

xl、Bcl-w 等;Bax 类,为凋亡促进因子,包括 Bax、Bak、Box 等。Bcl-2 可阻断 Ca^{2+} 从内质网释出,使依赖于 Ca^{2+} 的核酸内切酶活性降低,从而阻断 DNA 消化和细胞凋亡^[13];Bcl-2 作用于线粒体与核孔复合体上的信号分子,控制细胞信号传导来延长细胞生存^[14];Bcl-2 蛋白还可以和 Bax 蛋白相结合,从而抑制细胞凋亡。Bcl-2 与 Bax 的比值决定了细胞接受凋亡信号后细胞的存活与否,如果 Bax 占优势,细胞死亡,而 Bcl-2 占优势时,细胞存活^[15]。在应用反义蛋白激酶 AR1 α (Rial-pha) 对前列腺进行生长抑制诱导实验中,促进凋亡蛋白 Bax、Bak 表达增多,提示 Bax 与肿瘤细胞的生长抑制与凋亡有关。Bcl-2 与 Bax 的比值是决定凋亡与否的主要因素,一方面,Bcl-2 不仅可能通过抑制细胞色素 C 等从线粒体的释放调控着线粒体渗透性转换孔的开启,从而抑制 caspase-3 的活化,还可能参与抑制 caspase-3 的合成。另一方面,Bcl-2 又是 caspase-3 的直接底物,caspase-3 是 Bcl-2 的生理性蛋白酶,Bcl-2 蛋白的环区可被 caspase-3 在 Asp34 处剪切^[16]。本研究结果首次表明,冬凌草甲素能够通过诱导人肝癌 BEL-7402 细胞发生凋亡而发挥体外抗肝癌作用;上调 Bax 蛋白水平和下调 Bcl-2 蛋白水平以及活化 caspase-3 可能是冬凌草甲素体外诱导人肝癌 BEL-7402 细胞发生凋亡的重要作用机制之一,冬凌草甲素可能是一种潜在的抗肝癌药物;这为进一步的动物实验及其进一步的临床应用提供了实验依据。

References:

- [1] Han Q B, Li M L, Li S H, et al. Ent-kaurane diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *lushanensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(7): 790-793.
- [2] Zhang J X, Han Q B, Zhao A H, et al. Diterpenoids from *Isodon japonica* [J]. *Fitoterapia*, 2003, 74(5): 435-438.
- [3] Yang S L, Han S Y, Zhang Q, et al. Study on the antitumor of oridonin [J]. *Carcinog Teratog Mutag* (癌变·畸变·突变), 2001, 13(1): 8-10.
- [4] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Antiproliferation effects of oridonin on HPB-ALL cells and its mechanisms of action [J]. *Am J Hematol*, 2006, 81(2): 86-94.
- [5] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Anti-proliferative effects of oridonin on SPCA-1 cells and its mechanism of action [J]. *J Int Med Res*, 2004, 32(6): 617-626.
- [6] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Oridonin-induced apoptosis in leukemia K562 cells and its mechanism [J]. *Neoplasma*, 2005, 52(3): 225-230.
- [7] Liu J J, Li Q, Pan X L, et al. Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(8): 1188-1193.
- [8] Liu J J, Pan X L, Wu X Y, et al. Inhibitory effect and mechanism of oridonin on Raji cells proliferation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 774-777.
- [9] Nicholson D W, Thornberry N A. Caspase: killer proteases [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(8): 299-306.
- [10] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Ponichidin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPEC, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells *in vitro*. [J]. *Cancer Invest*, 2006, 24(2): 136-148.
- [11] Porter A G, Janicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99-104.
- [12] Huether A, Hopfner M, Sutter A P, et al. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(4): 661-669.
- [13] Hockenbery D M, Oltvai Z N, Yin X M, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis [J]. *Cell*, 1993, 75(2): 241-251.
- [14] Farrow S N, White J H, Martinou I, et al. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K [J]. *Nature*, 1995, 374(6524): 731-733.
- [15] Krajewski S, Krajewska M, Shabalik A, et al. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2 [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(6): 1323-1336.
- [16] Zhu X F, Liu Z C, Xie B F, et al. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60 [J]. *Life Sci*, 2002, 70(11): 1259-1169.

