

苦参碱对人原代白血病细胞的体外作用研究

白煜¹, 朱志超¹, 蒋丽佳¹, 夏蕾¹, 范静¹, 孙晓¹, 卢绪章², 周民², 马玲娣^{1*}

1. 南京医科大学附属常州市第二人民医院 中心实验室, 江苏 常州 213000

2. 南京医科大学附属常州市第二人民医院血液科, 江苏 常州 213000

摘要: 目的 研究苦参碱对原代人白血病细胞的体外作用及可能的分子机制。方法 取临床初诊的髓系白血病患者外周血, 分离得到原代白血病细胞体外培养。不同浓度苦参碱作用后, 观察细胞的形态学改变、CCK8 法检测细胞增殖、Annexin V-FITC/PI 分析细胞凋亡及流式检测细胞周期。结果 苦参碱作用 24 h, 细胞增殖明显受抑, 0.5、0.8 mg/mL 组的生长抑制率分别为 54.98%和 72.96%, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 抑制效应有明显剂量相关性。苦参碱作用 24 h 的 IC_{50} 为 0.5 mg/mL。苦参碱作用 24 h, 0.2、0.5、0.8 mg/mL 组细胞早期凋亡率分别为 11.8%、37.6%、54.7%, 明显高于对照组自发凋亡率 (7.50%) ($P < 0.05$)。苦参碱作用 48 h 后, 细胞周期阻滞于 G0/G1→S 期。结论 苦参碱可显著抑制体外培养的人原代白血病细胞增殖, 其机制与诱导细胞早期凋亡, 促进细胞周期 G1→S 期阻滞有关。

关键词: 苦参碱; 人原代白血病细胞; 增殖; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2015)03-0262-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.006

Effect of matrine on proliferation inhibition and apoptosis induction in primary leukemia cells *in vitro*

BAI Yu¹, ZHU Zhi-chao¹, JIANG Li-jia¹, XIA Lei¹, FAN Jing¹, SUN Xiao¹, LU Xu-zhang², ZHOU Min², MA Ling-di¹

1. Central Laboratory, Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China

2. Department of Hematology, Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of matrine on the human primary leukemia cells and its possible molecular mechanisms. **Methods** The primary leukemia cells were isolated from the PBMC of the patients with myeloid leukemia and cultivated under the regular culture medium. After exposed to the matrine with different concentration, the morphological changes of leukemia cells were observed under the light biomicroscopy. The proliferation was determined by CCK-8 assay. Annexin V-FITC/PI affinity assay was used to analyze the apoptosis of leukemia cells induced by matrine. The cell cycles were analyzed by flow cytometry before and after matrine treatment. **Results** Compared to the vehicle cells, there was a dramatically proliferation suppression was observed in the cells after matrine treatment. The inhibitory rates of primary leukemia cells were 54.98% and 72.96% after treated with matrine for 24 h at the doses of 0.5 and 0.8 mg/mL, respectively ($P < 0.01$), which has a significant dose-dependent manner. The half maximal inhibitory concentration of matrine (IC_{50}) was 0.5 mg/mL for 24 h treatment. Matrine could induce early cell apoptosis. The percentage of apoptotic cells were 11.8%, 37.6%, and 54.7% in the cells treated with 0.2, 0.5, or 0.8 mg/mL matrine for 24 h, respectively (with spontaneous apoptosis rate 7.50% for untreated cells) ($P < 0.05$). FCM method showed that cells at the G0/G1 phase decreased and cells at the S phase were declined obviously, suggested a blockage of cell cycles transition at the G1/S key checkpoint for 48 h. **Conclusion** Matrine manifests a significant inhibitory effects on the proliferation of human primary leukemia cells. Apoptosis induction and the arrest at G1 phase of cell cycle maybe contribute to its roles on the suppression of cell growth.

