

· 论 著 ·

氧化苦参碱对 LoVo 细胞 Bcl-2、OCLN、TUBA1A mRNA 表达的影响

韩 凌¹, 彭 燕², 孙 静¹, 危建安¹

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 遵义医学院第五附属医院, 广东珠海 519100)

摘要:目的 探讨氧化苦参碱(OM)抑制人结肠癌 LoVo 细胞增殖和诱导凋亡的分子作用机制。方法 采用实时荧光定量 PCR 法以及免疫组化法检测 OM 对 LoVo 细胞凋亡相关以及细胞骨架相关的 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、微管蛋白 1A(TUBA1A)、咬合蛋白(OCLN)的基因及蛋白表达的影响。结果 OM 能显著抑制 LoVo 细胞增殖;可明显抑制 LoVo 细胞 Bcl-2 的 mRNA 以及蛋白的表达($P < 0.05$),抑制 TUBA1A mRNA 表达,同时上调 OCLN 蛋白的表达,但不能明显上调 OCLN mRNA 的表达。结论 OM 抑制 LoVo 细胞增殖,可能与下调 LoVo 细胞 Bcl-2、TUBA1A 表达以及上调 OCLN 表达有关。

关键词:肿瘤细胞, 培养的;细胞凋亡;细胞骨架;氧化苦参碱

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1805-03

Effects of oxymatrine on expressions of Bcl-2, OCLN and TUBA1A in human colon carcinoma LoVo cells

Han Ling¹, Peng Yan², Sun Jing¹, Wei Jianan¹

(1. The Second Clinical Hospital of Guangzhou Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. The Fifth Hospital of Zunyi Medicine College, Zhuhai, Guangdong 519100, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of oxymatrine (OM) on inhibiting proliferation and inducing apoptosis in human colon carcinoma LoVo cells. **Methods** Using fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry assay to detect the effects of OM on apoptosis and cytoskeleton-related molecular gene and protein expression, such as Bcl-2, OCLN, TUBA1A on LoVo cells. **Results** OM could inhibit LoVo cells proliferation and significantly inhibit Bcl-2 gene and protein expression on LoVo cells. OM could also significantly inhibit TUBA1A gene expression on LoVo cells. OM showed only a slight increase trend on OCLN gene expression, but with immunohistochemical assay OM could significantly increase the OCLN protein expression on LoVo cells. **Conclusion** The molecular mechanism of OM to inhibit tumor cell proliferation may be related to down-regulate Bcl-2 and TUBA1A expression while increased expression of OCLN on LoVo cells.

Key words: tumor cells, cultured; apoptosis; cytoskeleton; oxymatrine

氧化苦参碱(oxymatrine, OM)是豆科槐属植物苦参(*Sophora flavescens* Ait.)、苦豆子(*S. Alopecuroides* L.)、广豆根(*S. Subprostrata* Chun)等中草药的有效活性成分。体外和体内实验研究已表明,OM 对多种肿瘤细胞均具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用^[1-3]。以 OM 为主要成分的注射液具有明确的抗肿瘤作用,已广泛的应用于临床,但确切的分子机制并不明确。因 OM 可导致细胞形态及数量发生变化,作者推测 OM 的作用机制可能与影响肿瘤细胞凋亡及细胞骨架相关基因及蛋白表达有关。本研究选择人结肠癌 LoVo 细胞为研究对象,采用荧光定量 PCR 以及免疫组化法观察 OM 对 LoVo 细胞 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、微管蛋白 1A(tubulin alpha 1A, TUBA1A)、咬合蛋白(occludin, OCLN)等基因表达的影响,为 OM 在临床治疗上的应用提供实验依据。

1 材料与方

1.1 试剂与仪器 LoVo 细胞为武汉中国生物制品典藏中心保存,氧化苦参碱购于陕西一星生物制剂公司,胎牛血清购于美国 Invitrogen 公司,OCLN 抗体购于 Abcom 公司,Bcl-2 抗体、免疫组化试剂盒购于北京中衫金桥公司,MEM 培养液、PBS、0.25%胰蛋白酶购于美国 Invitrogen 公司,TRIzol 购于 Invitrogen 公司,PrimeScript™ RT reagent kit 和 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂购于大连 Takara 公司,荧光定量 PCR 仪购于

ABI 公司,高速冷冻离心机购于 Beckman 公司,CO₂ 培养箱购于 Thermo 公司,倒置显微镜购于日本 NIKON 公司,超净工作台购于新加坡 ESCO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与药物配制 人结肠癌 LoVo 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素),于 37 ℃、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱中培养,细胞消化采用 0.25%含 EDTA 胰蛋白酶。OM 采用无血清 MEM 配制浓度为 20 mg/mL 储存液,0.22 μm 一次性滤器过滤。-20 ℃避光保存备用。使用时配成终浓度为 2 mg/mL。

