

苦参碱联合化疗药物对人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖及侵袭力的影响

晁 荣 胡晓燕 朱生东 邓 伟 王 莉

(甘肃省妇幼保健院小儿综合内科,兰州,730050)

摘要 目的:探究苦参碱联合化疗药物对人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖及侵袭力的影响。方法:体外培养人急性髓系白血病 HL-60 细胞,苦参碱单药组以 1.0 g/L 苦参碱干预,三氧化二砷单药组以 3 $\mu\text{mol/L}$ 三氧化二砷处理,联合组以终浓度为 1.0 g/L 的苦参碱 + 3 $\mu\text{mol/L}$ 三氧化二砷处理,空白组以等量生理盐水处理。MTT 法检测 HL-60 细胞增殖情况,transwell 小室实验检测 HL-60 侵袭力,蛋白免疫印迹法检测 HL-60 细胞 MMPs 蛋白表达情况。结果:苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组 24 h PIR 分别为 $(18.54 \pm 2.54)\%$ 、 $(29.54 \pm 2.62)\%$ 、 $(41.45 \pm 3.72)\%$,48 h PIR 分别为 $(27.46 \pm 2.55)\%$ 、 $(38.93 \pm 3.76)\%$ 、 $(45.64 \pm 3.54)\%$,3 组内 HL-60 的 PIR 均随着培养时间的增加而增加,其中联合组 24 h、48 h PIR 均高于同时时间点的苦参碱单药组、三氧化二砷单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白组、苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组侵袭细胞分别为 (127.64 ± 23.93) 个、 (94.24 ± 15.23) 个、 (81.23 ± 12.21) 个、 (75.13 ± 10.69) 个,相对侵袭指数分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(73.44 \pm 0.34)\%$ 、 $(62.47 \pm 0.15)\%$ 、 $(58.54 \pm 0.36)\%$;MMP-2 蛋白相对表达量分别为 (0.91 ± 0.05) 、 (0.39 ± 0.04) 、 (0.23 ± 0.04) 、 (0.14 ± 0.03) ;MMP-9 蛋白相对表达量分别为 (0.62 ± 0.05) 、 (0.31 ± 0.05) 、 (0.27 ± 0.04) 、 (0.16 ± 0.02) 。与空白组比较,苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组侵袭细胞数量显著减少,相对侵袭指数及细胞中 MMP-2、MMP-9 相对表达量降低,且联合组均低于苦参碱单药组、三氧化二砷单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:苦参碱联合三氧化二砷通过下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达有效抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖及侵袭。

关键词 人急性髓系白血病;HL-60 细胞;凋亡;苦参碱;表达;机制

Effects of Matrine Combined with Chemotherapeutic Drugs on Proliferation and Invasion of Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells

Chao Rong, Hu Xiaoyan, Zhu Shengdong, Deng Wei, Wang Li

(Department of Pediatric Comprehensive Internal Medicine, Gansu Maternal and Child Health Hospital, Lanzhou 730050, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of matrine combined with chemotherapeutic drugs on the proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. **Methods:** Human acute myeloid leukemia HL-60 cells were cultured in vitro. Matrine monotherapy group was treated with 1.0 g/L matrine, arsenic trioxide monotherapy group with 3 mmol/L arsenic trioxide, combination group with 1.0 g/L matrine + 3 mmol/L arsenic trioxide, blank group with the same amount of saline. MTT assay was used to detect the proliferation of HL-60 cells, transwell chamber assay was used to detect the invasion ability of HL-60 cells, and Western blotting was used to detect the expression of MMPs in HL-60 cells. **Results:** The 24-hour PIR of matrine group, arsenic trioxide group and combination group were $(18.54 \pm 2.54)\%$ 、 $(29.54 \pm 2.62)\%$ 、 $(41.45 \pm 3.72)\%$ and 48-hour PIR were $(27.46 \pm 2.55)\%$ 、 $(38.93 \pm 3.76)\%$ 、 $(45.64 \pm 3.54)\%$. The PIR of HL-60 in the 3 groups increased with the increase of culture time. PIR of 24 h and 48 h in THE combination group was higher than that of matrine and arsenic trioxide at the same time point ($P < 0.05$). The number of invasive cells in the blank group, the matrine group, the arsenic trioxide group and the combination group were (127.64 ± 23.93) 、 (94.24 ± 15.23) 、 (81.23 ± 12.21) 、 (75.13 ± 10.69) , and the relative invasion index were (100.00 ± 0.00) 、 (73.44 ± 0.34) 、 (62.47 ± 0.15) 、 $(58.54 \pm 0.36)\%$, respectively. The relative expressions of MMP-2 were (0.91 ± 0.05) 、 (0.39 ± 0.04) 、 (0.23 ± 0.04) 、 (0.14 ± 0.03) , and the MMP-9 protein were (0.62 ± 0.05) 、 (0.31 ± 0.05) 、 (0.27 ± 0.04) 、 (0.16 ± 0.02) , respectively. Compared with the blank group, the number of invasive cells in matrine monotherapy group, arsenic trioxide monotherapy group and combination group decreased significantly, the relative invasion index and the relative expression of MMP-2 and MMP-9 protein in cells decreased, and the combined group was lower than matrine monotherapy group and arsenic trioxide monotherapy group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Matrine combined with arsenic trioxide can effectively inhibit the proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia HL-60 cells, and its mechanism may be related to the down-regulation of