小檗碱体内外对人鼻咽癌细胞 CNE-2 生长的抑制作用

蔡于琛^{1,2}, 洗励坚^{1,2*}

(1. 华南肿瘤生物学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 中山大学肿瘤防治中心实验研究部, 广东 广州 510060)

摘要:目的 观察小檗碱体内外对人鼻咽癌 CNE-2 细胞生长的影响, 探讨小檗碱的抗肿瘤作用机制。方法 MTT 法测定小檗碱对 CNE-2 细胞生长的抑制作用; 流式细胞仪检测小檗碱对 CNE-2 细胞凋亡和周期的影响; 透射电镜观察 CNE-2 细胞经小檗碱处理后凋亡形态变化; Western blotting 法检测小檗碱对 CNE-2 细胞的细胞周

收稿日期: 2006-02-25

作者简介: 蔡于琛(1977—), 女, 广东省潮州市人, 助理研究员, 硕士, 在职博士生, 研究方向为抗癌药物筛选、减毒增效及其机制研究。

Tel: (020) 87343187 Fax: (020) 87343170 E-mail: edentry@163.com

* 通讯作者 洗励坚 Tel: (020) 87343187 E-mail: Lj_xian@yahoo.com

期相关蛋白 (cyclin) B1、CDK1、cdc25c 表达的影响; ^3H -胸腺嘧啶 (^3H -TdR) 和 ^3H -亮氨酸 (^3H -Leu) 标记前体掺入法检测小檗碱对 CNE-2 细胞 DNA 和蛋白质合成的影响; 利用荷人鼻咽癌的裸鼠模型验证小檗碱的体内抗肿瘤作用。结果 小檗碱能抑制 CNE-2 细胞生长, 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(49.5 \pm 5.8) \mu\text{mol/L}$, 72 h 的 IC_{50} 为 $(13.3 \pm 2.0) \mu\text{mol/L}$; 小檗碱能抑制 CNE-2 细胞 DNA 和蛋白质合成; 小檗碱能诱导 CNE-2 细胞凋亡, 细胞经过 $25.0 \mu\text{mol/L}$ 小檗碱处理 48 h 后的凋亡指数为 $(48.9 \pm 10.4)\%$; $50.0 \mu\text{mol/L}$ 小檗碱能诱导 CNE-2 细胞 G_2/M 期阻滞, 并且下调细胞周期相关蛋白 B1、CDK1、cdc25c 表达; 小檗碱能抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞在裸鼠体内的生长, 30 mg/kg 剂量组的肿瘤体积中位数为 317.9 mm^3 , 明显低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 小檗碱体内外均能抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞的生长, 其抗肿瘤作用可能与其诱导细胞周期阻滞和凋亡, 下调相关细胞周期蛋白有关。

关键词: 小檗碱; 人鼻咽癌细胞 CNE-2; 抗肿瘤作用

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1521-06

Inhibition of berberine on growth of human nasopharyngeal carcinoma cells CNE-2 *in vivo* and *in vitro*

CAI Yu-chen^{1,2}, XIAN Li-jian^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China;

2. Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: **Objective** To study the inhibitory effect of berberine on human nasopharyngeal cancer cell line CNE-2 *in vivo* and *in vitro*. **Methods** CNE-2 cell proliferation was measured by MTT assay and cell cycle was analyzed by flow cytometry. Cell morphology was observed with transmission electron microscopy. The cell cycle relative protein was detected by Western blotting. DNA and protein syntheses were assessed by the cellular incorporation of ^3H -TdR and ^3H -Leu, respectively. Anti-tumor activity of berberine in the experimental transplantation tumor CNE-2 was evaluated by relative tumor growth ratio. **Results** Berberine inhibited CNE-2 cells growth in a time- and dose-dependent manner. MTT Assay showed that the IC_{50} values of 48 and 72 h were (49.5 ± 5.8) and $(13.3 \pm 2.0) \mu\text{mol/L}$, respectively. Cell cycle analyses of $50.0 \mu\text{mol/L}$ berberine-treated CNE-2 cells by flow cytometry showed the accumulation of cells in the G_2/M phase while $25.0 \mu\text{mol/L}$ berberine treatments for 48 h induced apoptosis with the index of $(48.9 \pm 10.4)\%$. The inhibition of CNE-2 cell growth by berberine was associated with suppression of cyclin B1, CDK1, and cdc25c proteins. After the treatment of berberine at dose of 30 mg/kg, the median tumor volume was 317.9 mm^3 which was much lower than that in control group ($P < 0.05$) in nude mice bearing human nasopharyngeal cancer. **Conclusion** Berberine has inhibitory effect on the growth of CNE-2, which might be related to its inhibition of cyclin B, cdc25c, and CDK1 proteins.

Key words: berberine; human nasopharyngeal carcinoma cells CNE-2; anti-tumor effect

小檗碱又称黄连素, 为从毛茛科黄连属植物黄连、黄柏的根茎中提取的异喹啉类生物碱, 常用其盐酸盐。盐酸小檗碱的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 相对分子质量 407.85。临床长期用于解热、解毒、抗肠道细菌感染。近年来发现口服小檗碱能治疗心律失常、心衰、糖尿病等^[1~2]。此外, 许多实验研究证实小檗碱体外对多种肿瘤细胞株如白血病、肝癌、食管癌等均有不同程度的抑制作用^[3~5]。但是目前小檗碱的抗肿瘤作用研究绝大多数限于离体细胞, 动物体内抑瘤实验很少, 仍然没有明确定论。本实验研究小檗碱对人鼻咽癌 CNE-2 细胞生长的抑制作用, 进一步从细胞周期调控的角度探讨其抗肿瘤作用机制, 并研究小檗碱对裸鼠人鼻咽癌移植瘤的体内抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 药品与仪器: 小檗碱对照品 (质量分数 98.14%, 中国药品生物制品检定所提供, 批号 0713-9906); RPMI-1640 培养液、新生牛血清 (Gibco 公司产品); MTT (噻唑蓝, Sigma 公司产品); CDK1、cyclinB1、cdc25c 抗体 (Santa Cruz 公司产品); Western blotting 试剂盒 (Cell Signal 公司产品)。Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Labsystems 公司产品), 图像分析使用德国 Kontron IBAS 2.0 全自动图像分析系统和日本 JVC KY-F30B 3-CCD 彩色图像摄录输入仪。

1.2 动物: SPF 级 BALB/C 裸小鼠, 雌雄兼用, 6 周龄, 体重为 18~22 g, 由中山大学实验动物中心提供并饲养。动物合格证: 医动字第 26~00A005 号。实验室合格证: 医动字第 26~00C016 号。

2 方法

2.1 细胞培养:人低分化鼻咽癌 CNE-2 细胞由本实验室传代保种,用内含 10% 新生牛血清、200 U/mL 青霉素、200 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液,置 5% CO₂、37 °C 培养箱培养。

2.2 细胞生长曲线的测定:取对数生长期的 CNE-2 细胞,胰酶消化后制成细胞悬液,计数、调整细胞浓度为 2×10^4 /mL,接种于 10 cm 培养皿中,24 h 后,实验组加入不同浓度的小檗碱,分别为 10.0、40.0、80.0 μ mol/L,对照组加入等量培养液。培养 12、24、36、48、72 h 后各取出 3 瓶细胞,用台盼蓝拒染法,在光镜下计活细胞数,取平均值,以时间为横坐标,活细胞数为纵坐标,作图得细胞生长曲线。

2.3 小檗碱对 CNE-2 细胞的生长抑制作用:按 2.2 项方法制成细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。24 h 后加入不同浓度小檗碱 (3.1、6.3、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol/L),另设细胞对照组 (只加细胞不加药) 和空白对照组 (只加培养基)。每组设 4 个平行孔,每孔总体积为 200 μ L。加药 44、68 h 后,每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L。继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 200 μ L,室温振荡 15 min,用酶标仪 (波长 570 nm) 测定吸光度 (A) 值,计算细胞生长抑制率,Bliss 法计算半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率} = \left(1 - \frac{A_{\text{给药组}}}{A_{\text{对照组}}} \right) \times 100\%$$

