

# 复方苦参注射液对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞 Bcl-2/Bax、P27 表达的影响\*

张文谨 彭 瑶 连增林 靳 冉 李晋生 海丽娜

**摘要** [目的] 探讨复方苦参注射液(岩舒)对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞 Bcl-2/Bax、P27 基因表达的影响。[方法] 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察不同浓度复方苦参注射液及组方成分苦参注射液、白土苓注射液、顺铂注射液对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖的影响;采用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测复方苦参注射液对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞中 Bcl-2/Bax、P27 mRNA 表达水平的影响。[结果] 复方苦参注射液、苦参注射液均可抑制 HEC-1B 细胞增殖,并呈剂量依赖性,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );复方苦参注射液、苦参注射液、顺铂注射液作用于 HEC-1B 细胞 48 h 后,与空白对照组相比在 mRNA 表达水平 Bcl-2 降低,而 Bax、P27 表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。[结论] 复方苦参注射液、苦参注射液可抑制人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖,复方苦参注射液及苦参注射液可明显抑制 Bcl-2 表达并促进 Bax、P27 表达,说明复方苦参注射液抑制子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖的作用机制在于苦参对 Bcl-2/Bax 基因家族和 P27 基因的表达的影响。

**关键词** 复方苦参注射液(岩舒);子宫内膜癌;抗肿瘤;细胞凋亡;实验研究

中图分类号 R737.33

文献标识码 A

文章编号:1673-9043(2012)02-0088-04

子宫内膜癌是妇科常见的恶性肿瘤,发病率仅次于宫颈癌。大部分子宫内膜癌的发生与雌激素有关,分化好的腺癌雌激素受体阳性率高<sup>[1]</sup>。子宫内膜癌的治疗方法众多,中药具有一定的抗肿瘤作用。复方苦参注射液是目前临床应用比较广泛的肿瘤辅助治疗药物之一,对放化疗均有一定的增效减毒作用,但是缺乏其作用机制的深入研究。

本研究采用复方苦参注射液及其组方成分作用于子宫内膜癌 HEC-1B 细胞,观察用药各组对 HEC-1B 细胞增殖作用的影响,初步探讨复方苦参注射液抗肿瘤作用机制,研究不同药物对 Bcl-2/Bax、P27 表达的影响。

\*基金项目:“十一五”“重大新药创制”科技重大专项基金项目(2008ZX09202)。

作者单位:100075 中药复方新药开发国家工程研究中心(张文谨 彭 瑶 连增林 靳 冉 李晋生)  
300193 天津中医药大学(张文谨)  
100102 北京中医药大学中药学院(彭 瑶)  
100120 北京振东光明药物研究院有限公司(海丽娜)

作者简介:张文谨(1986-),女,硕士在读。

通讯作者:连增林。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞株(中国科学院上海细胞库),顺铂(北京中日友好医院),复方苦参注射液、单苦参注射液、单白土苓注射液(均由山西振东制药有限公司提供),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司),Reverse Transcription System(美国 Promega 公司),Trizol Reagent(美国 invitrogen 公司),GoldView<sup>TM</sup> 核酸染料、100 bp DNA Ladder,PCR 反应体系(购于北京赛百盛基因技术有限公司)。

Mastercycler pro 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),Molecular Imager Gel Doc(美国 Bio-Rad Laboratories 公司),Inc、HERA cell 150 恒温二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱(美国 Thermo Electron Corporation 公司),Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus Corporation 公司)。

所用引物序列以专业引物设计软件 Premier 5.0 设计而成。ER $\alpha$ 36、ER $\alpha$ 66、GAPDH 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HEC-1B 细胞常规培养于含10% FBS 的 DMEM 培养液中,放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和

