[10],本文综述苦参碱抗肝癌 HepG2 细胞的药理作用及其机制的研究进展,以期对临床研究和开发苦参碱治疗肝癌新适应症提供文献依据与参考。

1 抗人肝母细胞瘤 HepG2 细胞移植瘤

朱丹丹等^[11]给皮下接种 HepG2 细胞的荷瘤裸

鼠连续 35 d 每天 ip 苦参碱 25、50、75 mg/kg, 结果实验动物平均瘤体积由对照组的 4 159 mm³ 分别降为 3 519、2 411、2 343 mm³; 给药 2 周后瘤体生长速度明显减慢,也剂量相关地抑制生存素的基因和蛋白表达。可是李军等^[12]报道 sc 苦参碱 100 mg/kg 对荷 HepG2 细胞裸鼠无抑瘤作用,抑瘤率在 10% 以下。

胡高裕等^[13-14]给裸鼠皮下接种 HepG2 细胞的同时连续 3 周 ip 苦参碱或皮下接种 HepG2 细胞 1 周后连续 2 周 ip 苦参碱或皮下接种 2 周后连续 1 周 ip 苦参碱,剂量均为 100 mg/kg,或皮下接种的同时连续 3 周 ip 顺铂 2 mg/kg 和苦参碱 100 mg/kg,或皮下接种的同时连续 3 周 ip 顺铂 2 mg/kg,5 组均每周连续 5 d 给药,结果以瘤质量计算的抑瘤率分别为 54.0%、37.5%、8.3%、83.3% 和 75.%,说明给药越早、给药时间越长则抑瘤作用越强。HE 染色显示各给药组癌组织基本结构和形态与对照组比较无明显变化,均为肝实体瘤组织,只是各给药组可见数量、

收稿日期: 2019-12-10

第一作者: 张明发(1946—),男,研究员,研究方向为中药药理。Tel: 13816371915 E-mail: 13816371915@139.com

大小不等的凋亡细胞和凝固性坏死灶;瘤组织中生存素的阳性细胞表达率由生理盐水对照组的83.26%分别降至55.56%、62.50%、79.58%、19.58%和38.67%,而半胱天冬酶-3的阳性细胞表达率由对照组的21.15%分别升至43.68%、35.13%、24.65%、78.26%和65.88%。苦参碱与顺铂联用不仅增强顺铂的抑瘤作用,而且能对抗顺铂引起荷瘤小鼠的体质量、精神、活动和食量下降的不良反应。鄂颖等^[15]给皮下接种HepG2细胞成瘤后的裸鼠均连续2周ip顺铂2 mg/kg或苦参碱100 mg/kg、或顺铂2 mg/kg联用苦参碱100 mg/kg,结果3组动物的瘤质量抑瘤率分别为64%、36%、80%;瘤组织中半胱天冬酶-3阳性细胞表达率由对照组的19.89%分别升至64.86%、36.97%、77.89%,而生存素的阳性细胞表达率由对照组的84.85%分别降至39.05%、64.06%、20.04%,表明苦参碱是通过下调瘤组织中的生存素表达、上调半胱天冬酶-3表达,促进癌细胞凋亡。

2 抑制体外HepG2细胞增殖和诱导凋亡

王鹏等^[16]报道苦参碱抑制HepG2细胞增殖的半数抑制浓度(IC₅₀)为1.27 mmol/L。而孙莉等^[17]报道IC₅₀为21.4 mmol/L,两者相差太大,但2篇文献均未指出苦参碱作用于HepG2细胞的时间。毛俐等^[18]报道苦参碱Au(III)金属配合物作用48 h对HepG2细胞的IC₅₀为0.235 mmol/L。林泽^[19]报道苦参碱作用48 h对HepG2细胞增殖的IC₅₀为12.18 mmol/L。刘丽敏等^[20]报道苦参碱作用48 h对HepG2细胞的IC₅₀为80.39 mg/L。王淑静等^[21]报道苦参碱浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,作用48 h的IC₅₀为487.86 mg/L,远低于对人脐静脉内皮细胞ECV304的IC₅₀(1 815.34 mg/L)。

王怡楠^[22]报道苦参碱作用48 h对HepG2细胞的IC₅₀为1.365 g/L,形态学检查显示苦参碱使HepG2细胞核浆比减少,核固缩,染色加深,染色质聚集,碎裂,胞质中出现空泡,微绒毛数量减少,线粒体、粗面内质网等细胞器减少,使细胞发生凋亡;苦参碱还降低肝癌细胞糖酵解中的己糖激酶、丙酮酸激酶活性和乳酸、ATP含量,说明苦参碱能通过抑制癌细胞的能量代谢来抑制其增殖。

司维柯、李鹏等^[23-27]组成的研究团队报道苦参碱0.3~2.5 g/L浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,降低HepG2细胞的成活率。苦参碱0.8、1.5、2 g/L作用72 h的HepG2细胞凋亡率分别为10.57%、16.37%、10.85%,使细胞周期滞留在S期和G₂期;苦参碱浓度在0.5~1.5 g/L时作用12 h,

