

苦参碱对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤细胞凋亡及 对 FAS/FASL 信号途径的影响

黄光弦,赵蕊,卢相,王淑美*

重庆医科大学中医药学院,重庆 400016

摘要:本研究探讨苦参碱对肉瘤小鼠肿瘤生长和凋亡的影响,及其对 FAS/FASL 信号途径的影响。建立 S₁₈₀ 肉瘤小鼠模型,30 只小鼠分为 5 组,每组 6 只,分为对照组,10 mg/kg 苦参碱、25 mg/kg 苦参碱、50 mg/kg 苦参碱和 5 mg/kg 顺铂,对照组采用生理盐水灌胃,苦参碱组采用不同浓度苦参碱灌胃,顺铂组顺铂腹腔注射 3 天,饲养 12 天后取出瘤体,测定瘤体重量。TUNEL 法检测肿瘤组织凋亡,测定 Caspase-8 活性,免疫组化检测 FAS/FASL,Western blot 检测 FAS/FASL 和 Caspase-8 蛋白表达。与对照组相比,10、25、50 mg/kg 苦参碱组瘤体重量显著减小,瘤体细胞凋亡率显著增加,均具有显著统计学差异($P < 0.01$),且具有浓度依赖性。与对照组相比,10、25、50 mg/kg 苦参碱组瘤体组织 Caspase-8 活性显著增加,FAS/FASL 及 Caspase-8 蛋白表达增加,均具有显著统计学差异($P < 0.01$),且这些作用与苦参碱浓度呈现正相关趋势。与顺铂组相比,25 和 50 mg/kg 苦参碱组瘤体重量显著减小,瘤体细胞凋亡率显著增加,FAS/FASL 及 Caspase-8 蛋白表达和 Caspase-8 活性显著增加,均具有显著统计学差异($P < 0.01$)。苦参碱能够促进肉瘤小鼠肿瘤组织的凋亡,并且该作用与上调 FAS/FASL 表达及活化 Caspase-8 有关。

关键词:苦参碱;S₁₈₀ 肉瘤小鼠;凋亡;FAS/FASL 信号途径

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-1045-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.019

Effects of matrine on apoptosis and FAS/FASL signaling pathway on mouse S₁₈₀ sarcoma

HUANG Guang-xian, ZHAO Rui, LU Xiang, WANG Shu-mei*

Collegde of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This study investigated the effects of matrine on tumor growth and apoptosis in sarcoma mice and its effect on FAS/FASL signaling pathway. S₁₈₀ sarcoma in mice model was established, 30 mice were divided into 5 groups, each group of six, divided into control group, matrine group (10, 25 and 50 mg/kg) and cisplatin (DDP 5 mg/kg) group. The control group of rats were treated with normal saline lavage, matrine groups with different concentration of matrine to fill the stomach. DDP group received intraperitoneal injection of cisplatin for 3 days. After 12 days of feeding, the tumor was removed and its weight was measured. Apoptosis of tumor tissues was detected by TUNEL assay, Caspase-8 activity was measured, FAS/FASL was detected by immunohistochemistry, and protein expressions of FAS/FASL and Caspase-8 were detected by Western blot. Compared with the control group, the tumor weight of 10, 25 and 50 mg/kg matrine group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the tumor cell apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), all with significant statistical differences and concentration dependence. Compared with the control group, the activity of Caspase-8 in the tumor tissues of 10, 25 and 50 mg/kg matrine group was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of FAS/FASL and Caspase-8 protein was increased, all with statistically significant differences ($P < 0.01$), and these effects were positively correlated with the concentration of matrine. Compared with the cisplatin group, the tumor weight of the 25 and 50 mg/kg matrine group decreased significantly, the tumor cell apoptosis rate increased significantly, the expression of FAS/FASL and Caspase-8 protein and the activity of

caspase-8 increased significantly ($P < 0.01$). Matrine can promote the apoptosis of tumor tissues in sarcoma mice, and this effect is related to the up-regulation of FAS/FASL expression and activation of caspase-8.