湿度的孵育箱中孵育,2.5%胰酶常规消化传代培养,实验时取对数生长期细胞。

**1.2.2 MTT 法检测细胞增殖** 取对数生长期 HEC-1B 细胞,以 0.25%胰酶消化后用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞浓度接种于 96 孔培养板中,100  $\mu$ L/孔。当细胞生长至 70%~80%融合时,换成无血清培养液继续培养 24 h,使细胞同步于静止期后分组<sup>[2]</sup>。一共分为 5 组:细胞对照组、阳性对照组(DDP)、复方苦参注射液组(FK)、苦参注射液组(K)、白土苓注射液组(B)。顺铂注射用粉针剂用生理盐水稀释后加 DMEM 培养基,设高中低 3 个剂量组,终浓度分别为 5、2.5、1.25  $\mu$ g/mL。复方苦参注射液加 DMEM 培养基稀释,终浓度为 10%、5%、2.5%。各组药物浓度配比设计见表 1。各用药组每个浓度均设 5 个平行孔,用药处理 24、48、72 h 后,加入四甲基偶氮唑蓝(MTT)继续培养 4 h 后,吸去每孔的液体,加入二甲基亚砷(DMSO)100  $\mu$ L/孔,微振荡器上震荡 15 min,用双波长法(492 nm/630 nm)测出细胞对照组和各实验组的吸光度值<sup>[3]</sup>。本实验重复 3 次,按公式计算细胞生长抑制率(IR): $IR = (1 - \text{实验组 OD} / \text{对照组 OD}) \times 100\%$ 。

表 1 各给药组药物终浓度配比表

| 组别                    | 高     | 中    | 低    |
|-----------------------|-------|------|------|
| 复方苦参组(FK)(%)          | 10.00 | 5.00 | 2.50 |
| 苦参组(K)(%)             | 10.00 | 5.00 | 2.50 |
| 白土苓组(B)(%)            | 10.00 | 5.00 | 2.50 |
| 顺铂组(DDP)( $\mu$ g/mL) | 5.00  | 2.50 | 1.25 |

**1.2.3 RT-PCR 法检测 Bcl-2/Bax、P27 表达水平** 取对数生长期细胞,先用无血清培养液培养 24 h,使细胞处于静止期同步化后,分为 5 组:复方苦参注射液组(FK)、苦参注射液组(K)、白土苓注射液组(B)、顺铂注射液组(DDP)、空白对照组。药物配制方法同上,各组药物浓度设计见表 2。加入各组药物继续培养 48 h。

表 2 各给药组药物终浓度配比表

| 组别  | 药物配比                 |
|-----|----------------------|
| FK  | 复方苦参注射液 5%           |
| K   | 苦参注射液 5%             |
| B   | 白土苓注射液 5%            |
| DDP | 顺铂注射液 2.5 $\mu$ g/mL |
| 空白  | DMEM 培养液(含 10%FBS)   |

按 Trizol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度法测定提取的总 RNA 含量及纯度,按照逆转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录为 cDNA,以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,进行 PCR 反应。引物序列见表 3。反应程序:Bel-2(94  $^{\circ}$ C 变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 秒,58  $^{\circ}$ C 30 秒,72  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共 35 个循环);Bax(94  $^{\circ}$ C 变性 150 s,94  $^{\circ}$ C 40 秒,63  $^{\circ}$ C 40 秒,72  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,共 30 个循环);P27(94  $^{\circ}$ C 变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 秒,55  $^{\circ}$ C 30 秒,72  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共 35 个循环);GAPDH(95  $^{\circ}$ C 变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 1 min,55  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min,共 30 个循环)。

反应结束后以含有 GoldView<sup>TM</sup> 核酸染料的 1.5%的琼脂糖凝胶电泳。在紫外光凝胶成像分析系统下摄片,以 Bcl-2/Bax、P27 基因片段与 GAPDH 片段灰度值的比值作为其相应表达水平数值。实验重复 3 次。

表 3 引物序列及其 PCR 产物长度

| 基因名称  | 上下游引物  | 产物长度(bp) |
|-------|--|----------|
| Bcl-2 | 5'-TTGGATCAGGGAGTTGGAAG-3'<br>5'-TGTCCTACCAACCCAGAAGG-3'     | 295      |
| Bax   | 5'-CGTCCACCAAGAAGCTGAGCG-3'<br>5'-AGCACTCCCGCCACAAAAGATG-3'  | 382      |
| P27   | 5'-GAGGCCAAGTACGAGTGGCAA-3'<br>5'-CTGCGCATTTGCTCCGCTAACCC-3' | 238      |
| GAPDH | 5'-ACGGATTTGGTCTATTGGG-3'<br>5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'      | 250      |

