

龙葵碱对 U251 细胞增殖及凋亡的影响

郭玲, 盛华均, 刘茜, 杨清华, 朱淑娟*

重庆医科大学, 重庆 400016

摘要:目的 探讨龙葵碱对人胶质瘤 U251 细胞增殖及凋亡的影响。方法 使用不同质量浓度的龙葵碱处理 U251 细胞, 采用 CCK-8 法、划痕法、Transwell 法、Hochest 法、流式细胞术、免疫印迹法分别检测细胞增殖率、细胞迁移与侵袭、细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达。结果 龙葵碱对 U251 细胞的 48 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $20.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 其质量浓度在 $5 \sim 35 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 能够抑制细胞增殖 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 龙葵碱组抑制细胞迁移和侵袭的能力随药物质量浓度增高而增强 ($P < 0.05$), 同时细胞也出现明显凋亡特征, 并均呈浓度依赖性; 免疫印迹法显示龙葵碱可使凋亡相关蛋白 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低, Bcl-2/Bax 值降低。结论 龙葵碱在有效剂量 ($5 \sim 35 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 对 U251 细胞增殖生长具有抑制作用, 并呈浓度依赖性; 龙葵碱可抑制 U251 细胞的侵袭与迁移, 可以影响凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达, 使 Bcl-2/Bax 值降低, 从而抑制 U251 细胞的增殖生长。

关键词: 龙葵碱; 人胶质瘤细胞 U251; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)10-2081-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.024

Effect of solanine on proliferation and apoptosis of U251 cells

GUO Ling, SHENG Hua-jun, LIU Qian, YANG Qing-hua, ZHU Shu-juan

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of solanine on growth and proliferation of U251 cells. **Methods** U251 cells were cultured with different concentration of solanine together. CCK-8 method, wound healing assay, Transwell method, Hochest assay, flow cytometry screening and Western blotting were used to detect inhibitory rate, migration and invasive rates, apoptosis rate and expression level of cell apoptosis-related proteins. **Results** CCK-8 assay showed the median inhibition concentration (IC_{50}) of 48 h was $20.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. It was effective that solanine in the concentration range of $5 \sim 35 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ could inhibit the growth and proliferation of U251 cells, and played a role in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with control group, experimental groups can not only inhibit U251 cell migration and invasion in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), but also appear some significant apoptosis characteristics with a concentration dependence. Western blotting assayed that the expression of Bax protein was upregulated, whereas Bcl-2 protein expression was downregulated in experimental groups compared with control group and these changes were dose-dependent. **Conclusion** Solanine can inhibit growth and proliferation of U251 cells in effective concentration and in a dose-dependent manner. Solanine can inhibit the invasion and migration of U251 cells. Solanine can induce the apoptosis of U251 cells, and inhibit the proliferation and growth of U251 cells via regulating the expression of Bax and Bcl-2 proteins and affecting Bcl-2/Bax ratio.

Key words: solanine; U251 cells; proliferation; apoptosis; migration; invasion

神经胶质瘤起源于神经外胚层, 多数呈浸润性生长^[1]。因高恶性胶质瘤的高致死率和术后高复发率, 目前临床上治疗效果仍然不佳, 为此积极寻找新的治疗手段迫在眉睫^[2]。

临床研究表明, 中药治疗不仅能减轻患者术后放化疗引起的副作用, 还具有潜在的延长患者生存时间和提高患者生存质量的作用。资料显示茄科植物及其提取成分对正常细胞毒性较低, 抗肿瘤作用

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81502161); 重庆市科委基础与前沿项目(cstc2014jcyjA10028); 重庆医科大学基础医学院项目(2013-5)

作者简介: 郭玲(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分对肿瘤的基础研究。Tel: 18983144135 E-mail: linlingguo92@163.com

***通信作者** 朱淑娟(1975—), 女, 硕士研究生导师, 副教授, 研究方向为中药有效成分对肿瘤的基础研究。

Tel: 15823367965 E-mail: zhushujuan75@126.com

的范围广^[3]。龙葵碱(solanine)主要存在于茄科植物马铃薯的块茎及龙葵的全草中^[4]。近年有研究发现,龙葵碱可从细胞膜特性、细胞凋亡、肿瘤血管生成等方面抑制肝癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等多种肿瘤生长^[5-8],但未见报道其是否可以抑制胶质瘤增殖生长。为了探索龙葵碱是否具有广谱抗肿瘤药效,本实验以体外人胶质瘤 U251 细胞为研究对象,观察龙葵碱对 U251 细胞的增殖及凋亡的作用,为龙葵碱临床用于治疗肿瘤提供数据。