Key words: matrine; S₁₈₀ sarcoma mice; apoptosis; Fas/FasL signaling pathway

当前癌症发病率、死亡率呈持续增长趋势,癌症问题迫在眉睫,但目前并无有效方法彻底根治。中药抗肿瘤效果明显,副作用小且治疗后存活率高,因此逐渐成为研究热点。其中,中药苦参碱的抗肿瘤研究较多,其抗肿瘤作用明显,不良反应少,其制剂和复方已应用于临床试验。苦参为豆科植物苦参的干燥根,味苦,性寒,具有强心、抗炎、抗肿瘤、抗菌等多种药理活性^[1,2]。苦参碱(matrine, MT)是从传统中医苦参中提取的生物碱,在体外对多种肿瘤细胞如胰腺癌^[1]、肺癌^[2]、结肠癌^[3]、乳腺癌^[4]和前列腺癌^[5]具有杀伤作用。Fas/FasL是近年来研究得最为深入的有关细胞凋亡的膜表面分子信号通路,是细胞凋亡最关键的信号机制,能和死亡受体结合激活胞内凋亡信号分子,发出信号并传递至细胞内,调节基因转录,从而诱导细胞凋亡^[6]。本研究探讨了苦参碱对小鼠S₁₈₀肉瘤细胞凋亡及其对Fas/FasL信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

SPF级昆明小鼠(北京维通利华有限公司);苦参碱(中国药品生物制品检定所,批号110805-201709,20 mg/支,纯度>99%);TUNEL染色试剂盒(美国Sigma公司);FAS、FASL、Caspase-8和 β -actin抗体(美国Abcam公司);Caspase-8检测试剂盒和二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);SDS-聚丙烯酰胺、PBST溶液、垂直电泳仪及GIS-2020D凝胶图像分析系统(Sigma公司)。

1.2 S₁₈₀肉瘤小鼠肉瘤模型的建立

从液氮罐中取出S₁₈₀细胞株,37℃水浴中使之迅速解冻移到离心管内,加入10 mL RPMI1640培养液,振摇混匀,2000 rpm离心2次(5 min/次),除去冻存液,用10 mL RPMI1640培养液稀释10倍,振摇成混悬液,在超净工作台上进行小鼠腹腔注射1 mL传代。取传代第8天的S₁₈₀腹水小鼠,脱颈椎处死,无菌抽取腹水,以生理盐水调至瘤细胞浓度为 3.2×10^7 个/mL混悬液。接种取昆明种小鼠33只雌雄各半,用1 mL的一次性注射器吸取S₁₈₀肿瘤细

胞悬液0.2 mL,右前肢腋窝部皮下注射。接种24 h后,剔除死亡小鼠1只及状态不佳小鼠2只,将剩余30只小鼠分为5组,每组6只,对照组、苦参碱10 mg/kg、苦参碱25 mg/kg、苦参碱50 mg/kg和顺铂组(DDP 5 mg/kg),对照组采用生理盐水灌胃,苦参碱组采用不同浓度苦参碱灌胃,顺铂组采用顺铂5 mg/kg腹腔注射3天,正常饲养,每3天用游标卡尺测量肿瘤的长径(L)和短径(W),计算肿瘤体积: $TV = (L \times W^2)/2$,绘制成肿瘤增长曲线。饲养12天后取出瘤体,统一处死各组小鼠,剥离肉瘤,并测定的瘤体重量。计算抑瘤率=[(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/空白对照组平均瘤重]×100%。

1.3 肉瘤组织TUNEL法检测凋亡

每组随机选取部分肿瘤组织标本,经包埋剂OCT混合物包埋后冰冻,用冷冻切片机制作4 μm冰冻切片,严格按照TUNEL检测试剂盒说明书要求步骤进行操作。光学显微镜下观察3组切片内细胞凋亡情况,以细胞内有棕黄色物质或整个细胞呈棕黄色判定为凋亡细胞,每张切片计数5个随机视野($\times 400$),每个视野计数400个细胞,计算肿瘤凋亡率,肿瘤凋亡率(apoptosis rate)=(凋亡细胞总数/肿瘤细胞总数)×100%。

