

文章编号:1000-582X(2005)06-0125-04

苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展*

申晓东,宋关斌,严润彬,杨扬

(重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室,重庆 400030)

摘要:苦参碱和氧化苦参碱是一类生物碱,具有多方面的药理活性,其中的抗肿瘤作用,近年来受到了极大的关注.目前国内外关于苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究显示,苦参碱和氧化苦参碱通过抑制肿瘤细胞DNA的合成、抑制相关酶活性、影响肿瘤细胞的正常周期来抑制肿瘤细胞增殖;通过控制相关因子的表达来抑制肿瘤的转移;通过影响了与肿瘤相关基因的表达、影响端粒酶的活性等途径,来诱发细胞发生凋亡,诱导肿瘤细胞向正常细胞分化.

关键词:苦参碱;氧化苦参碱;肿瘤;癌症

中图分类号:R318.01

文献标识码:A

肿瘤是危害人类的重大疾病,运用中药治疗肿瘤是目前国内外研究的热点.苦参碱和氧化苦参碱作为一类生物碱,具有多方面的药理活性,研究表明苦参碱和氧化苦参碱能抑制肿瘤细胞增殖、转移,诱导其凋亡、及向正常细胞分化,具有抗肿瘤的活性,因此对苦参碱和氧化苦参碱的研究具有重要的意义.

1 抑制肿瘤细胞增殖

1.1 白血病 K562 细胞

通过试验表明:苦参碱对 K562 细胞的增殖抑制呈量-效关系和时-效关系.0.2 mg/mL 的苦参碱作用 3 d 后, K562 细胞的增殖速度明显减缓,达到一个稳态;小于 0.2 mg/mL 的苦参碱对 K562 细胞的增殖无明显的抑制作用;大于 0.2 mg/mL 的苦参碱作用 2 d 后细胞增殖受到明显抑制,并表现出较强的杀伤力.

乳酸脱氢酶(LDH)是细胞无氧酵解的关键酶,在肿瘤细胞无氧酵解代谢中相当旺盛,有文献报道白血病患者血清的 LDH 活性明显高于正常人,且其主要来源于白血病细胞,因此可将 LDH 活性变化作为白血病细胞增殖的指标之一.试验结果显示:0.2 ~ 0.3 mg/mL 的苦参碱作用后的 K562 细胞的 LDH 活性小于无苦参碱作用的对照组和 0.1 mg/mL 的苦参碱作用的处理组,处理 3 d 后达到稳态.可见苦参碱能降

低 LDH 的活性.

此外,采用流式细胞仪分析苦参碱对 K562 细胞周期的影响,结果显示:苦参碱作用 K562 细胞 72 h 后,4.6% 的肿瘤细胞阻滞于 G₁ 期,而 S 期细胞数明显少.说明苦参碱能明显抑制部分肿瘤细胞进入 S 期,从而抑制其增殖^[1].

1.2 肝癌细胞

苦参碱能有效地抑制人肝癌细胞株 HepG2 的增殖. MTT 试验显示:苦参碱对 HepG2 抑制作用也呈量-效关系和时-效关系.随着作用时间延长和药物浓度的增加, HepG2 细胞存活率明显降低,细胞 DNA 合成亦相应降低.病理学研究发现,苦参碱处理 HepG2 细胞后,细胞数量减少,形态呈多形性.苏丹 III 染色,胞浆内有阳性颗粒,其原因可能是苦参碱干扰或破坏了细胞的脂肪代谢所致;同时细胞的分裂指数和增殖细胞核抗原(PCNA)均降低.电镜下细胞的恶性形态表型减弱甚至消失,胞核变小,核浆比减小,核仁缩小、浓缩甚至消失.以上结果显示苦参碱可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖,并具有直接杀伤作用^[2].

对于另外一种肝癌细胞 SMMC-7721,经不同浓度的氧化苦参碱作用后,用 MTT 法检测细胞的生长和繁殖,结果显示:大于 2.5 mg/mL 浓度的氧化苦参碱作用 3 h 后, SMMC-7721 细胞形态变化明显,出现大

* 收稿日期:2005-02-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(19972077)

作者简介:申晓东(1979-),男,重庆人,重庆大学硕士研究生,从事生物力学研究.

