

苦参素对胃癌细胞株 MKN - 54 产生金属基质蛋白酶的抑制作用

陆振东¹, 张 戈² (1. 上海中医药大学附属岳阳医院普外科, 上海 200437; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 研究中药有效成分苦参素对胃癌细胞株 MKN - 45 产生金属基质蛋白酶 MMPs (matrix metallo-proteinases) 的作用。方法: 采用酶联免疫吸附试验检测 MKN - 45 细胞产生金属基质蛋白酶 MMP - 2 和 MMP - 9。采用明胶酶谱法检测金属蛋白酶活性。结果: 在 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, 苦参素能有效抑制 MKN - 45 细胞中 MMP - 2 和 MMP - 9 的表达, 同时明胶酶谱结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的苦参素能够显著抑制 MMP - 2 和 MMP - 9 的蛋白酶活性。结论: 苦参素能够显著抑制胃癌细胞株 MKN - 45 中金属基质蛋白酶的表达和活性, 表明苦参素对胃癌转移具有一定的抑制作用。

关键词 苦参素; 金属基质蛋白酶; 胃癌; 侵袭

中图分类号: R931.7

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0111 (2006) 03 - 0147 - 03

Inhibitory effects of matrine on the production of matrix metallo - proteinases of human gastric carcinoma cell line MKN - 45

LU Zhen-dong¹, Zhang Ge² (1. Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China.)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of therapeutic effect of matrine on human gastric carcinoma by inhibiting the production of matrix metallo-proteinases of cell line MKN - 45 induced by it. **Methods:** The production of matrix metalloproteinases (MMP - 2, MMP - 9) of MKN - 45 cells were measured by ELISA and gelatin zymogram. **Results:** In the dose of 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$, matrine can significantly inhibit MMP - 2 as well as MMP - 9 expressions in MKN - 45 cells. Especially, in the zymographic analysis of MMPs expressions in conditional culture media, matrine 20 $\mu\text{mol/L}$ can greatly inhibit the MMP - 2 and MMP - 9 enzyme activity. **Conclusion:** Matrine could significantly inhibit the production and activity of MMPs in gastric carcinoma cell line MKN - 45, which showed the inhibitory effect on the metastasis of gastric carcinoma cells

KEY WORDS matrine; matrix metalloproteinases; gastric carcinoma; invasive

胃癌是危害人民健康的主要恶性肿瘤之一, 其发病原因尚未明确。其中, 肿瘤转移是导致肿瘤治疗失败, 患者死亡的主要原因。肿瘤转移必须破坏由细胞外基质构成的组织屏障。肿瘤细胞分泌产生多种蛋白水解酶参与降解细胞外基质。金属蛋白酶是它的主要酶类, 包括间质胶原酶、IV型胶原酶及基质溶解酶等。IV型胶原酶有 MMP - 2 (72kD)、MMP - 9 (92kD) 两种, 除可以降解 IV 型胶原外, 还能降解 V、VII 型胶原及明胶。其中, 以 IV 型胶原酶与肿瘤侵袭转移的关系最为密切^[1, 2]。

近年来药物治疗作为胃癌综合治疗的重要组成部分日益受到重视。在消化道恶性肿瘤中, 胃癌属于对药物治疗较敏感的肿瘤, 目前普遍认为药物治疗有可能减少复发, 延长生存期。苦参素 (matrine) 是从豆科植物苦参 (*Sophora flavescens* Ait) 的干燥根中提取分离精制而得的白色结晶性单体粉末。已

有文献报道苦参素具有一定的抗肿瘤作用及升高外周血白细胞作用, 并已经在临床中应用于肿瘤放疗、化疗的辅助治疗^[3, 4]。本研究旨在通过检测苦参素对胃癌细胞金属蛋白酶 MMP - 2、MMP - 9 分泌的调控作用, 研究苦参素对肿瘤侵袭转移的作用。

1 材料

1.1 药品与试剂 苦参素注射液购于江苏正大天晴药业股份有限公司 (国准字第 H20010756), 产品批号 0511101, 用生理盐水无菌条件下配成适当浓度的溶液备用; 对照品中采用同等不含药物注射液敷料的生理盐水溶液。MMP - 2 和 MMP - 9 测定试剂盒购于 R&D Systems 公司。

1.2 细胞株和培养条件 人胃癌细胞株 MKN - 45, 购自中国科学院上海细胞所, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 生长至单层后, 以 0.25% 的胰蛋白酶消化贴壁

细胞,调整细胞数至 $1 \times 10^5/L$ 。

1.3 仪器 Muliskan MK3 型酶标检测仪 (Lab-systems 公司),垂直电泳槽 (Bio-Rad Technology 公司),FR-980A 生物电泳图像分析系统 (复日生物技术公司)。