HepG2细胞浆内可见圆形透明颗粒、贴壁细胞减少、细胞散在生长、相互间无连接、折光加强,细胞呈三角形、多边形和圆形,染色可见细胞浆内有空泡、核浆比减少、核仁减少或消失、核染色质变粗糙,电镜可见核浓缩、核碎裂、胞浆出现自噬体和空泡、胞浆有出芽并包裹核向外突起、细胞表面微绒毛消失等形态似凋亡细胞;苦参碱能浓度相关地抑制HepG2细胞的DNA合成和释放乳酸脱氢酶并破坏细胞膜的完整性,提高cAMP浓度和降低cGMP浓度以及肝癌特异性谷氨酰转肽酶活性,下调bcl-2、c-myc和上调野生型p53、bax、Fas、Rb的基因和蛋白表达。

张燕等^[28]报道苦参碱0.5、1、1.5 g/L浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖和DNA合成。程少冰等^[29]报道0.2 g/L的苦参碱作用96 h对人肝癌HepG2.2.15细胞生长的抑制率为75.5%,诱导其凋亡率为57.9%,并上调Fas的基因和蛋白表达。谢军等^[30]报道苦参碱0.125、0.25、0.5、1、2 g/L浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,使细胞周期滞留在G₁期、S期细胞数减少,质量浓度为0.125、0.5、2 g/L时G₁期细胞比例分别增加15%、40%、80%,S期细胞比例分别减少17%、38%、78%,并浓度相关地下调Bcl-2蛋白和上调半胱天冬酶-3蛋白表达。程向东等^[31]报道苦参碱0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L浓度和时间相关的抑制HepG2细胞增殖并诱导凋亡,下调Bcl-2蛋白和上调Bax蛋白、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-9的蛋白表达。

樊浩等^[32]报道1.5 g/L苦参碱作用12 h的HepG2细胞凋亡率为6.25%,HepG2细胞自发凋亡率为3.21%,此时苦参碱显著上调核因子- κ B(NF- κ B)p65、CD95(即Fas)、Smac和生存素的基因和蛋白表达;而NF- κ Bp65基因沉默转染的HepG2细胞凋亡率为11.82%,与HepG2细胞比较也显著上调CD95、Smac的基因和蛋白表达,但下调NF- κ Bp65和生存素的基因和蛋白表达;如果1.5 g/L苦参碱作用于NF- κ Bp65基因沉默转染的HepG2细胞,细胞凋亡率显著提高到21.06%,且CD95和Smac的表达进一步上调,并对抗苦参碱上调NF- κ Bp65和生存素的表达,说明苦参碱诱导HepG2细胞凋亡主要与上调CD95和Smac的表达有关。高航^[33]报道苦参碱0.8、1、1.5、2、2.5 g/L浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖并能使细胞浆中的NF- κ B转入核内,胞核和胞浆中NF- κ B均阳性表达并被激活,NF- κ B活化抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷能对抗苦参

碱激活 NF- κ B, 增强苦参碱的抑制增殖和诱导凋亡作用, 二硫代氨基甲酸吡咯烷 20 μ mol/L 诱导 HepG2 细胞的凋亡率为 3.07%、苦参碱 1.5 g/L 诱导的凋亡率为 6.11%, 二者联用凋亡率显著提高至 12.95%, 因此 NF- κ B 的激活在苦参碱诱导肝癌细胞凋亡中可能起到抗凋亡作用。李权林^[34]报道苦参碱 0.25、0.5、1、1.5 g/L 浓度和时间相关地抑制 HepG2 细胞凋亡, 上调 NF- κ B 基因表达和下调 p53 基因表达, 不影响诱骗受体 3(DcR3) 基因表达, 认为苦参碱诱导 HepG2 细胞凋亡过程中激活 NF- κ B 可能是肝癌细胞对苦参碱早期耐药的机制之一。

付燕燕等^[35]报道苦参碱 1、2 g/L 作用 24 h 使 HepG2 细胞的凋亡率分别达到 5.25%、8.20%, 使细胞周期滞留在 G₀/G₁ 期、S 期细胞数减少; 形态学检查可见细胞膜上微绒毛消失、核变小、异染色质边集、核浓缩、核碎裂并有脂滴和凋亡小体形成; 下调细胞周期蛋白 D1 和上调 p27^{Kip1} 蛋白表达。张方宇等^[36]报道浓度均为 0.5 g/L 时, 苦参碱、苦参碱脂质体或乳糖酰磷脂酰乙醇胺修饰的苦参碱脂质体作用 72 h 对 HepG2 细胞的杀伤率分别为 28.34%、31.89%、51.97%。

