

苦参素注射液联合顺铂对人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性及 wtp53、hTERT mRNA 表达的影响

卞光亮^{1*}, 蒋 华¹, 马秀建²(1. 连云港市第二人民医院, 江苏 连云港 222023; 2. 连云港市药品检验所, 江苏 连云港 222023)

中图分类号 R318 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)48-4561-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.48.17

摘要 目的: 观察苦参素注射液联合顺铂(DDP)对人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性、野生型 p53(wtp53)、端粒酶逆转录酶(hTERT) mRNA 表达的影响。方法: 将 Dulbecco 改良 Eagle 培养基培养的人肝癌 SMMC-7721 细胞分为苦参素组、DDP 组、联合组和对照组。苦参素组低、中、高质量浓度分别为 0.75、1.5、3.0 mg/ml, DDP 组低、中、高质量浓度分别为 1、2、4 mg/ml, 联合组浓度按两药联合用药 1:1 的比例应用, 对照组加入 200 μ l 磷酸缓冲盐溶液(PBS), 不给予药物干预。观察 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率及药物间的相互作用, 端粒酶活性吸光度差值(ΔA), wtp53 和 hTERT mRNA 相对表达量。结果: 联合组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率 > 苦参素组 > DDP 组 > 对照组, 4 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), q 值提示苦参素与 DDP 存在单纯相加或协同作用。苦参素组、DDP 组及联合组 SMMC-7721 细胞端粒酶活性 ΔA 、hTERT mRNA 均显著低于对照组, 且联合组 < DDP 组 < 苦参素组, 苦参素组、DDP 组及联合组 wtp53 显著高于对照组, 且联合组 > DDP 组 > 苦参素组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 苦参素注射液联合 DDP 可增加人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡, 其机制可能与 wtp53 表达上调、hTERT mRNA 表达下调, 从而影响端粒酶活性有关。

关键词 苦参素注射液; 顺铂; SMMC-7721 细胞; 肝癌; 端粒酶; wtp53; 端粒酶逆转录酶

Effects of Kushenin Injection Combined with Cisplatin on the Activity of Human Liver Cancer SMMC-7721 Cell Telomerase and mRNA Expression of wtp53 and hTERT

BIAN Guang-liang¹, JIANG Hua¹, MA Xiu-jian²(1. Lianyungang Second People's Hospital, Jiangsu Lianyungang 222023, China; 2. Lianyungang Institute for Drug Control, Jiangsu Lianyungang 222023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of Kushenin injection combined with cisplatin (DDP) on the activity of human liver cancer SMMC-7721 cells telomerase and mRNA expression of wild-type p53 (wtp53) and telomerase reverse transcriptase (hTERT). METHODS: Human liver cancer SMMC-7721 cells cultured with Dulbecco modified Eagle medium were divided into kushenin group, DDP group, combination group and control group. Kushenin group was given low, medium and high concentrations of kushenin 0.75, 1.5 and 3.0 mg/ml, DDP group was given 3 kinds of concentrations of DDP 1, 2 and 4 mg/ml, and combination group was given two-drug combination with ratio of 1:1; control group received 200 μ l phosphate buffer solution (PBS) without any drug intervention. The apoptosis rate of human liver cancer SMMC-7721 cells and drug interaction were observed, and telomerase activity absorbance difference (ΔA), relative expression of wtp53 and hTERT mRNA were compared. RESULTS: The apoptosis rate was in descending order: combination group > kushenin group > DDP group > control group, there was statistical significance ($P < 0.01$). q value indicated that kushenin was simply combined with or cooperated with DDP. ΔA and mRNA expression of hTERT of SMMC-7721 cells in kushenin group, DDP group and combination group were significantly lower than in control group, in ascending order as following: combination group < DDP group < kushenin group. mRNA expression of wtp53 in kushenin group, DDP group and combination group were significantly higher than in control group, in descending order as following: combination group > DDP group > kushenin group; there was statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Kushenin injection combined with DDP can enhance human liver cancer SMMC-7721 cells apoptosis, the mechanism of which may be related that the up-regulation of wtp53 expression and the down-regulation of hTERT mRNA expression affect the telomerase activity.

