

DOI:10.12174/j.issn.2096-9600.2025.12.02

苦参碱诱导肝癌细胞凋亡的作用机制*

王盼¹, 谢小青¹, 杨晓娟², 梁昭君¹, 何昱静¹, 卢利霞¹, 王俊科¹, 李斌¹, 张久聪¹, 于晓辉^{1△}, 郑英¹

1 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院, 甘肃 兰州 730050;

2 甘肃省第三人民医院, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的:基于P38MAPK和JNK信号通路探讨苦参碱诱导肝癌细胞凋亡的机制。方法:采用膜联蛋白V-碘化丙啶双染法染色HepG2和BEL-7404细胞,将4个浓度的苦参碱作用后,用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡能力,选择出苦参碱促进凋亡的最宜浓度,将该浓度的苦参碱作用于HepG2和BEL-7404细胞作为苦参碱组,不加苦参碱的作为空白对照组,加丝裂原活化蛋白激酶p38(mitogen-activated protein kinase p38, P38MAPK)抑制剂组和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抑制剂组为阳性对照组。Western Blot检测各组细胞中P38MAPK、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated mitogen-activated protein kinase p38, p-P38MAPK)、JNK、B淋巴细胞瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和B淋巴细胞瘤2相关蛋白(BCL-2-associated X protein, Bax)。结果:苦参碱促进HepG2和BEL-7404细胞凋亡的最宜浓度为3 mg/mL,实验组(3 mg/mL 苦参碱)与空白对照组和阳性对照组比较,P38MAPK和JNK蛋白的表达无差异($P > 0.05$),但p-P38MAPK和p-JNK、Bax及Bcl-2的表达有差异($P < 0.05$)。结论:苦参碱通过上调P38MAPK和JNK信号通路促进肝癌细胞凋亡,进而发挥抑制肝癌细胞增殖的作用。

[关键词] 苦参碱;肝癌细胞;加丝裂原活化蛋白激酶p38信号通路;c-Jun氨基末端激酶信号通路;凋亡

无明显毒性^[18-19],这提示槐花金银酒具有开发为安全、有效的天然抗肿瘤辅助治疗药物的潜力。本研究明确了槐花金银酒抗黑色素瘤的药效及相关机制,未来将进一步开展其活性成分分析与药代动力学研究,以期推动其向黑色素瘤防治药物转化。

参考文献

[1] SAGINALA K, BARSOUK A, ALURU J S, et al. Epidemiology of melanoma[J]. Med Sci(Basel), 2021, 9(4):63.

[2] 中国临床肿瘤学会(CSCO).《黑色素瘤诊疗指南》[M]. 北京:人民卫生出版社, 2024:1-218.

[3] CURTI B D, FARIES M B. Recent advances in the treatment of melanoma[J]. N Engl J Med, 2021, 384(23):2229-2240.

[4] MISHRA H, MISHRA P K, EKIELSKI A, et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144(12):2283-2302.

[5] 高月颖. 中药汤剂对恶性肿瘤患者细胞免疫功能的临床影响研究[J]. 中国医药指南, 2021, 19(24):84-86.

[6] 崔益雯, 王杰, 陈腾. 中药调节肿瘤免疫应答的研究进展[J]. 肿瘤, 2019, 39(8):674-679.

[7] 刘宁. 中医肿瘤类疾病的隐喻认知研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.

[8] LIU Y X, BAI J X, LI T, et al. A TCM formula comprising sophorae flos and Lonicerae Japonicae Flos alters compositions of immune cells and molecules of the STAT3 pathway in melanoma microenvironment[J]. Pharmacol Res, 2019, 142:115-126.

[9] LI T, FU X, TSE A K W, et al. Inhibiting STAT3 signaling is involved in the anti-melanoma effects of a herbal formula comprising Sophorae Flos and Lonicerae Japonicae Flos[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):3097.

[10] DAVIS L E, SHALIN S C, TACKETT A J. Current state

of melanoma diagnosis and treatment[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(11):1366-1379.

[11] HEGDE P S, CHEN D S. Top 10 challenges in cancer immunotherapy[J]. Immunity, 2020, 52(1):17-35.

[12] SCHOENFELD A J, HELLMANN M D. Acquired resistance to immune checkpoint inhibitors[J]. Cancer Cell, 2020, 37(4):443-455.

[13] 李杨. 中药抗肿瘤的优势[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4):672.

[14] 毕炜. 中药抗肿瘤多靶点效应的研究进展[J]. 江苏中医药, 2011, 43(3):92-93.

