

苦参碱对神经胶质瘤 U87 细胞增殖和侵袭的抑制作用研究

周 剑, 曹爱玲, 舒诚荣*

咸宁市中心医院 湖北科技学院附属第一医院 肿瘤中心, 湖北 咸宁 437100

摘 要: **目的** 研究苦参碱对神经胶质瘤 U87 细胞增殖和侵袭的影响, 探讨其作用机制。**方法** 采用 MTT 法和 Transwell 侵袭实验分别检测苦参碱对 U87 细胞的增殖能力和侵袭能力。采用 Western blotting 法和 qPCR 法检测苦参碱对 U87 细胞的 COX2 蛋白和 mRNA 表达情况。**结果** 药物作用 24 h 时, 与对照组比较, 随着苦参碱浓度 (5、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的增加, 苦参碱对 U87 细胞生长的抑制率不断地增加; 相同浓度下, 苦参碱对 U87 细胞增殖率在 24、48、72 h 时逐渐出现显著性差异 ($P < 0.05$)。对照组通过的细胞数量明显多于苦参碱 100 $\mu\text{g/mL}$ 组, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 随着苦参碱浓度的增加, COX-2 的蛋白和 mRNA 表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 苦参碱通过降低 COX-2 的蛋白和 mRNA 表达来抑制 U87 细胞的增殖和侵袭。

关键词: 苦参碱; U87 细胞; 侵袭; 增殖; COX-2

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)07-1184-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.07.004

Inhibitory effect of matrine on proliferation and invasion of glioma U87 cells

ZHOU Jian, CAO Ai-ling, SHU Cheng-rong

Center of Tumor, Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei Institute of Technology, Xianning 437100, China

Abstract: **Objective** To investigate the influence of matrine on glioma U87 proliferation and invasion, and explore its mechanisms. **Methods** MTT and Transwell were used to detect the influence of matrine on multiplication capacity and invasion ability of U87 cells. Western blotting and qPCR methods were used to detect the COX2 protein and mRNA expression. **Results** Compared with the control group, inhibition rates of matrine treated for 24 h on the growth rate of U87 cells were increased with the concentrations of matrine (5, 50, 100 g/mL) increased. Under the same concentration, there were significant difference of inhibition rates of matrine treated for 24, 48, and 72 h on the proliferation of U87 cells ($P < 0.05$). The number of cells in the control group was significantly more than that in matrine 100 g/mL group, with significant differences between two groups ($P < 0.01$). Compared with the control group, the expression of COX-2 protein and mRNA in matrine groups were significantly decreased with the increase of matrine concentration, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Matrine can inhibit the proliferation and invasion of U87 cells by lowering expression of COX-2 protein and mRNA.

Key words: matrine; U87 cell; invasion; proliferation; COX-2

胶质瘤是肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率 $> 90\%$ ^[1], 是人中枢神经系统发病率最高的恶性肿瘤^[2]。由于神经胶质瘤呈侵袭性生长方式, 与邻近正常脑组织无明显分界, 使得手术治疗难以根治, 造成易复发、死亡率高的现状。恶性脑胶质瘤患者大多数在确诊后 1 年内死亡。随着现代医学的发展, 神经胶质瘤的诊断和治疗有了很大提高, 但因其发病的确切分子机制仍然不是很明确, 从而影响了胶质瘤的预防和治疗。苦参碱有多种生理功能,

尤其在抗肿瘤治疗中有较高的活性^[3-4]。本实验以人神经胶质瘤 U87 细胞为研究对象, 探讨苦参碱对胶质瘤 U87 的 COX-2 蛋白和 mRNA 表达情况, 同时研究苦参碱对胶质瘤 U87 细胞增殖和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 试验药物

苦参碱, 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司, 批号 M109802, 质量分数 $\geq 98\%$, 规格 2 mg, 苦参碱用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 配制成

收稿日期: 2017-03-09

作者简介: 周 剑 (1980—), 男, 主治医师, 本科, 研究方向为消化道肿瘤放化疗。Tel: 18671513451 E-mail: 442394462@qq.com

