

化、抗自由基、提高 iNOS mRNA 的表达和增加 NO 合成有关

参考文献:

- [1] 汪为群, 张 艳, 方志炼, 等. 金丝桃苷对心肌脂质过氧化的影响 [J]. 中国药理学通报, 1995, 11(2): 123-125.
- [2] 曹文军, 陈瑞芬, 刘国贞. 槲皮素对缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(3): 311-313.
- [3] 范一菲, 孔德虎, 陈志武, 等. 杜鹃花总黄酮对心肌缺血损伤的保护作用及其机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2006, 41

(2): 157-160.

- [4] 徐叔云, 卞如瀟, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [5] Li Q, Guo Y, Tan W, *et al.* Gene therapy with iNOS provides long-term protection against myocardial infarction without adverse functional consequences [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(2): 584-589.
- [6] Engelman D T, Watanabe M, Engelman R M, *et al.* Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 110(4 Pt 1): 1047-1053.

小檗碱对 HeLa 细胞凋亡及其凋亡相关蛋白表达的影响^①

来丽娜¹, 赵 娜², 郭春花¹, 张晓一¹, 范毅敏¹

(1. 长治医学院 药理教研室, 山西 长治 046000; 2. 天津医科大学总医院 外科研究所, 天津 300052)

摘 要: 目的 研究小檗碱对人宫颈癌 HeLa 细胞株增殖及凋亡的影响及其发生机制。方法 采用 MTT 法观察小檗碱对 HeLa 细胞增殖的影响, DNA ladder 流式细胞仪等方法进行细胞凋亡检测, 用 Western blotting 方法检测凋亡过程中相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的变化。结果 小檗碱在体外试验中能明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 在一定的时间、剂量范围内呈时间-剂量依赖关系。20-40 mg/L 小檗碱作用 48 h 后, 细胞 DNA 片段分析可看到凋亡时降解形成的梯带, 流式细胞仪检测到了细胞凋亡峰, 各组的凋亡率分别是 (16.7±2.8)%、(29.6±4.4)%、与对照组 (1.9±0.6)% 和 5 mg/L 小檗碱组 (2.3±0.8)% 相比差异显著 ($P < 0.01$)。在凋亡过程中, Bax 蛋白表达明显增高, 而 Bcl-2 蛋白表达下调。结论 小檗碱体外能抑制 HeLa 细胞增殖并诱导其发生凋亡, 其机制可能与 Bax 蛋白表达明显增高, 而 Bcl-2 蛋白表达下调有关。

关键词: 小檗碱; HeLa 细胞; Bcl-2 Bax

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)02-0244-04

Effect of berberine on apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 proteins in HeLa cells

LAI Li-na¹, ZHAO Na², GUO Chun-hua¹, ZHANG Xiao-yi¹, FAN Yi-min¹

(1. Department of Pharmacology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. Institute of Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective To investigate the effect of berberine on growth and apoptosis of human cervical cancer cell line HeLa and its possible mechanism. **Methods** The effect of berberine on growth of HeLa cells was studied by MTT assay. Apoptosis of HeLa cells exposed to berberine was observed by flow cytometry and DNA gel electrophoresis. The expression of Bax and Bcl-2 was studied by Western blotting analysis. **Results** Berberine markedly inhibited the proliferation of HeLa cells in a time- and dose-dependent manner. After incubation of HeLa cells with 20 and 40 mg/L berberine for 48 h, DNA Ladder can be observed. A typical “sub-G₁ peak” was checked by flow cytometry. There was a very low rate of natural apoptosis (1.9±0.6)%, while in 5 mg/L berberine group, the apoptosis rate was (2.3±0.8)%. After exposing HeLa cells for 48 h to 20 and 40 mg/L berberine, the apoptosis rate reached (16.7±2.8)% ($P < 0.01$) and (29.6±4.4)% ($P < 0.01$), respectively. Western blotting showed the expression of Bax protein increased in HeLa cells, at the same time, the expression of Bcl-2 decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** *In vitro* berberine could inhibit the proliferation of HeLa cells and induce the apoptosis by promoting Bax and inhibiting Bcl-2 expression in a dose-dependent manner.