1 材料

1.1 细胞

人胶质瘤 U251 细胞由复旦 IBS 细胞资源中心提供。

1.2 药品与试剂

龙葵碱(质量分数>95%,批号 CY150720)购于杨凌慈缘生物技术有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)稀释至质量浓度为 1 mg/mL,0.22 μm 超滤除菌,-20 ℃储存,使用时用 DMEM 培养基稀释。DMEM 培养基、青链霉素、L-谷氨酰胺(HyClone 公司);Foundation 胎牛血清(博全生物科技有限公司);Cell Counting Kit-8(日本同仁化学研究所);Transwell 小室(Coster 公司);细胞 pH 指示荧光探针 Bcecfam、Hoechst33258(上海碧云天科技有限公司)。

1.3 仪器

细胞超净工作台、细胞培养箱(美国 Thermo 公司);全自动酶标仪 3550 型、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 伯乐公司);倒置显微镜(上海微图仪器科技发展有限公司);电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

U251 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,置入 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,2~3 d 传代 1 次,实验时取对数生长期的细胞。

2.2 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长期的 U251 细胞,将细胞调整为 5×10^5 个/孔(100 μL),接种于 96 孔板中,设空白组(加入等体积细胞培养液)、对照组(不用药物处理)和实验组(加入 2.5~35.0 μg/μL 龙葵碱),每组 5 个复孔,分别培养 48 h,每孔加入 10 μL CCK-8,继续孵育 2 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值,实验重复 3 次,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 划痕法检测细胞迁移

用标记笔在 12 孔板背面横轴划线,再制备细胞

悬液,调整细胞数为 1.0×10^5 个/mL,贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱(10、20、30 μg/μL),同时设置对照组(未加龙葵碱),用 200 μL 的移液器枪头在每孔纵轴划痕。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,改用无血清培养液培养,置入 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,并于 0 h 和 48 h,观察并拍照(×40)。实验重复 3 次。

2.4 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭

2.4.1 细胞迁移 制备细胞悬液,调整细胞数为 2.0×10^5 个/mL,贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱(10、20、30 μg/μL)作用 48 h,同时设置对照组(未加龙葵碱),加入 200 μL 于 Transwell 小室上层,下层加入 600 μL 含有 10%胎牛血清的培养基,37 ℃孵育 24 h,4%多聚甲醛室温固定 30 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 次后用 1%结晶紫避光染色 30 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 次后于显微镜下观察计数。

2.4.2 细胞侵袭 用无血清的预冷培养基 DMEM 稀释 Matrixgel 基质胶至终质量浓度为 2 mg/mL,在小室上层加入 80 μL 稀释后的基质胶,于 37 ℃孵育过夜;制备细胞悬浮液,调整细胞数为 3.0×10^5 个/mL,贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱(10、20、30 μg/μL)作用 48 h,同时设置对照组(未加龙葵碱),加入 Transwell 小室上层 200 μL,下层加入 600 μL 含有 10%胎牛血清的培养基,37 ℃孵育 24 h,4%多聚甲醛固定 30 min,1%结晶紫避光染色 30 min 后于显微镜(×100)下观察计数。实验重复 3 次。

2.5 Hoechst 法检测细胞凋亡

制备细胞悬浮液,调整细胞数为 1×10^5 个/mL,加入 12 孔板内,每孔 1 mL。贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱(10、20、30 μg/μL)作用 48 h,同时设置对照组(未加龙葵碱),药物处理 48 h 后取出 12 孔板,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min,4%多聚甲醛室温固定 15 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;每孔加入 Hoechst 33258 工作液 250 μL,室温染色 5 min;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,漂洗时轻轻摇动孔板;甘油与 PBS 比例为 1:9 的混合液封片,荧光显微镜观察。实验重复 3 次。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

制备细胞悬浮液,调整细胞数为 5×10^4 个/mL,加入 T25 培养瓶,每瓶 3 mL。贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱(10、20、30 μg/μL),同时设置对照组(未加龙葵碱),将药物诱导 48 h 后的 U251 细胞弃去培养液,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5

min, 0.25%胰蛋白酶消化后收集至 10 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液; 用 0.01 mol/L PBS 1 000 μ L 重悬细胞并转移至 1.5 mL 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 随后加入 200 μ L 0.01 mol/L PBS 重悬细胞并当日送检, 实验重复 3 次。