1.2.2 实验分组 实时荧光定量 PCR 实验分 3 组,分别是:空白对照组(不加任何药物)、高剂量 OM 组(2 mg/mL)及 TNF-α 组(100 ng/mL);免疫组化检测分为 3 组,分别是:空白对照组(不加任何药物)、高剂量 OM 组(2 mg/mL)及低剂量 OM 组(1 mg/mL)。各组均在细胞培养 24 h 后加药,加药后继续培养 24 h 或 48 h,进行实验。

1.2.3 mRNA 表达检测 每组设 3 个复孔,加药培养 24 h 后,弃去培养液,用预冷的 PBS 洗涤 1 次,弃去 PBS 后加入 1 mL TRIzol 并收集细胞,按说明书操作提取总 RNA,用紫外分光光度计测定 260 nm 及 280 nm 处吸光度值(A₂₆₀、A₂₈₀),计算 RNA 样品的纯度和浓度。按操作说明书合成 cDNA。

表 1 实验所用引物

引物名称	序列	扩增片段长度(bp)
Bcl-2	上游 5'-TGT TGT TCA AAC GGG ATT CA-3'	154
	下游 5'-GGC TGG GCA CAT TTA CTG TT-3'	
OCLN	上游 5'-CAC TTC TAC AAA TGG ACC TCT CCT-3'	149
	下游 5'-CCT ACA CTA CCT CCT AAA AGG GAA G-3'	
TUBA1A	上游 5'-GTC ATA GAT GGC CTC ATT GTC TAC-3'	139
	下游 5'-CAA GCT GGA GTT CTC TAT TTA CCC-3'	
GAPDH	上游 5'-GGC CTC CAA GGA GTA AGA CC-3'	147
	下游 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'	

按照 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂说明进行实时荧光定量 PCR 反应,反应体系 20 μ L,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,40 个循环,每份样品做复孔。mRNA 相对表达量用比较 Ct 值法计算,以看家基因 GAPDH 为内参,用看家基因和靶基因 Ct 值差 (Δ Ct) 计算靶基因相对看家基因 GAPDH 表达量 $[1/(2^{\Delta Ct})]$,与空白对照组比较,计算其他各组 mRNA 的相对表达量(Ratio)。引物应用 Invitrogen 公司在线软件 Oligo PerfectTM Designer 设计,用 BLAST 进行比对,由 Invitrogen 公司合成,实验用引物相关情况见表 1。

1.2.4 免疫组化检测 按试剂盒说明书进行。4%多聚甲醛固定细胞后自然吹干,加 1~2 滴 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,PBS 洗 3 次,每次 2 min;将玻片吹干,每张玻片上滴加 100 μ L $\times$ 1/100 Bcl-2,4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜;第 2 天取出,PBS 洗 3 次,每次 2 min,加 PV-6000 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 2 min;加 DAB 显色,流水清洗,晾干;中性树胶固定;显微镜观察拍照。显色为棕色颗粒时表示特异蛋白阳性表达。

1.3 统计学处理 特异基因 mRNA 表达结果采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 相关基因的特异性引物溶解曲线及扩增曲线 基因扩增后,Bcl-2、OCLN、TUBA1A 和 GAPDH 基因扩增产物的溶解曲线、扩增曲线见图 1、2。各基因扩增曲线均呈明显的 S 型曲线,扩增产物的溶解曲线均为特异高尖的信号峰,说明扩增产物单一,无非特异性扩增片段。

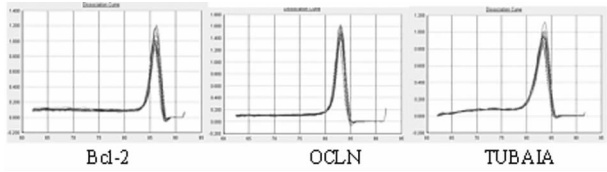


图 1 各基因扩增产物的溶解曲线

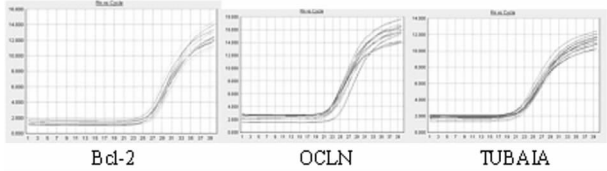


图 2 各基因扩增产物的扩增曲线

2.2 OM 对 LoVo 细胞 Bcl-2、OCLN、TUBA1A mRNA 表达

的影响 加药培养 24 h 后,高剂量 OM 组 Bcl-2、TUBA1A mRNA 明显下调,与空白对照组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05);OCLN 有上调趋势,但与空白对照组相比,差异无统计学意义(*P*>0.05)。TNF- α 组 Bcl-2、OCLN、TUBA1A mRNA 表达的作用趋势与高剂量 OM 组一致,但与空白对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