2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布:收集不同浓度小檗碱 (12.5、25.0、50.0 μ mol/L) 处理 48 h 后的 CNE-2 细胞,PBS 洗涤 2 次,70% 乙醇固定过夜。2 000 r/min 离心 10 min,弃去乙醇,再次悬浮于 PBS,细胞经溴化丙啶 (PI,10 μ g/mL) 染色 5 min,4 °C 避光 30 min 后,上流式细胞仪,激发光波长为 488 nm,吸收波长 610 nm,功率为 15 mW。检测细胞 DNA 水平,根据 DNA 水平在流式细胞仪中得出每份样品的 G₁、S 和 G₂/M 期细胞分布图。LYSIS 软件 (Becton Dickinson 公司产品) 分析。

2.5 透射电镜观察细胞凋亡形态:取对数生长期的 CNE-2 细胞,设对照组 (加 RPMI-1640 培养液) 和小檗碱用药组 (25.0 μ mol/L),48 h 后收集细胞。先吸去培养液,PBS 洗涤 1 次,加入固定液固定 15~30 min,将细胞刮下,2 000 r/min 离心 10 min。送检前于 4 °C 保存。按常规电镜样品制备程序脱水、渗透、LR White 树脂包埋、超薄切片,醋酸铀枸橼酸铅双重染色,JEM-1200 透射电镜观察并摄片。

2.6 Western blotting 检测 CDK1、cyclinB1、cdc25c 表达:不同浓度的小檗碱 (12.5、25.0、50.0 μ mol/L) 处理 CNE-2 细胞 48 h 后,按常规方法裂解细胞,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白,电转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂奶 Tris 缓冲液封闭膜上的非蛋白结合点,4 °C 过夜。加 1:200 稀释的鼠抗人 cyclin B1/CDK1/cdc25c 抗体,室温作用 4 h。漂洗 3 次后加第二抗体 (辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体) 室温作用 2 h,漂洗 3 次。加发光剂 (Lumi GLO),置感光盒中感光,显影,定影。实验重复 3 次。

2.7 ³H-胸腺嘧啶 (³H-TdR) 和 ³H-亮氨酸 (³H-Leu) 标记前体掺入法检测细胞 DNA 和蛋白质合成:取对数生长期 CNE-2 细胞,细胞浓度调整为 2×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。24 h 后加入不同浓度小檗碱 (15.0、30.0、60.0、120.0 μ mol/L),另设细胞对照组 (不加药) 和空白对照组 (只加培养基)。每组设 3 个平行孔,每孔总体积 200 μ L。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 20 h 后,每孔加入 18.5 kBq ³H-TdR 或 ³H-Leu,4 h 后终止反应,将培养液吸去,每孔加 50 μ L 胰酶消化细胞,15 min 后加 150 μ L RPMI-1640 培养液终止消化。用自动细胞收集器将每孔内细胞分别收集于玻璃纤维素膜上,蒸馏水冲洗 3 次,取下滤膜,置 80 °C 烘烤 60 min,对号剪下各滤膜,加闪烁剂 (0.4% PPO,0.1% POPOP 的二甲苯溶液) 5 mL,暗处放置 15 min 后,用液体闪烁计数器测定 cpm 值。实验结果以掺入抑制率表示。