1.4 肉瘤组织Caspase-8活性测定

每组随机取部分肿瘤组织标本,用PBS洗涤3次,加入组织裂解缓冲液,冰浴条件下剪碎组织,用匀浆器匀浆至充分裂解,在4℃条件下10 000 rpm离心10 min,吸取上清液,-20℃保存。采用二喹啉甲酸(BCA)比色法进行蛋白定量。按Caspase-8活性活性检测试剂盒说明加入缓冲液及底物,加入100 μg总蛋白。37℃孵育60 min,405 nm检测吸光度。做标准曲线同时测定并计算caspase-8活性。

1.5 免疫组化检测FAS/FASL蛋白表达

每组随机取部分肿瘤组织标本,石蜡包埋切片,脱蜡,梯度乙醇脱水,过氧化氢浸泡15 min,TritonX-100通透15 min,羊血清37℃湿盒封闭25 min,滴加一抗4℃孵育过夜。次日二抗室温孵育2 h,滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液室温2 h,DAB显色,封片,显微镜下观察。

1.6 Western blot 方法检测小鼠肉瘤的 FAS/FASL 蛋白及 Caspase-8 的表达影响

每组随机取部分肿瘤组织标本,组织匀浆后,进行 BCA 蛋白定量检测,取等量蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,一抗稀释于 0.5% BSA 液中,与印迹膜室温孵育 2 h,取出用 TBST 洗膜 10 min × 3 次,然后用 0.5% BSA 液稀释的二抗与印迹膜于室温孵育 2 h 后,TBST 液洗膜 15 min × 3 次,ECL 试剂发光,凝胶成像仪观察成像,进行统计学分析。

1.7 统计分析

实验数据用 Mean ± SD 表示,采用 SPSS17.0 软件进行检验,正态分布资料统计描述采用均数 ± 标准差,服从正态分布采用方差分析进行多组间比较,

继而采用 t 检验进行组内比较,采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异, $P < 0.01$ 为差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 苦参碱对小鼠肉瘤成瘤实验的影响

小鼠肉瘤模型建立成功,实验结束时,对照组、苦参碱 10、25、50 mg/kg 与顺铂 5 mg/kg 五组肉瘤的平均肿瘤重量为 4.6 ± 1.7 、 3.1 ± 1.2 、 1.9 ± 0.8 、 1.5 ± 0.6 和 2.8 ± 1.6 g。苦参碱三组的肿瘤重量和抑瘤率与对照组相比,差异具有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。随着苦参碱浓度增加,抑瘤率也不断增加,具有明显浓度依赖性。苦参碱 25 和 50 mg/kg 组的肿瘤重量和抑瘤率明显低于顺铂组,差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 1)。