3 诱导 HepG2 细胞自噬和内质网应激

张军强^[37]报道苦参碱 0.25~2 g/L 浓度和时间相关地抑制 HepG2 细胞增殖, 使细胞周期滞留在 G₁ 期; 苦参碱 0.5、1、2 g/L 作用 24 h 的 HepG2 细胞凋亡率由对照组的 0.14% 分别显著升高到 28.91%、34.36%、38.80%; 形态学检查显示胞浆中可见大小不等的空泡, 随着苦参碱浓度升高, 空泡逐渐增大增多, 大量自噬泡形成, 并能上调自噬基因 beclin、自噬相关蛋白轻链 3-II(LC3-II) 蛋白和 Bax 基因表达, 而自噬特异性抑制剂 3-甲基腺嘌呤能显著对抗苦参碱诱导自噬泡产生, 使 MDC 标记的自噬泡染色颗粒显著减少; 不影响哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR) 及其下游的核糖体蛋白 S6(p70s6k) 的蛋白表达, 但阻滞二者的磷酸化激活, 即苦参碱是通过下调 mTOR 信号通路诱导自噬的^[38]。范悦等^[39]也报道苦参碱 0.5、1、2 g/L 浓度和时间相关地抑制 HepG2 细胞增殖, 使细胞周期滞留在 G₁ 期、S 期细胞数减少, 作用 36 h 时 HepG2 细胞浆中有自噬体形成, 且与苦参碱浓度之间存在量效关系, 自噬多发生在细胞周期的 G₁ 期。相反, 郭浩等^[40]报道苦参碱 0.5、1、2 g/L 浓度相关地下调 mTOR 的基因和蛋白表达以及蛋白激酶 B(Akt) 的磷酸化, 而不影响 Akt 的基因和蛋白表达, 也能浓度相关地上调 LC3-II 基

因和蛋白表达和诱导 HepG2 细胞自噬, 认为苦参碱是通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导细胞自噬的。

欧秀元^[41]对苦参碱抗 HepG2 细胞的作用机制进行了深入研究: 苦参碱 0.5~12 mmol/L 作用 72 h 可浓度相关地抑制 HepG2 细胞增殖, 4 mmol/L 时增殖抑制率为 75.5%, IC₅₀ 为 3.17 mmol/L; 苦参碱 2、8 mmol/L 作用 48 h 使 HepG2 细胞的凋亡率分别为 5.4% 和 35.6%, 使细胞周期滞留在 G₁ 期, S 期和 G₂/M 期细胞数减少, 浓度和时间相关地上调细胞周期抑制蛋白 p21、p27 的表达、下调 p53 和细胞周期蛋白 D1 的表达, 但不影响 β -半乳糖苷酶阳性细胞表达, 提示苦参碱阻滞 G₁ 期不会引起细胞衰老; 也浓度相关地激活半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-9 和聚 ADP 核糖聚合酶-1(PARP-1) 并下调 p53 表达, 降低磷酸化 AKT 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2) 从而诱导细胞凋亡。苦参碱浓度和时间相关地诱导 HepG2 细胞自噬和 LC3-II、p62(泛素连接的脚手架蛋白) 表达, 而 p62 的积累被认为是自噬降解过程被抑制的结果, 故苦参碱能抑制自噬降解途径。苦参碱能抑制 HepG2 细胞的溶酶体蛋白酶中的组织蛋白酶 D(cathepsin D) 的激活, 即苦参碱可通过抑制组织蛋白酶的激活, 阻滞自噬降解过程的完成。苦参碱不影响自噬基因 beclin-1 表达, 在作用 1 h 内泛素样修饰激酶 ATG7 表达上调, 但随着作用时间延长逐渐降至原来水平, 因此苦参碱是自噬晚期抑制剂。由于自噬早期抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA) 能抑制苦参碱诱导自噬和阻滞苦参碱诱导 LC3-II 积累, 因此苦参碱是自噬早期诱导剂, 也是自噬晚期抑制剂。苦参碱在作用较短时间内引起 HepG2 细胞自噬, 此时细胞基本没有发生凋亡, 随着作用时间的延长, 凋亡相关蛋白半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-3 被切割激活、凋亡标志蛋白 PARP-1 也被切割激活并发生细胞凋亡。苦参碱作用从第 3 小时起 HepG2 细胞的细胞核周围出现透明膜泡, 并随着作用时间延长膜泡不断增大, 作用 24 h 时去掉苦参碱, 膜泡很快消失, 说明膜泡化是可逆的。蛋白合成抑制剂放线菌酮能阻滞苦参碱诱导 HepG2 细胞产生膜泡, 说明苦参碱需要诱导新的蛋白质合成才能产生膜泡化现象。降低泛素样修饰激酶 ATG7, 可显著抑制苦参碱诱导 HepG2 细胞积累 LC3-II, 并可抑制自噬, 但不能抑制空泡化。3-MA 也不能阻滞苦参碱诱导膜泡化, 因此苦参碱诱导膜泡化与自噬无关。苦参碱作用后 HepG2 细胞内中性红着色面积增大、着色程度明显升高, 以及苦参