量坏死细胞,表明细胞毒作用较大;在 0.1 ~ 2.5 mg/mL 浓度范围内,细胞存活率逐渐降低,而且这种抑制作用呈时间剂量依赖型;在浓度 < 0.1 mg/mL,对肿瘤细胞生长几乎无抑制作用.此外经流式细胞仪分析显示,0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL 氧化苦参碱处理 SMMC-7721 细胞 2~3 h 后,可增加 G₀/G₁ 期细胞所占百分比,降低 S 期和 G₂/M 期的百分比,提示氧化苦参碱对 SMMC-7721 细胞生产的抑制是阻止细胞进入 S 期,使细胞堆积于 G₀/G₁ 期. S 期主要完成 DNA 的合成以及与 DNA 有关的组蛋白的合成,因此可以推测,氧化苦参碱可以抑制 DNA 的合成^[3],但也有研究认为,苦参碱作用于 SMMC-7721 细胞,使细胞堆积于 S 期^[4]. 氧化苦参碱是否作用于细胞核 DNA,通过改变 DNA 序列和抑制 DNA 的合成而抑制肿瘤细胞的生长,值得进一步探讨.

此外苦参碱和氧化苦参碱还对 BT325 胶质瘤细胞^[5]、人胃腺癌细胞 SGC-7901^[6-8]、人卵巢癌细胞 SKOV-3^[9] 等肿瘤细胞具有类似的作用.

综上所述,可见经苦参碱和氧化苦参碱有效地抑制多种肿瘤细胞增殖,其抑制效果与时间、浓度相关. 而其抑制原因可能与苦参碱和氧化苦参碱能抑制肿瘤细胞 DNA 的合成,影响细胞的正常周期,阻止其进入 S 期,以及抑制相关酶活性有关.

2 抑制肿瘤转移

2.1 影响粘附分子的表达

CD44 分子是粘附分子家族中的一员,它所编码的是细胞表面的一组跨膜糖蛋白. 当 CD44 基因转录时,如果出现了 V 区外显子的变异性拼接或在翻译后修饰方式不同(如 N 和 O 位的糖基化),就产生了 CD44 分子的变异异构体,即 CD44V. 目前已发现了 16 种 CD44V,其中 CD44V6、CD44V9、CD44V3 的表达被认为与肿瘤的侵袭和转移有关,一些肿瘤转移的过程中,往往伴有 CD44 表达的上调^[10]. Eramk^[11] 等认为 CD44V6 的表达有助于肿瘤细胞获得转移潜能,其转移机理可能是表达 CD44V6 的肿瘤细胞与远隔的淋巴管或血管内某一配体结合,使转移至那里的肿瘤细胞更加稳定地寄宿与生长. 研究表明,苦参碱处理后的 PG 细胞(人肺高转移巨细胞癌细胞系) CD44 粘附因子表达明显减少,内皮细胞通透性明显降低,表明苦参碱可明显抑制肿瘤细胞与内皮细胞的粘附,减轻肿瘤的转移^[12].

浸润转移促进基因(TIAM1)的表达与细胞的浸润成正比. Buchanan^[13] 等新近研究发现收缩肌受刺激后, Tiam1 可在细胞膜上迁移和磷酸化,且这一过程与

钙激酶 II (CAMK II) 有关. 林洪生等进一步研究表明,一定浓度苦参碱可明显抑制 Tiam1 的表达,通过这种调控作用可以降低肿瘤细胞的粘附和迁移,从而对一些肿瘤的浸润和转移产生一定的抑制作用^[14].