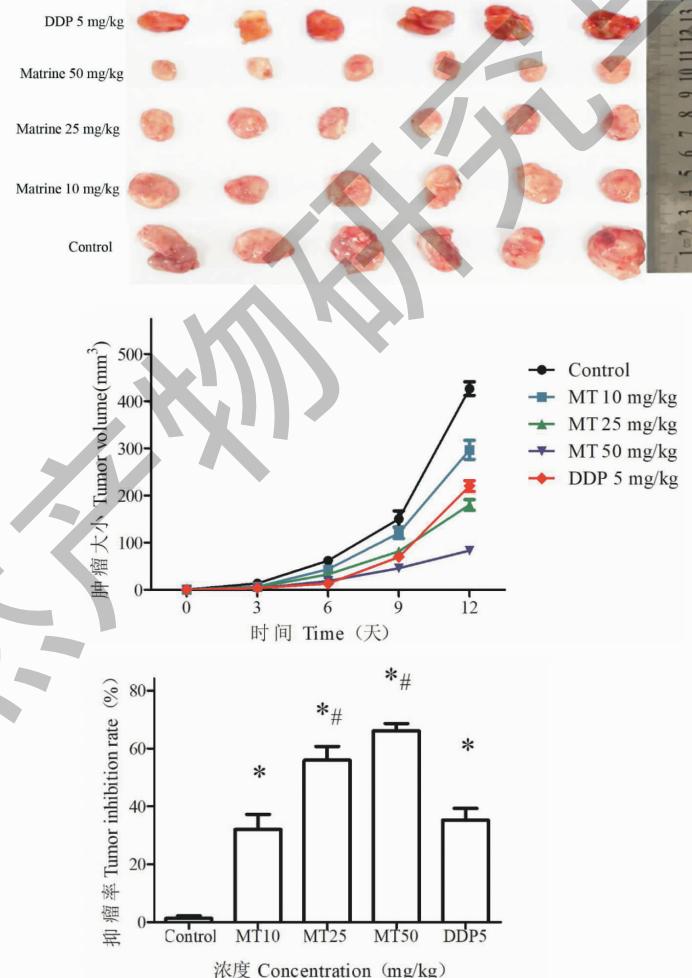


图 1 苦参碱对 S₁₈₀肉瘤小鼠肿瘤生长情况及抑瘤率的影响

Fig. 1 Effect of matrine on growth and inhibition rate of S₁₈₀ sarcoma in mice

注:与对照组相比, * $P < 0.01$;与顺铂组相比, # $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the DDP group,

$P < 0.01$.

2.2 TUNEL 染色观察苦参碱对肉瘤凋亡情况的影响

TUNEL 染色中棕褐色即为凋亡阳性细胞。对照组凋亡细胞数量少见,凋亡率 $2.7\% \pm 0.8\%$;苦参碱 10、25、50 mg/kg 组凋亡细胞显著增加,分别为 $32.8\% \pm 4.9\%$ 、 $39.6\% \pm 7.2\%$ 和 $46.7\% \pm 9.4\%$,

与正常对照相比具有显著统计学差异($P < 0.01$),且与苦参碱浓度呈现正相关趋势。顺铂组凋亡率为 $37.8\% \pm 8.4\%$,苦参碱 25 和 50 mg/kg 组凋亡率高于顺铂组,具有显著统计学差异($P < 0.01$) (见图 2)。

2.3 Caspase-8 活性测定

与对照组相比,苦参碱 10、25 和 50 mg/kg 的

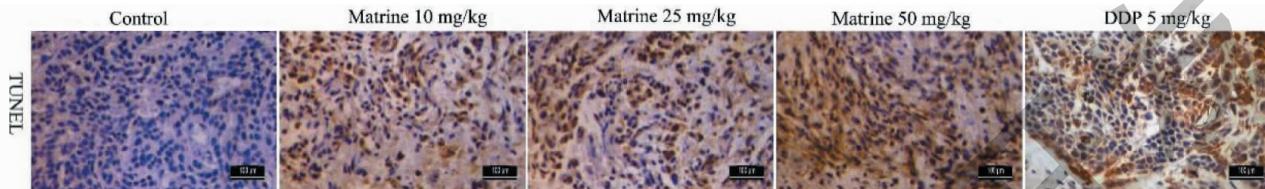


图 2 苦参碱对肉瘤小鼠瘤体细胞凋亡情况的影响

Fig. 2 Effect of matrine on apoptosis of sarcoma cells in mice

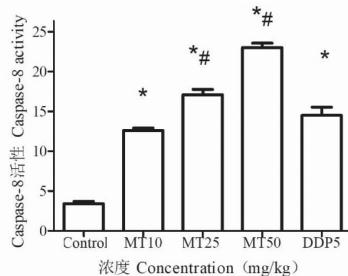


图 3 苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 Caspase-8 活性的影响

Fig. 3 Effect of matrine on the activity of Caspase-8 in sarcoma mice

注:与对照组相比, * $P < 0.01$;与顺铂组相比, # $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the DDP group, # $P < 0.01$.

Caspase-8 活性逐渐增加,差异均具有显著统计学意义($P < 0.01$),且 Caspase-8 活性随着苦参碱浓度增加而增加,具有明显浓度依赖性。苦参碱 25 和 50 mg/kg 组 Caspase-8 活性高于顺铂组,具有显著统计学差异($P < 0.01$) (见图 3)。

2.4 免疫组化观察苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 FAS/FASL 表达的影响

免疫组化观察肉瘤组织中 FAS 染色及 FASL 染色呈现棕黄色,对照组 FAS 染色及 FASL 染色较为淡染,而低、中、高浓度苦参碱组 FAS 染色及 FASL 染色与对照组相比明显增强,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中以高浓度苦参碱组增加最为显著,具备浓度依赖性(见图 4 及图 5)。