2.7 Western blotting 检测细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

制备细胞悬浮液, 调整细胞数为 1×10^5 个/mL, 加入 T25 培养瓶, 每瓶 3 mL。贴壁后加入不同质量浓度的龙葵碱 (10、20、30 μ g/ μ L), 同时设置对照组 (未加龙葵碱) 将药物处理 48 h 后的 U251 细胞弃去培养液, 收集细胞。收集好后加入裂解缓冲液于冰上裂解 10 min。4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测定蛋白浓度并配平至浓度一致的样品, 上样量 50 μ g, 电泳后转膜至 0.2 μ m PVDF 膜。封闭液封闭 2 h, 孵育一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 一抗浓度分别为 Bax (1:500)、Bcl-2 (1:500)、 β -actin (1:1 000)。洗膜后加 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1:10 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 0.01 mol/L TBST 洗膜后用 ECL 显影。Image Lab 5.2 软件测定条带灰度值并计算蛋白相对表达量。

2.8 数据分析

数据均采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用 Students'*t* 检验, 正态性及方差采用齐性检验, 多组均数相互比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 龙葵碱对细胞增殖的影响

龙葵碱处理细胞 48 h 后, CCK-8 法检测细胞增

殖抑制率, 进而求得龙葵碱作用 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 20.05 μ g/ μ L; 当其质量浓度在 5.0~35.0 μ g/ μ L, 与对照组相比, 龙葵碱明显抑制细胞增殖, 且随着质量浓度的增加, 抑制率逐渐上升 ($P < 0.001$), 且呈质量浓度依赖性; 当治疗浓度低于或等于 2.5 μ g/ μ L 时无统计学意义 (表 1)。因此后续采用 10、20、30 μ g/ μ L 的龙葵碱进行实验。

表 1 龙葵碱对 U251 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of solanine on proliferation of U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	增殖抑制率/%
对照	0	—
龙葵碱	2.5	0.57 ± 0.43
	5.0	$1.21 \pm 0.25^{***}$
	10.0	$17.90 \pm 0.18^{***}$
	15.0	$29.35 \pm 3.20^{***}$
	20.0	$50.39 \pm 0.16^{***}$
	25.0	$78.30 \pm 0.17^{***}$
	30.0	$88.06 \pm 0.17^{***}$
	35.0	$93.44 \pm 0.21^{***}$

与对照组比较: $^{***}P < 0.001$

$^{***}P < 0.001$ vs control group

3.2 龙葵碱对细胞迁移和侵袭的影响

划痕实验结果 (图 1) 显示, 与对照组相比, 不同质量浓度龙葵碱作用 U251 细胞 48 h 后, 细胞迁移能力明显减弱, 且随着药物质量浓度的升高抑制能力增强。提示龙葵碱抑制细胞迁移呈浓度依赖性。