碱诱导细胞酸性膜泡(包括溶酶体)的体积和通透性增大。巴弗洛霉素-A1是特异性空泡型质子泵抑制剂,能对抗苦参碱诱导膜泡化。欧秀元认为苦参碱系碱性药物,能够进入细胞内的溶酶体中,导致溶酶体内pH值升高,随着苦参碱浓度在溶酶体内的积累,通过渗透吸水引起空泡膨胀,而巴弗洛霉素-A1通过抑制溶酶体上的质子泵,抑制酸化产生而对抗苦参碱诱导膜泡化的作用。苦参碱诱导HepG2细胞表达内质网应激标志蛋白葡萄糖调节蛋白-78和c/EBP同源蛋白的蛋白表达,并引起内质网应激感受器双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)和抑制物阻抗性酯酶(IRE1)磷酸化,下调活性转录因子-6(ATF-6)的表达,并激活下游的真核启动因子-2 α (eIF2 α)。内质网应激抑制剂4-苯基丁酸能对抗苦参碱诱导的膜泡化现象和内质网应激反应葡萄糖调节蛋白-78和c/EBP同源蛋白的表达,但也能增强苦参碱对HepG2细胞增殖的抑制作用。因此苦参碱是自噬早期诱导剂,更是自噬晚期抑制剂,这有利于其抗肿瘤作用的发挥。但苦参碱对自噬的作用与其诱导膜泡化无关。其膜泡化作用是由苦参碱诱导内质网应激所引起的,并导致肿瘤细胞凋亡。

4 抑制HepG2细胞的端粒酶活性和诱导线粒体应激及其他

陈伟忠等^[42]报道苦参碱250、500、750 mg/L作用72 h,仅在750 mg/L时明显抑制HepG2细胞的端粒酶活性和人端粒酶逆转录酶启动子表达;3个浓度的苦参碱作用24 h不影响HepG2细胞周期,500、750 mg/L作用48、72 h时才使G₀/G₁期细胞百分比明显增多,S期细胞百分比明显减少。即苦参碱是通过下调人端粒酶逆转录酶启动子的表达,抑制端粒酶活性的。何松等^[43]报道苦参碱2.15、4.31、8.62、17.24、34.47 mmol/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,作用72 h的IC₅₀为6.93 mmol/L,并诱导凋亡,细胞周期分析发现苦参碱作用24 h细胞周期滞留在G₀/G₁期,作用48、72 h滞留在S期;苦参碱还浓度和时间相关地抑制端粒酶活性。

程向东等^[44]报道苦参碱0.1~0.5 g/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,苦参碱0.1、0.3、0.5 g/L作用24 h使HepG2细胞的凋亡率分别为27.77%、50.31%、71.26%;0.3 g/L苦参碱作用24 h能使HepG2细胞的谷胱甘肽水平显著下降,细胞生存率降至57.84%,谷胱甘肽供体N-乙酰半胱氨酸能完全对抗苦参碱的增殖抑制作用,使癌细胞生存率恢

复到100.81%,而谷胱甘肽抑制剂丁硫氨酸-亚砷亚胺能进一步增强苦参碱消耗谷胱甘肽的作用,使癌细胞的成活率进一步降至43.23%。苦参碱还能促进线粒体内细胞色素C向胞浆内释放,进而水解半胱天冬酶-9使之激活,认为苦参碱是通过消耗谷胱甘肽造成线粒体氧化应激性损伤,进而诱导细胞凋亡。X线照射也能增强苦参碱诱导线粒体应激的凋亡通路^[45]。

周欢等^[46]报道苦参碱0.25~2 g/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖和诱导凋亡,使细胞周期滞留在G₀/G₁期。在引起线粒体膜电位崩溃的同时诱导Bid、Bcl-2表达下调,Bax表达上调。孟凡等^[47]也报道苦参碱0.125、0.5、1、2 g/L浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,作用24 h能使线粒体膜电位分别下降9.21%、19.26%、42.33%、35.75%,并能浓度相关地下调父系表达基因10(paternally expressed gene 10, PEG10)的基因和蛋白表达。

何星星等^[48]报道苦参碱0.8、1.6、2.4 g/L作用48 h使HepG2细胞的凋亡率由对照组的6.7%分别提高到11.1%、29.7%、43.3%,并能抑制细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化。电镜下可见苦参碱使HepG2细胞核变形、缩小并集聚在胞浆边缘、部分染色质固缩并凝结成块、胞浆浓缩、内质网疏松并与胞膜融合形成空泡,呈细胞凋亡的早期改变。而ERK通路特异性抑制剂U0126与1.6 g/L苦参碱联用可使HepG2细胞凋亡率进一步提高到63.3%。康生朝等^[49]报道苦参碱不仅抑制ERK磷酸化,也浓度相关地下调HepG2细胞的ERK基因和蛋白表达。因此苦参碱还可以通过抑制ERK信号通路诱导癌细胞凋亡。