2 方法

2.1 肿瘤细胞产生金属蛋白酶蛋白表达测定^[5]

胃癌细胞株 MKN-45 消化,以 1×10^5 /孔密度接种于 6 孔培养板,待细胞长成 70%~80% 密度时,弃去培养上清,以 PBS 洗 2 次,换无血清培养液培养 2h,以 PBS 洗 2 次,加 400 μ L 含待测药物的无血清培养基培养 24h,吸取细胞培养上清,3 000r/min 离心 10 min 去除细胞碎片,即为条件培养基。按照 MMP 免疫酶联吸附试剂盒说明进行测定。

2.2 肿瘤细胞金属蛋白酶蛋白谱分析^[5] 取等量条件培养基超滤浓缩,进行 SDS-PAGE 电泳。用含 0.1% 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶作为分离胶,上层为 5% 的浓缩胶,以 8V/cm 稳压电流电泳约 4h,至染色前沿进入分离胶,将电压调整为 15V/cm 继续电泳,待溴酚蓝前沿距底部 2cm 时停止电泳;室温下,将凝胶浸于 2.5% Triton X-100 洗脱液中震荡洗脱 2 次,加入明胶酶孵育液,在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中孵育 24h。染色液染色 3h,以不同浓度脱色液进行梯度脱色,直至凝胶上显现位于蓝色背景的清晰反白亮带。

2.3 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以方差分析比较不同处理组间差异的显著性。

3 结果

3.1 苦参素对 MKN-45 分泌 MMPs 蛋白量的抑制作用 ELISA 结果显示,胃癌细胞 MKN-45 分泌 MMPs 蛋白,蛋白水平 MMP-2 为 (10.13 ± 1.12) ng/mL, MMP-9 为 (6.25 ± 0.45) ng/mL,苦参素能够剂量依赖性抑制 MMPs 的分泌;10 μ g/L 的苦参素对 MMP-2 的抑制率为 51%,对 MMP-9 的抑制率为 47%;20 μ g/L 的苦参素对 MMP-2 的抑制率为 68%,对 MMP-9 的抑制率为 77%;均有显著性差异 ($P < 0.05$),详见(表 1)。

表 1 苦参素对 MKN-45 细胞分泌 MMPs 蛋白量的抑制作用

| 苦参素剂量 (μ g/L) | MMP-2 (ng/mL) | MMP-9 (ng/mL) |
|--------------------|----------------------|----------------------|
| 对照组 | 10.13 ± 1.12 | 6.25 ± 0.45 |
| 5 | 9.13 ± 0.83 | 5.19 ± 0.89 |
| 10 | $4.97 \pm 0.52^{1)}$ | $3.33 \pm 0.25^{1)}$ |
| 20 | $3.24 \pm 0.87^{1)}$ | $1.43 \pm 0.58^{1)}$ |

注: ¹⁾ $P < 0.05$ 与对照组相比较

3.2 苦参素对 MKN-45 中 MMPs 酶解活性的抑制作用 胃癌细胞 MKN-45 产生的 IV 型胶原酶复性后降解明胶,在对应位置呈现未染色的亮白条带,条带面积大小反应细胞产生金属蛋白酶的量。从明胶电泳图谱可以看出,对照组 MKN-45 细胞样品电泳条带在 72kD,92kD 处明显呈现两条亮白带。经 20 μ g/L 浓度的苦参素作用后,MKN-45 细胞电泳图谱中对应于 72kD (MMP-2) 的亮白带面积显著小于对照组,对应于 92kD (MMP-9) 的亮白带面积很小,几乎不可见(图 1)。



图 1 MKN-45 细胞条件培养基中金属基质蛋白酶的蛋白电泳谱

4 讨论

我国北方豆科植物苦参,是我国历史悠久的传统药物,古书记载具有利尿,平喘,抗心律失常,升白及抗肿瘤等作用。苦参素是从苦参根部提取出的氧化苦参碱和极少量氧化槐果碱的混合物。现代药理研究表明,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、调节免疫等作用,对中枢神经系统、心血管系统等方面亦有明显的药理作用。苦参素抗肿瘤作用确切,田晓华等研究表明^[7],苦参素具有较好的清除羟基自由基的作用,并呈明显量效关系。通过清除羟基自由基,苦参素对辐射导致的胸腺嘧啶核苷酸的间接损伤有显著防护作用。抗氧化可能是其发挥抗肿瘤作用的机制之一。胡雅妮等研究发现^[8],苦参素对保持小鼠体质质量有明显作用,同时对荷瘤小鼠外周血红细胞、白细胞数目也有升高趋势。