Key words berberine; HeLa cell; Bcl-2 Bax

小檗碱是从毛茛科黄连属植物黄连、黄柏的根茎中提取的主要成分, 属异喹啉类生物碱, 也称黄连

① 收稿日期: 2007-06-25

作者简介: 来丽娜 (1974-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药药理学。
Tel (0355) 3151442 E-mail: lailina@126.com

素,用于抗肠道细菌感染已有悠久的历史,对其心血管系统等方面的作用近年也有了更多的认识,如对心律失常、心肌梗死、高血脂、糖尿病等症的应用或试用已趋广泛。近来的研究还表明,小檗碱具有一定的抗肿瘤作用,对多种肿瘤细胞有一定的抑制和杀伤作用^[1-4]。本实验以人宫颈癌 HeLa 细胞株为实验对象,观察小檗碱对其增殖的影响,并进一步探索其抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 材料:小檗碱购自 Sigma 公司,溶于 120 mmol/L 的 HEPES 调节液 (pH 7.4) 中,配制成 100 mg/L 的储备液,超滤除菌, - 20℃ 保存。使用前将小檗碱储备液用 RPMI-1640 培养基稀释,分别配制成质量浓度为 5 20 40 mg/L 的加药培养基。溴化四氮唑蓝 (MTT)、碘化丙啶 (PI) 均购自天津联星生物公司 (进口分装), Bcl-2 Bax 单克隆抗体购于北京中杉生物公司 (进口分装), 5-FU (天津金耀氨基酸有限公司,批号 0609032), HeLa 细胞株由本室保存,于含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置 37℃、5% CO₂ 孵育箱中进行培养。

1.2 MTT 法检测药物对 HeLa 细胞生长的抑制作用:将指数生长期细胞 1×10^7 /L 接种于 3 块 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,贴壁后换含不同质量浓度药物的 5% 无酚红 RPMI-1640 全培养液每孔 200 μ L,每组设 9 复孔,培养至预定时间 24 48 72 h,终止培养前 4 h 加 MTT (5 g/L, PBS) 每孔 20 μ L,弃上清液加入 DMSO 每孔 100 μ L,震荡混匀,于酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值。计算生长抑制率 (IR)

$$IR = (1 - \text{药物组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

1.3 细胞 DNA 片段分析:收集 2×10^6 细胞, 1 500 $\times$ g 离心 5 min,弃上清液。PBS 洗涤两次,具体步骤按基因组 DNA 提取试剂盒 (北京中杉生物公司) 操作说明书进行。取制备的 DNA 样品,

1. 5% 琼脂糖凝胶 70 V 电压,电泳约 2 h

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率:将 1×10^7 /L 指数生长期细胞接种于 50 mL 的培养瓶中,待细胞汇合约 70% 时换无血清的 RPMI-1640 培养液培养 18 h,使细胞同步化,再换含不同质量浓度药物的全培养液,对照组加入等量的药物溶剂,每组设 3 复瓶,继续培养 48 h,收集细胞,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤细胞 1 遍,用 0.5 mL PBS 悬浮细胞吹散使之成单细胞悬液,将其滴入 4 mL 95% 冷乙醇

中, 4℃ 固定 24 h, PBS 洗 1 遍,加入 PI (50 mg/L, 含 RNase 100 mg/L) 使细胞终浓度大于 1×10^6 /L,室温避光染色 20 min 上机检测 (Beckman Coulter EPICS-XL)。

1.5 Western blotting 检测 Bcl-2 Bax 蛋白的表达:分别收集用不同剂量药物处理 48 h 后的细胞,用冰预冷的 PBS 洗两次,用细胞裂解液 (50 mmol/L HEPES pH 7.4, 1% TritonX-100, 2 mmol/L 正钒酸钠, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 100 mg/L 抑肽酶 10 mg/L 亮抑酶肽 100 mg/L 胃蛋白酶抑制剂) 冰水浴中裂解 1 h, 16 000 $\times$ g 离心 5 min,收集上清液, Bio-Rad 法蛋白定量,调整蛋白浓度一致,制备 10% SDS-PAGE 分离胶,垂直电泳分离蛋白质后转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入 1:200 稀释的小鼠抗人 Bcl-2 Bax 单克隆抗体,以 β -actin 作为内参照,室温下持续摇动 2 h, TBST 洗 3 次,每次 20 min 按 1:4 000 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠二抗, 37℃ 温育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 20 min 加 ECL 发光剂,显影、定影,实验重复 3 次, Scan Maker 6 型扫描仪测定印迹区带的吸光度值并进行半定量分析。

1.6 统计方法:数据均采用 SPSS 10.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 对 HeLa 细胞增殖的影响:小檗碱对 HeLa 细胞增殖抑制作用有明显的剂量依赖和时间依赖关系,即抑制作用随药物质量浓度增高和作用时间延长而增强,见表 1

2.2 细胞 DNA 片段分析:20 40 mg/L 小檗碱作用于细胞 48 h 后,在琼脂糖电泳上出现明显的具有生化特征的梯状区带图谱 (DNA Ladder),而对照组和 5 mg/L 小檗碱组无此特征 (图 1)

2.3 对 HeLa 细胞凋亡率的影响:流式细胞仪检测不同质量浓度小檗碱作用 48 h 后对 HeLa 细胞凋亡的作用,结果发现随着药物质量浓度增加, HeLa 细胞凋亡率随之增加,见表 2