2.2 抑制血管内皮细胞增殖

新生血管的形成是肿瘤生产和转移的主要步骤,血管内皮细胞(VEC)的增殖是肿瘤新生血管形成的基础,其形成是在肿瘤细胞分泌的许多细胞生长因子的调节下进行的,这些因子中最主要的是血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF,) 通过研究发现,氧化苦参碱对肿瘤细胞诱导 VEC 增殖具有一定的抑制作用. 本来肺癌和胃癌细胞的条件培养液对能促进 VEC 的增殖,但经不同浓度的氧化苦参碱作用后的肺癌和胃癌细胞条件培养液对 VEC 增殖有不同程度的抑制作用,当氧化苦参碱浓度为 1.25 ~ 10 mg/mL 时,抑制率分别为 11.1% ~ 37% 和 8.7% ~ 39.1%,推测可能与氧化苦参碱对肿瘤细胞分泌促使 VEC 生长的因子有一定的抑制作用,尤其与 VEGF 和 bFGF 有关^[15].

3 诱导肿瘤细胞分化和凋亡

3.1 白血病 K562 细胞

c-myc, N-ras, wp53 是和细胞分化凋亡有关的基因,其中 c-myc 蛋白定位与细胞核内,由于它与 DNA 的亲性和核定位性决定了它在控制 DNA 负责的基因表达中发挥关键作用^[16-17],经过试验发现:未经苦参碱作用的 K562 细胞随着细胞的增殖,c-myc 的 mRNA 的表达增强,而苦参碱作用 K562 细胞 48 h 后,c-myc 的 mRNA 水平表达降低;而对于 N-ras, wp53 基因,苦参碱作用后其 mRNA 表达增强,说明 N-ras 和 wp53 表达活化有助于 K562 细胞分化^[18-19]. 而苦参碱能够调节这些相关基因的表达,从而诱导 K562 细胞的分化^[20].

端粒酶是一种特殊的逆转录酶,是由 RNA 和蛋白质组成的蛋白质复合体,其作用是在 S 期的线性染色体末端增加 TTAGGG 重复片断,以弥补染色体由于细胞分裂出现的末端进行性短缩,从而使细胞无限增殖,导致肿瘤细胞永生化的发生. 研究发现大部分肿瘤有端粒酶活性表达,而正常细胞(除生殖细胞外)没有端粒酶活性表达,不能无限分裂,因而端粒酶已成为新的肿瘤标志物,有学者用苦参碱作用 K562 细胞后,2 d 就出现端粒酶活性抑制,5 d 后端粒酶活性明显降低^[21-22],可见苦参碱能降低端粒酶活性.

3.2 肝癌细胞

采用不同浓度的苦参碱处理 HepG2 细胞,在光镜

和电镜下显示:随着时间和浓度的增加,出现悬浮细胞增多、细胞体积变小、核浓缩、碎裂等现象,细胞成凋亡状.用不同浓度苦参碱作用 HepG2 细胞 3 h 后,用流式细胞仪检测,均出现凋亡峰.对凋亡基因的检测也显示,苦参碱作用后,凋亡基因 *wp53*, *bax*, *Fax* 表达上调,而抗凋亡基因 *bcl-2*, *c-myc* 表达下降,可见一定浓度的苦参碱能诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡,且该凋亡与凋亡基因和抗凋亡基因表达强弱有关^[23].

对于 SMMC-7721 细胞,研究显示苦参碱 0.03 mg/mL 作用 SMMC-7721 细胞 6 d 后,AFP 分泌量、 γ GT 活力均降低,酪氨酸 α 酮戊二酸转移酶 (TAT) 活力增高;透射电镜显示 SMMC-7721 细胞亚细胞结构趋于正常,提示苦参碱可降低 SMMC-7721 细胞的恶性程度而使其向正常细胞转化^[24].

对于 BT325 胶质瘤细胞^[5],人胃腺癌细胞 SGC-7901^[6],人卵巢癌细胞 SKOV-3^[25] 等其他肿瘤细胞,经研究证明,苦参碱和氧化苦参碱也能起到不同的诱导分化和凋亡的作用.

以上研究证明,经苦参碱和氧化苦参碱作用后,多种肿瘤细胞在形态学上均呈现凋亡状,比如出现悬浮细胞增多、细胞体积变小、核浓缩、碎裂等现象.其作用效果与浓度相关,总的来说是低浓度刺激引起凋亡,而较高浓度刺激则引起坏死.