*通信作者 舒诚荣, 主任医师。

1 mg/mL 的储备液。

1.2 细胞株

人神经胶质瘤细胞株 U87 购自美国 ATCC 公司, 货号 HTB-14, 规格 500 mL。细胞培养条件: 含 10%胎牛血清的 RPMI 1640, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。

1.3 主要试剂

PCR 试剂盒购自美国 Kapa 公司, 货号 KK4610, 规格 5 mL; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自上海生工生物工程有限公司, 货号 A100793-0001; COX-2 单克隆抗体购自 Abcam 公司, 批号 H20110041; 小牛血清购自杭州四季青生物试剂公司, 货号 sc-224480; 胰蛋白酶购自美国赛默飞公司, 批号 NUE0164; RPMI-1640 培养基购自美国赛默飞公司, 货号 BW12014; FITC/PI 双染试剂盒购自碧云天生物试剂公司, 货号 AP002。

1.4 仪器

SpectraMax Plus384 酶标仪购自美谷分子公司; TGL-16B 型台式高速离心机购自上海安亭科学仪器厂; pH5-3C 型酸度计购自上海雷磁仪器厂; EPS-300 电泳仪及电泳设备购自上海天能; LDS-2A 型台式低速离心机购自北京医用离心机厂; HS3120 超声波清洗器购自天津市恒奥科技发展有限公司。

2 方法

2.1 胶质瘤 U87 细胞增殖能力

将对数生长期胶质瘤 U87 细胞接种于 96 孔板中, 使每孔 U87 细胞达到 1×10^5 个, 培养 24、48、72 h, 之后分别把 U87 细胞加入苦参碱 (5、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 培养基中。以不添加苦参碱为对照组, 每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 μL , 在培养箱中继续培养 4 h, 之后吸掉所有的培养基, 再把 150 μL DMSO 试剂加入其中, 完全振荡后, 使其溶解结晶充分, 再用酶标仪在 570 nm 处测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 苦参碱对胶质瘤 U87 细胞侵袭能力的影响

在 Transwell 小室中加入将 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ 的悬浮细胞, 在上室中加入对照组和苦参碱组 (5、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 培养基, 每个药物 3 个平行孔, 培养 24 h 后, 每孔中加入 100 μL 细胞悬浮液。常规细胞培养 24 h。取出小室后, 立即用 PBS 溶液对滤膜进行冲洗, 并擦除上室的胶质瘤 U87 细胞, 之后进行染色和计数, 计算胶质瘤 U87 细胞的侵袭能力。

2.3 Western blotting 检测 COX-2 的表达

收集对数生长期的 U87 细胞进行相应的对照组和苦参碱组 (5、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24 h, 提取各组细胞总蛋白, 通过 Bradford 法调整相同的蛋白浓度后, 进行电泳获得根据相对分子质量分离的蛋白条带, 根据 Pierce 公司 Western blotting 显像试剂盒的指导说明来进行, 蛋白的 NC 膜电转, 进行蛋白封闭和一抗结合, 一抗结合后洗脱, 再进行二抗孵育标记兔抗大鼠的多克隆抗体。ECL 试剂盒显色后, 暗室发光拍照, 实验重复 3 次, 以 GAPDH 作为对照计算蛋白表达率。

$$\text{蛋白表达率} = \text{实验组蛋白表达量} / \text{GAPDH 表达量}$$

2.4 COX-2 表达的 qPCR 检测

根据 Trizol 说明书对组织中的 RNA 进行提取, 利用分光光度计 (超微量) 测定总 RNA 浓度, 复能基因有限公司设计 miR-26b 引物, 上游引物: 5'-GAAGATCTATGGCCCATCTGAGGTTG-3'; 下游引物: 5'-CCCAAGCTTAAAAACCTCCACCACGAAT-3'。以总 RNA 为模版 (100 ng), 进行 cDNA 逆转录, 反应条件为: 在 37 °C 进行 15 min, 再在 98 °C 进行 5 min。之后根据说明书进行 PCR 反应 (Kapa PCR 试剂盒), 计算 mRNA 表达量。实验重复 3 次, 计算 mRNA 相对表达率。

$$\text{mRNA 相对表达率} = \text{药物组 mRNA 表达量} / \text{对照组表达量}$$

2.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 苦参碱抑制胶质瘤细胞 U87 的增殖能力

预实验发现苦参碱的半抑制浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 因此选用 5、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为研究对象, 见图 1。