Key words: matrine; human primary leukemia cells; proliferation; apoptosis; cell cycles

收稿日期: 2015-01-20

基金项目: 国家自然科学基金 (81101647); 南京医科大学博士后课题

作者简介: 白煜 (1989—), 女, 江苏常州人, 研究实习员, 研究方向中药抗白血病作用

*通信作者 马玲娣, 博士. Tel: (0519)88107313 E-mail: lingdimawsh@126.com

白血病是发病率较高的血液系统恶性肿瘤之一。随着联合化疗在临床中的应用,完全缓解率明显提高,但仍有部分患者对化疗产生耐药,成为化疗失败的主要原因。苦参碱(matrine)是豆科植物苦参的干燥根、植株、果实中提取出的一种生物碱,具有抗感染、升高白细胞数、缓解癌痛等多种药理活性,也是一种理想的肿瘤诱导分化药物^[1-4]。以往的研究中,本课题组发现苦参碱对多个白血病细胞株体外生长都具有明显抑制作用^[5],本研究拟进一步观察苦参碱对原代白血病细胞的体外作用,以期苦参碱临床应用提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦参碱 相对分子质量 248.36,质量分数为 99.9%,购自陕西省科学院西安植物园植物化学开发研究所。双蒸水配制成 10 g/L 的储存液于 -20 °C 保存备用。

1.1.2 细胞株及培养 研究对象为南京医科大学附属常州市第二人民医院血液科收治的白血病初诊患者,经血象和骨髓病理活检临床确诊,共 8 例,其中急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)有 5 例,慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)有 3 例。抽取患者外周血 2~3 mL,置于肝素抗凝无菌试管中,加入人淋巴细胞分离液,在超净工作台中进行无菌分离。离心后吸取中间层细胞,置于另一无菌离心管中,以 0.01 mol/L PBS 液洗涤 1 次后,2 000 r/min 离心 5 min。重复上述操作 1 次后弃上清,分离可得单个核细胞。所余下层细胞经红细胞裂解液,在 37 °C、5 min 后,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清。以 0.01 mol/L PBS 液洗涤 1 次后,可得粒细胞。将单个核细胞与粒细胞混合,为实验用白血病细胞。于含 10% 胎牛血清(FBS)、青、链霉素(分别为 100 U/mL 和 100 µg/mL)的 PRMI 1640 培养基重悬后,0.4% 台盼蓝法染色计数活细胞 ≥ 95%,调整为细胞密度 $(3\sim5)\times10^5/\text{mL}$ 后,37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.1.3 主要试剂和仪器 胎牛血清(FBS),细胞培养基(PRMI 1640)为 Gibco 产品。人淋巴细胞分离液(批号 20100827)购自上海华精生物高科技有限公司。台盼蓝(Trypan Blue)购于 Sigma 公司。cck-8(Cell counting kit-8)购于东仁公司。凋亡试剂盒 Annexin V/PI Dead Cell Apoptosis Kit 为 Invitrogen 公司产品。IX71-22FL/PH 倒置荧光显微

镜为 OLYMPUS 公司产品。BD Biosciences FACS Calibur 流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 形态学观察 原代白血病细胞,调整密度为 $2\times10^5/\text{mL}$,按每孔 2 mL 接种于 6 孔板中。实验组加入终质量浓度分别为 0.2、0.5、0.8 mg/mL 的苦参碱药液,阴性对照组加入等体积 1640 培养液,作用 24、48 h 后倒置光学显微镜下观察白血病细胞形态学改变。

1.2.2 苦参碱对原代白血病细胞作用浓度-时间曲线的测定 原代白血病细胞调整密度为 $1.5\times10^5/\text{mL}$,按每孔 1 mL 接种于 24 孔板中。实验组加入苦参碱药液,终质量浓度分别为 0.2、0.5、0.8 mg/mL,阴性对照组加入等体积 1640 培养液,每组设 6 个平行孔。细胞于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中常规培养。每天各实验组取出 1 孔,台盼蓝染色计数活细胞,连续计数 6 次,绘制苦参碱对白血病细胞的作用浓度和时间曲线。每个实验至少重复 3 次。

