

穿心莲内酯对人舌鳞癌 Tca8113 细胞增殖和凋亡的影响

涂玉绮,唐维平[△]

(南昌大学第二附属医院口腔科,南昌 332300)

摘要:目的 研究穿心莲内酯(AD)对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖、周期和 *Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达的影响。方法 采用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度的 AD 对 Tca8113 细胞增殖的抑制作用;通过流式细胞仪分析 AD 作用 Tca8113 细胞后细胞周期的变化;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 AD 对人舌鳞癌 Tca8113 细胞 *Bax*、*Bcl-2* mRNA 的表达的影响。结果 AD 能抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖,细胞半数致死值(IC50)为 74.66 $\mu\text{g/mL}$,且具有明显的剂量时间依赖性;镜下见凋亡细胞形态学特征;随着 AD 浓度的升高与作用时间的延长,细胞周期中 G_0/G_1 期细胞比例由 $(39.45 \pm 0.65)\%$ 上升至 $(63.70 \pm 0.65)\%$,S 期细胞比例由 $(56.55 \pm 0.64)\%$ 下降至 $(32.28 \pm 0.54)\%$,对细胞 G_0/G_1 期的阻滞作用差异有统计学意义($P < 0.01$)。AD 作用于人舌鳞癌 Tca8113 细胞后,*Bax* mRNA 表达量增加,*Bcl-2* mRNA 表达量下调。结论 AD 对人舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖有明显的抑制作用,并能诱导舌鳞癌细胞凋亡,为临床上舌鳞癌的治疗提供了新的思路。

关键词:穿心莲内酯;舌肿瘤;细胞周期;噻唑蓝法;逆转录-聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)14-1741-03

Proliferation inhibition and apoptosis of human tongue cancer cell line Tca8113 by andrographolide

Tu Yuqi, Tang Weiping[△]

(Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 332300, China)

Abstract: Objective To explore the effects of andrographolide(AD) on proliferation inhibition, cells cycle distribution and the expression of *Bax* and *Bcl-2* mRNA in human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells. **Methods** MTT was used to measure the levels of the proliferation of Tca8113 cells cultured with different concentraions of AD. Cell cycles were analyzed by flow cytometry. RT-polymerase chain reaction(RT-PCR) technique was used to evaluate *Bcl-2* mRNA and *Bax* mRNA expression. **Results** Andrographolide inhibited Tca8113 cells growth in a time and dose-dependent manner, the IC50 was 74.66 $\mu\text{g/mL}$. A feature of apoptosis was observed under microscope. With a increase in concentration and increase in time, the cells in G_0/G_1 phase increased from $(39.45 \pm 0.65)\%$ to $(63.70 \pm 0.65)\%$, the cells in S phase decreased from $(56.55 \pm 0.64)\%$ to $(32.28 \pm 0.54)\%$. Statistics showed tha the cells arrested in G_0/G_1 phase. It was statistically significant in comparison with the control group($P < 0.01$). AD could up-regulate the experssion of *Bax* mRNA, and AD could down-regulate the experssion of *Bcl-2* mRNA. **Conclusion** Andrographolide inhibited the growth of Tca8113 cells and increased the cell apoptosis. It may be promising as a new drug for treatment of tongue squamous cell carcinoma.

Key words: andrographolide; tongue neoplasms; cell cycle; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; reverse transcription PCR

目前,舌鳞癌在口腔恶性肿瘤中的发病率最高,其生长快,浸润性强,恶性程度高,且转移高,预后较差^[1]。近年来中草药中的抗肿瘤药物成为了研究的热点^[2]。穿心莲是一种爵科植物,现已有许多国家在研究使用。穿心莲的主要活性成分有二萜内酯类,黄酮类和多酚类物质^[3-5]。穿心莲内酯(andrographolide,AD)是穿心莲中的二萜内酯类化合物,不仅有抗炎、抗菌、抗病毒和免疫调节作用外,还表现出较强的抗肿瘤作用^[6-7]。AD对舌鳞癌作用效果尚未见报道,本研究旨在检测AD对舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖、细胞周期和 *Bax*、*Bcl-2* mRNA 表达的影响。