表 2 OM 对 LoVo 细胞 Bcl-2、OCLN、TUBA1A mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	Bcl-2	OCLN	TUBA1A
空白对照组	1.285 $\pm$ 0.224	1.93 $\pm$ 0.722	1.135 $\pm$ 0.116
高剂量 OM 组	0.799 $\pm$ 0.139*	2.666 $\pm$ 0.869	0.616 $\pm$ 0.022*
TNF- α 组	1.002 $\pm$ 0.054	2.788 $\pm$ 0.515	0.998 $\pm$ 0.104

*:*P*<0.05,与空白对照组相比。

2.3 OM 对 Bcl-2 蛋白表达的影响 Bcl-2 主要表达于 LoVo 细胞的细胞质,空白对照组细胞数量较多,胞质内可见明显棕色染色;加药培养 24 h 后,低剂量 OM 组 LoVo 细胞数量明显减少,与空白对照组比较,胞质内仅见浅黄棕色染色;高剂量 OM 组仅见少量 LoVo 细胞留存,棕色颗粒表达明显下调。研究结果表明 OM 可明显下调 LoVo 细胞 Bcl-2 蛋白的表达。见封 2 图 3。

2.4 OM 对 OCLN 蛋白表达的影响 选取高、低剂量 OM,分别作用 LoVo 细胞 24、48 h,观察 OM 对 OCLN 蛋白表达的影响,结果见封 2 图 4 及插 I 图 5。OCLN 主要表达于 LoVo 细胞膜上及胞质内。空白对照组 LoVo 细胞 OCLN 表达较少。加药培养 24 h 后,低剂量 OM 组可见 OCLN 表达明显增多,细胞内棕色颗粒明显增多,染色加深;随着 OM 剂量的加大,细胞染色也逐渐加深。加药培养 48 h 后,高、低剂量 OM 组细胞数量相对于空白对照组明显减少,而细胞膜和细胞质内棕色颗粒随剂量增加而逐渐增加。研究表明,OM 可明显上调 LoVo 细胞 OCLN 蛋白的表达。

3 讨 论

3.1 OM 对 LoVo 细胞 Bcl-2 基因及蛋白表达的影响 人的 Bcl-2 基因是从大多数滤泡型非霍奇金 B 细胞淋巴瘤中分离获得的。1988 报道 Bcl-2 基因可使细胞存活时间延长。1990 年进一步确证 Bcl-2 基因具有抗细胞凋亡的功能后,Bcl-2 基因作为重要的凋亡抑制基因,在多种肿瘤中得到证实。近年来的研究表明,Bcl-2 基因的异常表达,与肺癌的发生、发展、预后以及

肿瘤耐药密切相关^[4]。徐康等^[5]发现羟喜树碱可诱导结肠癌 LoVo 细胞凋亡,同时下调 Bcl-2 基因的表达,从而起到抗结肠癌细胞的作用。研究表明,OM 可下调 Bcl-2 基因表达;同时用免疫组化方法进一步证实 OM 可下调 Bcl-2 蛋白表达,提示 OM 诱导 LoVo 细胞凋亡与影响 Bcl-2 基因与蛋白表达有关。

3.2 OM 对结肠癌 LoVo 细胞 TUBA1A 基因及蛋白表达的影响 肿瘤细胞的运动能力是浸润和转移的先决条件。细胞骨架被认为是生长因子参与和作用的多种细胞反应的最初靶结构。作为细胞骨架主要成分之一的微管,在细胞形态的维持、细胞运动以及在细胞分裂过程中发挥重要作用。目前在真核生物中已经确定的微管蛋白有 7 种,其中 α -tubulin 和 β -tubulin 是微管结构的主要组成,在真核生物细胞中普遍存在,并且高度保守性^[6]。研究表明,tubulin 表达在非小细胞肺癌(NSCLC)中增高可能表示预后不良,而且微管蛋白是紫杉醇作用的位点,与紫杉醇的获得性耐药也密切相关。tubulin 的表达与紫杉醇化疗敏感性相关,tubulin 表达降低则对紫杉醇敏感性增加^[7-8]。本实验发现 OM 可明显下调 TUBA1A mRNA 表达,推测 OM 可能通过影响 TUBA1A 表达而影响 LoVo 细胞的形态以及运动能力。而 OM 能否提高 LoVo 细胞对紫杉醇的敏感性仍需进一步研究。