$$\text{掺入抑制率} = (1 - \text{给药组 cpm 值} / \text{对照组 cpm 值}) \times 100\%$$

2.8 小檗碱对 CNE-2 裸鼠移植瘤的抑制作用:选择肿瘤生长旺盛且无溃破、健康情况良好的荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,固定于手术板上,用酒精消毒动物皮肤,无菌条件下在超净台上剥离肿瘤组织,所用器械全部经高压消毒。肿瘤组织用加了青霉素、链霉素的平衡盐溶液冲洗,将其剪成直径 0.2 cm 左右的小块,接种于裸鼠右侧背部皮下。7 d 后根据肿瘤体积将其随机分组,设对照组 (H₂O)、环磷酰胺组 (CTX,10 mg/kg)、小檗碱各剂量组 (10、30、50 mg/kg),接种 24 h 后开始用药。每天 ig 给药 1 次,连续用药 10 d。每 3 天用游标尺测量肿瘤大小及称体重,按公式计算肿瘤体积 (V), $V = S^2 \times L / 2$ (S 为肿瘤短径,L 为肿瘤长径) 绘制生长曲线。肿瘤接种

后第 30 天处死小鼠。CTX 组及小檗碱处理组肿瘤体积与对照组肿瘤体积之间采用统计软件 SPSS 10.0 进行秩和法检验。

2.9 统计处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 10.0 进行数据处理,组间数据采用 t 检验或秩和检验。

3 结果

3.1 小檗碱抑制 CNE-2 细胞生长:由生长曲线可见,CNE-2 细胞经不同浓度的小檗碱处理 72 h 后,CNE-2 细胞数明显减少,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱对细胞的抑制率为 $(34.6 \pm 17.0)\%$,40.0 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制率为 $(85.9 \pm 2.9)\%$,80.0 $\mu\text{mol/L}$ 的抑制率为 $(91.9 \pm 1.1)\%$ 。结果表明 CNE-2 细胞经不同浓度的小檗碱处理 72 h 后,生长受到明显抑制,见图 1。

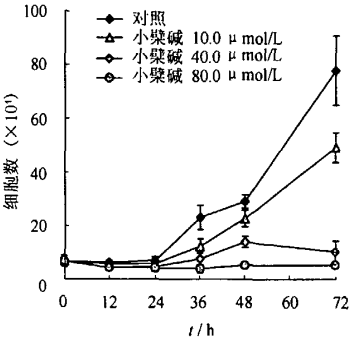


图 1 小檗碱对人鼻咽癌 CNE-2 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Inhibition of berberine on growth of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell line ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 小檗碱对 CNE-2 细胞的细胞毒作用:CNE-2 细胞经小檗碱处理 48、72 h 后,经 MTT 法检测,48 h 小檗碱的 IC_{50} 为 $(49.5 \pm 5.8) \mu\text{mol/L}$,72 h 的 IC_{50} 值为 $(13.3 \pm 2.0) \mu\text{mol/L}$ 。

3.3 小檗碱诱导 CNE-2 细胞凋亡和 G_2/M 期阻滞:不同浓度的小檗碱作用 CNE-2 细胞 48 h 后,细胞出现不同程度的亚 G_1 峰(凋亡峰),小檗碱在浓度为 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导细胞凋亡,50.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞出现 G_2/M 期阻滞,见表 1。

3.4 透射电镜观察细胞凋亡形态:CNE-2 细胞经 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱处理 48 h,细胞呈现明显的凋亡形态,电镜下可见:细胞固缩,体积变小,密度增加;质膜起泡,染色质浓缩,聚集于核膜下,呈境界分明的块状或新月形小体;细胞核碎裂,染色质片断化,细胞浆浓缩裂解成质膜包绕的碎片,凋亡小体形成。未处

理的 CNE-2 细胞核染色质均匀,核膜完整,胞质内有丰富的线粒体、粗面内质网、核糖体、高尔基体。见图 2。

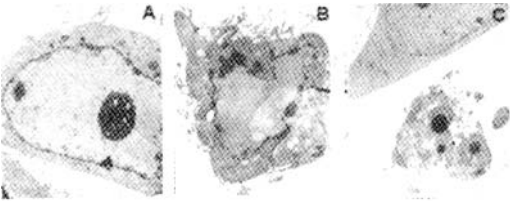
3.5 小檗碱对 cyclinB1、CDK1、cdc25c 表达的影响:CNE-2 细胞经过不同浓度小檗碱处理 48 h 后,吸光度分析表明,25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组的 cyclinB1、CDK1 和 cdc25c 表达均下调 ($P<0.01$),结果见表 2。