KEYWORDS Kushenin injection; Cisplatin; SMMC-7721 cells; Liver cancer; Telomerase; wtp53; Telomerase reverse transcriptase

肝癌细胞的迅速增殖和侵袭转移是影响患者病情发展及预后的主要原因, 抑制相关细胞的增殖对抗肿瘤具有重大意义。人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖与抑制已受到较多学者的关注。崔兵兵等^[1]研究认为, 熊果酸可有效抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期进程。

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0518-85433484。E-mail: 1907148490@qq.com

万凌峰等^[2]研究也发现, 中药对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制可能是通过诱导细胞凋亡来实现。此外, 还有学者认为, 抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞 TWIST 基因的表达可能进一步抑制肝癌细胞上皮间质转化的发生, 从而降低肝癌细胞的侵袭转移能力^[3-4]。苦参素可抑制部分肿瘤细胞的增殖和转移, 增加化疗的疗效。有研究表明, 苦参素与顺铂(DDP)联合应用可诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡^[5-6], 端粒酶及野

生型 p53 (wtp53) 对肿瘤发生及抑制过程有明显影响, 而端粒酶的活性则受端粒酶逆转录酶 (hTERT) 的调控^[7-8]。因此, 笔者观察了苦参素联合 DDP 对人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性及 wtp53、hTERT mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

人肝癌 SMMC-7721 细胞 (上海信然生物科技有限公司); DDP (江苏豪森药业有限公司); 苦参素 (江苏正大天晴药业股份有限公司); 胎牛血清 (FBS, 法国 Biowest 公司); Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM 培养基, 法国 Biowest 公司); 端粒重复序列扩增法——酶联免疫吸附试验 (Telomerase PCR-ELISA) 试剂盒 (北京康碧泉生物科技有限公司); 反转录酶-聚合酶链锁反应 (RT-PCR) 试剂盒 (上海艾博思生物技术有限公司); Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (武汉科昊佳生物技术有限公司); PCR 引物 (武汉中帆生物科技有限公司)。

1.2 仪器

FACSCanto 流式细胞仪 (美国 BD 仪器公司); CO₂ 培养箱 (上海赛默科技生物发展有限公司); 高速离心机 (美国 Beckman 公司); IX73 (倒置) 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 9700 型 PCR 扩增仪 (美国 AB 公司)。

1.3 细胞培养

将 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养人肝癌 SMMC-7721 细胞, 待细胞生长至对数增殖期, 取生长状态良好的细胞进行实验。

1.4 分组及干预方法

将生长状态良好的人肝癌 SMMC-7721 细胞随机分为苦参素组、DDP 组、联合组和对照组。各组每孔加入 200 μl 培养液稀释的药物, 苦参素组低、中、高质量浓度分别为 0.75、1.5、3.0 mg/ml, DDP 组低、中、高质量浓度分别为 1、2、4 mg/ml, 联合组浓度按两药联合用药 1:1 的比例应用, 对照组仅加入 200 μl 磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 不给予药物干预。待 48 h 后, 使用原位末端标记法 (TUNEL) 观察各组细胞凋亡情况, 方法如下: 收集各组细胞, PBS 漂洗并涂片, 风干固定后于渗透液中孵育, 以双蒸水 (ddH₂O) 冲洗后加入 TUNEL 反应混合物和转化剂, 孵育 30 min 后冲洗; 滴加二氨基联苯胺 (DAB) 底物溶液并以 ddH₂O 冲洗; 苏木素复染、脱水、封片, 镜下见细胞核呈棕黄色为 TUNEL 反应阳性细胞。选取 10 个高倍视野, 以阳性细胞所占的百分比作为凋亡率。

1.5 端粒酶活性检测

采用 Telomerase PCR-ELISA 法检测对照组、苦参素组 (1.5 mg/ml)、DDP 组 (2 mg/ml) 及联合组 (苦参素 1.5 mg/ml + DDP 2 mg/ml) 细胞端粒酶的活性。以 690 nm 为参比波长, 测定样品在 450 nm 波长的吸光度 (A), 吸光度差值 ΔA = A_{450 nm} - A_{690 nm}, ΔA 为细胞端粒酶活性。

1.6 wtp53、(hTERT) mRNA 表达量检测

选取对照组、苦参素组 (1.5 mg/ml)、DDP 组 (2 mg/ml) 及联合组 (苦参素 1.5 mg/ml + DDP 2 mg/ml), 按 Trizol 试剂盒的说明书提取总 RNA 并测定浓度。cDNA 合成: 反应体系共 20 μl, 其中 RNA 样品 10 μl、4 种脱氧核苷酸混合物 (各 10 mM) 1 μl、RNase 抑制剂 0.5 μl, 及逆转录酶 37 °C × 60 min, 95 °C × 10 min, 终止于 4 °C, 保存。PCR 反应体系: 反应体系共 20 μl, 转

