

氧化苦参碱对人结肠癌 SW620 细胞 p16/cyclinD1/CDK4 通路的影响

张绪慧¹, 郑堰心², 张丽², 邓虹珠², 梁磊^{3*}

1. 广东省第二人民医院 肿瘤二科, 广东 广州 510317

2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

3. 广州军区广州总医院 药剂科, 广东 广州 510010

摘要: 目的 观察氧化苦参碱诱导人结肠腺癌细胞株 SW620 凋亡的作用并探讨其可能机制。方法 采用 MTT 法检测氧化苦参碱对 SW620 细胞的增殖抑制作用; Hoechst33258 荧光染色检测氧化苦参碱对 SW620 细胞凋亡的影响; 流式细胞仪检测氧化苦参碱对 SW620 细胞周期的影响; 实时定量 PCR 法检测细胞内 p16、cyclinD1 及 CDK4 基因表达水平; 免疫印迹法检测细胞内 p16、CyclinD1 及 CDK4 蛋白表达水平。结果 氧化苦参碱抑制 SW620 细胞增殖作用呈剂量依赖性, 其作用 24 h 的 IC₅₀ 为 4.02 μmol/L; 与对照组相比, 苦参碱处理后的 SW620 细胞 G₁ 期比例明显增高, G₂ 期细胞比例下降 ($P < 0.05$); 氧化苦参碱作用后 SW620 细胞 p16 基因和蛋白水平升高 ($P < 0.05$), cyclinD1 及 CDK4 基因和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 氧化苦参碱在体外能抑制 SW620 细胞的增殖, 诱导细胞在 G₁ 期阻滞, 其诱导作用与其调控 p16、cyclinD1 及 CDK4 基因和蛋白表达有关。

关键词: 氧化苦参碱; 细胞周期; SW620 细胞; p16; cyclinD1; CDK4

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)15-2201-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.015

Effect of oxymatrine on p16/cyclinD1/CDK4 pathway in human colon adenocarcinoma SW620 cells

ZHANG Xu-hui¹, ZHENG Yan-xin², ZHANG Li², DENG Hong-zhu², LIANG Lei³

1. Department of Oncology, Guangdong No.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

3. Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To explore the antitumor effect of oxymatrine and detect the mechanism involved. **Methods** The Anti-proliferative effects of oxymatrine in human colon adenocarcinoma SW620 cells were assessed using MTT assay. SW620 cells treated with oxymatrine were assessed with Hoechst 33258 staining and cell cycle distribution assay was performed by flow cytometry. The quantitative real-time PCR assay was used to evaluate the expression of p16, cell cycle-related cyclinD1 and CDK4 mRNA at the genetic level. To investigate the molecular mechanisms underlying alterations in cell apoptosis, the proteins p16, cell cycle-related cyclinD1, and CDK4 were determined by Western blotting analysis. **Results** Oxymatrine could significantly inhibit the growth of SW620 cells compared with the control group, the IC₅₀ was 4.02 μmol/L. Its anticancer activity was related to the alteration in expression of p16, cyclinD1, and CDK4 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** These results suggest that oxymatrine produces the obvious antitumor effects on SW620 cells *in vitro*, induces the cell arrest in G₁ phase which is related to the regulation on the protein expression of p16, cyclinD1, and CDK4.

Key words: oxymatrine; cell cycle; SW620 cells; p16; cyclinD1; CDK4

肿瘤是危害人类的重大疾病之一, 近年来, 运用中药治疗肿瘤是目前国内外研究的热点^[1]。氧化苦参碱 (oxymatrine) 是苦参的有效成分, 属于四环喹诺里西啶类 (quinolizidine) 生物碱^[2], 药理

和临床研究发现, 氧化苦参碱具有抗炎、抗病毒、抗纤维化、免疫调节等多种药理作用^[3], 并且其抗肿瘤的作用越来越得到重视^[4]。本研究针对氧化苦参碱对人结肠癌细胞株 SW620 增殖、细胞周期及

收稿日期: 2013-11-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81001701); 广东省中医药局建设中医药强省科研项目 (20131106)