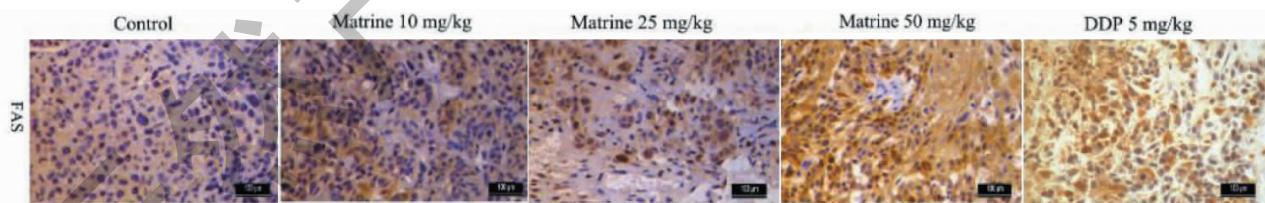


图 4 免疫组化观察苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 FAS 表达的影响

Fig. 4 Immunohistochemical observation of the effect of matrine on the expression of FAS in sarcoma mice

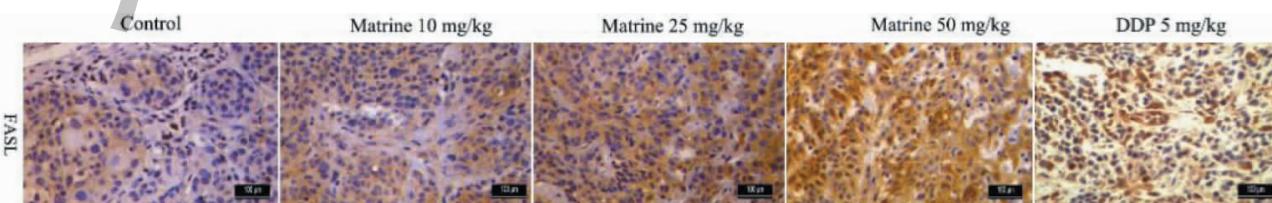


图 5 免疫组化观察苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 FASL 表达的影响

Fig. 5 Immunohistochemical observation of the effect of matrine on the expression of FASL in sarcoma mice

2.5 苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 FAS/FASL 及 Caspase-8 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,低、中、高浓度苦参碱 FAS、FASL 及 Caspase-8 表达较对照组明显增加,差

异具有显著统计学意义($P < 0.05$),且 FAS、FASL 及 Caspase-8 表达与苦参碱浓度呈现正相关趋势(见图 6)。

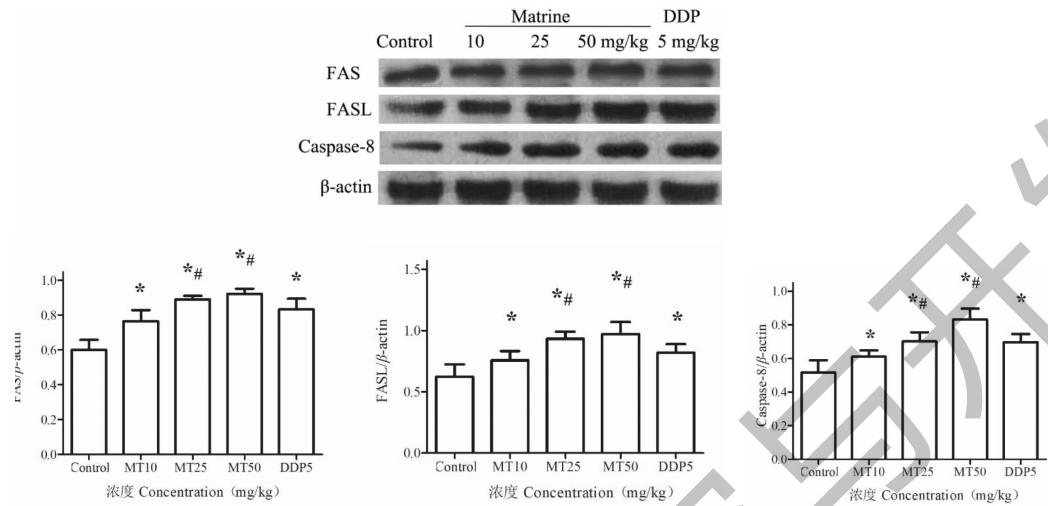


图 6 Western Blot 观察苦参碱对肉瘤小鼠瘤体 FAS/FASL 及 Caspase-8 表达的影响

Fig. 6 Effect of matrine on expression of FAS/FASL and Caspase-8 in sarcoma mice by Western blot