MMP-2 and MMP-9 protein expression.

Key Words Human acute myeloid leukemia; HL-60 cells; Apoptosis; Matrine; Expression; Mechanisms

中图分类号:R284;R552 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.019

白血病是血液系统恶性肿瘤,与造血干细胞增殖失控、分化成熟受阻、正常程序凋亡失调等有关,目前化疗仍是其主要治疗手段,但由于化疗不良反应较大,治疗效果不佳,因此急需寻求更为安全有效的治疗方案^[1-2]。近年来从传统中草药中开发高效低毒的抗肿瘤活性成分已成为人们关注的焦点^[3]。苦参碱(苦参啶-15-酮)提取自豆科植物苦参(*Sophora flavescens*)的干燥根中,具有抗炎、抗病毒、强心、抗肝损伤、抗肝纤维化及抗肿瘤等多种生物活性,近年来有关苦参碱的抗肿瘤作用方面的研究日渐增多,但有关其抗肿瘤机制尚未完全阐明^[4-5]。本研究体外培养人急性髓系白血病 HL-60 细胞,观察苦参碱对细胞增殖、细胞凋亡及侵袭的影响,并探讨作用机制,为苦参碱在临床应用提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人急性髓系白血病 HL-60 细胞,购于中国医学院科学院血液学研究所。

1.1.2 药物 苦参碱注射液(陕西昂盛生物医药科技有限公司,生产批号:110805-200306);纯度 $\geq 98\%$;注射用三氧化二砷(北京双鹭药业有限公司产品,国药准字 H20080665)。

1.1.3 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基及 0.25% 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);二甲基亚砜、四甲基偶氮唑盐(美国 Sigma 公司);基质金属蛋白酶-2、9(MMP-2、MMP-9)多克隆抗体(英国 Abcam 公司)等。HERAcell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);LXJ-II 型超低温高速离心机(上海领成生物科技有限公司);JY-ZY3 型蛋白凝胶电泳转印系统(美国 Bio-Rad 公司);JYH27020 型电泳仪、Gel doc 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 HL-60 细胞以含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,置于恒温培养箱中培养(37℃,5% CO₂ 饱和湿度),待细胞形态良好,且处于生长对数期时进行实验研究。实验分为空白组、苦参碱单药组、三氧化二砷单药组和联合组。

1.2.2 干预方法 取生长至对数期形态较好的 HL-60 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,接种于

96 孔板,苦参碱单药组以 1.0 g/L 苦参碱干预,三氧化二砷单药组以 3 $\mu\text{mol/L}$ 三氧化二砷处理,联合组以终浓度为 1.0 g/L 的苦参碱 + 3 $\mu\text{mol/L}$ 三氧化二砷处理,空白组以等量生理盐水处理。

1.2.3 检测指标与方法 MTT 法^[6] 检测 HL-60 细胞增殖情况:空白组、苦参碱单药组、三氧化二砷单药组和联合组 HL-60 细胞培养经 1.2.2 方法干预 24、48 h 后,弃去每孔上清液,加 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液检测细胞增殖情况,采用酶标仪检测各孔吸光光度值($A_{490\text{ nm}}$),计算各组 HL-60 增殖抑制率(PIR) = (空白组 $A_{490\text{ nm}}$ - 实验组 $A_{490\text{ nm}}$) / 空白组 $A_{490\text{ nm}} \times 100\%$ 。