作者简介: 张绪慧, 男, 博士研究生, 研究方向为肿瘤放化疗临床与基础研究。Tel: 13527896335 E-mail: alps0210@163.com

*通信作者 梁磊 (1978—), 女, 博士, 主管药师, 研究方向为中药药理与临床药学。

Tel: (020)36652218 E-mail: 414909084@qq.com, libraliang78@126.com

p16/cyclinD1/CDK4 通路调节方面的影响, 探讨其对大肠癌可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人结肠腺癌细胞株 SW620 为南方医科大学中药学院药理实验室所存。氧化苦参碱(质量分数 $\geq 98\%$)由宁夏盐池县医药公司提供, 批号 080630; 5-氟尿嘧啶(5-Fu)注射液由上海旭东海普药业生产, 批号 100108。新生胎牛血清购自杭州四季青公司; 0.25% Trypsin、RPMI 1640 培养基购于吉诺公司; 噻唑蓝(MTT)购于 Sigma 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购于 AITresco 公司。细胞周期检测试剂盒购于碧云天公司; 兔抗 p16、cyclinD1、CDK4 及 β -actin 一抗与兔二抗均购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

SW620 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养, 待细胞生长到 80%~90%, 弃除培养液, PBS 轻轻洗涤细胞 2、3 次, 用 0.25%胰酶消化 3~5 min, 终止消化后, RPMI 1640 培养液重悬细胞, 并按 1:3 的比例进行传代, 分别接种至表面积为 25 cm² 的培养瓶中, 移入 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养^[5]。

1.3 MTT 法检测 SW620 细胞增殖

调整细胞悬液浓度至 2×10^5 /mL, 取 100 μ L 的细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 37 °C、5%CO₂ 培养箱孵育, 培养至细胞贴壁单层铺满孔底。对照组加入同样量的培养液 200 μ L, 阳性对照组加入终质量浓度为 4 mg/L 的 5-Fu, 氧化苦参碱设 1、2、4、8、16、32 μ mol/L 6 个浓度, 每组设 3 个重复孔, 药物分别作用 24、48、72 h 后, 每孔加 20 μ L (5 mg/mL) MTT, 培养 4 h 后, 弃去培养基, 加 150 mL 的 DMSO 溶液, 轻轻振荡约 10 min 后, 酶标仪 490 nm 测吸光度(A)值, 计算细胞增殖率。

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

1.4 Hoechst33258 光镜观察 SW620 细胞核形态

对数生长期的细胞消化成单细胞悬液, 以 5×10^5 /mL 浓度接种于装有消毒玻片的培养皿中, 培养 24 h 后, 更换培养基。实验组加入氧化苦参碱 2、4、8 μ mol/L, 另设对照组。作用 24 h 后收集细胞爬片, 固定后 Hoechst33258 染色, 荧光显微镜下观察细胞核形态。

1.5 流式细胞仪分析 SW620 细胞周期

细胞处理、分组同“1.4”项。收集培养 24 h

的所有细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗 2 次, 1 200 r/min 离心 5 min, 吸尽上清液, 加入 70%乙醇(4 °C 预冷)固定, 碘化丙啶(PI)染色 30 min。进行流式细胞仪分析, 并用 MUTCYCLE 软件分析细胞周期分布情况。

1.6 荧光实时定量 PCR 检测基因水平

细胞处理分组同“1.4”项。RNA 提取与纯化: 在细胞沉淀中加入 Trizol 试剂 1 mL, 充分振荡混匀, 室温放置 5 min, 加入氯仿 0.2 mL, 盖紧盖子, 用振荡器振荡 15 s, 室温孵育 2~3 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至新的 1.5 mL Eppendorf 管中。加与上清液等体积的异丙醇, 轻轻混匀, -20 °C 孵育样品 20~30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 75%乙醇(含 DEPC 水) 800 μ L 洗涤沉淀 1 次, 4 °C、7 500 r/min 离心 5 min, 弃乙醇。空气或真空干燥 5~10 min (不要完全干燥), 加 DEPC 处理水 20~50 μ L 溶解 RNA, -80 °C 保存备用。若长期保存, 加入 2.5 倍体积乙醇, 置 -80 °C 保存。逆转录反应: 取 4 μ L RNA 模板进行逆转录反应, 仪器为 BIO-RAD 定性 PCR 仪(美国), 反应体系按逆转录试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 反应条件: 93 °C、2 min, 93 °C、15 s, 55 °C、25 s, 72 °C、25 s, 共 40 个循环。PCR 引物由上海英俊公司设计合成, 具体序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 反应引物序列

Table 1 Primer sequence of quantitation RT-PCR by fluorescent

基因	序列
p16	正向 5'-ACCAGAGGCAGTAACCATGC-3'
	反向 5'-CCTGTAGGACCTTCGGTGAC-3'
CDK4	正向 5'-CCCGAAGTTCTTCTGCAGTC-3'
	反向 5'-CTGGTCGGCTTCAGAGTTTC-3'
cyclinD1	正向 5'-ACCTGAGGAGCCCCAACAAC-3'
	反向 5'-GCTTCGATCTGCTCCTGGC-3'
β -actin	正向 5'-GCATGGGTGTCAGAAGGATTCCT-3'
	反向 5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'