注:与对照组相比,* $P < 0.01$;与顺铂组相比,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the DDP group, ** $P < 0.01$.

3 讨论

苦参为豆科植物苦参的干燥根,味苦,性寒,始见于《神农本草经》,主心腹气结,癥瘕积聚,黄疸,溺有余沥等,其中癥瘕积聚描述的是腹部肿块,苦参具备明目、养肝胆、清热解毒、杀虫、祛风湿、泻血解热的功效,临幊上苦参注射液多用于肝炎及肠道疾病的治疗^[7,8]。

苦参碱是从传统中医苦参中提取的生物碱,是苦参的主要有效成分。多项研究发现苦参碱具有抗肿瘤的效果:Li 等^[9]发现苦参碱能够通过下调 ERK-NF-kappa B 进而抑制骨肉瘤细胞的增殖和侵袭转移。苦参碱通过降低细胞周期蛋白 mRNA 的表达,在 G0/G1 期阻断细胞周期,显著抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖^[10]。Zou 等^[11]发现苦参碱抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和诱导凋亡,苦参碱具有提高肉瘤小鼠生存质量、抑制肉瘤小鼠肿瘤细胞生长等作用,其作用机制亦涉及多个方面,主要表现在促进肿瘤细胞凋亡,降低瘤细胞的增殖,提高机体抗肿瘤能力,以及降低瘤组织的侵袭转移能力等^[12]。有研究认为^[13],苦参碱对肺癌肿瘤血管形成有明显的抑制作用。苦参碱亦能协同增强肺癌化疗的效果,降低化疗的骨髓抑制,减轻化疗的毒副反应^[7,8]。

本研究发现苦参碱和顺铂能显著抑制肉瘤小鼠肿瘤生长,并且增加肉瘤小鼠肿瘤组织的凋亡率,且苦参碱 25 mg/kg 和 50 mg/kg 抑制肿瘤生长和促肿瘤凋亡的效果甚至优于顺铂 5 mg/kg,说明苦参碱能够促进肉瘤细胞凋亡,与其他研究结果较为一致^[12]。

死亡受体介导信号通路是新近发现的一种细胞凋亡途径,死亡受体 FAS 属肿瘤坏死因子受体超家族,死亡受体 FAS 与配体 FASL 结合形成 Fas 结合蛋白(FADD),结合死亡效应结构域及 Caspase-8 前体,形成 Fas-FADD-Caspase-8 前体组成的死亡诱导复合物(DISC),激活 Caspase-8,活化后的 Caspase-8 可以进一步激活执行死亡功能的效应蛋白 Caspase3、6、7 等,触发一系列级联反应,最终导致细胞死亡^[14,15]。研究显示^[16],苦参碱在体内外均能通过上调 Fas/FasL,激活 Caspase-3、8 和 9 诱导骨肉瘤细胞凋亡。苦参碱能够以剂量依赖的方式诱导胰腺癌凋亡,这一作用与降低 Bcl-2/Bax 的比例,上调 Fas,促进 Caspase-3、8 和 9 的活化有关^[17]。苦参碱通过上调 Fas/FasL 和活化 Caspase-3 亦能诱导胃癌细胞凋亡^[15]。苦参碱能够促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡,其作用机制可能是上调 Fas 蛋白的表达、抑制端粒酶活性和抑制肿瘤血管的形成有关^[18]。苦参