而苦参碱和氧化苦参碱促使肿瘤细胞凋亡的原因可能是苦参碱和氧化苦参碱影响了与肿瘤相关基因的表达,比如降低了 *c-myc* 的 mRNA 的表达,增强了 *N-ras*, *wp53* 的 mRNA 表达;或者是降低了端粒酶的活性等,从而诱发了细胞凋亡发生,但具体原因尚待深入研究.

4 总结和展望

苦参碱和氧化苦参碱在治疗慢性肝炎和肝纤维化等方面得到了广泛的应用,目前一系列的研究证实,苦参碱和氧化苦参碱可抑制部分肿瘤的增殖和转移.在诱导肿瘤细胞分化、促进肿瘤细胞凋亡以及对分化和凋亡基因的调控上,苦参碱和氧化苦参碱亦表现出一定的作用.

就目前的研究状况来看,大部分研究集中在苦参碱上,而氧化苦参碱则相对较少,量子力学试验显示,在构象方面,苦参碱和氧化苦参碱最低能量构象相近,不同的是氧化苦参碱多一个氧原子,这增加了它的空间立体作用.在轨道方面,两者轨道结构相似,相异之处是氧化苦参碱的最低空轨道能量较低,容易接受外来电子,使其轨道作用增强.在电荷方面,两者电荷结构相似,都为单开口正包负电荷包含体系,相异之处是

氧化苦参碱开口处氧原子电荷值高,增加了电性作用,可见苦参碱与氧化苦参碱的电子结构具有相似性和相异性,对生物受体的立体作用、轨道作用和电性作用相近而大小不同,相比而言氧化苦参碱的作用要强一些,其药理活性要大于苦参碱^[26].因此以后应加强对氧化苦参碱的研究.

此外肿瘤细胞的转移是肿瘤恶性的主要表现之一,而目前关于苦参碱和氧化苦参碱如何抑制肿瘤细胞转移的力学机制的研究相对较少,故这方面的研究也需要进一步加强.

参考文献:

- [1] ZHANG L P, JIANG J K, TAM J W, et al. Effects of Matrine on Proliferation and Differentiation in K562 Cells[J]. *Leuk Res*, 2001, 25(9): 793-800.
- [2] 司维柯,尚桃元,康格非.苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 的细胞形态影响和相关增殖因素的变化[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(6): 553-556.
- [3] 钱学敏,李继强,罗鸿予,等.氧化苦参碱抑制 SMMC-7721 细胞增殖的研究[J]. *上海第二医科大学学报*, 2002, 22(6): 512-514.
- [4] 张燕军,夏天,赵建斌.苦参碱对 SMMC-7721 细胞系的诱导分化作用[J]. *第四军医大学学报*, 1998, 19(3): 340-343.
- [5] 程光,章翔,费舟,等.苦参碱对 BT325 胶质瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(23): 2152-2154.
- [6] 张百红,岳红云,李新民.苦参碱抗癌作用与诱导肿瘤细胞凋亡[J]. *肿瘤研究与临床*, 1999, 12(6): 402-403.
- [7] LIDENBOIN L, DIAMOND R, ROTHERNBERG E, et al. Apoptosis is Induced by Serum Deprivation of Bcl-2 Cells is Not Preceded by Growth Arrest and Can Occur at Each Phase of the Cell Cycle [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(6): 1242-1244.
- [8] TAMURA A, YUIK L. Age-dependent Reduction of Bcl-2 Expression in Peripheral T-cells of Lpr/gld Mutant Mice [J]. *J Immunol*, 1995, 155(1): 499-501.
- [9] 李龙江,陈志琼,郑元义,等.氧化苦参碱对人卵巢癌细胞 SKOV-3 体外活性的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2003, 17(2): 100-101.
- [10] SHIRATORI H, KNSINO T, UESUGI M, et al. Acceleration of Lung Metastasis by Up-regulation of CD44 Expression in Osteosarcoma-derived Cell Transplanted Mice [J]. *Cancer Lett*, 2001, 170(2): 177-182.
- [11] ERMAK G, JENNINGS T, KOBINSON L, et al. Restricted Pattern of CD44 Variant Exon Expression in Human Papillary Thyroid Carcinoma [J]. *Can Res*, 1996, 56(5): 1037-1039.