1.2.3 CCK-8 增殖实验 原代白血病细胞调整密度为 $2\times10^5/\text{mL}$,按每孔 200 µL 接种于 96 孔板中。实验组加苦参碱药液,终质量浓度分别为 0.2、0.5、0.8 mg/mL,另设不加药组为对照组,无细胞单加药组为空白组,每组设 3 个平行孔。细胞分别培养 24、48 h 后,CCK-8 法检测苦参碱对细胞的影响。细胞增殖活性计算公式: $[(\text{实验组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450}) / (\text{对照组 } A_{450} - \text{空白组 } A_{450})] \times 100\%$ 。每个实验至少重复 3 次。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡 原代白血病细胞调整密度为 $2\times10^5/\text{mL}$,按每孔 3 mL 接种于 6 孔板中。实验组分别加入 0.2、0.5、0.8 mg/mL 苦参碱处理。24 h 后,收集细胞以预冷 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,以 100 µL $1\times\text{Annexin-binding buffer}$ 重悬细胞,调整细胞数目在 1×10^6 个/mL,实验组和对照组细胞内依次加入 5 µL Annexin-V 和 1 µL PI 工作液;另设 Annexin-V 和 PI 单染对照,分别加入 5 µL Annexin-V 或 1 µL PI 工作液;避光室温孵育 15 min,各管内加入 400 µL $1\times\text{Annexin-binding buffer}$,混匀避光至于冰上。以 FITC 标记的 Annexin-V 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。每个实验至少重复 3 次。

1.2.5 细胞周期分析 原代白血病细胞调整密度为

$2 \times 10^5/\text{mL}$, 按每孔 5 mL 接种于 6 孔板中。实验组分别加入终质量浓度 0.2、0.5、0.8 mg/mL 苦参碱处理。48 h 后, 收集细胞以预冷 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 以 500 μL 冰 70% 乙醇固定细胞, -20°C 过夜。后离心弃上清, 以预冷 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 实验组和对照组细胞内依次加入 100 μL Triton X-100 (0.1%) 破膜, 5 min。后离心弃上清, 以预冷 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 加入终质量浓度 0.2 mg/mL RNaseA, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 避光室温孵育 30 min, 流式细胞仪检测各组细胞周期情况。每个实验至少重复 3 次。

1.3 统计学分析

数据用采用 SPSS17.0 统计软件处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 并进行组间两两比较。

2 结果

2.1 形态学观察

原代白血病细胞经苦参碱处理前后, 细胞形态发生明显变化。见图 1, 对照组经 24 h 培养后, 细胞数量略有增加, 形态呈圆形透亮状, 折光性减弱, 胞质中出现细颗粒状物质; 而经苦参碱处理 24 h, 细胞数量虽有增加, 但胞体胀大, 内有空泡, 核内染色质固缩, 可见死亡细胞及碎片。培养 48 h 后, 对照组细胞略有增加, 细胞形态胀大, 可见些许死亡细胞及碎片; 苦参碱处理组细胞数量减少, 核内染色质固缩, 细胞破裂降解, 细胞开始大量死亡。

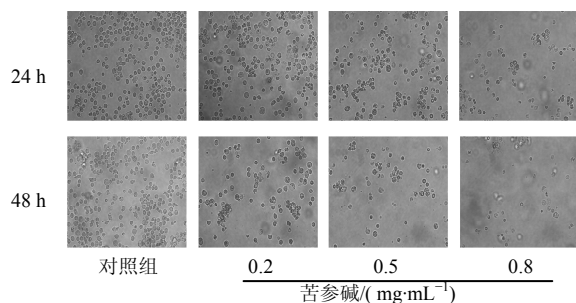


图 1 不同浓度苦参碱作用 24、48 h 后原代白血病细胞形态学改变

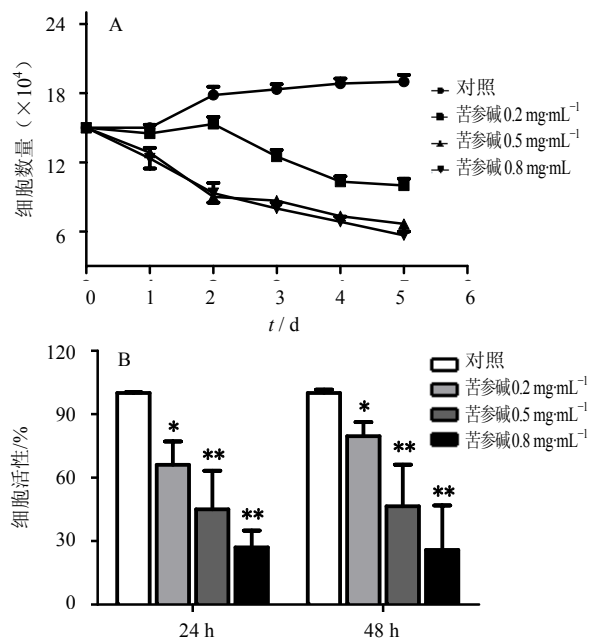
Fig. 1 Morphological changes of primary leukemia cells treated with matrine at indicated concentration for 24 h, 48 h