舒婷婷^[50]报道苦参碱0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 g/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖并诱导凋亡,作用12 h的增殖抑制率分别为5.8%、9.7%、17.5%、34.8%、46.0%;作用24 h的增殖抑制率分别为13.9%、21.2%、43.4%、59.3%、64.9%;作用48 h的增殖抑制率分别为13.2%、29.4%、57.3%、73.3%、76.9%,并能下调HepG2细胞中的人宫颈癌基因-1的蛋白表达和上调p53、Bax的蛋白表达。苦参碱在0.2 g/L时能提高HepG2细胞对X射线的敏感性,与单纯X射线对照组比,上述所有作用进一步加强。丁梦南^[51]报道苦参碱0.2、0.4、0.8、1.6 g/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖,作用24、48、72 h的IC₅₀分别为0.6、0.41、0.38 g/L。用低细胞毒浓度0.2 g/L苦参碱作用48 h对HepG2的细胞周期分布

无影响,但能对抗X线照射升高G₂/M期细胞数和降低S期细胞数量。0.2 g/L苦参碱作用48 h的HepG2的早期凋亡率为6.40%、晚期凋亡率为2.14%,而对照组分别为0.08%和0,X线照射组分别为3.39%和1.37%,苦参碱+X线照射联用组凋亡率分别为10.03%和2.97%,说明苦参碱能显著诱导凋亡并可协同X线进一步诱导细胞凋亡。X线照射可促进HepG2细胞过表达黏蛋白-1,而黏蛋白过表达可抑制射线诱导癌细胞凋亡,降低癌细胞对放疗的敏感性。苦参碱可显著下调HepG2细胞表达黏蛋白-1,与X线联用可进一步下调黏蛋白-1的基因和蛋白表达,因此苦参碱是肝癌放疗的增敏剂。苦参碱也能提高HepG2细胞对顺铂或多柔比星的敏感性^[51]。

何金花等^[52]报道苦参碱作用48 h对HepG2细胞增殖的IC₅₀为0.9 g/L,并诱导凋亡和下调凋亡抑制蛋白Apollon基因表达,因此抑制Apollon基因表达也是苦参碱抗HepG2细胞的作用机制之一。如果苦参碱作用于转染Apollon反义核酸的HepG2细胞48 h,IC₅₀降为0.43 g/L,致敏倍数达到2.09,与Apollon反义核酸协同增强抗HepG2细胞的作用。

罗耀玲等^[53]报道苦参碱0.25、0.5、0.75、1 g/L作用24 h可浓度相关地上调HepG2细胞表达癌基因微小RNA-21,浓度达到0.75 g/L时微小RNA-21的表达显著增加,此时HepG2细胞增殖抑制率为40%,Bcl-2基因和蛋白表达显著下调而Bax基因和蛋白表达显著上调。如果将HepG2细胞转染上微小RNA-21的抑制物,使HepG2细胞成为低表达微小RNA-21的肝癌细胞,苦参碱对此种肝癌细胞的作用被显著增强:促进凋亡和Bax的基因和蛋白表达,下调Bcl-2的基因和蛋白表达作用进一步提高。也就是说苦参碱上调微小RNA-21表达是HepG2细胞对苦参碱产生耐药的机制之一。

5 诱导HepG2细胞分化和抑制其侵袭和转移

娄诚^[54]报道苦参碱1.61、2.42、3.22、4.03、4.83、5.64 mmol/L可浓度相关地降低HepG2细胞成活率,作用2~3 d时除5.64 mmol/L组外,各组成活率呈缓慢上升。苦参碱在3.22 mmol/L浓度以下,HepG2细胞体积缩小、形态逐渐规则;在更高浓度时,除上述表现更明显外,凋亡和坏死细胞增多,且呈浓度和时间相关。作用4 d所有浓度的苦参碱组HepG2细胞成活率再次下降,但细胞恶性表型逐渐消失。形态学检查可见苦参碱作用2 h,细胞体积缩小、胞浆出现大小不等的空泡、细胞周围代谢产物堆积;随着苦参碱浓度提高和时间增加,细胞生长

缓慢,形态逐渐规整、细胞体积缩小、变圆、轮廓清楚、折光加强。3.22 mmol/L组作用2 d开始出现漂浮细胞,作用4 d细胞数量明显减少。HE染色中低浓度苦参碱组可见细胞胞浆浓缩、染色质凝集、细胞核变圆、数量减少、核仁不清楚、胞浆内可见明显空泡变性。3.22 mmol/L苦参碱组除上述改变进一步明显外,部分细胞出现胞浆浓缩、核浓缩、核碎裂等凋亡改变,少部分细胞膜破裂、细胞坏死崩解。电镜下可见细胞表面微绒毛消失、细胞体积变小、胞浆疏松、胞质内可见泡体、脂质体及不定形物、核凝集、异染色质凝集或趋边、核蛋白体明显减少、未见明显细胞器,显示出细胞恶性表型的减弱或消失。苦参碱作用4 d,细胞周期滞留在G₀/G₁期,S期和G₂/M期细胞数量减少,其中以1.61 mmol/L组最为明显。以上形态学观察表明苦参碱在低浓度时以诱导分化为主,在高浓度时虽然也诱导分化,但以细胞毒作用为主。苦参碱1.61、2.42、3.22 mmol/L作用4 d不能逆转HepG2细胞中因甲基化而失活的肿瘤抑制基因,但能浓度相关地明显增强抑癌基因p16和p53的基因表达,提示苦参碱诱导分化的作用与DNA去甲基化机制无关,而与诱导p16和p53表达有关。