**1.3 统计学分析** 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MTT 法检测细胞增殖** 结果表明,各组药物作用 48 h 后显示出对细胞的抑制作用,复方苦参注射液和苦参注射液低浓度对子宫内癌 HEC-1B 细胞不但没有明显的抑制增殖作用反而出现轻微的促增殖作用,但随用药浓度的增加表现出抑制作用,并且该作用随着药物剂量的增加而逐渐增强,其作用呈浓度依赖趋势。白土苓注射液几乎不影响细胞生长,吸光度值与空白对照组比较,组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。不同给药组组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),复方苦参注射液组对细胞抑制作用最强。各组细胞抑制率见图 1。

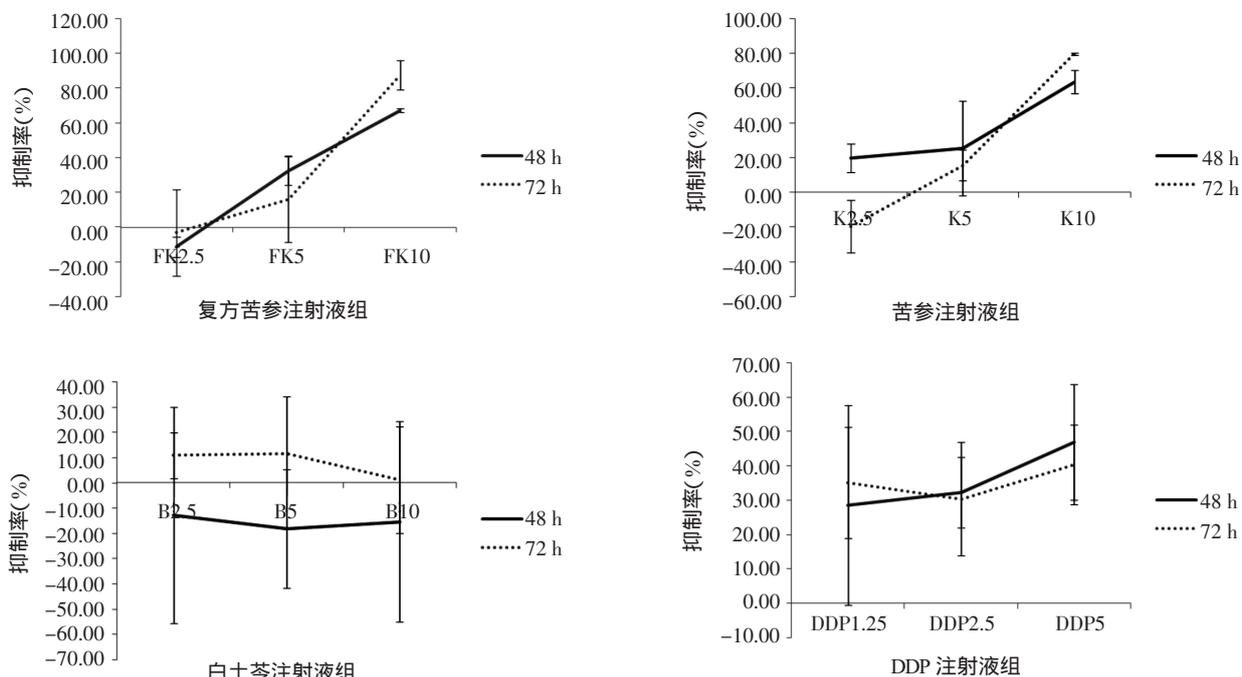


图1 不同给药组对 HEC-1B 细胞抑制率

2.2 RT-PCR 检测 Bcl-2/Bax、P27 的表达 从电泳图观察,FK、K、DDP 组 Bcl-2 的表达较空白对照组明显减弱( $P<0.05$ ),而 Bax、P27 的表达量明显增强,组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图2、图3。