3.3 OM 对结肠癌 LoVo 细胞 OCLN 基因及蛋白表达的影响 肿瘤细胞从原发部位解离是肿瘤侵袭、转移过程的第 1 个及重要环节。而明确细胞解离机制则有利于阐明肿瘤侵袭转移的机制,并探索限制癌症侵袭转移的治疗新方法。紧密连接是细胞间连接处的复杂结构,在细胞间黏着等生理学功能方面起重要作用。紧密连接与细胞癌变有关,在上皮衍生癌中经常可发现紧密连接结构缺失。电子显微镜证实,紧密连接在细胞癌变中逐渐减少。OCLN 是被克隆的紧密连接的第 1 个转膜蛋白,其不仅是紧密连接的结构成分,同时也是功能成分。OCLN 作为紧密连接的重要转膜蛋白可能在细胞解离过程中起重要作用^[9]。OCLN 在胃肠分化腺癌中的表达水平与正常上皮细胞一致,但在低分化腺癌中表达水平显著降低^[10]。朱光能等^[11]运用免疫组化技术检测 OCLN 在人肝细胞癌中的表达,并分析 OCLN 表达与肝癌发生、发展的关系。结果表明 OCLN 主要定位于肝细胞膜,肝细胞癌与癌旁肝组织相比,OCLN 表达阳性率及其强度均明显下降,其改变在肝细胞癌的发生发展中可能起重要作用。本研究发现 OM 可上调 OCLN 基因表达,采用免疫组化方法进一步证实 OM 可上调 OCLN 蛋白表达,本研究结果提示,OM 可能通过影响 OCLN 的基因与蛋白的表达,从而恢复肿瘤细胞中被破坏的紧密连接,影响肿瘤细胞的迁移,而起到抗肿瘤的作用。

综上所述,OM 抑制 LoVo 细胞增殖的作用,可能与下调

细胞 Bcl-2 基因和蛋白表达有关。另外,OM 也可能通过下调 TUBA1A,上调 OCLN 基因表达,从而影响 LoVo 细胞的形态、细胞周期以及运动与迁移的能力,而发挥抗癌的作用。

参考文献:

- [1] 张于人,朱金水,王小银,等. 氧化苦参碱注射液联合小剂量紫杉醇对人胃癌 SGC-7901 细胞血管内皮生长因子及 CXCR4 趋化因子受体 4 表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2010,8(11):1029-1035.
- [2] 张琼,潘平东. 氧化苦参碱对人卵巢癌 HO-8910 细胞的作用及其机制的初步研究[J]. 医学信息, 2010,23(18):3381-3383.
- [3] 万旭英,罗明,贺平,等. 苦参碱和氧化苦参碱体外对人肝癌细胞的诱导分化作用[J]. 中国药理学通报, 2009,25(7):977-979.
- [4] 孟潘庆,胡国强. BCL-2 基因研究进展[J]. 山东医药, 2000,40(23):54-56.
- [5] 徐康,范钰,林庚金. 羟喜树碱对结肠癌 LoVo 细胞凋亡及 bcl-2、p53 基因表达的影响[J]. 上海医学, 2002,25(10):642-644.
- [6] 盖领,茅国新. ERCC1、RRM1、 β -tubulin Ⅲ 在非小细胞肺癌化疗中作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2011,40(1):91-93.
- [7] Dumontet C, Isaac S, Souquel PJ, et al. Expression of class Ⅲ beta tubulin in non small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy[J]. Bull Cancer, 2005,92(2):25-30.
- [8] 杜亚明,王宝华,王天一,等. NSCLC 组织中 β -微管蛋白 Ⅲ、stathmin 蛋白表达变化及意义[J]. 山东医药, 2010,50(38):18-20.
- [9] 周磊,谭晓冬,王巍,等. 胰腺癌细胞解离中 occludin 和 MEK/ERK 信号通路的作用[J]. 外科理论与实践, 2010,15(2):153-159.
- [10] Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, et al. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract[J]. Am J Pathol, 1997,151(1):45-54.
- [11] 朱光能,承泽农,桂淑玉,等. Occludin 表达与人肝细胞癌发生和发展的关系[J]. 蚌埠医学院学报, 2004,29(4):286-288.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-03-06)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。