[15] LIU Y X, BAI J X, LI T, et al. MiR-let-7a/f-CCR7 signaling is involved in the anti-metastatic effects of an herbal formula comprising Sophorae Flos and Lonicerae Japonicae Flos in melanoma[J]. Phytomedicine, 2019, 64:153084.

[16] PARKIN J, COHEN B. An overview of the immune system[J]. Lancet, 2001, 357(9270):1777-1789.

[17] SILVA ALVES RDA, ABDALLA D R, IUNES D H, et al. Influence of an exergaming training program on reducing the expression of IL-10 and TGF- β in cancer patients[J]. Games Health J, 2020, 9(6):446-452.

[18] 郭呈金. 研究中药槐花的药理作用及炮制[J]. 智慧健康, 2018, 4(1):153-154.

[19] 马丽. 金银花的药理作用研究[J]. 光明中医, 2020, 35(20):3308-3310.

收稿日期:2025-08-04

*基金项目:国家自然科学基金(81874358, 82174029)。

作者简介:刘雨溪(1993—),女,博士学位,助理研究员。研究方向:中药药理。

△通讯作者:禹志领(1960—),男,博士学位,教授。研究方向:中药药理。Email:zlyu@hkbu.edu.hk。

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 2096-9600(2025)12-0006-05

The Mechanism of the Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells Induced by Matrine

WANG Pan¹, XIE Xiaoqing¹, YANG Xiaojuan², LIANG Zhaojun¹, HE Yujing¹, LU Lixia¹, WANG Junke¹,
LI Bin¹, ZHANG Jiucong¹, YU Xiaohui^{1△}, ZHENG Ying¹

1 Hospital 940 of PLA Joint Logistics Support Force, Lanzhou 730050, China;

2 the Third People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract Objective: To discuss the mechanism of inducing the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells with matrine based on P38MAPK and JNK signaling pathway. Methods: HepG2 and BEL-7404 cells were stained by annexin V-propidium iodide double staining method of membrane-associated protein, the apoptotic ability of each group of cells was detected by flow cytometry after the action of four concentrations of matrine, for the selection of optimal concentration of matrine to promote the apoptosis, HepG2 and BEL-7404 cells were chosen as matrine group after applying the concentrations of matrine to them, blank control group didn't add matrine, P38MAPK inhibitor group and JNK inhibitor group were taken as positive control groups. Western Blot was applied to detect the expressions of P38MAPK, p-P38MAPK, JNK, Bcl-2 and Bax in the cells of different groups. Results: The optimal concentrations of matrine to promote the apoptosis of HepG2 and BEL-7404 cells was 3 mg/mL, when the experiment group (3 mg/mL matrine) was compared with blank control group and positive control group, there was no difference in the expressions of P38MAPK and JNK ($P>0.05$), while there was difference in the expressions of p-P38MAPK and p-JNK, Bax and Bcl-2 ($P<0.05$). Conclusion: Matrine could promote the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating P38MAPK and JNK signaling pathway, thereby exerting the effects of inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cells.

Keywords matrine; hepatocellular carcinoma cells; P38MAPK; JNK; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是影响人类健康的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居前列^[1],治疗方法多样,而药物治疗是重要的治疗方法。近年来,随着血管抑制剂和免疫检查点抑制剂进入临床应用,HCC治疗的有效率明显上升,但由于这两类药物的靶点单一,因此研发更为有效的药物成为目前的热点。中草药具有抗肿瘤作用,而其中的有效化合物单体的研发,聚焦了很多学者的深入研究成果,苦参碱就是其中之一。它是从多种中草药中提取的具有镇静、抗炎、免疫调节、抗病毒^[2]、抗肿瘤^[3-4]等作用的有效化合物,但目前对于苦参碱抗HCC的作用机制尚未阐明。加丝裂原活化蛋白激酶p38信号通路(mitogen-activated protein kinase p38, P38MAPK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路是与细胞凋亡密切相关的两条通路^[5-6]。本研究针对苦参碱通过这两条通路诱导肝癌细胞凋亡作用进行研究,旨在揭示其抑制HCC的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2和BEL-7404细胞株(中科院上海生物研究所,批号:CL018、C6113);苦参碱(Aladdin公司,A111286-100 mg);P38MAPK抑制剂和JNK抑制剂(MedChem Express公司,批号:HY-N8453、HY-13319);P38MAPK、p-P38MAPK兔抗人单克隆抗体(博奥森生物技术有限公司,批号:

bsm-5476R、bsm-52316R);p-JNK、JNK兔抗人单克隆抗体(Cell Signaling Technology公司,批号:4668、9252);B淋巴细胞瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和B淋巴细胞瘤2相关蛋白(BCL-2-associated X protein, Bax)兔抗人抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bsm-61074R);羊抗兔IgG、 β -actin抗体(北京中杉金桥公司,批号:ZB-2301、TA-09);Western-blot试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0023);膜联蛋白V-碘化丙啶双染法凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:CA1030)。