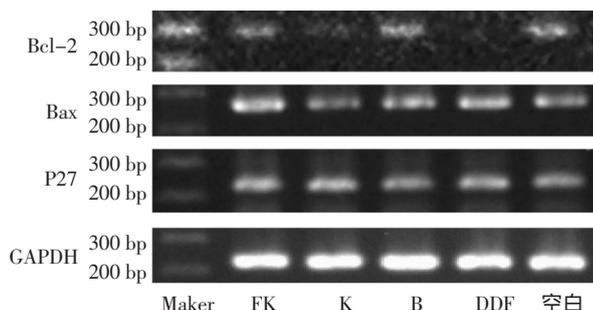


图2 不同给药组对 Bcl-2/Bax、P27 mRNA 水平的影响

### 3 讨论

复方苦参注射液(岩舒)是以苦参、白土苓为主

的两味中草药经现代技术加工制成,其功效为清热利湿、凉血解毒、散结止痛。临床多用于晚期癌症的辅助治疗,具有较好的辅助抗癌及缓解患者癌性疼痛的作用。近年来,大量临床研究证实,复方苦参注射液在放化疗中不仅能够增强机体免疫功能,而且具有增效减毒作用<sup>[4]</sup>。本研究证实了复方苦参注射液和苦参注射液能够抑制人子宫内膜癌 HEC-1B 细胞生长,且该作用呈剂量依赖关系。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡的重要调节者,其成员通过调节线粒体外膜的通透性和完整性起重要调控作用。正常子宫内 Bcl-2 与 Bax 表达具有一定周期性,Bcl-2 表达增殖期高于分泌期、Bax 表达分泌期高于增殖期<sup>[5-7]</sup>,说明雌孕激素可能通过调节细胞凋亡与增殖来维持子宫内膜的正常生理功能。本研究结果显示,复方苦参注射液、苦参注射液均能有效抑制 HEC-1B 细胞 Bcl-2 基因 mRNA 水平

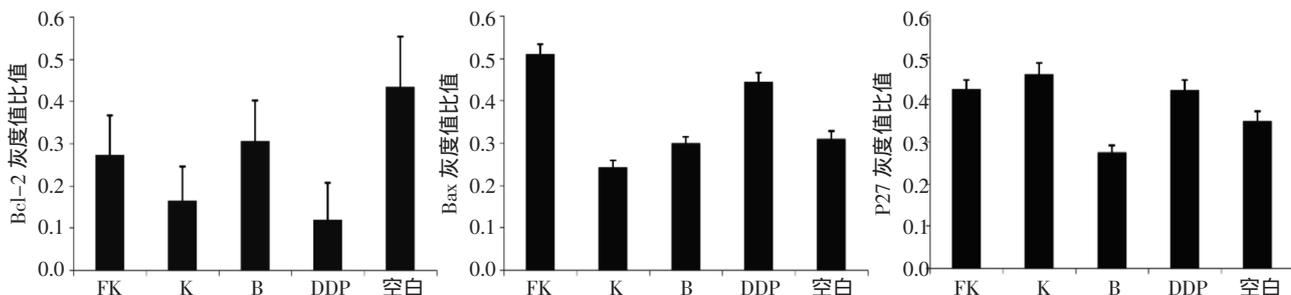


图3 不同给药组 Bcl-2、Bax、P27 相对表达量

的表达,但苦参并未见增加 HEC-1B 细胞 Bax 基因表达的作用,而复方苦参注射液在抑制 Bcl-2 表达的同时还可增加 Bax 基因表达,证明复方苦参注射液的抗肿瘤作用机制在于对 Bcl-2/Bax 表达的调控,诱导肿瘤细胞凋亡。