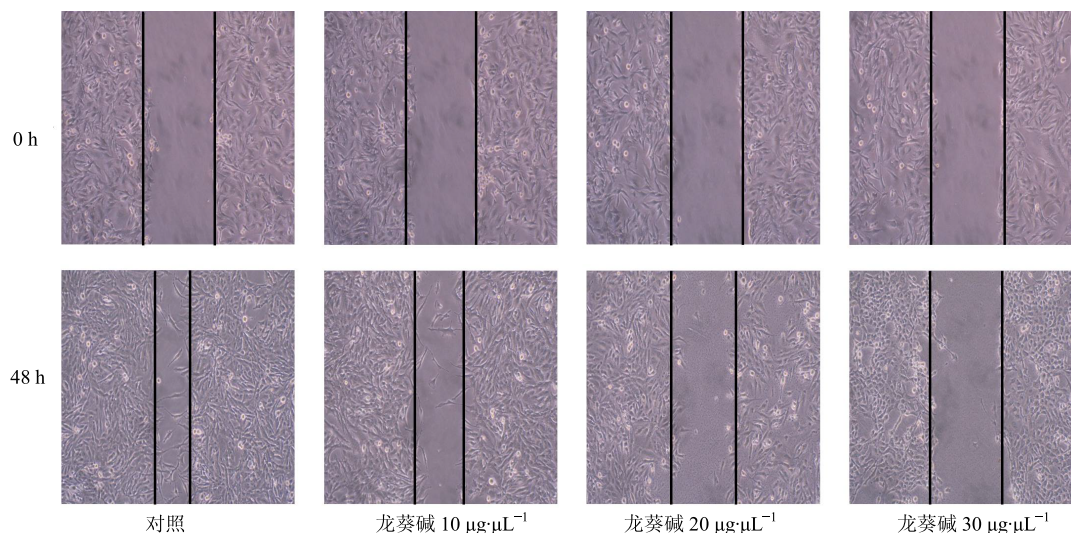


图 1 龙葵碱对 U251 细胞迁移的影响 ($\times 40$, 划痕实验)

Fig. 1 Effect of solanine on migration of U251 cells ($\times 40$, wound healing assay)

Transwell 法检测结果显示, 龙葵碱组迁移细胞数量明显少于对照组, 且迁移细胞数随着龙葵碱质量浓度的增加而逐渐减少 ($P<0.01$ 、 0.001) (图 2、表 2)。与对照组相比, 龙葵碱组侵袭细胞数量明显减少, 且侵袭细胞数亦随着龙葵碱质量浓度的增加而逐渐减少 ($P<0.05$ 、 0.01) (图 3、表 2)。结果提示龙葵碱抑制细胞迁移和侵袭作用呈浓度依赖性。

3.3 龙葵碱对细胞凋亡的影响

Hochest 法染色后观察, 结果可见对照组细胞呈现均匀、淡蓝色的荧光, 未见凋亡细胞, 而不同质量浓度龙葵碱处理过的细胞均出现核染色质固缩、聚集、核碎裂、凋亡小体及发出蓝白色荧光等典型凋亡现象, 且随着龙葵碱质量浓度的增加, 凋亡现象越明显 (图 4)。

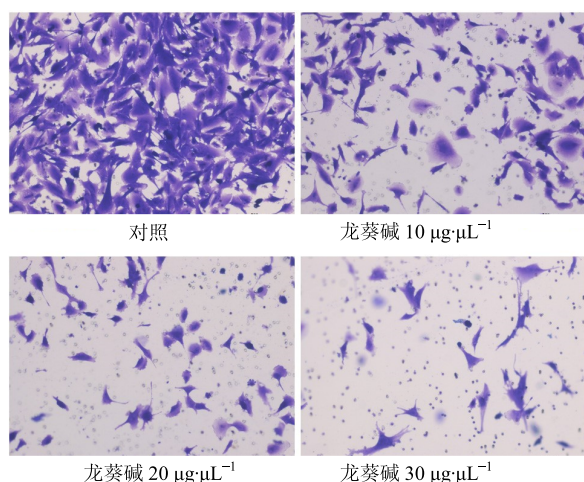


图 2 龙葵碱对 U251 细胞迁移的影响 (Transwell 法)

Fig. 2 Effect of solanine on migration of U251 cells (Transwell method)

表 2 龙葵碱对 U251 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, Transwell 法)

Table 2 Effect of solanine on migration and invasion of U251 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, Transwell method)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1})$	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
对照	0	191.33 ± 18.50	223.67 ± 25.58
龙葵碱	10	$90.33 \pm 16.80^{**}$	$156.33 \pm 20.84^{*}$
	20	$54.67 \pm 10.70^{***\#}$	$103.33 \pm 15.31^{***\#}$
	30	$20.33 \pm 6.11^{***\#\#\Delta\Delta}$	$68.00 \pm 8.39^{***\#\#\Delta}$

与对照组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$; 与龙葵碱 $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与龙葵碱 $20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ solanine group; $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs $20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ solanine group