录酶 10 μl, 上下游引物 (各 10 pM) 混合液 1.6 μl, cDNA 样品 1.6 μl。采用 primer premier 5.0 软件设计 β-actin、p53 和 hTERT 引物, 序列如下: p53: 上游 5'-GTG GCC TCT GTC ATC TTC CG-3', 下游 5'-CCGTCA CCA TCA GAG CAACG-3', 扩增产物为 291 bp; hTERT: 上游 5'-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3', 下游 5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3', 扩增产物为 145 bp; β-actin: 上游 5'-CTA TCG GCA ATG AGC GGT TCC-3', 下游 5'-TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT ACG-3', 扩增产物为 154 bp。取各组 PCR 产物 10 μl, 进行琼脂糖凝胶电泳, 内参 β-actin。紫外透射仪下观察 wtp53、hTERT-mRNA 条带的表达, 计算相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件对所得数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。以金氏公式^[9]评价药物相互作用, q < 0.85 为拮抗, 0.85 ~ 1.15 为单纯相加, > 1.15 为协同作用。

2 结果

2.1 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率比较

联合组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率 > 苦参素组 > DDP 组 > 对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.01), q 值提示两种药物间存在单纯相加或协同作用, 详见表 1。

表 1 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率比较 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of apoptosis rate of SMMC-7721 cell among 4 groups (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

浓度	苦参素组	DDP 组	联合组	对照组
低浓度	5.23 ± 1.14	7.92 ± 2.67	11.83 ± 2.64*	0
中浓度	12.35 ± 2.26	21.34 ± 3.18	33.57 ± 3.39*	0
高浓度	19.68 ± 3.57	33.65 ± 4.12	51.07 ± 4.75*	0
q	0.92	1.35	1.12	

与苦参素组、DDP 组、对照组比较: *P < 0.01

vs. Kushenin group, DDP group, control group: *P < 0.01

2.2 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率随浓度变化趋势

苦参素组、DDP 组及联合组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率均随着药物浓度的增加呈上升趋势, 详见图 1。

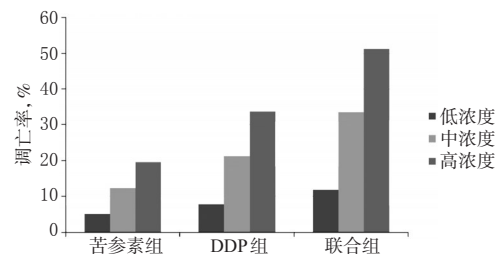


图 1 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率随浓度变化趋势
Fig 1 Trend chart of apoptosis rate of SMMC-7721 cell with the change of concentration in 4 groups

2.3 4 组人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性 ΔA、wtp53 和 hTERT mRNA 相对表达量比较

苦参素组、DDP 组及联合组人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶活性 ΔA、hTERT mRNA 均显著低于对照组, 且联合组 < DDP 组 < 苦参素组; 苦参素组、DDP 组及联合组 wtp53 显著高于对照组, 且联合组 > DDP 组 > 苦参素组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 详见表 2。

表2 4组人肝癌SMMC-7721细胞端粒酶活性 ΔA 、wtp53和hTERT mRNA相对表达量比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of ΔA , relative expression wtp53 and hTERT mRNA among 4 groups($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	人肝癌SMMC-7721 细胞端粒酶活性 ΔA	wtp53/ β -actin	hTERT mRNA/ β -actin
苦参素组	1.24 \pm 0.37*	0.29 \pm 0.07*	0.51 \pm 0.03*
DDP组	0.92 \pm 0.26*	0.43 \pm 0.06*	0.38 \pm 0.05*
联合组	0.42 \pm 0.08**	0.61 \pm 0.02**	0.22 \pm 0.07**
对照组	1.59 \pm 0.07	0.25 \pm 0.04	0.67 \pm 0.04

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与苦参素组、DDP组比较: ** $P < 0.05$

vs. control group: * $P < 0.05$; vs. kushenin group and DDP group:

** $P < 0.05$

3 讨论

全球每年新增肝癌患者约60万,多数患者就诊时已为晚期,因此预后较差、病死率较高^[10]。肿瘤侵袭转移是一个复杂的过程,涉及多种基因的异常表达,肿瘤细胞无限增殖和凋亡过程被抑制是肿瘤快速发展与侵袭的重要原因^[11-12]。因此,寻找能够抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡的药物对于肿瘤治疗显得尤为重要。