表 1 小檗碱处理 48 h 后对 CNE-2 细胞的细胞周期分布及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of berberine on cell cycle distribution and apoptosis rate of CNE-2 cells for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/ %	细胞周期/%		
			G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	7.2 $\pm$ 1.4	59.9 $\pm$ 8.9	34.5 $\pm$ 7.2	5.6 $\pm$ 1.8
小檗碱	12.5	31.4 $\pm$ 4.2**	57.0 $\pm$ 14.6	36.0 $\pm$ 13.5	7.1 $\pm$ 1.2
	25.0	48.9 $\pm$ 10.4**	55.2 $\pm$ 2.2	33.7 $\pm$ 4.0	11.2 $\pm$ 2.2*
	50.0	10.2 $\pm$ 0.7*	28.0 $\pm$ 1.9*	31.2 $\pm$ 1.2	40.8 $\pm$ 3.0**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group



A-对照 B-小檗碱 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h C-凋亡小体
A-control B-berberine 25.0 $\mu\text{mol/L}$ treatment for 48 h C- apoptotic body

图 2 透射电镜观察小檗碱诱导 CNE-2 细胞凋亡形态

Fig. 2 Apoptosis morphology of CNE-2 cells induced by berberine observed by transmission electronmicroscopy

表 2 小檗碱对 CNE-2 细胞 cyclinB1、CDK1 和 cdc25c 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of berberine on cyclin B1, CDK1, and cdc25c protein expression in CNE-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	cyclin B1	CDK1	cdc25c
对照	—	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
小檗碱	12.5	101.0 $\pm$ 4.9	8.8 $\pm$ 0.8**	9.4 $\pm$ 5.0**
	25.0	78.0 $\pm$ 7.3**	24.6 $\pm$ 4.4**	7.5 $\pm$ 3.7**
	50.0	6.1 $\pm$ 0.9**	3.3 $\pm$ 0.7**	1.8 $\pm$ 1.3**

与对照组比较: ** $P<0.01$
** $P<0.01$ vs control group

3.6 小檗碱抑制 CNE-2 细胞 DNA 和蛋白质合成:小檗碱浓度为 15.0、30.0、60.0、120.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 CNE-2 细胞 24 h, ^3H -TdR 及 ^3H -Leu 标记前体掺入均受明显抑制,表明小檗碱抑制 CNE-2 细胞 DNA 和蛋白质的合成。见图 3。

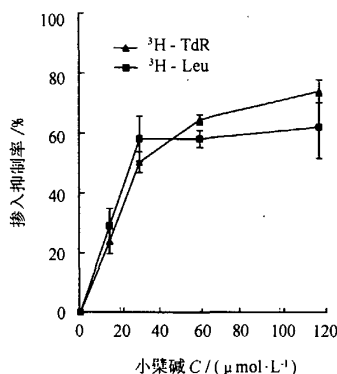


图 3 小檗碱对 CNE-2 细胞 DNA 和蛋白质合成的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of berberine on DNA and protein synthesis in CNE-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.7 小檗碱对人鼻咽癌裸鼠移植瘤的抑制作用:肿瘤接种后第 30 天,对照组肿瘤体积的中位数为 2 178.4 mm^3 ,阳性对照 CTX 组肿瘤体积的中位数为 582.1 mm^3 ($P < 0.05$)。小檗碱 10、30 和 50 mg/kg 组的肿瘤体积的中位数分别为 1 312.2 mm^3 ($P > 0.05$)、317.9 mm^3 ($P < 0.05$)、524.4 mm^3 ($P > 0.05$)。见表 3。小檗碱用药组裸鼠活动状态良好,无明显毒性反应。肿瘤接种后第 30 天,对照组裸鼠体重为 (26.3 ± 3.1) g,CTX 组裸鼠体重为 (27.8 ± 2.4) g。小檗碱 10、30、50 mg/kg 组的裸鼠体重分别为 (24.4 ± 2.4)、(26.1 ± 3.4)、(24.9 ± 1.9) g。