Transwell 小室实验检测 HL-60 细胞侵袭力:参照相关文献^[7] 检测 HL-60 细胞侵袭力,HE 染色后于光学倒置显微镜下观察并拍照,计数侵袭细胞数量,相对侵袭指数 = 干预组侵袭细胞数 / 空白组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

蛋白免疫印迹法(WB)^[8] 检测 HL-60 细胞 MMPs 蛋白表达情况:空白组、苦参碱单药组、三氧化二砷单药组和联合组经不同药物处理 48 h 后,收集细胞,提取细胞总蛋白,参照 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。经 10% 分离胶及 5% 浓缩胶行 SDS-PAGE,转膜,孵育抗体,最后于暗室中以 ELC 发光试剂盒显影,以 GADPH 为参照,采用 Bio-Rad 凝胶成像系统分析各组 MMP-2/MMP-9 蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞增殖的影响 苦参碱、三氧化二砷及联合用药均可抑制 HL-60 细胞增殖,3 组内 HL-60 的 PIR 均随着培养时间的增加而增加,其中联合组 24 h、48 h PIR 均高于同时时间点的苦参碱单药组、三氧化二砷单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞侵袭力的影响 与空白组比较,苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组侵袭细胞数量显著减少,相对侵袭指数降低,且联合组侵袭细胞数量及相对侵袭指数显著

低于苦参碱单药组、三氧化二砷单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表1 苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	24 h	48 h
空白组($n=24$)	—	—
苦参碱单药组($n=24$)	18.54 $\pm$ 2.54 *	27.46 $\pm$ 2.55 * Δ
三氧化二砷单药组($n=24$)	29.54 $\pm$ 2.62 *	38.93 $\pm$ 3.76 * Δ
联合组($n=24$)	41.45 $\pm$ 3.72	45.64 $\pm$ 3.54 Δ
注:与联合组比较, * $P < 0.05$; 与干预 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$; — 为无数据		

表2 苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞侵袭力的影响($\bar{x} \pm s$)		
组别	侵袭细胞数量(个)	相对侵袭指数(%)
空白组($n=24$)	127.64 $\pm$ 23.93	100.00 $\pm$ 0.00
苦参碱单药组($n=24$)	94.24 $\pm$ 15.23 * Δ	73.44 $\pm$ 0.34 * Δ
三氧化二砷单药组($n=24$)	81.23 $\pm$ 12.21 * Δ	62.47 $\pm$ 0.15 * Δ
联合组($n=24$)	75.13 $\pm$ 10.69 *	58.54 $\pm$ 0.36 *
注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与联合组比较, $\Delta P < 0.05$		

2.3 苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞 MMP-2/MMP-9 蛋白表达比较 空白组、苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组 MMP-2 蛋白相对表达量分别为(0.91 $\pm$ 0.05)、(0.39 $\pm$ 0.04)、(0.23 $\pm$ 0.04)、(0.14 $\pm$ 0.03); MMP-9 蛋白相对表达量分别为(0.62 $\pm$ 0.05)、(0.31 $\pm$ 0.05)、(0.27 $\pm$ 0.04)、(0.16 $\pm$ 0.02)。与空白组比较,苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组 MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量显著降低,且联合组 MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量低于苦参碱单药组、三氧化二砷单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

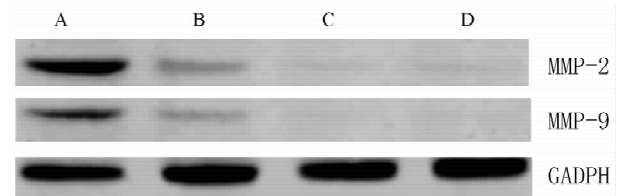


图1 蛋白免疫印迹(WB)法检测苦参碱联合化疗药物对 HL-60 细胞 MMP-2/MMP-9 蛋白表达的影响
注:A:空白组;B:苦参碱单药组;C:三氧化二砷单药组;D:联合组

3 讨论

白血病是一种严重危害人类健康的血液系统恶性肿瘤,其发病机制与肿瘤细胞增殖失控、凋亡抵抗效应相关,导致肿瘤形成^[9-10]。三氧化二砷作为一种有毒性的药物古代即用于治疗多种疾病,我国于20世纪70年代用于急性早幼粒细胞白血病的治