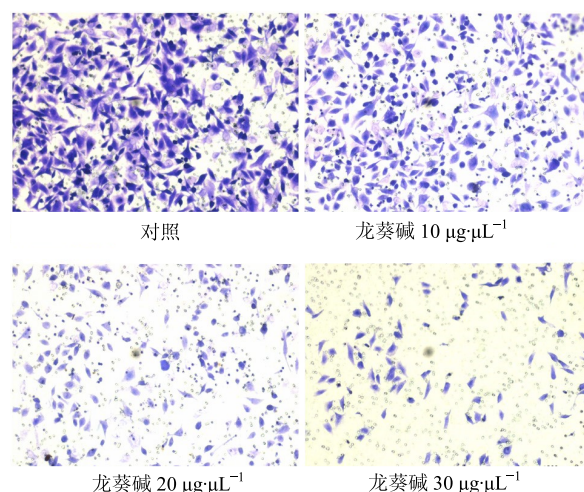
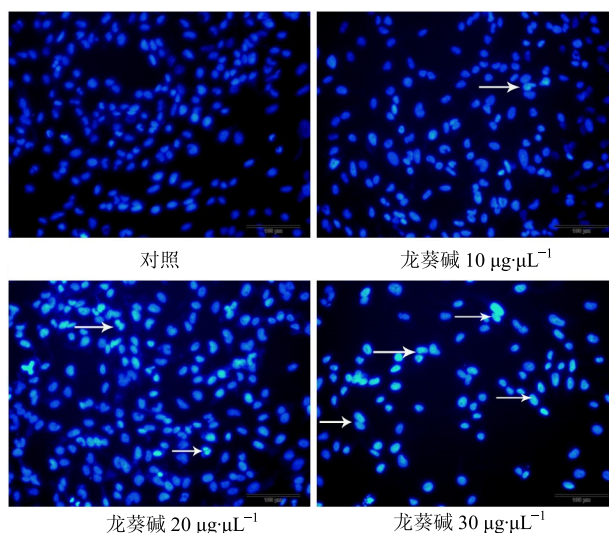


图 3 龙葵碱对 U251 细胞侵袭的影响

Fig. 3 Inhibition of invasion of U251 cells by solanine treatment



箭头所示核染色质固缩, 凋亡小体形成

Arrows show chromatin condensation in nuclear and apoptotic bodies form chromatin

图 4 龙葵碱对 U251 细胞凋亡的影响 ($\times 100$, Hochest 染色)

Fig. 4 Effect of solanine on apoptosis of U251 cells ($\times 100$, Hochest straining)

龙葵碱 (10 、 20 、 $30 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 处理细胞 48 h 后, 收集细胞并送检流式, 结果显示龙葵碱组凋亡细胞数明显多于对照组 ($P<0.001$), 且随着龙葵碱质量浓度的升高, 凋亡率逐渐上升 (图 5, 表 3), 提示龙葵碱呈浓度依赖性地诱导 U251 细胞凋亡。

3.4 龙葵碱对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组相比, 龙葵碱组细胞 Bax 蛋白水平表达上调, Bcl-2 蛋白表达下调, Bcl-2/Bax 值降低 ($P<0.001$), 且龙葵碱质量浓度越高, Bcl-2/Bax 值降低越明显 (图 6, 表 4)。

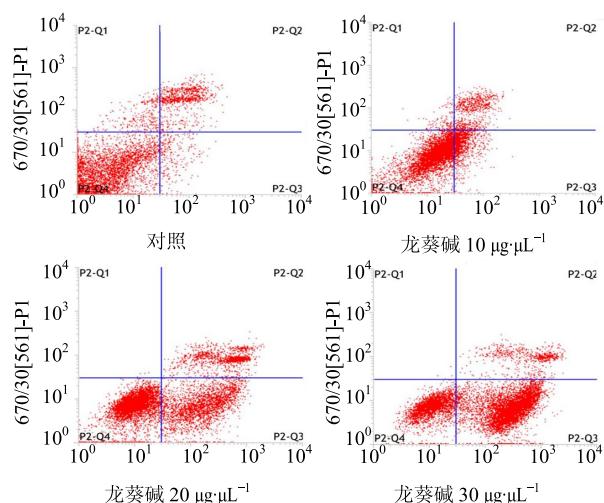


图 5 龙葵碱对 U251 细胞凋亡的影响 (流式细胞仪)
Fig. 5 Inhibition of apoptosis of U251 cells by solanine treatment (flow cytometry)

表 3 龙葵碱对 U251 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of solanine on apoptosis rate of U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1})$	凋亡率/%
对照	0	3.24 ± 1.87
龙葵碱	10	30.51 ± 3.80***
	20	44.37 ± 5.71****
	30	73.64 ± 9.59****▲

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与龙葵碱 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与龙葵碱 20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs solanine 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ vs solanine 20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ group