1 材料与方

1.1 试剂与仪器 AD 购于上海源叶生物科技有限公司,RP-MI-1640、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)均购于北京索来宝科技公司,凯基细胞 DNA 含量检测试剂盒购于凯基生物公司,Trizol RNA 提取液、RNA 逆转录试剂盒购于 Takara 公司,PCR 引物由南昌赛尔科学仪器有限

公司长城生物试剂部设计合成。酶标仪(Dencey Dragon,芬兰),Biofuge primo 台式低温高速离心机(赛默飞世尔科技公司,美国),MyCycler 型 PCR 仪(Bio-RAD,美国),DYCP-31C 型电泳仪(北京六一仪器厂生产),流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人舌鳞癌 Tca8113 细胞为本科室传代保株。细胞在常规条件下培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 镜下观察细胞形态 各组细胞(加入 AD)分别培养 24 h 和 48 h 后,观察 Tca8113 细胞形态。

1.2.3 MTT 法检测 AD 对细胞的增殖抑制 将 Tca8113 细胞按每孔 1×10^4 个细胞接种到 2 块 96 孔培养板,每孔 200 μL ,孵育箱内培养 24 h。试验设阴性对照组、DMSO 溶剂对照组、给药组。给药组分别加入浓度为 0、10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 的 AD(用 DMSO 溶解,终浓度小于或等于 0.5%) 200 μL ,每组 6 个复孔,分别培养 24、48 h 后,每孔加入 MTT 液 20 μL (5 mg/mL),再培养 4 h,吸尽上清液加入 150 μL DM-

SO, 37 °C 下震荡 10 min, 上酶标仪检测, 设定波长为 492 nm 的光密度吸收值, 计算细胞的增殖抑制率和 IC₅₀ 值。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 给药组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%, 实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期的分布 将 Tca8113 细胞按每个孔 5×10^5 个置于 2 块 6 孔板中, 培养 24 h。设对照组和给药组, 给药组加入 AD(终浓度分别为 20、40 μg/mL, 分别命名 20、40 μg/mL 给药组)。分别培养 24 h 和 48 h 后, 用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶 2.5 g/L 消化, 制成单细胞悬浮液。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 70% 的乙醇固定, 离心, 洗涤, 加入 100 μL 37 °C 水浴 30 min, 再加入 400 μL 碘化丙啶(PI) 4 °C 避光 30 min, 上流式细胞仪检测。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 将 Tca8113 细胞按每个培养皿 1×10^6 个置于 5 个 6 cm² 的培养皿中。细胞培养 24 h 贴壁后, 设对照组和给药组, 给药组加入 AD(终浓度分别为 5、10、20、40 μg/mL)。培养 24 h 后, 采用 Trizol 法提取总 RNA。紫外分光光度法测定 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值及含量, 用无核酸酶水将各组总 RNA 调整至同一浓度。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 得到 cDNA。β-actin 上游引物 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC -3', 下游引物 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3', 扩增长度为 443 bp; Bax 上游引物 5'-AGG ATG ATT GCC GCC GTG GA-3', 下游引物 5'-CAC CAC TGT GAC CTG CTC CAG A-3', 扩增产物长度为 365 bp; Bcl-2 上游引物 5'-TGG CCC CCG TTG CTT TTC CT-3', 下游引物 5'-AAG CTC CCA CCA GGG CCA AA-3', 扩增产物长度为 714 bp。热循环参数: β-actin 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min; Bax 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 8 min。Bcl-2 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。取 PCR 产物 5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统照相。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 Tca8113 细胞形态学变化 倒置显微镜下见对照组细胞生长旺盛, 贴壁生长, 呈多角形, 形态饱满, 加入不同浓度的 AD 后, 部分细胞体积变小, 变圆, 脱壁细胞增多并漂浮在培养基中。