1.7 免疫印迹法检测 p16、CyclinD1 及 CDK4 蛋白的表达

细胞处理分组同“1.4”项。细胞以 5×10^9 /L 接种至 6 孔板, 按照实验分组进行相应处理后, 提取细胞总蛋白, 以双辛丁酸(BCA)法进行蛋白定量检测。按每个样品 25 μ L 上样后进行电泳分离蛋白质。电泳结束后, 采用半干转法将蛋白质转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,

将一抗与膜 4 ℃ 孵育过夜 (抗 p16、CyclinD1 及 CDK4, 体积分数为 1 : 1 000), 二抗以 1 : 10 000 室温孵育 2~3 h, 化学发光法显色成像, 分析条带灰度值, 检测 p16、CyclinD1、CDK4 蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件包进行, 多组比较采用 One-way ANOVA 分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 对 SW620 细胞增殖的影响

不同浓度的氧化苦参碱作用于 SW620 细胞不同时间后对细胞增殖的影响结果见表 2。结果表明氧化

苦参碱能显著抑制 SW620 细胞的增殖, 与对照组比较, 给药组细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$), 并有明显的剂量效应关系, 其作用 24 h 的 IC_{50} 值为 4.02 $\mu\text{mol/L}$ 。与 5-Fu 组比较, 氧化苦参碱在浓度为 8~32 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 SW620 增殖抑制率显著提高 ($P < 0.05$)。

2.2 氧化苦参碱作用后 SW620 细胞形态的改变

氧化苦参碱作用 SW620 细胞 24 h 后, 细胞经 Hoechst33258 染色, 荧光显微镜下观察可见 SW620 细胞核形态出现了明显的改变, 见图 1, 与对照组比较, 药物处理后, 细胞皱缩, 染色质浓缩边集, 形成新月形细胞核。对照组无明显凋亡细胞。随着氧化苦参碱作用浓度增加, 细胞核皱缩更明显。

表 2 氧化苦参碱对 SW620 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of oxymatrine on proliferation of SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖率 / %		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.0	100.0	100.0
5-Fu	4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	47.3 $\pm$ 0.9*	41.2 $\pm$ 1.5*	33.3 $\pm$ 1.9*
氧化苦参碱	1	92.7 $\pm$ 0.7	82.1 $\pm$ 0.8*	70.4 $\pm$ 0.8*
	2	84.4 $\pm$ 0.7*	69.4 $\pm$ 1.7*	62.4 $\pm$ 0.8*
	4	64.6 $\pm$ 0.9*	52.2 $\pm$ 0.8*	47.4 $\pm$ 0.7*
	8	40.3 $\pm$ 1.0*#	32.2 $\pm$ 1.0*#	22.1 $\pm$ 2.0*#
	16	31.3 $\pm$ 0.9*#	19.6 $\pm$ 0.5*#	15.7 $\pm$ 2.4*#
	32	25.5 $\pm$ 1.9*#	14.6 $\pm$ 0.8*#	7.5 $\pm$ 0.8*#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5-Fu 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 5-Fu group

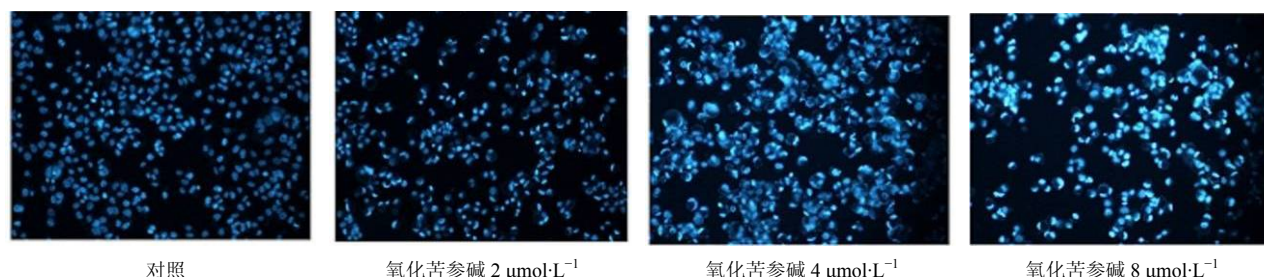


图 1 氧化苦参碱对 SW620 细胞形态的影响 (Hoechst33258 染色)

Fig. 1 Effect of oxymatrine on morphology of SW620 cells (Hoechst33258 staining)