表 4 龙葵碱对 U251 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effects of solanine on protein expression of Bax and Bcl-2 proteins in U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1})$	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bcl-2/Bax
对照	0	0.18 ± 0.03	0.83 ± 0.11	4.69 ± 0.60
龙葵碱	10	0.26 ± 0.02**	0.58 ± 0.10*	2.47 ± 0.51**
	20	0.36 ± 0.04***	0.39 ± 0.08***	1.04 ± 0.12****
	30	0.46 ± 0.05****▲▲	0.24 ± 0.04****▲	0.52 ± 0.04****▲▲

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与龙葵碱 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与龙葵碱 20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs solanine 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs solanine 20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ group

具体机制尚不完全清楚。

目前, 龙葵碱抑制肿瘤细胞增殖机制的相关研究颇多, 但主要集中在 3 个方面: (1) 影响肿瘤细胞膜, 包括膜的流动性、膜蛋白的表达、膜唾液酸水平和封闭度; (2) 影响肿瘤血管生成; (3) 肿瘤细胞凋亡路径。其中, 凋亡通路与细胞生长过程息

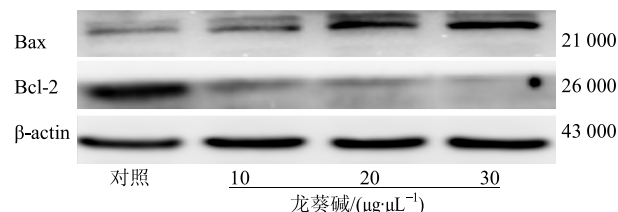


图 6 龙葵碱对 U251 细胞中 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响
Fig. 6 Effects of solanine on Bax and Bcl-2 protein expression of U251 cells

4 讨论

龙葵碱是从茄科一年生草本植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的全草或未成熟果实中提取出的一种生物碱。龙葵又名苦菜、苦葵、老鸦眼、天茄子^[5], 性寒, 味微苦、微甘, 有小毒, 归肺、胃、膀胱经, 具有清热解毒、活血散瘀、利水消肿、止咳祛痰的功效^[7]。近年研究指出, 龙葵碱除了具有治疗感冒、牙疼、慢性支气管炎、痢疾、乳腺炎等疾病的作用之外^[4], 还具有免疫调节和抗肿瘤等作用^[9]。临床上用龙葵水煎剂或注射剂治疗乳腺癌、肝癌、宫颈癌、肺癌、卵巢癌、胃癌等多种恶性肿瘤。可见龙葵碱用于临床治疗肿瘤具有广阔前景。本实验进一步探讨了龙葵碱对胶质瘤细胞增殖生长的抑制作用, 结果显示一定剂量范围内的龙葵碱能够抑制胶质瘤 U251 细胞增殖、迁移和侵袭, 并诱导其发生凋亡, 抑制作用随着药物浓度的增高而增强。因此, 本实验结果提示龙葵碱在治疗胶质瘤方面可能具有潜在的应用价值, 但龙葵碱抑制 U251 细胞增殖的

息相关。细胞凋亡由于不引起周围组织的炎症损伤, 因而成为杀死肿瘤细胞的最佳方式。研究显示, 在人肝癌 HepG2 细胞^[10]、人胰腺癌细胞 PANC-1^[11-12]、前列腺癌^[13]、乳腺癌^[14-17]等细胞实验中, 龙葵碱能够下调 Bcl-2 蛋白表达, 上调 Bax 蛋白表达, 并促进 PT 通道开放, 从而降低线粒体膜电位, 使线粒

体通透性增强,促使孔道转变,一方面诱导细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞内,使胞内 Ca^{2+} 超载,而胞内 Ca^{2+} 超载反过来亦会使线粒体膜电位降低,形成恶性循环;另一方面致使线粒体膜内相对高渗,基质膨胀,导致外膜破裂,从而释放细胞色素 C (cytochrome C),细胞色素 C 进入胞质内,激活 caspase 家族级联反应,最终导致 caspase-3 的活化而诱导凋亡发生。龙葵碱还通过抑制人胃癌 MGC-803 细胞中 β -catenin 的表达,参与细胞凋亡信号调控^[18-19]。还有报道龙葵碱通过降低人宫颈癌 HeLa 细胞的环氧合酶-2 (COX-2) 表达来诱导凋亡^[20]。本实验结果显示一定剂量的龙葵碱可以上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,从而影响了 Bcl-2/Bax 值,与龙葵碱在其他肿瘤细胞中的研究结果一致。从凋亡途径来看,龙葵碱抑制胶质瘤细胞增殖生长是否是通过影响线粒体通透性,使发生钙超载,或是通过 Cytochrome C 引起 caspase 家族的级联反应等,需进一步实验证明。