- [12] 林洪生,李树奇,裴迎霞,等. 川芎嗪、苦参碱对癌细胞与内皮细胞粘附及粘附因子表达的影响[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(6): 384 - 386.
- [13] BUCHANAN F G, ELLIOTE C M, GIBBS M, et al. Translocation of the Rael Guanine Nucleotide Exchange Factor TI-AM-linduced by Platelet-derived Growth Lysophosphatidic Acid[J]. J Bio Chem, 2000, 275(13): 9 742 - 9 748.
- [14] 林洪生,李树奇,朴炳奎. 三参冲剂对肿瘤转移中内皮细胞及粘附因子的影响[J]. 中国肿瘤, 1999, 8(12): 574 - 576.
- [15] 王兵,王国俊,徐均. 氧化苦参碱对肿瘤诱导血管内皮细胞增殖的抑制作用[J]. 实用肿瘤杂志, 2000, 15(5): 297 - 300.
- [16] MEICHLE A, PHILIPP A, EILERSE M, et al. The Functions of Myc Proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 114: 129 - 146.
- [17] PULLNER D, MANTNER J, ALBERT T, et al. Nucleosomal Structure of Active and Inactive c-myc Genes[J]. J Bio Chem, 1996, 271(49): 31 452 - 31 457.
- [18] JENKINSON D, RUTHERFORD T R, GORDON SMITH T C. Activated N-ras Causes Differentiation of K562 Cells[J]. Biochem Soc Trans, 1997, 25(2): 252 - 255.
- [19] CAMMAN G E, GILMER T M. Growth Factor Modulation of p53-mediated Growth Arrest Versus Apoptosis[J]. Genes Develop, 1995, 9: 600 - 611.
- [20] 张丽萍,蒋纪恺,JOE T. 苦参碱对白血病细胞癌基因和细胞周期调控蛋白表达的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2001, 28(5): 346 - 350.
- [21] 张丽萍,蒋纪恺,谭荣安,等. 苦参碱对 K562 细胞株端粒酶活性的细胞周期的影响[J]. 基础研究, 1998, 20(5): 328 - 329.
- [22] 陈伟忠,曾欣,林勇,等. 苦参碱对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及端粒酶活性调控的体外研究[J]. 肿瘤学杂志, 2002, 8(3): 168 - 170.
- [23] 司维柯,陈安,李鹏,等. 苦参碱诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 816 - 820.
- [24] 张燕军,夏天,赵建斌. 苦参碱对 SMMC - 7721 细胞系的诱导分化作用[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(3): 340 - 342.
- [25] 侯华新,黎丹戎,栾英姿,等. 氧化苦参碱诱导卵巢癌 SKOV - 3 细胞凋亡作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(6): 704 - 707.
- [26] 赵宝中,荣大齐,王秀军,等. 苦参碱和氧化苦参碱电子结构和药性的关系[J]. 分子科学学报, 2000, 16(2): 88 - 93.

Research Progress of Matrine and Oxymatirne in the Anti-tumor Mechanism

SHEN Xiao-dong, SONG Guan-bin, YAN Run-bin, YANG Yang

(Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering Under the State Ministry of Education,
College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The Matrine and Oxymatirne are two kinds of alkaloid, and have many kinds of pharmacological functions. In recent years, their anti-tumor mechanism has been paid more attention. This article is a summarization of the research progress of Matrine and Oxymatirne in the anti-tumor mechanism. Now people have found out that the Matrine and Oxymatirne can restrain the multiplication of tumor cells via restraining the synthesization of DNA and the enzyme activity and effecting the normal cycle, and they also can restrain the transfer of the tumour via controlling the expression of the genes, and induce the death of the tumour cell and induce the tumour cell to differentiate into the common cell via controlling the expression of the genes and effecting the telomerase activity.

Key words: Matrine; Oxymatirne; tumour; cancer

(编辑 李胜春)