2.2 苦参碱抑制原代白血病细胞的增殖活性

不同浓度苦参碱对原代白血病细胞的生长均显示抑制作用, 呈药物浓度相关性。由图 2A 生长曲线可见, 随着苦参碱处理浓度的增加, 细胞的增值速

度减慢。苦参碱 0.2 mg/mL 组 48 h 细胞计数为 $(15.33 \pm 1.04) \times 10^4$, 苦参碱 0.5 mg/mL 组为 $(9 \pm 0.87) \times 10^4$, 对照组为 $(17.83 \pm 1.26) \times 10^4$ 。随着苦参碱作用时间的延长, 处理组细胞数减少更加明显。5 d 时, 苦参碱 0.2、0.5、0.8 mg/mL 组细胞计数依次为 $(10 \pm 1) \times 10^4$ 、 $(6.67 \pm 1.15) \times 10^4$ 、 $(5.67 \pm 0.58) \times 10^4$ 。

随着苦参碱处理浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 见图 2B。24 h 苦参碱处理组细胞活性依次为 $(66.10 \pm 11.02)\%$ 、 $(45.02 \pm 18.21)\%$ 、 $(27.04 \pm 7.89)\%$ 。其中 0.5、0.8 mg/mL 与对照组差异显著 ($P < 0.01$)。而且 0.2 mg/mL 与 0.8 mg/mL 之间也存在显著差异 ($P < 0.05$)。苦参碱处理时间延长后, 48 h 苦参碱 0.2 mg/mL 组细胞活性为 $(79.68 \pm 6.59)\%$, 抑制作用有所减弱; 苦参碱 0.8 mg/mL 组细胞活性为 $(25.88 \pm 21.01)\%$, 抑制作用略有增加, 但是差异无显著性。苦参碱对原代白血病细胞的抑制作用呈剂量相关性, 其中苦参碱 0.5 mg/mL 在 24、48 h 均呈现半数抑制。



A-不同浓度苦参碱作用后原代白血病细胞的生长曲线 MAT (mg/mL); B-不同浓度苦参碱抑制原代白血病细胞的体外增殖。与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A-The cells were grown in 24-well culture plate and counted everyday. B- Cells were incubated with CCK-8 solution.

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

图 2 苦参碱抑制原代白血病细胞体外增殖

Fig. 2 Inhibition of matrine on primary leukemia cells proliferation in vitro

2.3 苦参碱诱导原代白血病细胞凋亡

苦参碱对原代白血病细胞诱导凋亡作用具有剂量相关性, 见图3。苦参碱作用24 h, 对照组的细胞凋亡率约为8.71%, 随着苦参碱加药浓度的增加, 细胞凋亡率分别为13.37%、40.62%、63.21%, 其中早期凋亡率分别为11.8%、37.6%、54.7%。

2.4 苦参碱阻滞原代白血病细胞于G0/G1→S期

苦参碱处理48 h后, 原代白血病细胞的周期发

生改变。其中G0/G1期细胞逐渐增多, S和G2期细胞比例显著降低, 见图4。G0/G1期细胞逐渐增多, 其中对照组为74.7%, 苦参碱0.5 mg/mL组为88.06%, 苦参碱0.8 mg/mL组为90.4%。S和G2期细胞比例显著降低, S期对照组为8.22%, 苦参碱0.5 mg/mL组为4.42%。G2期对照组为17.08%, 苦参碱0.2、0.5、0.8 mg/mL组依次为16.75%, 7.52%, 2.48%。显示细胞周期阻滞于G0/G1→S期。