综上所述,在一定剂量范围内,龙葵碱具有抑制多种肿瘤(包括胶质瘤在内)的作用,但有关抑制机制研究仍旧甚少。中药是一个巨大的宝库亟待开发,希望以后能在肿瘤细胞微环境的变化、胞内 pH 值变化、血管生成机制、血脑屏障等多方面进一步探讨龙葵碱的作用机制,为防治肿瘤奠定基础。

参考文献

- [1] Ru Q, Shang B Y, Miao Q F, *et al.* A cell penetrating peptide-integrated and enediyne-energized fusion protein shows potent antitumor activity [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(4): 781-789.
- [2] Walbert T, Chasteen K. Palliative and supportive care for glioma patients [J]. *Cancer Treat Res*, 2015, 163(9): 171-184.
- [3] 付宏伟, 万福生, 黄春洪. 茄科属植物抗肿瘤研究进展 [J]. *实用临床医学*, 2008, 9(8): 134-136.
- [4] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵活性成分的研究 [J]. *哈尔滨商业大学学报: 自然科学版*, 2004, 20(6): 637-641.
- [5] 曲中原, 邹翔, 邹晓祺, 等. 龙葵碱药理作用研究进展 [J]. *黑龙江医药*, 2014, 27(4): 795-797.
- [6] 季宇彬, 王胜惠, 高世勇, 等. 龙葵碱对 H22 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响 [J]. *中草药*, 2005, 36(2): 239-241.
- [7] 季宇彬, 刘家源, 高世勇. 龙葵碱对乳腺癌 MCF-7 细胞微管系统的影响 [J]. *中草药*, 2012, 43(1): 111-114.
- [8] 谢纲, 李冲. 茄属植物化学成分和生物活性 [J]. *现代药物与临床*, 2006, 21(2): 63-65.
- [9] 李红念, 梅全喜, 张志群, 等. 龙葵的化学成分与药理作用研究进展 [J]. *今日药学*, 2011, 21(11): 713-715.
- [10] Ji Y B, Gao S Y. Antihepatocarcinoma effect of solanine and its mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 126-135.
- [11] 王英秀, 孙洪伟, 杨龙龙, 等. 龙葵碱诱导胰腺癌细胞 Panc-1 凋亡的实验研究 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2012, 24(5): 411-414.
- [12] Lv C, Kong H, Dong G, *et al.* Antitumor efficacy of α -solanine against pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87868.
- [13] 李志雄, 梁蔚波, 唐晖, 等. 龙葵碱对前列腺癌 LNCaP 及 Du145 细胞系的作用及机制 [J]. *广东医学*, 2013, 34(8): 1153-1156.
- [14] 张新红, 朱佳, 徐水凌. 龙葵碱通过线粒体途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(16): 1404-1409.
- [15] Mohsenikia M, Alizadeh A M, Khodayari S, *et al.* The protective and therapeutic effects of alpha-solanine on mice breast cancer [J]. *Euro J Pharm*, 2013, 718(1/3): 1-9.
- [16] Razali F N, Sinniah S K, Hussin H, *et al.* Tumor suppression effect of solanum nigrum, polysaccharide fraction on breast cancer via immunomodulation [J]. *Inter J Biol Macromol*, 2016, 92(1): 185-193.
- [17] Mohsenikia M, Farhangi B, Alizadeh A M, *et al.* Therapeutic effects of dendrosomal solanine on a metastatic breast tumor [J]. *Life Sci*, 2016, 148(7): 260-267.
- [18] 张卫东, 孙睿, 李莉, 等. 龙葵碱对人胃癌 MGC-803 荷瘤小鼠癌细胞钙粘蛋白表达的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(30): 11965-11966.
- [19] 张卫东, 李丽, 张丽敏, 等. 胃癌淋巴管上皮 β -catenin 表达与癌转移相关性的研究 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2013, 34(6): 12-14.
- [20] 房昭, 杨爱莲, 高福云, 等. 龙葵碱诱导人宫颈癌细胞 HeLa 凋亡的体外实验研究 [J]. *华西药理学杂志*, 2010, 25(3): 266-268.