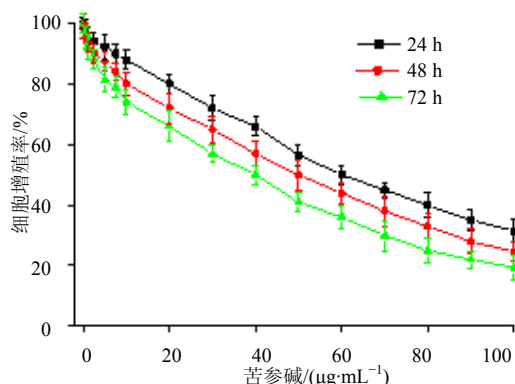


图1 胶质瘤 U87 细胞增殖率

Fig. 1 Proliferation rate of Glioma U87 cells

解析苦参碱对胶质瘤 U87 的抑制作用, 药物作用 24 h 时, 与对照组比较, 随着苦参碱浓度 (5、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的增加, 苦参碱对 U87 细胞生长的抑制率不断地增加; 相同浓度下, 苦参碱对 U87

细胞增殖率在 24、48、72 h 时逐渐出现显著性差异 ($P < 0.01$)。由于在 24 h 时就已经出现了明显的差异, 为了保持实验的高效性, 实验选择 24 h 作为处理时间。见表 1。

表 1 苦参碱对 U87 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of matrine on proliferation rates of U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞增殖率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.56 $\pm$ 3.43	99.98 $\pm$ 2.13	100.45 $\pm$ 2.42
苦参碱组	5	91.44 $\pm$ 3.51*	88.45 $\pm$ 2.34*	82.85 $\pm$ 2.56*
	50	58.67 $\pm$ 4.12**	47.51 $\pm$ 3.45**	39.91 $\pm$ 3.34**
	100	33.43 $\pm$ 2.84**	26.38 $\pm$ 1.37**	18.67 $\pm$ 1.96**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.2 苦参碱抑制胶质瘤细胞 U87 的侵袭能力

Transwell 结果显示, 对照组通过的细胞数量明显多于苦参碱 100 $\mu\text{g/mL}$ 组, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 苦参碱对 U87 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of matrine on invasion ability of U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	转移细胞数 ($\times 10^2$ 个)
对照	—	187.56 $\pm$ 6.99
苦参碱	5	154.58 $\pm$ 4.55*
	50	86.55 $\pm$ 5.32**
	100	49.45 $\pm$ 4.76**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.3 胶质瘤 U87 中 COX-2 蛋白的表达

Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 随着苦参碱浓度的增加, COX-2 的蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、表 3。

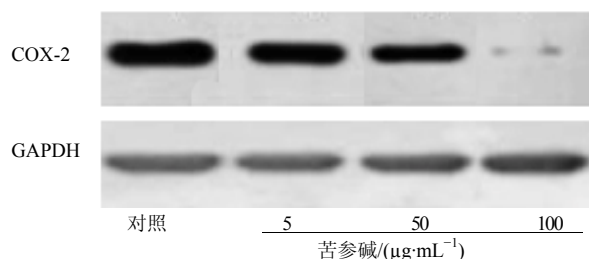


图 2 U87 细胞中 COX-2 的蛋白表达情况

Fig. 2 Protein expression of COX-2 in U87 cells

表 3 U87 细胞中 COX-2 的蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Protein expression levels of COX-2 in U87 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	蛋白表达量/%
对照	—	256.75 $\pm$ 7.12
苦参碱	5	212.45 $\pm$ 5.12*
	50	105.78 $\pm$ 4.56**
	100	21.56 $\pm$ 4.33**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.4 胶质瘤 U87 中 COX-2 mRNA 的表达

与对照组比较, 随着苦参碱浓度的增加, COX-2 mRNA 的蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 U87 细胞中 COX-2 mRNA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 mRNA Expression of COX-2 detected by Q-PCR in glioma ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	mRNA 表达量/%
对照	—	0.987 $\pm$ 0.034
苦参碱	5	0.764 $\pm$ 0.041*
	50	0.412 $\pm$ 0.038**
	100	0.271 $\pm$ 0.043**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