肿瘤细胞的无限增殖与端粒酶的激活密切相关。人端粒酶由人端粒酶RNA、端粒酶相关蛋白质1和hTERT组成,其中hTERT是端粒酶活性的决定性因素,其活性主要受转录水平的调节,而hTERT的转录受到多种癌基因及抑癌基因产物的调控,如c-Myc、bcl-2和p53等均可对端粒酶活性产生直接或间接的调控作用^[13]。wtp53在DNA损伤诱导细胞凋亡中发挥关键作用,目前大多数传统化疗药物均是通过wtp53相关信号通路发挥抗癌效应^[14]。

苦参素注射液的主要成分是氧化苦参碱和氧化槐果碱,可抑制肿瘤细胞的增殖,增强放疗的疗效,但作用机制尚不明确。有研究表明,苦参注射液具有减轻病毒性肝炎的症状与体征,促进肝功能恢复的作用^[15]。

本研究结果显示,联合组人肝癌SMMC-7721细胞凋亡率>苦参素组>DDP组>对照组,差异有统计学意义,q值提示苦参素与DDP存在单纯相加或协同作用。苦参素组、DDP组及联合组人肝癌SMMC-7721细胞端粒酶活性 ΔA 、hTERT mRNA均显著低于对照组,且联合组<DDP组<苦参素组;苦参素组、DDP组及联合组wtp53显著高于对照组,且联合组>DDP组>苦参素组,差异有统计学意义。此结论与相关研究结果一致^[16-17]。

综上所述,苦参素注射液联合顺铂可增强人肝癌SMMC-7721细胞的凋亡,其机制可能与wtp53表达上调、hTERT mRNA表达下调,从而影响端粒酶活性有关。

参考文献

[1] 崔兵兵,程丽芳,侯立静,等.熊果酸抑制人肝癌SMMC-7721细胞生长及凋亡的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):181.

[2] 万凌峰,薛博瑜,柳璋璞.芪参清肝汤对人肝癌SMMC-7721细胞增殖、凋亡的影响[J].国际中医中药杂志,2013,35(12):1079.

[3] Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition[J]. *Jour-*

nal of Biological Chemistry, 2012,287(8):5819.

[4] 乔泽强.抑制肝癌SMMC-7721细胞TWIST基因表达对细胞侵袭能力的影响[J].郑州大学学报:医学版,2013,48(3):359.

[5] 黄赞松,周喜汉.苦参素药理和抗肿瘤作用研究[J].医学综述,2009,15(11):1701.

[6] 肖硕.苦参碱多种抗癌功效研究进展[J].实用医学杂志,2010,26(24):4605.

[7] Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, et al. p53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(5):479.

[8] Jaitner S, Reiche JA, Schäffauer AJ, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a target gene of β -catenin in human colorectal tumors[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(17):3331.

[9] Ghavami G, Sardari S, Ali Shokrgozar M. Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistance tumor cells: ACHN and A2780/CP cell lines[J]. *Comput Biol Med*, 2011, 41(8):665.

[10] Hicks SD, Lewis L, Ritchie J, et al. Evaluation of cell proliferation, apoptosis, and dna-repair genes as potential biomarkers for ethanol-induced CNS alterations[J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13(1):128.

[11] Xu J, Zhu X, Wu L, et al. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Liver Int*, 2012,32(5):752.

[12] 赵冬耕,孙佳,王明艳,等.抗癌扶正方对人肝癌细胞SMMC-7721 PI3K/AKT 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):136.

[13] Kretzner L, Scuto A, Dino PM, et al. Combining histone deacetylase inhibitor vorinostat with aurora kinase inhibitors enhances lymphoma cell killing with repression of c-Myc, hTERT, and microRNA levels[J]. *Cancer Res*, 2011,71(11):3912.

[14] 王鹏,王进,姜慧,等.川楝素通过线粒体途径诱导人肝癌细胞凋亡[J].中国中西医结合杂志,2011,31(2):218.

[15] 余会元,张小兵,钟惠德,等.苦参素注射液对慢性丙型肝炎患者肝纤维化的影响[J].中华传染病杂志,2008,26(12):758.

[16] 韦星,黄赞松,黄岑汉,等.苦参素注射液联合顺铂对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡相关基因c-myc、bcl-2和bax表达的影响[J].山东医药,2012,52(7):12.

[17] 韦星,黄赞松,黄岑汉,等.苦参素注射液与顺铂联合对人肝癌细胞SMMC-7721端粒酶活性及wtp53、hTERT mRNA表达的影响[J].实用医学杂志,2012,28(11):1759.

(收稿日期:2014-08-25 修回日期:2014-10-24)