2.2 AD 对 Tca8113 细胞增殖的抑制作用 细胞的抑制率随着 AD 浓度的增加而升高, 存在剂量依赖性 ($P < 0.01$); 随着作用时间的延长, 同一浓度的 AD 对舌鳞癌细胞的抑制率升高, 具有时间依赖性 ($P < 0.05$)。细胞加 AD 培养 24 h 后的细胞半数致死值(IC₅₀)为 74.66 μg/mL, 见表 1。

2.3 AD 对 Tca8113 细胞周期分布的影响 不同浓度的 AD 分别作用 24 h 和 48 h 后 Tca8113 细胞周期分布结果见表 2、3, 图 2、3。结果显示在相同的时间内, 随着 AD 浓度的升高, G₀/G₁ 期细胞比例有明显上升 ($P < 0.01$), S 期细胞比例明显下降 ($P < 0.01$); 在相同浓度的 AD 的作用下, 随着作用时间的延长, G₀/G₁ 期细胞比例明显上升, 而 S 期细胞比例明显下降, 而对照组细胞周期随时间的变化细胞周期分布变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$), AD 能使 Tca8113 细胞周期阻滞于

G₀/G₁ 期, 且表达出明显的剂量和时间依赖性。

2.4 RT-PCR 检测结果 结果显示随着 AD 浓度的增加, Tca8113 舌癌细胞中 Bax mRNA 的表达水平逐渐增加; 而 Bcl-2 mRNA 的表达量逐渐降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4, 图 4。

表 1 不同浓度穿心莲内酯对舌癌细胞抑制率($\bar{x} \pm s, n=6$)

AD 浓度(μg/mL)	抑制率(%)	
	24 h	48 h
0	0	0
10	2.37 ± 0.19	11.37 ± 1.01
20	11.34 ± 1.01	27.43 ± 1.93
40	36.65 ± 1.99	46.08 ± 3.28
80	49.61 ± 3.34	65.59 ± 6.33
160	72.11 ± 5.01	79.47 ± 7.33

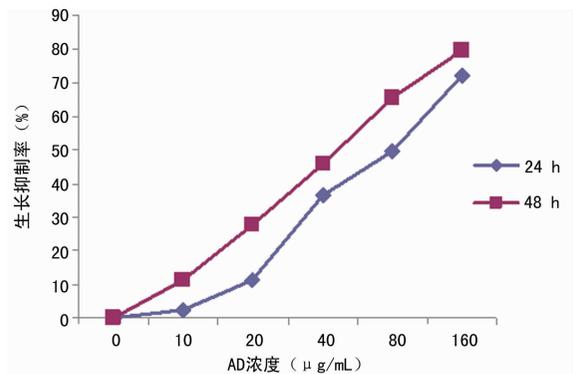


图 1 AD 对 Tca8113 细胞增殖的抑制作用

表 2 不同浓度 AD 作用 24 h Tca8113 舌癌细胞周期分布($\bar{x} \pm s, n=3$)

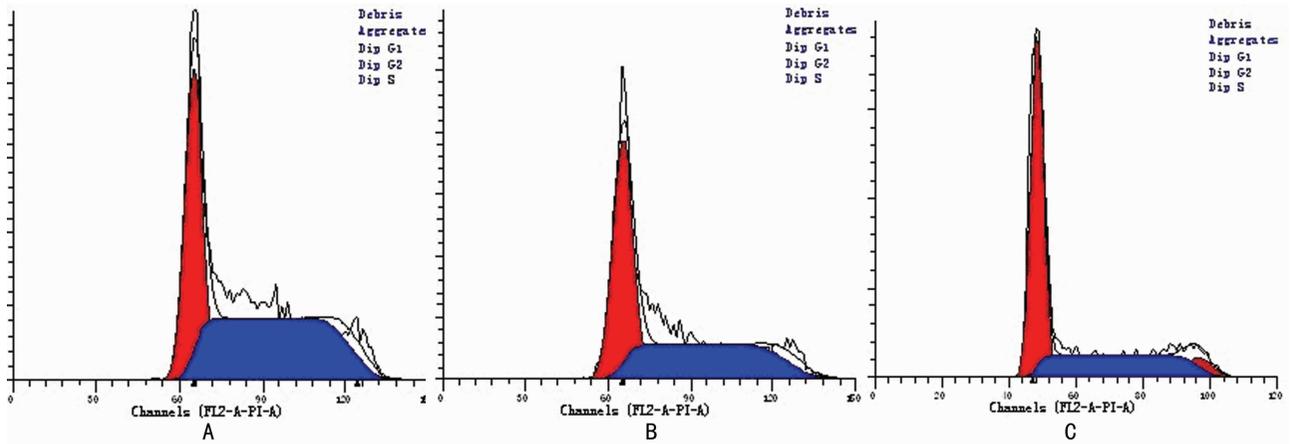
浓度(μg/mL)	细胞周期(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0(对照组)	39.45 ± 0.56	56.55 ± 0.53	4.00 ± 0.08
20	49.10 ± 0.81	46.57 ± 0.60	4.32 ± 0.23
40	56.61 ± 0.64	36.86 ± 0.73	6.53 ± 0.17