张彬等^[55]报道苦参碱0.3~3.5 g/L浓度相关地抑制HepG2细胞增殖,当质量浓度达到3.5 g/L癌细胞出现死亡。当苦参碱浓度≥0.3 g/L时HepG2细胞胞浆内出现圆形、折光很强的透明颗粒、细胞形态变得规则、核变小、核仁明显减少、胞浆呈空泡状,类似正常肝细胞,从形态学证实苦参碱能促使HepG2细胞向正常肝细胞分化。

尹继云^[56]报道苦参碱0.3~3.5 g/L可浓度和时间相关地抑制HepG2细胞增殖。但苦参碱0.5 g/L组在作用的头16 h能促进HepG2细胞增殖和贴壁生长。免疫组化法检测可见苦参碱能下调HepG2细胞表达甲胎蛋白、增殖细胞核抗原(PCNA)、p53、Bcl-2的蛋白表达,上调Bax表达。司维柯等^[27]和蒲玲玲等^[57]都报道苦参碱0.8、1.5 g/L均能显著下调HepG2细胞甲胎蛋白、PCNA、c-myc的表达和肝癌特异性谷氨酰转氨酶活性,上调抑癌基因p53、Rb表达,苦参碱1.5 g/L甚至完全抑制HepG2细胞表达甲胎蛋白和PCNA。甲胎蛋白和PCNA是反映肝癌细胞恶性程度的重要指标,因此可以认为苦参碱能降低HepG2细胞的恶性程度,间接证明苦参碱能诱导HepG2细胞分化。

罗耀玲等^[58]报道苦参碱0.125~2 g/L可浓度相

关地抑制 HepG2 细胞增殖,下调遗传印记基因 DLK1 基因表达和细胞侵袭能力,使细胞周期滞留在 G₁ 期, S 期细胞数减少。杨婉等^[59]报道苦参碱 0.25~4 g/L 可浓度和时间相关地抑制 HepG2 细胞增殖,使 HepG2 细胞形态变圆、贴壁差、密度降低、边界不清、形态不完整,高浓度时出现细胞坏死、碎片。1、2、4 g/L 苦参碱使 HepG2 细胞的迁移能力分别下降 27.0%、53.0%、86.1%。赵海亮等^[60]报道苦参碱 0.2~3.2 g/L 可浓度和时间相关地抑制 HepG2 细胞增殖,并下调血管内皮生长因子的基因和蛋白表达以及基质金属蛋白酶-9 的蛋白表达,提示苦参碱可能有抑制肿瘤转移的作用。

6 结语

苦参碱能剂量相关地抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移、侵袭和血管内皮生长因子表达,能诱导 HepG2 细胞凋亡和分化。苦参碱是 HepG2 细胞的自噬早期诱导剂,更是自噬晚期抑制剂。苦参碱是通过诱导线粒体应激、内质网应激和抑制 ERK 信号通路、人宫颈癌基因-1、Apollon 基因表达和端粒酶活性,产生抗 HepG2 细胞作用的。苦参碱还能对抗其他十多种肝癌细胞的生长^[10]。

苦参碱是一种免疫调节剂,在低剂量时以促进免疫为主,随着剂量提高其促进免疫作用达到最高点后会转向免疫抑制为主^[7,61]。苦参碱也是肿瘤细胞凋亡和分化的诱导剂,在低剂量以诱导分化为主,随着剂量的提高,诱导分化的作用逐渐提高并开始诱导细胞凋亡,随着剂量的进一步提高,苦参碱主要表现为诱导肿瘤细胞凋亡、甚至细胞坏死^[8-10,62]。

癌症是一类易复发和转移的慢性疾病,当手术或放化疗(包括与苦参碱联用)取得临床近期疗效后,笔者建议可以参考临床上苦参碱治疗肝病的经验^[4-6],为肝脏肿瘤患者适当使用苦参碱,并摸索长期应用的个性化剂量,以提高肿瘤患者的免疫调节功能,诱导残留在体内的癌细胞向正常细胞方向分化,且防止肿瘤复发或转移。也可以开展设计严谨的临床研究,为肝肿瘤治疗寻找高效、低毒的新药。