表 3 小檗碱对人鼻咽癌荷瘤小鼠的体内抑瘤作用

Table 3 Anti-tumor effect of berberine on CNE-2 xenografted in tumor-bearing mice *in vivo*

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物/ 只	肿瘤体积/ mm^3		
			最小	最大	中位
对照	—	8	337.5	3594.0	2178.4
CTX	10	7	0.0	1946.3	582.1*
小檗碱	10	7	0.0	1703.5	1312.2
	30	8	0.0	1998.1	317.9*
	50	8	0.0	2239.6	524.4

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

小檗碱是一种高效低毒的常用的广谱抗菌药

物,已经成功获得结构明确的化学单体。近年来,小檗碱的抗肿瘤作用受到许多学者的关注。本实验结果表明,小檗碱能明显抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞的增殖,其抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系。

诱导肿瘤细胞凋亡是抗癌药物作用机制之一。透射电镜观察结果表明,小檗碱 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 CNE-2 细胞 48 h 后,细胞出现凋亡的特征形态学改变。流式细胞仪检测结果显示,细胞出现不同程度的亚 G_1 峰(凋亡峰)。12.5 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱诱导细胞凋亡的比例为 (31.4 ± 4.2)%,25.0 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大,为 (48.9 ± 10.4)%,但是最高浓度 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的凋亡率反而下降,只有 (10.2 ± 0.7)%。有文献报道小檗碱对 Balb/c 3T3 细胞的凋亡诱导呈明显的剂量依赖性^[6]。小檗碱高剂量(200 $\mu\text{g/mL}$,即 490 $\mu\text{mol/L}$)作用下,细胞大量凋亡,这时候小檗碱主要存在于细胞核中。而当小檗碱在较低剂量(100 $\mu\text{g/mL}$)的情况下,可以观察到大量的细胞被阻滞在 G_2/M 期,而这时候的小檗碱主要存在于细胞浆中。提示小檗碱引起的 Balb/c 3T3 细胞凋亡和对细胞周期的调节中存在着一个重要的“极限点”。有关小檗碱对肿瘤细胞凋亡的诱导作用与其作用浓度和小檗碱在细胞内的定位的关系还有待进一步探讨。

细胞周期是一个连续的过程,细胞在进入下一期之前都要经过检测点(checkpoint),其中 G_1/S 和 G_2/M 检测点最为重要。在真核细胞内,cyclinB1 与 CDK1 的激酶活性是细胞由 G_2 期进入 M 期的关键。研究表明,CDK1 激酶活性需要 cyclinB1 的蓄积及 CDK1 的去磷酸化。而 CDK1 的去磷酸化依赖于磷酸酶 cdc25c 的作用^[7]。流式细胞仪分析结果表明,50.0 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱能诱导 CNE-2 细胞发生明显的 G_2/M 期阻滞。进一步用 Western blotting 分析上述 3 种蛋白表达水平。结果可见小檗碱处理细胞后,cyclinB1、CDK1 和 cdc25c 表达随小檗碱剂量升高而逐渐下降,这可能是小檗碱导致细胞增殖阻滞在 G_2/M 期的原因之一。有文献报道含有小檗碱的黄连提取物能抑制 cyclinB1 的表达,从而降低 CDK1 酶活性,使细胞停留在 G_2 期^[8]。本研究结果提示,小檗碱单体同样能抑制 cyclinB1 的表达,并且也下调 cdc25c,从而抑制 CDK1 酶活性,使细胞周期阻滞在 G_2/M 期。

虽然对小檗碱体外抑制肿瘤细胞增殖的报道较多,但是关于小檗碱体内抑瘤效果的研究却很少。以前人们普遍认为,小檗碱口服不易被吸收。然而,在

家兔体内对小檗碱的药动学研究表明,小檗碱口服能获得有效血药浓度并维持较长时间(AUC 为 211.94 $\mu\text{g/mL}$, C_{max} 为 25.2 $\mu\text{g/mL}$)^[9,10]。本研究应用裸鼠荷人鼻咽癌模型,ig 给予小檗碱 10、30 和 50 mg/kg,连续用药 10 d,其中 30 mg/kg 剂量组的肿瘤体积中位数明显低于对照组($P<0.05$)。本结果提示小檗碱口服可以达到有效抑瘤的血药浓度。