P27 基因是一种调控细胞周期并抑制细胞分裂的重要基因,定位于第 12 号染色体短臂 1 区 3 带 (12p13),其编码的蛋白 P27kip1 是一种非特异性多功能周期素依赖性激酶抑制剂(CDKI),通过抑制 cyclin-CDK 复合物的生物活性来调控细胞周期,最终导致肿瘤细胞在 G1/S 期停滞<sup>[8]</sup>。研究发现 P27 在子宫内膜增殖过程中起到调控作用,其表达缺失是发展为子宫内膜癌的重要一步。本研究结果显示复方苦参注射液和苦参注射液均有增加子宫内膜癌 HEC-1B 细胞 P27 基因 mRNA 水平表达,证明复方苦参注射液对 HEC-1B 细胞抑制作用还依赖于对细胞周期的影响<sup>[9]</sup>。

参考文献:

[1] 孙健衡.观念变化与临床处理子宫内膜癌的一些问题[J].现代妇产科进展,2001,10(1):1-2.  
[2] 杨勤,张亚声.复方苦参注射液对胃癌 SGC-7901 细胞 VEGF、CXCR4 表达的影响[J].现代肿瘤医学,2010,18(8):1481-1484.

[3] 叶正青,梁重峰,丁海,等.复方苦参注射液对人肝癌 SMMC-7721 肿瘤细胞作用的实验研究[J].山东医药,2009,49(16):44-45.  
[4] 李春梅,张宗江,石岩.复方苦参注射液的临床应用[J].疾病监测与控制杂志,2010,4(6):330-332.  
[5] Mertens HJ, Heineman MJ, Evers JL. The expression of apoptosis related proteins Bcl-2 and Ki67 in endometrium of ovulatory menstrual cycles[J]. Gynecol Obstet Invest, 2002, 53(4):224-230.  
[6] Vaskivuo TE, Stenback F, Karhumaa P, et al. Apoptosis and apoptosis related proteins in human endometrium[J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 165(122):75-83.  
[7] Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, et al. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1 beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis[J]. Hum Reprod, 2003, 18(9):1767-1771.  
[8] Zhi JD, Xi JW. Relationship between expression of p27Kip1 and cell proliferation in breast carcinoma tissue[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2009, 16(2):114.  
[9] Masciullo V, Susini T, Zamparelli A, et al. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in estrogen-related endometrial adenocarcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14):5332-5338.

(收稿日期 2012-02-18)

### Effects of compound Kushen injection on expression of Bcl-2/Bax and P27 in human endometrial cancer HEC-1B cell

ZHANG Wen-jin<sup>1,2</sup>, PENG Yao<sup>1,3</sup>, LIAN Zeng-lin<sup>1</sup>, JIN Ran<sup>1</sup>, LI Jin-sheng<sup>1</sup>, HAI Li-na<sup>4</sup>

(1. National Engineering Research Center for R&D of TCM Multi-ingredient Drugs, Beijing 100075, China;  
2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China;  
3. Beijing University of TCM, Beijing 100102, China;  
4. Beijing Zhendong Guangming Pharmaceutical Institute Co.Ltd, Beijing 100120, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the effects of compound Kushen injection (Yanshu) on Bcl-2/Bax, P27 expression in endometrial cancer HEC-1B cell. [Methods] Using MTT method the inhibition of HEC-1B cell proliferation treated by compound Kushen injection, Kushen injection, Baituling injection and DDP injection was detected. Using RT-PCR method their expression of Bcl-2/Bax and P27 was also detected. [Results] Compound Kushen injection and Kushen injection could inhibit the proliferation of HEC-1B cell and the effect was dose-dependent. The expression of Bcl-2 gene was reduced significantly while Bax and P27 gene were risen on mRNA level treated for 48 h by compound Kushen injection, Kushen injection and DDPC injection ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Compound Kushen injection and Kushen injection can inhibit the expression of Bcl-2 and promote the expression of Bax and P27. Compound kushen injection and its active ingredients Kushen can reduce Bcl-2 expression in HEC-1B cell while rise Bax and P27 gene on mRNA level.

**Key words:** compound Kushen injection; human endometrial cancer; anti-tumor; apoptosis; experimental study