参考文献

- [1] 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的研究进展[J].抗感染药学,2018,15(1):1-6.
- [2] 张明发,沈雅琴.苦参碱抗急性肝损伤的药理作用研究进展[J].抗感染药学,2018,15(10):1657-1662.
- [3] 张明发,沈雅琴.苦参碱抗慢性肝损伤的药理研究进展[J].抗感染药学,2018,15(12):2025-2029.
- [4] 张明发,沈雅琴.苦参碱治疗病毒性肝炎临床评价的研究进展[J].抗感染药学,2019,16(1):5-9.
- [5] 张明发,沈雅琴.苦参碱对病毒性肝炎治疗药物协同作用疗效的评价进展[J].抗感染药学,2019,16(2):185-189.
- [6] 张明发,沈雅琴.苦参碱对肝纤维化患者临床疗效的再评价[J].抗感染药学,2019,16(3):371-375.
- [7] 张明发,沈雅琴.苦参碱抗炎和免疫抑制药理作用的研究进展[J].抗感染药学,2018,15(5):737-742.
- [8] 张明发,沈雅琴.苦参碱类生物碱抗红白血病 K562 细胞药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2019,42(1):223-229.
- [9] 张明发,沈雅琴.苦参碱抗乳腺癌和卵巢癌的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2019,42(10):2111-2118.
- [10] 张明发,沈雅琴.苦参碱抗肝癌药理作用及临床应用研究进展[J].药物评价研究,2020,43(1):157-165.
- [11] 朱丹丹,姚树坤.苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 荷瘤裸鼠的抑瘤作用研究[J].现代药物与临床,2016,31(6):736-741.
- [12] 李军,司维柯,潘静,等.苦参碱与氧化苦参碱影响荷瘤小鼠肿瘤生长及其免疫调节作用的研究[J].重庆医学,2011,40(27):2719-2721.
- [13] 胡高裕,黄桂柳,胡静,等.人肝癌细胞裸鼠移植瘤模型建立及苦参碱的抑瘤作用[J].世界华人消化杂志,2014,22(33):5056-5062.
- [14] 胡高裕.人肝癌裸鼠模型建立及苦参碱与顺铂联合对肝癌移植瘤和 Survivin、Caspase-3 表达的影响[D].桂林:桂林医学院,2015.
- [15] 鄂颖,尚德高,尤胜.苦参碱联合顺铂对人肝癌细胞株 HepG2 裸鼠移植瘤模型瘤体生长及 Caspase-3、Survivin 表达的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18(5):457-460.
- [16] 王鹏,陶遵威,郑晓辉,等.新型酯类苦参碱衍生物的合成与体外抗肿瘤活性[J].中国新药杂志,2012,21(21):2547-2551.
- [17] 孙莉,钱生勇,冒小平,等.苦参碱衍生物的生物转化制备及其抗肿瘤活性研究[J].药学与临床研究,2017,25(1):24-26.
- [18] 毛俐,王广杰,张鑫,等.氧化苦参碱及苦参碱 Au(III) 金属配合物对肿瘤细胞增殖的影响及分子机制初探[J].中草药,2019,50(3):639-646.
- [19] 林泽.槐属植物中药生物碱抗肿瘤作用机制研究[D].汕头:汕头大学,2011.
- [20] 刘丽敏,刘华钢,毛俐,等.苦参碱和氧化苦参碱体外对肿瘤细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(11):35-36.
- [21] 王淑静,刘晨,姜珊,等.苦参碱对人 HepG2 细胞与人 ECV304 细胞的增殖抑制活性比较研究[J].黑龙江医药,2013,26(2):212-214.
- [22] 王怡楠.苦参碱、氧化苦参碱联合对肝癌细胞 HepG2 的体外活性研究及能量代谢影响[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2015.
- [23] 司维柯,潘静,陆华,等.苦参碱抑制 HepG2 细胞增殖及其剂量与抑制方式关系的研究[J].世界华人消化杂志