表 3 不同浓度 AD 作用 48 h Tca8113 舌癌细胞周期分布($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度(μg/mL)	细胞周期(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0(对照组)	40.16 ± 1.03	58.21 ± 0.75	1.52 ± 0.38
20	57.34 ± 0.65	37.23 ± 0.76	5.43 ± 0.21
40	63.70 ± 0.65	32.28 ± 0.54	4.02 ± 0.12

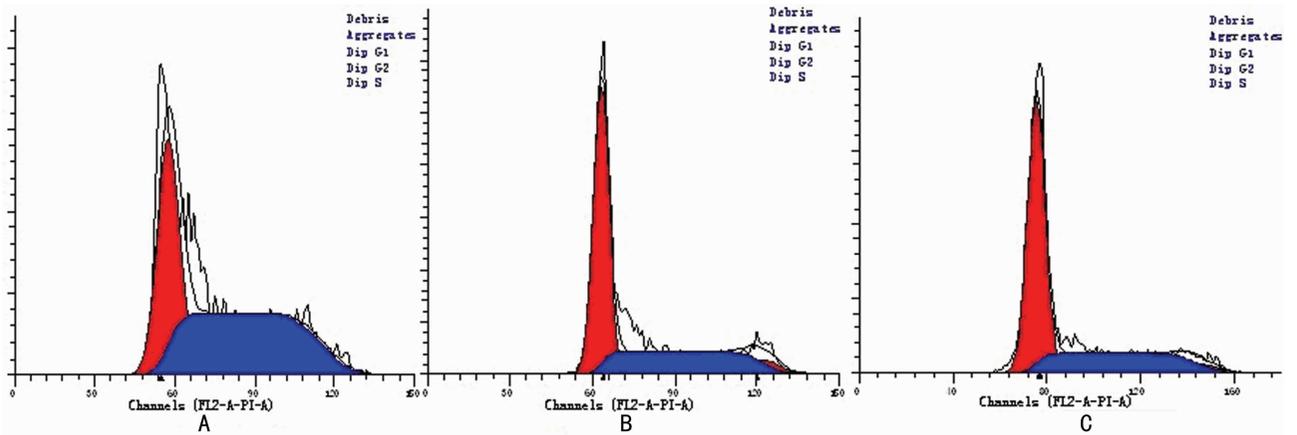
表 4 不同 AD 浓度作用 24 h 后对细胞 Bax、Bcl-2 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

AD 浓度(μg/mL)	Bax	Bcl-2
0(对照组)	0.383 ± 0.013	1.137 ± 0.016
5	0.513 ± 0.021	0.913 ± 0.025
10	0.631 ± 0.036	0.570 ± 0.030
20	0.733 ± 0.042	0.403 ± 0.032
40	0.916 ± 0.048	0.333 ± 0.025



