

# 苦参碱对视网膜母细胞瘤细胞 survivin 和端粒酶活性表达的影响

张璐烨

**摘要 目的** 研究苦参碱对视网膜母细胞瘤(RB)细胞凋亡抑制蛋白 survivin 和端粒酶活性表达的影响,探讨苦参碱对 Rb 的作用机制。**方法** 体外培养视网膜母细胞瘤患者 HXO-Rb 细胞经不同浓度的苦参碱作用后,采用噻唑蓝比色法测定细胞生长情况,RT-PCR 检测 survivin RNA 水平,聚合酶链法(PCR)检测端粒酶活性。**结果** 苦参碱在一定范围内可抑制 HXO-Rb 细胞的生长,使 survivin mRNA 表达下调。可明显观察到细胞凋亡的形态学改变,端粒酶活性明显下降,细胞凋亡率增加。**结论** 苦参碱可以增加 HXO-RB 细胞凋亡,可以减少 RB 细胞 mRNA 表达,减弱 RB 细胞端粒酶活性,影响其周期变化,抑制 RB 细胞系增殖。其对 survivin 的抑制,及端粒酶活性的下降可能是诱发 RB 细胞凋亡的原因。

**关键词** 苦参碱 视网膜母细胞瘤 凋亡 端粒酶 Survivin

**Effect of Matrine on Telomerase Activity and Expression of Survivin in Retinoblastoma.** Zhang Luyue. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316000, China

**Abstract Objective** To study the effect of matrine on telomerase activity and the expression of survivin, an inhibitor of apoptosis, in retinoblastoma (Rb), so as to explore the action mechanism of matrine on Rb. **Methods** HXO-Rb cells of Rb patients were cultured in vitro, followed by treatment with matrine at different concentrations. MTT colorimetry method, RT-PCR and PCR were used to measure the growth condition of cells, the level of survivin RNA and the telomerase activity, respectively. **Results** Matrine could inhibit the growth of HXO-Rb cells within limits to down-regulate the expression of survivin mRNA. Morphological changes of apoptosis were observed clearly. The telomerase activity was significantly decreased and the apoptosis rate was increased. **Conclusion** Matrine can increase the apoptosis of HXO-Rb cells, reduce the expression of mRNA in Rb cells, weaken the telomerase activity and influence the cell cycle, thus inhibiting the proliferation of Rb cell line. Reasons for Rb apoptosis may be the inhibition on survivin and the decrease of telomerase activity.

**Key words** Matrine; Retinoblastoma; Apoptosis; Telomerase; Survivin

视网膜母细胞瘤是婴幼儿常见恶性肿瘤,它的性质严重,危害性大。发生于视网膜核层,具有家族遗传现象,且发生于5岁以下,可发生单眼,双眼先后或同时罹患。严重危害患者视力功能生活质量。RB容易发生颅内及远处转移,目前的治疗是在RB眼内期的保守治疗,眼外期进行辅助治疗。早期发现,早期诊断及时治疗是提高治愈率,降低病死率的关键<sup>[1]</sup>。

苦参碱是由中草药植物苦参根、植株、果实经乙醇等有机溶剂提取制成的生物碱。据大量药理学研究及临床应用显示苦参碱具有抗肝纤维化,抗心律失常、抗炎、抗高血压血管重构、抗肿瘤及免疫抑制等药理作用。目前苦参碱在眼科疾病的价值还处于实验性研究阶段<sup>[2]</sup>。笔者采用苦参碱作用于RB细胞,观察凋亡抑制蛋白 survivin 表达及端粒酶的活性变化,

以分析探讨苦参碱对RB细胞的作用及机制。

## 资料与方法

1. 一般资料:选择人RB细胞株(美国ATCC Rb人视网膜母瘤细胞株批次N655)细胞在含10%浓度的类标准胎牛血清,加入青、链霉素各100Ug/ml的RPMI培养液(北京索宝生物科技有限公司产品,批次31800-022),37℃,5% CO<sub>2</sub>培养悬浮状态。倒置显微镜观察细胞形态学,生长状态取对数期生长细胞进行检测。苦参碱购自辽宁玉皇药业公司。