碱能够通过活化 Caspase-3、8 和 9 促进鼻咽癌细胞凋亡^[19]。上述研究说明苦参碱能够调控部分肿瘤细胞 FAS/FASL 表达, 活化 Caspase-8, 并且这些作用与促进肿瘤细胞凋亡高度相关^[15-19]; 但目前少见苦参碱与肉瘤细胞 FAS/FASL 信号通路相关报道。本研究结果显示, 苦参碱和阳性对照顺铂均能够上调肉瘤小鼠肿瘤组织中的 FAS/FASL 表达, 增加 Caspase-8 活性和表达, 且苦参碱的这些作用呈现浓度依赖性, 说明苦参碱可能能够通过上调 FAS/FASL 信号途径, 活化 Caspase-8, 进而抑制肉瘤组织生长及促进肉瘤细胞凋亡。

综上所述, 苦参碱能够促进肉瘤小鼠肿瘤组织的凋亡, 并且该作用与上调 FAS/FASL 表达及活化 Caspase-8 有关。

参考文献

- 1 Cho Y, Lee JH, Kim JH, et al. Matrine suppresses KRAS-driven pancreatic cancer growth by inhibiting autophagy-mediated energy metabolism [J]. Mol Oncol, 2018, 12: 1203-1215.
- 2 Xie W, Lu J, Lu Q, et al. Matrine inhibits the proliferation and migration of lung cancer cells through regulation of the protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 beta signaling pathways [J]. Exp Ther Med, 2018, 16: 723-729.
- 3 Zhang S, Cheng B, Li H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon cancer LoVo cells by inactivating Akt pathway [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41: 2101-2108.
- 4 Shao H, Yang B, Hu R, et al. Matrine effectively inhibits the proliferation of breast cancer cells through a mechanism related to the NF-kappa B signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2013, 6: 517-520.
- 5 Zhang P, Wang Z, Chong T, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 [J]. Mol Med Rep, 2012, 5: 783-787.
- 6 Villa-Morales M, Fernandez-Piqueras J. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets. 2012, 16(1): 85-101.
- 7 Guo S, Chen Y, Pang C, et al. Matrine is a novel inhibitor of the TMEM16A chloride channel with antilung adenocarcinoma effects [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 8698-8708.
- 8 Liu H, Zou M, Li P, et al. Oxymatrine-mediated maturation of dendritic cells leads to activation of FOXP3 + /CD4 + Treg cells and reversal of cisplatin-resistance in lung cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2019, 19: 4081-4090.
- 9 Li Y, Zhang Z, Zhao H, et al. Matrine inhibits the invasive properties of human osteosarcoma cells by downregulating the ERK-NF-kappa B pathway [J]. Anti-Cancer Drug, 2014, 25: 1035-1043.
- 10 Quo L, Xue T, Xu W, et al. Matrine promotes G(0)/G(1) arrest and down-regulates cyclin D1 expression in human rhabdomyosarcoma cells [J]. Panminerva Med, 2013, 55: 291-296.
- 11 Zou M, Xu J J. Effect of matrine on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma MG63 cells and its mechanism [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学), 2019, 35: 140-142.
- 12 Zhang MF, Shen YQ. Advances in pharmacological action of matrine alkaloids against sarcoma [J]. Drug Eval Study(药品评价研究), 2018, 41: 2117-2122.
- 13 Pu L, Chen W, Cao L, et al. Compound kushen injection as an adjunctive therapy for the treatment of non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Evid-based Compl Alt, 2019, 19: 724-736.
- 14 Sekiguchi Y, Yamada M, Noguchi T, et al. The anti-cancer drug gefitinib accelerates Fas-mediated apoptosis by enhancing Caspase-8 activation in cancer cells [J]. J Toxicol Sci, 2019, 44: 435-440.
- 15 Dai Z, Gao J, Ji Z, et al. Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3 [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 123(1): 91-96.
- 16 Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, et al. Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2 [J]. Cancer Chemother Pharm, 2012, 69: 317-331.
- 17 Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33: 1740-1745.
- 18 Li HJ, Wang JM, Tian YT, et al. Effects of matrine on Fas, VEGF and telomerase activity in MCF-7 cells [J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合), 2013, 33: 1247-1251.
- 19 Chen J, Tang AZ, Liang G, et al. Matrine receptor X regulates the expression of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 proteins and induces the apoptosis of CNE1 in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2013, 29: 1136-1140.