2.4 对 Bcl-2 Bax 蛋白表达的影响:小檗碱作用 48 h 后, Bcl-2 Bax 蛋白表达水平明显不同, Bcl-2 随药物质量浓度增加蛋白表达逐渐降低,相反 Bax 蛋白表达水平则随药物质量浓度的增加而逐渐增强,见图 2

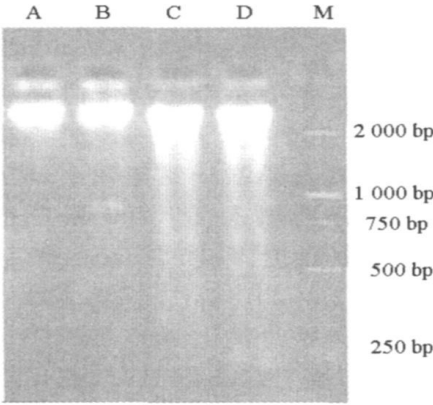
表 1 小檗碱对 HeLa细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Inhibition of berberine on proliferation of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组 别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	24 h		48 h		72 h	
		A	IR/%	A	IR/%	A	IR/%
对照	0	0.65 $\pm$ 0.024	—	0.81 $\pm$ 0.038	—	1.00 $\pm$ 0.065	—
小檗碱	5	0.68 $\pm$ 0.021	5.36	0.75 $\pm$ 0.045	8.13	0.88 $\pm$ 0.041 [*]	12.13
	20	0.56 $\pm$ 0.033 [*]	14.73	0.61 $\pm$ 0.054 [*]	24.34	0.69 $\pm$ 0.054 [*]	30.71
	40	0.48 $\pm$ 0.027 [*]	26.97	0.52 $\pm$ 0.037 [*]	35.49	0.54 $\pm$ 0.036 [*]	46.01
5-FU	5	0.55 $\pm$ 0.030 [*]	16.13	0.62 $\pm$ 0.026 [*]	23.65	0.70 $\pm$ 0.044 [*]	29.95
	10	0.47 $\pm$ 0.030 [*]	28.00	0.52 $\pm$ 0.031 [*]	36.15	0.59 $\pm$ 0.037 [*]	41.33

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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



M-DNA marker A-对照组 B- D-小檗碱 5 20 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组
M-DNA marker A-control group
B- D-berberine 5, 20, and 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group

图 1 HeLa细胞 DNA琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoregram of HeLa cells DNA

表 2 小檗碱对 HeLa细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of berberine on apoptosis of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

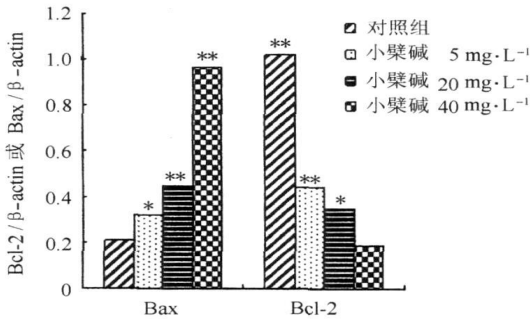
组 别	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率 /%
对照	—	1.9 $\pm$ 0.6
小檗碱	5	2.3 $\pm$ 0.8
	20	16.7 $\pm$ 2.8 [*]
	40	29.6 $\pm$ 4.4 [*]

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

有相当多的研究报道表明小檗碱在体内、外均具有抑制肿瘤细胞生长的作用。其作用机制至今未明。本实验观察到小檗碱对 HeLa细胞有明显增殖抑制作用,其抑制率在 5~ 40 mg / L 质量浓度、0~ 72 h 范围内有剂量依赖关系和时间依赖关系。流式细胞仪检测结果显示,经小檗碱处理的 HeLa细胞 DNA 直方图出现典型的亚二倍体峰,即凋亡峰,且随药物质量浓度增加,凋亡细胞数量增多。细胞 DNA 琼脂糖电泳出现明显的梯形条带,通过以上



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

图 2 小檗碱对 HeLa细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of berberine on protein expression of Bcl-2 and Bax in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

结果证实小檗碱具有抑制 HeLa 细胞生长和显著诱导 HeLa 细胞凋亡的作用。

研究无创性,无不良反应的天然植物抗肿瘤药物是当今国际医药界的重点方向。目前,临床应用的抗肿瘤药物多是通过诱导各自敏感的肿瘤细胞发生凋亡来达到治疗目的。因此,寻找或合成凋亡诱导率高的药物显得极为重要。分子生物学研究证实细胞凋亡受促凋亡基因和抑凋亡基因的协同调控。其中,中药对促凋亡基因 bax 和抑制凋亡基因 bcl-2 的调节作用受到了众多学者的关注。Bcl-2 和 Bax 分别是 bcl-2 和 bax 基因的蛋白质表达产物。Bcl-2 和 Bax 在细胞内是以同源二聚体或异源二聚体形式存在的。近年研究提示,bcl-2 与 bax 调节细胞凋亡,不仅取决于自身蛋白表达的高低,还与 Bax 与 Bcl-2 两蛋白之间的比值有关,当比值增大时,细胞趋向凋亡^[5]。本实验表明小檗碱处理后,Bcl-2 随药物质量浓度增加蛋白表达逐渐降低,相反 Bax 蛋白表达水平则随药物质量浓度的增加而逐渐增强,Bax 与 Bcl-2 的比值上调,从而促进 HeLa 细胞凋