2. 方法:调整细胞密度 $7.5 \times 10^4$ /ml,按每孔2ml接种至12孔培养板内,并设空白对照组和苦参碱不同质量浓度组分别为20、40、60、80、100μg/ml,同时于0、24、48、72h收集RB细胞。

3. 苦参碱对RB细胞生长和存活作用的检测:苦参碱对RB细胞生长和存活作用采用MTT比色法。将对数生长期RB细胞加入96孔培养板中,每孔加入180μl细胞悬浮液<sup>[3]</sup>。以不同浓度药物分别加入5孔中20、40、60、80、100μg/ml。每块培养板设置3孔对照孔。加入200μl细胞悬浮液。再设3孔0孔,加入200μl培养液。在实验孔中加入不同浓度质量苦参

碱,培养 24、48、72h 后,将每孔中加入 20 $\mu$ l 的 MTT 溶液,作用 4h 后加入 100 $\mu$ l 酸化的 10% 十二烷基硫酸钠溶解 12h 后使用酶标仪测定 570nm 吸光度值并用 655nm 作为参考,重复操作 3 次。按照如下公式进行细胞增殖抑制率计算:细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 处理孔 A 均数/对照孔 A 均数)  $\times$  100%。

4. *survivin* mRNA 表达的检测:使用 RT - PCR 检测 *survivin* mRNA 的表达用 Trizol 提取 RB 细胞总 RNA,经反转录后, $\beta$  - *actin* 为内参,进行 PCR 检测。扩增产物 168bp,反应体系 50 $\mu$ l,退火温度为 57 $^{\circ}$ C 进行 30 个循环。产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行紫外灯光下照相,并将照片通过凝胶图像分析系统分析,PCR 产物量用光密度  $\times$  面积表示。结果用 PCR 产物量/ $\beta$  - *actin* 产物量表示<sup>[4]</sup>。

5. 细胞凋亡的形态学观察:苏木伊染色,4% 多聚甲醛固定。取各组细胞悬浮液,离心纸杯细胞涂片,显微镜下观察细胞形态学变化。

6. 细胞端粒酶活性检测:采用端粒重复扩增法<sup>[2]</sup>,具体操作严格按照端粒酶活性检测试剂盒说明书进行。将培养的细胞离心后,取上清,进行 PCR 扩增,先取 2 $\mu$ l 细胞液加入 PCR 反应物,20 $^{\circ}$ C 40min,90 $^{\circ}$ C 3min 后均加入 1 $\mu$ l 的荧光标志物,1 $\mu$ l Taq 酶,并按程序进行扩增。扩增产物加入 2 $\mu$ l 缓冲液变性 2min,最后行凝胶电泳,结束后行分析。

7. 统计学方法:采用 SPSS 15.0 统计学软件对数据进行处理,计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。用单因素方差分析对各药物不同质量浓度组的均数进行比较,两两比较采用 SNK - q 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 不同浓度苦参碱对 RB 的抑制作用:不同浓度组的吸光值和抑制率与对照组比较具有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。随浓度的增加及时间增长,苦参碱对 RB 的抑制作用明显增强,具体见表 1。

表 1 不同浓度苦参碱对 RB 细胞的吸光度作用及 48h 抑制率

苦参碱 ( $\mu$ g/ml)	12h	24h	48h	RB 抑制率 (%)
0	0.991 $\pm$ 0.012	0.985 $\pm$ 0.025	0.971 $\pm$ 0.035	
20	0.722 $\pm$ 0.013	0.891 $\pm$ 0.031	0.752 $\pm$ 0.045	25.1 $\pm$ 3.7
40	0.699 $\pm$ 0.013	0.721 $\pm$ 0.062	0.651 $\pm$ 0.078	40.1 $\pm$ 4.6
60	0.632 $\pm$ 0.233	0.612 $\pm$ 0.031	0.459 $\pm$ 0.073	47.5 $\pm$ 5.2
80	0.534 $\pm$ 0.101	0.495 $\pm$ 0.028	0.423 $\pm$ 0.037	50.2 $\pm$ 4.3
100	0.266 $\pm$ 0.042	0.191 $\pm$ 0.045	0.144 $\pm$ 0.025	80.7 $\pm$ 3.9
<i>F</i>	122.391	86.301	117.349	46.553
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2. 苦参碱对 RB 肿瘤细胞增殖的影响:MTT 法检测苦参碱体外 RB 细胞作用 48h 后检测形态学发生不同改变,HE 染色显示对照组多细胞增生分裂象。药物组细胞生长明显受到抑制,活细胞数量明显减少,部分细胞体积减少、细胞核固缩,呈现细胞凋