2.3 对 SW620 细胞周期的影响

氧化苦参碱 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 作用 SW620 细胞 24 h 后, 与对照组比较, 细胞在 G_1 期的比例明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01), S 期的比例显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 3。

2.4 对 SW620 中 p16、cyclinD1、CDK4 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, p16 (INK4A) 基因在氧化苦参碱组中表达明显升高, 与对照组比较差异显著

($P < 0.01$), 氧化苦参碱 8 $\mu\text{mol/L}$ 组 p16 mRNA 表达水平最高; 氧化苦参碱组 cyclinD1 和 CDK4 mRNA 的表达均下降, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 氧化苦参碱 8 $\mu\text{mol/L}$ 组 cyclinD1 和 CDK4 mRNA 水平与对照组比较下降最为显著 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.5 对 SW620 细胞 p16、CyclinD1、CDK4 蛋白表达的影响

免疫印迹法结果 (图 3 和表 4) 显示, 与对照

表3 苦参碱对 SW620 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of oxymatrine on cell cycle of SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G ₁ 期 / %	S 期 / %	G ₂ 期 / %
对照	—	44.52 ± 2.90	46.73 ± 1.68	8.74 ± 1.91
氧化苦参碱	2	64.81 ± 1.21*	33.16 ± 0.98*	2.03 ± 0.23
	4	73.43 ± 1.33**	25.71 ± 1.43**	0.86 ± 0.59
	8	83.98 ± 3.20**	15.39 ± 2.94**	0.63 ± 0.30

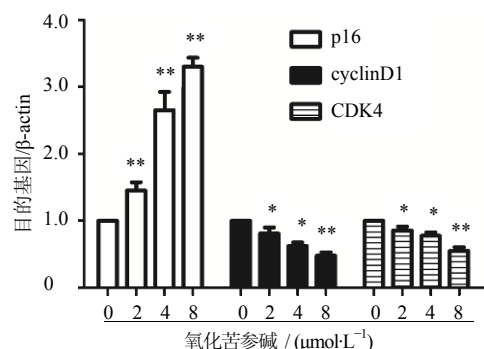
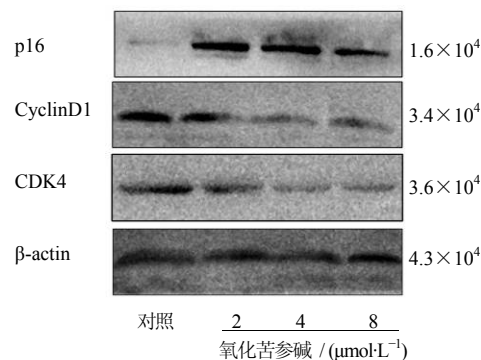
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below图2 氧化苦参碱对 SW620 细胞 p16、cyclinD1、CDK4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effect of oxymatrine on mRNA expression of p16, cyclinD1, and CDK4 in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图3 氧化苦参碱对 SW620 细胞 p16、CyclinD1、CDK4 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of oxymatrine on protein expression of p16, cyclinD1, and CDK4 in SW620 cells

表4 各组细胞内 p16、CyclinD1 及 CDK4 蛋白表达相对量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Relative quantity of protein expression of p16, cyclinD1, and CDK4 in SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	p16/β-actin	CyclinD1/β-actin	CDK4/β-actin
对照	—	0.063 ± 0.000	1.652 ± 0.159	1.650 ± 0.120
氧化苦参碱	2	1.014 ± 0.007*	0.558 ± 0.005*	1.260 ± 0.053*
	4	0.616 ± 0.013*	0.096 ± 0.002**	0.131 ± 0.051**
	8	0.314 ± 0.014**	0.120 ± 0.017*	0.191 ± 0.025*

组比较,氧化苦参碱可明显提高 SW620 细胞内 p16 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01),氧化苦参碱 8 $\mu\text{mol/L}$ 组 p16 蛋白表达水平最高 ($P < 0.01$);与对照组比较,氧化苦参碱组 CyclinD1 和 CDK4 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$ 、0.01),氧化苦参碱 4 $\mu\text{mol/L}$ 组 CyclinD1 和 CDK4 蛋白水平下降最为显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

大肠癌是全球发病率居第 3 位的常见肿瘤,近年来其发病率呈逐年上升趋势^[2]。针对大肠癌的化疗方案主要是以 5-Fu 为主的综合化疗,但存在毒副作用大等缺陷。中药以其独特的抗肿瘤疗效、不良反应少等特点,已成为抗肿瘤研究的热点之一^[6]。氧化苦参碱对 SW620 结肠癌细胞具有明显的诱导