亡。因此推测这可能是小檗碱诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制之一。

参考文献:

- [1] 林菁. 小檗碱对 K562 细胞生长的抑制作用 [J]. 福建医科大学学报, 1996, 30(4): 309-312.
- [2] 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.

- [3] Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, *et al.* Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 66(2): 227-233.
- [4] 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 等. 小檗碱对人胃癌 MGC-803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 40-43.
- [5] Li Y, Bhuiyan M, Mohammad R M, *et al.* Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA [J]. *Oncogene*, 1998, 17(22): 2915-2920.

化州柚提取物止咳作用及其机制的研究^①

李沛波, 苏畅, 毕福均, 王永刚, 彭维, 苏薇薇*

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 探讨化州柚提取物止咳作用及其机制的研究。方法 采用辣椒素致豚鼠咳嗽模型, 观察化州柚提取物对豚鼠咳嗽次数及气管内 C 纤维 P 物质释放的影响; 采用电刺激猫喉上神经引咳模型, 观察化州柚提取物对电刺激猫喉上神经引咳的电压阈值的影响; 采用机械刺激致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽模型, 观察化州柚提取物对机械刺激致豚鼠咳嗽的影响。结果 化州柚提取物能明显抑制辣椒素所致豚鼠咳嗽, 但对辣椒素诱导的气管内 C 纤维 P 物质的释放不产生明显影响; 对电刺激猫喉上神经引咳的电压阈值无显著影响; 对机械刺激致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽有显著抑制作用。结论 化州柚提取物具有明显止咳作用, 但不产生中枢性镇咳, 其止咳机制不是通过抑制气管内 C 纤维 P 物质释放, 但与快速适应性肺部牵张感受器 (RARs) 有关。

关键词: 化州柚; 止咳; 辣椒素

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)02-0247-04

化州柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck var. *to-mentosa* Hort. 又称化州仙橘, 系芸香科柑桔属植物, 为柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的栽培变种, 主产于广东化州, 是广东的地道药材。化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮经加工即为中药化橘红, 习称“毛橘红”, 具有化痰、理气、健胃、消食之功效, 用于治疗胸中痰滞, 咳嗽气喘, 呕吐呃逆, 饮食积滞等症。本课题组已有研究报道: 化州柚提取物能明显抑制氨水所致小鼠咳嗽和枸橼酸所致豚鼠咳嗽, 具有明显止咳作用^[1]; 化州柚提取物还具有明显的抗炎作用^[2]。本研究在原研究基础上进一步探讨其止咳作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂: 化州柚提取物 (由中山大学广州现代中药质量研究开发中心提供, 黄酮类成分占 70% 以上); 磷酸可待因, 青海制药厂, 批号 20051212; 氯醛糖, A Johnson Mathey Company 生

产; 辣椒素, 湖北襄西化工厂生产; P 物质测定试剂盒, Adlitteram Diagnostic laboratories. Inc; 硫酸阿托品注射液, 郑州羚锐制药有限公司, 规格 0.5 mg/mL, 批号 0506196; 氨茶碱注射液, 广州明兴制药有限公司, 规格 0.125 g/mL, 批号 050701; 莫吉司坦, 北京华奉联博科技有限公司, 质量分数 ≥ 99.0%, 批号 HF0501012; 乌拉糖, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 动物: 豚鼠, 体重 300~450 g, 由南方医科大学提供, 动物合格证号: 粤监证字 2007A005; 家猫, 体重 2.0~3.0 kg, 购于从化动物养殖场。

1.3 仪器: BE-420E 泰盟生理记录仪, 成都泰盟仪器厂生产; CC2170A 超声雾化器, 中外合资成都维信电子科大新技术有限公司产品; Wellsan MK3 酶标仪, Labsystems Dragon。

1.4 方法

1.4.1 对辣椒素所致豚鼠咳嗽的影响^[3]。取豚鼠

① 收稿日期: 2007-06-29

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A02-02)

作者简介: 李沛波 (1973-), 男, 湖南涟源人, 药理学博士, 讲师, 研究方向为心血管药理学和新药研发。

Tel: (020) 84110808 E-mail: lipb73@yahoo.com.cn

* 通讯作者 苏薇薇 Tel: (020) 84110808 E-mail: lssww@126.com