亡。见图 2、图 3。

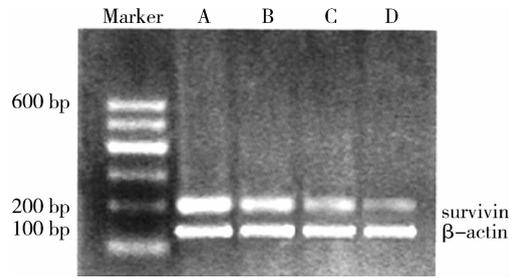


图 1 RT - PCR 检测细胞 *survivin* 表达结果

A. 对照组; B. 20 $\mu$ g/ml; C. 60 $\mu$ g/ml; D. 100 $\mu$ g/ml。随着浓度的增加,抑制作用增强

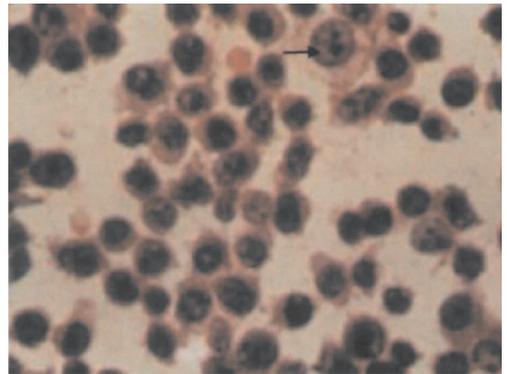


图 2 对照组细胞图片 (HE 染色,  $\times 400$ )

染色显示多细胞增生分裂现象

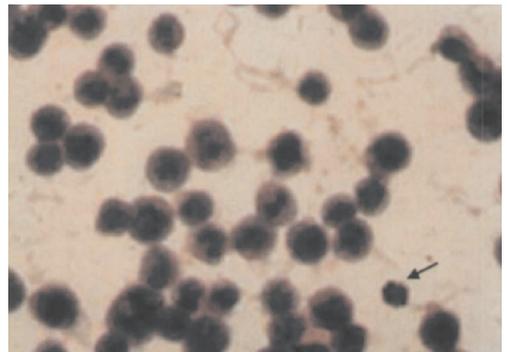


图 3 60 $\mu$ g/ml 药物浓度作用下 48h 后

RB 细胞形态 (HE 染色,  $\times 400$ )

3. 苦参碱对 RB 细胞端粒酶活性影响:未经药物处理的 RB 细胞端粒酶活性设置为 0.60 $\mu$ g/ml,苦参碱在 RB 细胞端粒酶的作用下,活性较原本下降分别为 61.45%  $\pm$  1.88% 和 51.28%  $\pm$  2.93%,与对照组浓度下降程度相比更加明显。具体见图 4。

### 讨 论

视网膜母细胞瘤是一种源于视网膜核层原始肝细胞的胚胎性恶性肿瘤,也是婴幼儿常见眼内恶性肿

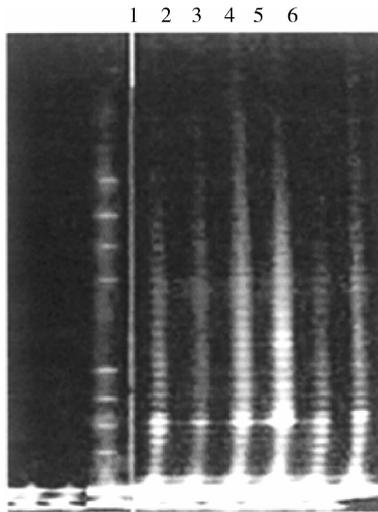


图4 苦参碱对RB细胞端粒酶活性的影响

1,2为60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下的灰度;3,4为对照组浓度;5,6为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度