- 志, 2001, 9(2): 185-189.
- [24] 司维柯, 罗朝学, 陈庆海. 流式细胞术分析苦参碱诱导人肝癌细胞HepG2凋亡[J]. 肿瘤, 2001, 21(3): 213-214.
- [25] 李 鹏, 司维柯, 王 源, 等. 苦参碱与氧化苦参碱抑制HepG2细胞增殖的对比研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(5): 261-264.
- [26] 司维柯, 陈 安, 李 鹏, 等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系HepG2凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 816-820.
- [27] 司维柯, 李 鹏, 姚 婕. 苦参碱对HepG2细胞代谢水平和基因水平的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1346-1349.
- [28] 张 燕. 苦参碱对HepG2细胞系增殖能力的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 143-144.
- [29] 程少冰, 赵昌林. 苦参碱诱导人肝癌细胞株HepG2.2.15凋亡的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1123-1125.
- [30] 谢 军, 孟 凡, 刘永萍, 等. 苦参碱对人肝癌细胞HepG2增殖及凋亡相关蛋白的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(24): 4007-4009.
- [31] 程向东, 杜义安, 黄 灵, 等. 苦参碱在调节Bax和Bcl-2蛋白表达诱导HepG2细胞凋亡中的作用[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(12): 711-713.
- [32] 樊 浩, 何 松, 汤为学. NF- κ B沉默联合苦参碱诱导人肝癌细胞HepG2凋亡和相关分子的表达[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(2): 148-154.
- [33] 高 航. 核因子- κ B在苦参碱诱导的肝癌细胞凋亡中的作用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [34] 李权林. 苦参碱对肝癌细胞NF- κ B、p53、DcR3mRNA表达的影响[D]. 南充: 川北医学院, 2011.
- [35] 付燕燕, 陈 彦, 吴 键, 等. 苦参碱诱导HepG2细胞凋亡与cyclin D1和p27^{kpl}关系的实验观察[J]. 徐州医学院学报, 2006, 26(4): 305-307.
- [36] 张方宇, 何 松. 乳脂修饰苦参碱脂质体的肝靶向性和体外抑瘤作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(6): 747-751.
- [37] 张军强. 苦参碱对肝癌HepG2细胞的抗肿瘤作用: 诱导凋亡和自噬[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [38] 任志俭. 苦参碱通过mTOR信号通路诱导人肝癌HepG2细胞发生自噬现象[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [39] 范 悦, 王世明, 石青青. 苦参碱对肝癌细胞增殖及其细胞自噬的影响[J]. 中国当代医药, 2013, 20(7): 11-13.
- [40] 郭 浩, 周淑妮, 冉瑞智. 苦参碱调控肝癌细胞HepG2自噬作用研究[J]. 中国药业, 2019, 28(6): 14-17.
- [41] 欧秀元. 苦参碱引起内质网应激的机制及相关药效的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [42] 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[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(5): 498-500.
- [43] 何 松, 左国庆, 张 燕, 等. 苦参碱对肝癌细胞HepG2端粒酶活性调控的体外研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 291-292, 295.
- [44] 程向东, 杜义安, 黄 灵, 等. 苦参碱对人肝癌HepG2细胞内GSH水平调节和细胞杀伤作用[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(4): 311-313.
- [45] 汪丽箐, 程向东, 徐志远, 等. 苦参碱联合X线对肝癌细胞协同杀伤作用的实验[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(5): 442-445.
- [46] 周 欢, 徐敏英, 雷 宇, 等. 苦参碱通过线粒体通路诱导HepG2细胞凋亡的机制研究[J]. 广西医学, 2014, 36(11): 1588-1592.
- [47] 孟 凡, 张自翔, 谢 军, 等. 苦参碱对人肝癌细胞HepG2凋亡和PEG10表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(10): 1523-1526.
- [48] 何星星, 谢步善. 抑制ERK通路增强苦参碱诱导的肝癌HepG2细胞凋亡[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2018, 58(3): 1-4, 107.
- [49] 康生朝, 杨 婉, 郑 英, 等. 苦参碱抑制HepG2肝癌细胞的靶点—ERK信号通路[J]. 肝脏, 2019, 24(2): 187-189.
- [50] 舒婷婷. X射线照射联合苦参碱对肝癌HepG2细胞人宫颈癌基因-1及相关基因表达的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [51] 丁梦南. 苦参碱对人肝癌细胞增殖抑制及放射敏感性的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [52] 何金花, 李毓光, 韩泽平, 等. Apollon反义核酸联合苦参碱对肝癌细胞增殖与凋亡影响的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(1): 36-40.
- [53] 罗耀玲, 黄铀新, 赖 平, 等. 低表达miR-21对苦参碱诱导的肝癌HepG2细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2): 284-288.
- [54] 娄 诚. 肝细胞癌DNA甲基化谱实验研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2008.
- [55] 张 彬, 盖自宽. 苦参碱影响HepG2细胞分化的相关指标检测[J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(5): 443-446.
- [56] 尹继云. 苦参碱和氧化苦参碱对体外培养HepG2细胞影响的比较研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- [57] 蒲玲玲, 刘 桦, 曾莉萍, 等. 苦参碱对HepG2细胞代谢水平和基因水平的影响[J]. 中国美容医学, 2012, 21(9): 22-23.
- [58] 罗耀玲, 黄铀新, 刘 瑶. 苦参碱对HepG2细胞DLK1基因表达及细胞生长的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(17): 2823-2825.
- [59] 杨 婉, 王盖昊, 王兆林, 等. 苦参碱对人肝癌HepG2细胞的作用机制研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2016, 26(2): 99-101, 132.
- [60] 赵海亮, 黄桂柳, 黄赞松, 等. 苦参碱抑制人肝癌HepG2细胞增殖及其VEGF、MMP-9表达的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(1): 1-5.
- [61] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱免疫促进作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 579-585.
- [62] 王珂欣, 高 丽, 周玉枝, 等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的¹H-NMR代谢组学研究[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4275-4283.