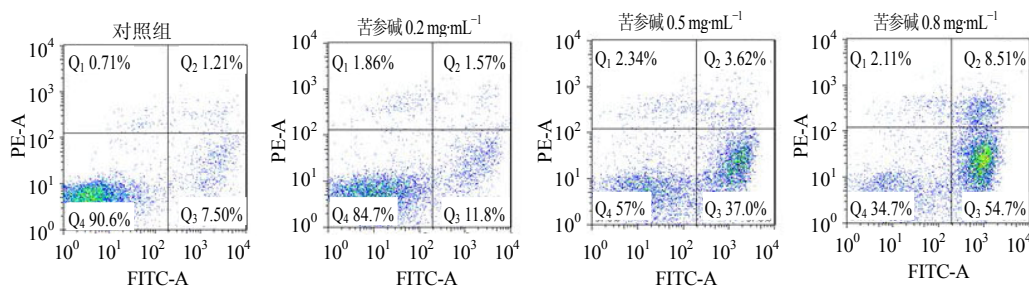


图3 苦参碱诱导原代白血病细胞凋亡 (Annexin V-PI)

Fig. 3 Induction of matrine to primary leukemia cells into apoptosis (Annexin V-PI)

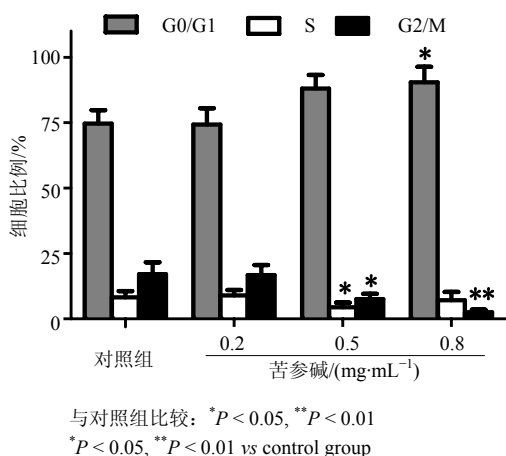


图4 不同浓度苦参碱作用后原代白血病细胞周期流式分析
Fig. 4 DNA cell cycle analyses in primary leukemia cells exposed to matrine at different concentration

3 讨论

白血病是一种造血系统恶性肿瘤, 在我国青少年中发病率较高, 其高度增生和恶性侵袭的生物学特性使其临床防治始终是一个难点。白血病的常规疗法主要是放疗和化疗, 但是由于缺乏选择特异性, 往往对正常组织、器官 (特别是骨髓和消化道) 造成功能性或器质性损伤。因此, 寻找新的治疗方法和有效的抗癌药物具有重要意义。中草药以其副作用小, 价廉易得在肿瘤综合防治中越来越受到关注。

苦参碱是提取于豆科植物苦参、苦豆子、广豆

根等中草药的活性成分^[6]。近年来, 有关苦参碱类抗肿瘤机制的研究目前已成为抗肿瘤中药研究的一个热点, 研究结果表明作为抗肿瘤联合用药在肿瘤综合防治中具有较好的应用前景。以往研究发现, 苦参碱能明显抑制人慢粒白血病细胞 K562、早幼粒白血病细胞 HL-60、U937 细胞增殖, 诱导凋亡增加, 其中抑制 K562 细胞内 DNA 复制; 诱导 T 淋巴细胞白血病 JM 多个凋亡基因差异表达, 其中 Caspase8 表达上调 5 倍以上^[5-7]。以上这些都是在白血病细胞株中的研究, 苦参碱对原代白血病细胞的作用尚没有更多报道。

本研究发现, 苦参碱对原代白血病细胞也具有明显的增殖抑制作用, 呈剂量相关性。随着时间的延长, 其抑制效应有所减弱, 但高浓度仍具有较强抑制效果, 苦参碱 0.5 mg/mL 在 24、48 h 均呈现半数抑制。细胞凋亡也与肿瘤之间关系密切, 正常细胞通过增生和凋亡来维持自身稳定, 若两者失衡, 则会导致肿瘤发生^[8]。本次研究, 24 h 苦参碱诱导凋亡作用显著, 其中早期凋亡占较大比例。肿瘤细胞的无限增殖与细胞周期的失控有关, G1/S 是其重要的调控点。本次研究, 苦参碱处理 48 h, 原代白血病细胞 G0/G1 期细胞逐渐增多, S 和 G2 期细胞比例显著降低, 显示细胞周期阻滞于 G0/G1→S 期。