A: 对照组; B: 20 μg/mL 给药组; C: 40 μg/mL 给药组。

图 2 AD 作用 24 h 后对细胞周期的影响



A: 对照组; B: 20 μg/mL 给药组; C: 40 μg/mL 给药组。

图 3 AD 作用 48 h 后对细胞周期的影响

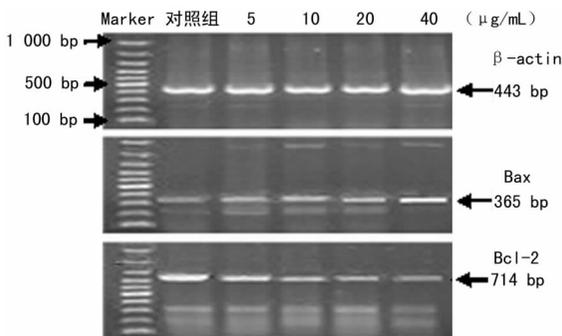


图 4 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

3 讨论

舌癌的治疗手段目前是以手术为主,放化疗为辅的综合治疗^[1]。化疗为一种全身性的治疗手段,越来越受到肿瘤学界的重视,近年来中草药中的抗肿瘤药物成为研究的热点^[2,8]。

MMT 法是一种检测细胞存活和生长的方法,已广泛用于大规模的抗肿瘤药物筛选^[9]。它的特点是灵敏度高、重复性好、操作简单、经济快速^[9]。本实验中采用 MTT 法对 AD 抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞增殖的作用进行了测定并求出各浓度 AD 对人舌鳞癌细胞的抑制率,发现 AD 能够明显的抑制人舌鳞癌细胞的增殖。随着药物浓度的增加和作用时间的延长,抑制率逐渐的增大,具有明显的时间-剂量效应。

细胞增殖周期分为有丝分裂期(M 期)和间期(G₁ 期、S 期和 G₂ 期),有丝分裂结束后暂时处于静止状态的细胞为 G₀ 期。G₀/G₁、G₁/S、G₂/M 是细胞周期的检测点,能修复受损的细胞,不能修复的细胞则发生凋亡。研究发现肿瘤细胞能跨过检测点不进行细胞修复,进入周期下一阶段,使凋亡受阻^[10-11]。本实验中舌癌细胞在不同浓度的 AD 作用下,分别培养 24、48 h,实验组细胞随着 AD 浓度的升高与作用时间的延长,细胞周期中 G₀/G₁ 期细胞比例由 (39.45±0.65)% 上升至 (63.70±0.65)%,S 期细胞比例由 (56.55±0.64)% 下降至 (32.28±0.54)%,而对照组在不同的时间里细胞周期的分布变化不大(P>0.05),显示 AD 能阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,使细胞不能进入 S 期和 G₂/M 期进行 DNA 合成和细胞分裂,从而导致细胞不能进入下一个周期,成为细胞凋亡一个因素。

肿瘤的发生不仅与细胞增殖有关,而且与细胞凋亡有关。细胞凋亡由基因调控,是一个主动而有序的细胞自我消亡过程^[12]。研究发现 Bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质,Bcl-2 是细胞内的抗凋亡基因,能够阻止细胞凋亡进程;Bax 是 Bcl-2 家族中的促凋亡基因,发挥促凋亡作用^[13-15]。实验采用 RT-PCR 法检测 AD 对人舌鳞癌 Tca8113 细胞 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达的影响。分析结果显示 AD 作用 24 h 后,Bax mRNA 的表达量显著升高,并随着浓度的增加而升高;Bcl-2 mRNA 的表达量显著降低,并随着浓(下转第 1746 页)