本课题从苦参素抑制胃癌细胞金属基质蛋白酶

作用的角度,研究苦参素对胃癌细胞侵袭和转移作用的影响。肿瘤转移扩散起始于肿瘤细胞降解并穿过基底膜向其邻近组织的侵袭浸润。肿瘤细胞侵袭转移能力与其产生降解细胞外基质的蛋白酶能力密切相关。抑制癌细胞产生蛋白水解酶,降低癌细胞对基底膜的侵袭性是抑制肿瘤细胞转移的重要措施。肿瘤细胞分泌产生包括肝素酶、组织蛋白酶B、弹性蛋白酶及金属蛋白酶等多种蛋白水解酶,参与降解细胞外基质。在中性pH环境中,金属蛋白酶几乎能分解所有的大分子蛋白,是影响肿瘤细胞侵袭转移的限速酶。在正常生理条件下,IV型胶原酶在其合成、分泌及降解活性上受到严格控制 and 调节。在肿瘤细胞侵袭转移过程中IV型胶原酶活性增强,促进癌细胞侵袭和转移。高转移性的癌细胞比低转移性的癌细胞有更强的降解IV型胶原能力。在转移性癌细胞所侵袭的基底膜部位,IV型胶原缺失^[6]。

实验结果表明,苦参素能剂量依赖性的降低胃癌细胞MKN-45产生MMP-2、MMP-9的蛋白分泌量,同时对分泌MMPs的蛋白酶活性有较好的抑制作用。胃癌是危害人民健康的主要恶性肿瘤之一,它的转移及复发是导致治疗失败及死亡的主要原因。目前在临床上对于已经有转移的患者主要应用以药物治疗为主的综合治疗,虽然胃癌对药物治疗较为敏感,但联合化疗方案疗效仅为40%左右,且药物副作用较大。手术、放射和化学治疗等方法对肿瘤治疗的效果已进入平台期,开发针对转移过程和微小转移灶的抗恶性肿瘤药,是提高肿瘤治愈

率、降低复发和死亡率、延长患者生命的重要途径。本研究为苦参素用于抗胃癌的转移治疗提供了进一步依据。

参考文献:

- [1] Anlavoorian S, Stetler - Stevemom WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. *Cancer*, 1993, 71(4):1368.
- [2] Stetler - Stevemom WG, Liotta LA, Kleiner DE, et al. Role of matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis [J]. *FASEB J*, 1993, 7: 1434.
- [3] Eriguchi M, Osada I, Fujii Y, et al. Pilot study for preoperative administration of matrine to patients with advanced scirrhus type gastric cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 1997. 51(5): 217.
- [4] 罗艳君,林万隆. 苦参素对胃癌细胞株MKN-45凋亡的影响[J]. *世界肿瘤杂志*. 2004,3(1): 61.
- [5] Fadwa AA, Patricia MF, Ashani TW, et al. Inhibitors of staggland in synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 4629.
- [6] Davis B, Miles DW, Happerfield LC, et al. Activity of type IV collagenase in benign and malignant breast disease [J]. *Br J Cancer*, 1993, 67: 1126.
- [7] 田晓华,丛建波,孙存普,等. 氧化苦参碱清除·OH自由基作用及对胸腺嘧啶核苷酸辐射防护作用的ESR研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 1996, 6(3): 412.
- [8] 胡雅妮,王四旺,谢艳华,等. 苦参素抗肿瘤作用研究[J]. *辽宁中医学院学报*, 2003, 5(1): 3.

收稿日期:2006-01-15

不同产地楮实子提取物体外抗氧化作用及其质量比较

庞素秋^{1,2},黄宝康¹,张巧艳¹,秦路平^{1*} (1.第二军医大学药学院生药学教研室,上海200433;2.中国人民解放军第180医院药械科,福建泉州362000)

摘要 目的:对10个不同产地楮实子的乙醇、水提物进行体外抗氧化作用研究,并按中国药典部分质量标准对不同产地的楮实子进行质量比较。方法:采用不同产地的楮实子醇、水提取物对大鼠肝组织匀浆脂质过氧化作用的抑制,评价其体外抗氧化作用,并对不同产地的楮实子的灰分及提取物含量进行比较。结果:不同产地楮实子的抗氧化能力差别较大,其中安徽、山西和广西产的楮实子抗氧化能力最强,灰分含量以山东、浙江和广东三产地的较好。结论:不同产地楮实子的质量有很大差异,其提取物有较明显的体外抗氧化活性,并建议中国药典再版时收载楮实子提取物含量标准。

关键词 楮实子;灰分;体外抗氧化;丙二醛

中图分类号:R931.7

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)03-0149-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO.30400595)。

作者简介:庞素秋(1972-),女,汉族,硕士研究生,主管药师。

通讯作者:秦路平, Tel: (021)25070394, E-mail: lqin@smmu.edu.cn