瘤。发病机制较复杂,主要同基因突变导致RB蛋白通路异常所致。

苦参碱是中药苦豆中的有效成分,作用确切机制并不清楚,动物试验研究发现它对于正常细胞无明显不良反应,但证实苦参碱可以诱导肝癌,白血病等多种肿瘤细胞凋亡,而天然中药有效成分对眼内肿瘤的作用已有报道。研究发现,苦参碱具有同抗代谢药物相似特征,能够降低肿瘤分裂增生能力从而诱导肿瘤细胞凋亡,起到治疗肿瘤的目的<sup>[6]</sup>。

近年研究均表明<sup>[7]</sup>,肿瘤的产生是同细胞凋亡失衡有关,促凋亡基因活性受抑制和抗凋亡基因被激活,是导致肿瘤细胞凋亡抑制长期存活的重要原因。survivin是结构独特的凋亡抑制蛋白家族成员具有抑制凋亡调节细胞分裂的双重功能。它可以参与细胞生长、分化,在终末分化成熟的正常成人组织中无表达,但可重新表达于多种转化细胞和人类绝大多数常见肿瘤组织中。有研究证明<sup>[5]</sup>,survivin在脉络膜黑色素瘤组织中呈阳性高表达,同预后相关临床病理指标间有密切关系,说明survivin在眼肿瘤的预后结局

可能起重要作用。本实验结果证明,survivin在RB细胞中有高表达,经过苦参碱作用后,其表达受到明显抑制。证明了survivin在调控RB细胞凋亡方面具有重要作用。

端粒酶由RNA,蛋白质构成的核糖核酸蛋白复合物,具有反转录酶活性,并且可以自身RNA为模版翠花合成染色体端粒。以往报道端粒酶的表达同肿瘤发生,发展明显相关,其活性高低是肿瘤恶性肿瘤的重要指标。本研究中使用苦参碱作用于RB细胞,端粒酶活性受到明显抑制。说明苦参碱可以通过改变端粒酶活性对肿瘤细胞增殖产生影响。

综上所述,苦参碱可以增加HXO-RB细胞凋亡,可以减少mRNA表达,减弱RB细胞端粒酶活性,影响其周期变化,抑制RB细胞系增殖。其对survivin的抑制及端粒酶活性的下降可能是诱发RB细胞凋亡的机制,说明苦参碱对视网膜母细胞瘤的治疗有一定的应用价值,但具体应用需要临床大样本研究。

#### 参考文献

- 1 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
- 2 方蓉,李芳秋,武建国,等.MTT比色法的条件探讨[J].临床检验杂志,2003,21(1):34-35
- 3 沈长新,胡利华,夏琳,等.实时荧光定量端粒重复扩增法检测大肠癌患者单个核细胞端粒酶基因表达[J].中华检验医学杂志,2008,31(8):880-883
- 4 王德荣,赵幼安,丁浩,等.胃癌发生过程中凋亡基因Survivin与Fas表达及其与幽门螺杆菌感染的关系[J].中华消化内镜杂志,2006,23(5):351-354
- 5 Andrusiak MG, McClellan KA, Dugal-Tessier D, et al. Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration[J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(2):238-247
- 6 Dean JL, McClendon AK, Stengel K. Modeling the effect of the RB tumor suppressor on disease progression: dependence on oncogene network and cellular context[J]. Oncogene, 2010, 29(1):618-620
- 7 Popov BV, Watt SM, Rosanov JM. A structural pocket mutation of pRb increases its affinity for E2F4, which is coupled with activation of muscle differentiation[J]. Molecular Biology, 2010, 44(2):89-90

(收稿日期:2013-02-22)

(修回日期:2013-03-25)

欢迎订阅

欢迎赐稿