本课题组在以往研究中发现, 苦参碱可以抑制

K562 细胞生长, 诱导其凋亡、分化, 其作用可能与 Bcl-2、C-myc、CyclinD1、P53 的表达有关^[9-11]。有报道称苦参碱作用后的 K562、HL-60 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显的下调, 与苦参碱浓度呈反比。近年来的研究表明 Bcl-2 在内源性凋亡途径中起着重要作用^[12]。另外, 苦参碱作用 K562 细胞后, P53 表达增强。P53 是一种肿瘤抑制基因, 对细胞生长、凋亡和 DNA 修复有调控作用^[13]。此外, 苦参碱作用 K562 细胞后, 伴随着 DNA 合成能力的降低, C-myc 的 mRNA 水平表达降低, CyclinD1 表达增强并几乎同步达到最高。C-myc、CyclinD1 作为一种细胞周期蛋白, 其表达水平受苦参碱影响, 在 G0 期到 S 期的过程中起重要作用^[14-15]。因此, 推测苦参碱对原代白血病细胞生长抑制作用可能与 Bcl-2、C-myc 基因表达水平的下调, CyclinD1 表达增强, P53 活化有关。

以往的研究提供了一些可能, 苦参碱抑制原代白血病细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G0/G1→S 期, 其作用机制是否与这些分子相关, 还有待更深入的研究。这些涉及到的相关分子将是本课题组下一步的研究方向。

参考文献

- [1] Wu D, Shao K, Sun J, *et al.* Matrine cooperates with all-trans retinoic acid on differentiation induction of all-trans retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia Cells (NB4-LR1): possible mechanisms [J]. *Planta Med*, 2014, 80(5): 399-408.
- [2] Luo C, Zhong H J, Zhu L M, *et al.* Inhibition of matrine against gastric cancer cell line MNK45 growth and its anti-tumor mechanism [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5459-5464.
- [3] Li LQ, Li X L, Wang L, *et al.* Matrine inhibits breast cancer growth via miR-21/PTEN/Akt pathway in MCF-7 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3): 631-641.
- [4] 任 峰, 王 丰, 许洪卫. 复方苦参注射液经 P13K/Akt 信号通路抑制胃癌细胞株 BGC-823 生长 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 814.
- [5] 樊 丽, 高吉照. 苦参碱对吡柔比星诱导 HL-60 细胞凋亡及核因子- κ Bp65 活性的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(3): 212-214.
- [6] 张丽华, 陈邦恩, 潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(6): 1001-1003.
- [7] 张永清, 黄高昇, 陈协群, 等. 苦参碱诱导 T 淋巴细胞白血病 JM 细胞凋亡相关基因表达变化及其机制研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(5): 1207-1210.
- [8] 覃遵科, 殷小成. 苦参碱对急性淋巴细胞性白血病细胞 Bcl-2 表达的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(6): 497-499.
- [9] 吕晓霞, 蒋丽佳, 范 静, 等. 苦参碱抑制慢性粒细胞白血病 K562 细胞生长和诱导凋亡作用研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(2): 147-150.
- [10] 马玲娣, 张 彦, 文世宏, 等. 苦参碱抗肿瘤作用及其机制的初步研究 [J]. *中医与免疫*, 2007, 23(5): 434-437.
- [11] Ma L D, Zhou M, Wen C, *et al.* effect of lentiviral shRNA-mediated STAT3 shRNA on Biological characteristics of chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. *Leuk Lymph*, 2010, 51(7): 1326-36.
- [12] 董海林, 宋永平. 苦参碱诱导 HL-60 细胞株凋亡作用的实验研究 [J]. *白血病淋巴瘤*, 2011, 20(8): 480-489.
- [13] Joe Tam, 张莉萍, 蒋纪恺. 苦参碱对白血病细胞癌基因和细胞周期调控蛋白表达的影响 [J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(5): 347-361.
- [14] Guo L, Xue T Y, Xu W, *et al.* Matrine promotes G0/G1 arrest and down-regulates cyclinD1 expression in human rhabdomyosarcoma cells [J]. *Panminerva Med*, 2013, 55(3): 291-296.
- [15] 鲍娇琳, 陆金建, 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.