- Dtsch Arztebl Int, 2013, 110(20): 347-353.
- [3] Ross JL, Quigley CA, Cao D, et al. Growth hormone plus childhood low-dose estrogen in Turner's syndrome[J]. N Engl J Med, 2011, 364(13): 1230-1242.
- [4] Blum WF, Ross JL, Zimmermann AG, et al. GH treatment to final height produces similar height gains in patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(8): E1383-1392.
- [5] Panayotova R, Brooks R, Borg A, et al. No late effects of growth hormone exposure on ventricular mass and function in patients with Turner's syndrome[J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2013, 15(1): 1-2.
- [6] Nahata L, Rosoklija I, Yu RN, et al. Klinefelter syndrome: are we missing opportunities for early detection? [J]. Clin Pediatr(Phila), 2013, 52(10): 936-941.
- [7] Sahin FI, Yilmaz Z, Yuregir OO, et al. Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility[J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(5): 191-195.
- [8] Dong Y, Jiang YT, Du RC, et al. Impact of chromosomal heteromorphisms on reproductive failure and analysis of 38 heteromorphic pedigrees in Northeast China[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(2): 275-281.
- [9] Mierla D, Stoian V. Chromosomal polymorphisms involved in reproductive failure in the romanian population[J]. Balkan J Med Genet, 2012, 15(2): 23-28.
- [10] 李春燕, 明蕾, 张露, 等. 染色体异常中的复发性流产染色体核型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(4): 64-65, 41.
- [11] Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, et al. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in southern region of India: report and review[J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(2): 145-149.
- [12] 楚伟, 郭文潮, 王方娜, 等. 石家庄地区 1513 对自然流产夫妇的细胞遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2013, 30(1): 121-122.
- [13] 王卫红, 李红玉, 贺骏, 等. 长沙地区 24 例染色体平衡易位的临床分析与遗传咨询[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(8): 37-38.
- [14] 王昊. 两条染色体平衡易位携带者配子类型的理论分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(5): 1-2, 8.
- [15] 李刚, 孙莹璞, 金海霞, 等. 胚胎染色体非整倍体筛查用于平衡易位携带者植入前的遗传学诊断[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(1): 32-35.

(收稿日期: 2013-11-16 修回日期: 2014-03-21)

(上接第 1743 页)

度的增加而降低。从而说明 AD 诱导细胞凋亡可能与 Bcl-2/Bax 的表达有密切的关系。

本实验结果提示 AD 能抑制舌鳞癌细胞的增殖、改变细胞周期的分布, 并且 AD 诱导细胞凋亡还可能与通过调节 Bcl-2/Bax 的表达有关, 为临床上舌癌的治疗提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 贾琼. 舌癌的综合治疗现状[J]. 辽宁医学院学报, 2011, 32(3): 280-282.
- [2] Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs [J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(12): 767-776.
- [3] Chao WW, Lin BF. Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian) [J]. Chin Med, 2010, 5(1): 17.
- [4] Rao KY, Vimalamma G, Rao CV, et al. Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata* [J]. Phytochemistry, 2004, 65(16): 2317-2321.
- [5] Xu C, Chou GX, Wang ZT. A new diterpene from the leaves of *Andrographis paniculata* Nees [J]. Fitoterapia, 2010, 81(6): 610-613.
- [6] 杨琼, 李曙光, 董建华, 等. 穿心莲内酯及其衍生物的抗肿瘤作用及机制[J]. 山东医药, 2009, 49(12): 108-109.
- [7] 杨静. 穿心莲内酯的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1168-1170.
- [8] 邱蔚六, 郑家伟. 应重视口腔颌面部恶性肿瘤的综合序治疗[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2005, 3(3): 179-182.
- [9] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 2 版. 西安: 世界图书出版西安公司, 2006: 200.
- [10] Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, et al. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2007, 8(6): 377-397.
- [11] 陈文娟, 陈燕, 吴裕丹, 等. 姜黄素调节 HL-60 细胞周期蛋白表达的研究[J]. 临床血液学杂志, 2001, 14(5): 215-217.
- [12] 杨志杰, 李秀丽. 中医药诱导细胞凋亡治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(1): 18-20.
- [13] Choi BH, Kim W, Wang QC, et al. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells [J]. Cancer Lett, 2008, 261(1): 37-45.
- [14] 杨连君. Bcl-2, Bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.
- [15] Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and Bax with apoptosis in human pituitary adenomas [J]. Pituitary, 2003, 6(3): 127-133.

(收稿日期: 2013-12-28 修回日期: 2014-03-25)