凋亡作用,是很有潜力的抗癌药物。体外实验表明氧化苦参碱对多种肿瘤细胞有抑制或杀伤作用,并能诱导细胞分化和凋亡^[2,4]。本研究发现不同浓度氧化苦参碱(1~32 $\mu\text{mol/L}$)对结肠癌细胞 SW620 有不同程度的增殖抑制作用,并有一定的剂量效应关系。通过细胞形态学的观察,氧化苦参碱作用 SW620 细胞 24 h 后,可见细胞核固缩、核碎裂、细胞膜起泡等形态。

近年来的研究认为,肿瘤是一类细胞周期性疾病。细胞周期的调节因子中就包括多种癌基因和抑癌基因。在细胞增殖周期中,最主要的调控点是 G₁ 期与 S 期之间的调控点^[5]。G₁ 期与 S 期调控点受控于细胞周期蛋白(cyclins)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)对细胞周期蛋白依赖性激

酶 (CDKs) 的正负调节作用, 即正常细胞从 G_1 期向 S 期的调控需要 cyclinD1 的正调控和 p16 的负调控来完成^[7-8]。p16 蛋白主要通过 CDK 竞争性结合 cyclinD, 而阻碍其与 Cyclin D 形成复合物, cyclin D/CDK 激酶失活, 从而阻止细胞从 G_1 期进入 S 期, 细胞增殖受抑制^[9-10]。本实验研究表明: 流式细胞仪检测发现氧化苦参碱作用 SW620 细胞 24 h 后, 在 2~8 mmol/L 内, 细胞的 G_1 期比例逐渐升高, S 期比例明显下降, 存在 G_1 /S 阻滞^[11]。通过以上研究结果推测氧化苦参碱主要是通过阻滞 SW620 细胞 G_1 期向 S 期的进程, 形成 G_1 期阻滞, 造成 G_1 期细胞堆积阻滞并阻断细胞的 DNA 合成和复制, 从而影响细胞周期进程, 起到抑制肿瘤细胞增殖的作用。RT-PCR 及免疫印迹法研究表明, 与对照组比较, cyclinD1、CDK4 蛋白及 mRNA 表达均下降。p16 蛋白和 mRNA 表达明显增强。说明氧化苦参碱通过调控了 G_1 期这些细胞周期正负调节因子表达发挥作用, 最终抑制细胞周期进展, 而导致肿瘤细胞凋亡。综上所述, 氧化苦参碱诱导的 SW620 细胞凋亡, 可能是通过使细胞阻滞 G_1 期无法完成修复而发挥抗肿瘤作用, 其分子机制可能与抑制 p16/cyclinD1/CDK4 通路有关。

参考文献

- [1] 周逢仓, 金 明. 肿瘤的分子诊断及其研究进展 [J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2003, 2(1): 54-56.
- [2] 申晓东, 宋关斌, 严润彬, 等. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2005, 28(6): 125-128.
- [3] 张鸣号, 王秀玉, 何沿虹, 等. 氧化苦参碱对感染性休克大鼠心肌组织细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2242-2246.
- [4] 朱晓伟, 宝金荣, 布 仁. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 化学试剂, 2010, 32(1): 32-36.
- [5] Tajitsu Y, Ikeda R, Nishizawa Y, *et al.* Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(3): 703-708.
- [6] Liang L, Wang X Y, Zhang X H, *et al.* Sophoridine exerts an anti-colorectal carcinoma effect through apoptosis induction *in vitro* and *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2012, 91(25/26): 1295-1303.
- [7] Soto M J, Cabrera M C, Serrano O S, *et al.* Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15 [J]. *Clin Transl Oncol*, 2005, 7(4): 156-164.
- [8] Kang Y K, Kim W H, Jang J J. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(9): 877-883.
- [9] Wang X Y, Wang Y G, Wang Y F. Ginsenoside Rb₁, Rg₁ and three extracts of traditional Chinese medicine attenuate ultraviolet B-induced G1 growth arrest in HaCaT cells and dermal fibroblasts involve down-regulating the expression of p16, p21 and p53 [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2011, 27(4): 203-212.
- [10] Nakamura S, Nishioka K. Enhanced expression of p16 in seborrheic keratosis; a lesion of accumulated senescent epidermal cells in G1 arrest [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 149(3): 560-565.
- [11] 何劲松, 赖焕辉, 姜立华, 等. p16、CyclinD1、Cdk4、Rb 基因在胰腺癌中的表达及其意义 [J]. 癌症, 1999, 18(4): 418-421.