4 讨论

肿瘤细胞的增殖和转移与肿瘤细胞的信号通路的下放息息相关, 对肿瘤细胞信号通路下放进行阻截或已成为肿瘤凋亡靶向治疗的重要手段之一。肿

瘤细胞转移的实现是通过减少肿瘤细胞的黏附能力,使细胞的自主运动性增加,进而向细胞周围临近的组织浸润和转移^[5]。

近年来研究发现,环氧化酶参与肿瘤的发生、侵袭和转移。Tyagi 等^[6]研究表明 PGE2 的升高可以上调 Treg 细胞的活性,降低了机体的免疫反应,最终导致肿瘤的发生发展。Martin 等^[7]研究表明在一些转基因小鼠体内,COX-2 的上调可以引起肿瘤形成。Krzystyniak 等^[8]研究表明,与正常脑组织相比,COX-2 在胶质瘤呈高表达,并可以促进胶质瘤血管生成,并且能够促进一些与胶质瘤生长、侵袭和转移相关的蛋白酶的生成和释放。大量证据证明,COX-2 过表达与多种肿瘤转移密切相关。可能参与改变细胞黏附能力、改变细胞外基质、促进肿瘤血管生长等过程。Brouxhon 等^[9]研究表明,在高表达 COX-2 的鳞状上皮癌中,鳞状上皮癌细胞之间的相互作用力明显的减弱了,通过检测发现鳞状上皮癌细胞中 E-cadherin 表达水平受到了明显的抑制。Lee 等^[10]研究表明,骨肉瘤中 COX-2 表达增高,且在骨肉瘤细胞株中过表达 COX-2、MMP-2、MMP-9 的活性也显著增加,细胞侵袭和迁移能力明显增加。

本研究通过对神经胶质瘤 COX-2 蛋白和 mRNA 的检测发现,随着苦参碱的增加,COX-2 的蛋白和 mRNA 表达水平也逐渐降低,同时 U87 细胞的侵袭迁移能力也随之降低。这意味着苦参碱抑制 COX-2 的蛋白和 mRNA 表达水平降低诱导胶质瘤血管生成速率的降低,减少一些与胶质瘤生长、侵袭和转移相关的蛋白酶的生成和释放速率,进而达到抑制 U87 细胞增殖和转移的目的。

本研究结果为苦参碱的多靶点性抗胶质瘤活性提供了参考,为该苦参碱的临床应用于胶质瘤治疗提供了实验数据,也将作为一种新型的抗肝癌的化疗药物,被进一步论证和研究。

参考文献

- [1] Sathornsumetee S, Reardon D A, Desjardins A, et al. Molecularly targeted therapy for malignant glioma [J]. *Cancer*, 2007, 110(1): 13-24.
- [2] 张忠民,顾志成,王彩霞,等. NF- κ B 与脑胶质瘤的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(2): 330-333.
- [3] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3): 369-373.
- [4] 张庆,茹庆国,刘艳,等. 苦参碱与氧化苦参碱对炎症相关结直肠癌的化学预防作用研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1548-1553.
- [5] 周同,宋长玲. 细胞粘附分子、粘附蛋白与肿瘤转移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1995, 2(3): 232-234.
- [6] Tyagi A, Singh R P, Ramasamy K, et al. Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor- κ B and signal transducers and activators of transcription 3 [J]. *Cancer Prevention Res*, 2009, 2(1): 74-83.
- [7] Martín S P, Callejas N A, Casado M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines [J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 125(6): 1313-1319.
- [8] Krzystyniak K L. Current strategies for anticancer chemoprevention and chemoprotection [J]. *Acta Pol Pharm*, 2002, 59(3): 473-477.
- [9] Brouxhon S, Kyrkanides S, O'Banion M K, et al. Sequential down-regulation of E-Cadherin with squamous cell carcinoma progression: Loss of E-Cadherin via a prostaglandin E2-EP2-dependent posttranslational mechanism [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7654-7664.
- [10] Lee E J, Choi E M, Kim S R, et al. Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 469-476.