由于小檗碱的安全性较高,至今在临床上仍然作为常用抗菌药物广泛应用。小檗碱的体内外抗肿瘤活性研究为其单独或者联合其他抗肿瘤药物应用到临床肿瘤化疗方案中提供可能性和理论依据。

References:

- [1] Zhao X Z, Guo X. Clinical survey and myocardial electrophysiology of anti-arrhythmia effects of berberine [J]. *Chin J Cardiol* (中华心血管病杂志), 1989, 17(3): 159-161.
- [2] Xie P Y, Zhou H, Gao Y B. The clinical efficacy of berberine in treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Clin Health Care* (中国临床保健杂志), 2005, 8(15): 402-403.
- [3] Lin J. Inhibitory effects of berberine on growth of K562 cells [J]. *J Fujian Med Coll* (福建医学院学报), 1996, 30(4): 309-312.
- [4] Chi C W, Chang Y F, Chao T W, et al. Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG₂ cells [J]. *Life Sci*, 1994, 54(26): 2099-2107.
- [5] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2000, 148(1): 19-25.
- [6] Yang I W, Chou C C, Yung B Y. Dose-dependent effects of berberine on cell cycle pause and apoptosis in Balb/c 3T3 cells [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1996, 354(2): 102-108.
- [7] Eastman A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(2): 223-231.
- [8] Li X K, Motwani M, Tong W, et al. Huanglian, a Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(6): 1287-1293.
- [9] Xiong C Y, Shi X B, Dai Z S, et al. Pharmacokinetic study of ³H-berberine in rabbits and mouse [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1989, 5(5): 293-296.
- [10] Pang Z G, Wang B Q, Jiang H T. Study on the pharmacokinetics of berberine [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 1997, 13(1): 51-53.

人参多糖对 K562 细胞人粒-巨噬细胞集落刺激因子和促红细胞生成素及其受体表达的影响

陈地龙, 李 静, 刘永刚, 王亚平*, 陈婷梅, 郑 敏, 姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

摘要:目的 研究人参多糖(GPS)对人红白血病细胞株(K562)表达人粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素(EPO)及其受体的影响。方法 采用细胞体外培养技术,RT-PCR 检测 GPS 诱导后 K562 细胞中 GM-CSF、EPO mRNA 的表达、免疫细胞化学方法检测 K562 细胞经 GPS 作用后 GM-CSF、EPO 及其受体蛋白表达的变化、Western blotting 检测 GPS 诱导后 K562 细胞 GM-CSF、EPO 受体蛋白的表达。结果 经 GPS 诱导后,RT-PCR 检测显示 K562 细胞 GM-CSF mRNA 的表达有所增强,但与对照组相比无统计学意义,EPO mRNA 的表达有明显的降低;免疫细胞化学方法检测 EPO 与 GM-CSF 蛋白的表达明显减弱,EPO 与 GM-CSF 受体蛋白的表达明显增强;Western blotting 检测 GM-CSF、EPO 受体蛋白的表达增强。结论 GPS 既能抑制 K562 细胞分泌 GM-CSF、EPO,又能明显促进 GM-CSF、EPO 受体的合成和分泌。

关键词:人参多糖; K562; 造血生长因子

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)10-1526-04

Effect of ginseng polysaccharide on expression of GM-CSF, EPO, and their receptors in K562 cells

CHEN Di-long, LI Jing, LIU Yong-gang, WANG Ya-ping, CHEN Ting-mei, ZHENG Min, JIANG Rong

(Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

收稿日期:2006-01-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670880);重庆市教委资助课题[渝教科(2001)12号]

作者简介:陈地龙(1971—),男,重庆万州人,博士,副研究员,研究方向为造血调控机制。

Tel: (023) 68485614 E-mail: chendilong@21cn.com

* 通讯作者 王亚平 Tel: (023) 68485968