为急性早幼粒细胞白血病的一线治疗药物。三氧化二砷与其他药物无交叉耐药反应,主要通过诱导肿瘤细胞凋亡抑制肿瘤细胞的增殖,广泛用于淋巴瘤、多发性骨髓瘤及骨髓增生异常综合征等疾病的治疗中,近年来也逐渐用于治疗肝癌、胆囊癌、乳腺癌、神经母细胞瘤等恶性肿瘤;但应用中发现心脏毒性、肝脏毒性,胃肠道反应等不良反应大,因此探讨更佳的治疗方案,以降低三氧化二砷应用剂量及其不良反应是临床目前研究的热点^[11]。

苦参是豆科植物苦参的干燥根,别名为苦骨、牛参等,始载于《神农本草经》,列为中品。在梁代陶弘景的《本草经集注》中对苦参的原植物形态和分布进行了初步描述。明代李时珍在《本草纲目》曰:苦以味名,参以功名。苦参性寒味苦,归心、肝、胃、大肠和膀胱经;属于清热燥湿药,具有清热燥湿,杀虫,利尿的功效;用于便血,热痢,湿疹,湿疮,黄疸尿闭,阴肿阴痒,赤白带下等病症的治疗^[12-13]。苦参有效成分苦参碱具有广泛药理活性,研究报道,其抗肿瘤作用显著,可有效抑制肿瘤血管新生、抑制肿瘤细胞生长转移、诱导肿瘤细胞分化凋亡等^[14-16];苦参碱可通过显著下调肝癌细胞表皮生长因子受体表达而发挥抗肿瘤作用;通过下调B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白表达,上调Fas/FasL及Bcl-2相关X(Bax)蛋白表达,同时还可通过活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3、8(Caspase3、Caspase8)达到抑制骨肉瘤细胞增殖,诱导其凋亡。细胞无限增殖是恶性肿瘤细胞的重要生长特性之一,因此有效抑制肿瘤细胞生长是重要的抗肿瘤机制,也是抗肿瘤药物筛选的重要指标和途径。本研究中选取1.0 g/L的苦参碱联合3 μ mol/L三氧化二砷干预HL-60细胞,并与苦参碱、三氧化二砷单独用药进行比较,结果显示,3组内HL-60的PIR均随着培养时间的增加而增加,其中联合组24 h、48 h PIR均高于同时间点的苦参碱单药组、三氧化二砷单药组。提示苦参碱联合三氧化二砷对HL-60细胞增殖的抑制作用更强,优于单独用药。

肿瘤细胞侵袭及转移是一个复杂的过程,与肿瘤细胞及宿主微环境间的相互作用密切相关^[17-18]。MMPs是参与细胞外基质和基底膜降解的蛋白水解酶,MMP-2及MMP-9是MMPs家族中唯一可以降解IV型胶原的明胶酶类,MMP-2与MMPs结构上具有较大同源性,在肿瘤侵袭、转移过程中起关键作用,MMP-2的过度表达在多种肿瘤组织中均可检测出来,MMP-9可通过破坏基质降解平衡,促使癌细胞穿

越组织学屏障,促进肿瘤细胞侵袭其邻近周围组织及向远处正常组织转移^[19-20]。周剑等^[21]研究显示,苦参碱通过降低 COX-2 的蛋白和 mRNA 表达来抑制神经胶质瘤 U87 细胞的增殖和侵袭。李金州等^[22]的一项关于结肠癌体外实验研究结果显示,苦参碱可抑制结肠癌 SW480 和 SW480/M5 细胞的增殖和迁移侵袭力,可能与抑制 AKT/GSK3 β / β -catenin 信号通路有关。本研究结果中,与空白组比较,苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组侵袭细胞数量显著减少,相对侵袭指数降低,且联合组侵袭细胞数量及相对侵袭指数显著低于苦参碱单药组、三氧化二砷单药组。WB 检测可见,与空白组比较,苦参碱单药组、三氧化二砷单药组、联合组 MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量显著降低,且联合组 MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量低于苦参碱单药组、三氧化二砷单药组。表明苦参碱联合三氧化二砷可有效抑制 HL-60 细胞发生侵袭,可能与下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达。

综上所述,苦参碱联合三氧化二砷可有效抑制人急性髓系白血病 HL-60 细胞增殖及侵袭,其作用机制与显著下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,但有关其最佳应用剂量及其他促 HL-60 凋亡作用机制仍需进一步系统研究。

参考文献

- [1] 林鹏,姚海英,周伯良,等. IDA 联合 Ara-C 治疗初发急性髓系白血病对血清 sICAM-1、sVCAM-1 以及淋巴细胞亚群的影响[J]. 贵州医药,2018,42(5):533-536.
- [2] 齐兴菊,吴昌学. 康复新液治疗儿童急性淋巴细胞白血病化疗性口腔溃疡的临床疗效[J]. 贵州医科大学学报,2017,42(10):1176-1178,1195.
- [3] 朱文赫,陈丽红,许娜,等. 双氢青蒿素诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡及其分子机制研究[J]. 中国药理学杂志,2018,53(3):187-192.
- [4] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱的毒性研究进展[J]. 药物评价研究,2018,41(4):682-691.
- [5] 王珂欣,高丽,周玉枝,等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的 ¹H-NMR 代谢组学研究[J]. 中草药,2017,48(20):4275-4283.
- [6] 高平章,韩旭花,白赛赛,等. 汉黄芩素抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响急性白血病 HL-60 细胞增殖[J]. 泉州师范学院学报,2017,35(6):1-5.

- [7] 冯品,姚青林,王晓光,等. 三氧化二砷通过线粒体途径诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡[J]. 现代生物医学进展,2017,17(24):4621-4625.
- [8] 魏婧昕,丁兰,刘扬,等. Rabdosin B 对急性早幼粒白血病细胞 HL-60 分化的诱导作用[J]. 中草药,2018,49(11):2591-2600.
- [9] Farge T, Saland E, de Toni F, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism[J]. Cancer Discov,2017,7(7):716-735.
- [10] Brenner AK, Nepstad I, Bruserud Ø. Mesenchymal Stem Cells Support Survival and Proliferation of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells through Heterogeneous Molecular Mechanisms[J]. Front Immunol,2017,8:106.
- [11] 叶永斌,许晓军,陈艳红,等. 三氧化二砷联合阿克拉霉素对急性髓系白血病 KG-1a 细胞的协同杀伤效应[J]. 中华肿瘤杂志,2017,39(4):256-262.
- [12] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱的镇痛作用研究进展[J]. 药物评价研究,2018,41(5):904-911.
- [13] 卢迎宏,王丹,井海云. 苦参碱对 oxLDL 诱导的血管平滑肌细胞炎症反应及增殖凋亡的影响及分子机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(4):537-543.
- [14] 刘晶晶,牟艳玲. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中国药房,2017,28(19):2707-2711.
- [15] 王珂欣,高丽,周玉枝,等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的 ¹H-NMR 代谢组学研究[J]. 中草药,2017,48(20):4275-4283.
- [16] 李国慧,刘瑞花,李贵霞,等. 苦参碱抑制人骨肉瘤细胞 MG63 增殖的实验研究[J]. 河北医科大学学报,2014,35(2):162-165.
- [17] Díaz-Valdivia N I, Calderón C C, Díaz J E, et al. Anti-neoplastic drugs increase caveolin-1-dependent migration, invasion and metastasis of cancer cells[J]. Oncotarget,2017,8(67):111943-111965.
- [18] Kwak T, Drews-Elger K, Ergonul A, et al. Targeting of RAGE-ligand signaling impairs breast cancer cell invasion and metastasis[J]. Oncogene,2017,36(11):1559-1572.
- [19] Shen KH, Hung JH, Chang CW, et al. Solasodine inhibits invasion of human lung cancer cell through downregulation of miR-21 and MMPs expression[J]. Chem Biol Interact,2017,268:129-135.
- [20] Zou S, Yang J, Guo J, et al. RAD18 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell cancer via the JNK-MMPs pathway[J]. Cancer Lett,2018,417:65-74.
- [21] 周剑,曹爱玲,舒诚荣. 苦参碱对神经胶质瘤 U87 细胞增殖和侵袭的抑制作用研究[J]. 现代药物与临床,2017,32(7):1184-1187.

(2019-09-05 收稿 责任编辑:杨觉雄)