1.2 细胞培养 用含10% FBS和DMEM培养基对复苏后的HepG2和BEL-7404细胞进行培养放置在37℃、5% CO₂培养箱中,每隔1天换液。细胞长至80%~90%时用0.25%胰蛋白酶消化,并按1:2比例进行传代。

1.3 用AV-PI双染法检测苦参碱对HepG2和BEL-7404细胞凋亡的影响 用不含EDTA的胰酶对处于对数生长的HepG2和BEL-7404细胞进行离心,以 1×10^5 个细胞接种于6孔培养板内,过夜后给予苦参碱0、1、2、3、4 mg/mL处理,24 h后收集细胞混悬于200 μ L缓冲液中,避光下分别加入5 μ L细胞凋亡液和碘化丙啶液混匀,进行染色,4℃条件下反应10 min,结束后用流式细胞仪进行检测,选择出苦参碱促进细胞凋亡的最佳浓度。

1.4 用WesternBlot检测苦参碱对HepG2和

BEL-7404 肝癌细胞中 P38MAPK、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 (phosphorylated mitogen-activated protein kinase p38, p-P38MAPK)、JNK、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)、Bcl-2、Bax 的改变将苦参碱的最宜浓度作用于 HepG2 和 BEL-7404 细胞作为实验组,不加苦参碱者作为空白对照组,加 P38MAPK 抑制剂组和 JNK 抑制剂组者为阳性对照组。将各组呈对数生长的 HepG2 和 BEL-7404 细胞,以 1×10^5 /孔的密度接种在 6 孔板中,待细胞贴壁生长 24 h 后,更换培养基,加入浓度为 3 mg/mL 的苦参碱,24 h 后分别提取 HepG2 和 BEL-7404 细胞总蛋白,用 Western Blot 法检测 P38MAPK、p-P38MAPK、JNK、p-JNK、Bcl-2 和 Bax。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析用于多组间的实验数据,以 $P < 0.05$ 表示差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 苦参碱促进 HepG2 和 BEL-7404 细胞凋亡活性 以 0、1、2、3 mg/mL 浓度的苦参碱促进 HepG2 细胞的凋亡率分别为 5.39%、17.53%、32.10%、54.44%,见图 1。促进 BEL-7404 细胞的凋亡率分别为 4.45%、16.68%、25.26% 和 54.24%,见图 2。其中最宜促进肝癌细胞的最佳浓度为 3 mg/mL。浓度为 4 mg/mL 的苦参碱作用于这两株肝癌细胞后,细胞大量死亡,无法进行凋亡测定。

2.2 苦参碱对 HepG2 和 BEL-7404 细胞中 P38MAPK/p-P38MAPK 表达的影响 两组细胞的苦参碱组与空白对照组比较,p38MAPK 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),p-P38MAPK 的表达明显上调 ($P < 0.05$);苦参碱加 P38-MAPK 抑制剂组与空白组比较,P38MAPK 和 p-P38MAPK 的表达均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3、表 1。

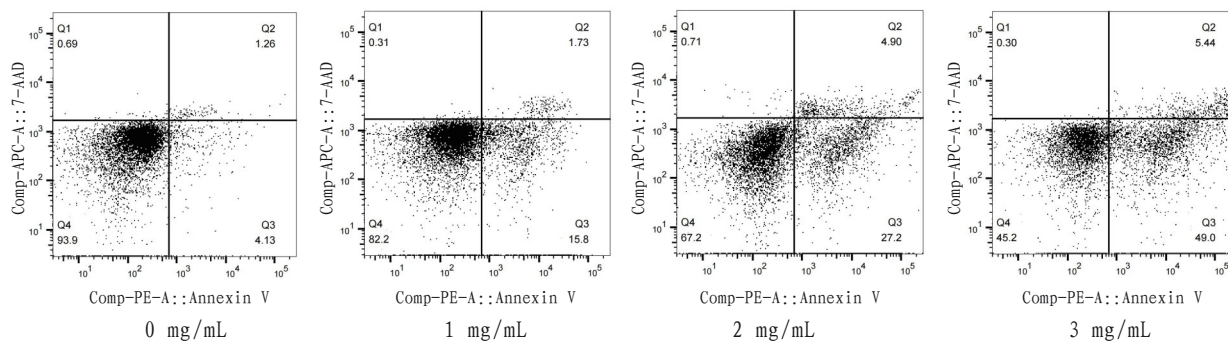


图 1 苦参碱对 HepG2 肝癌细胞凋亡的流式图

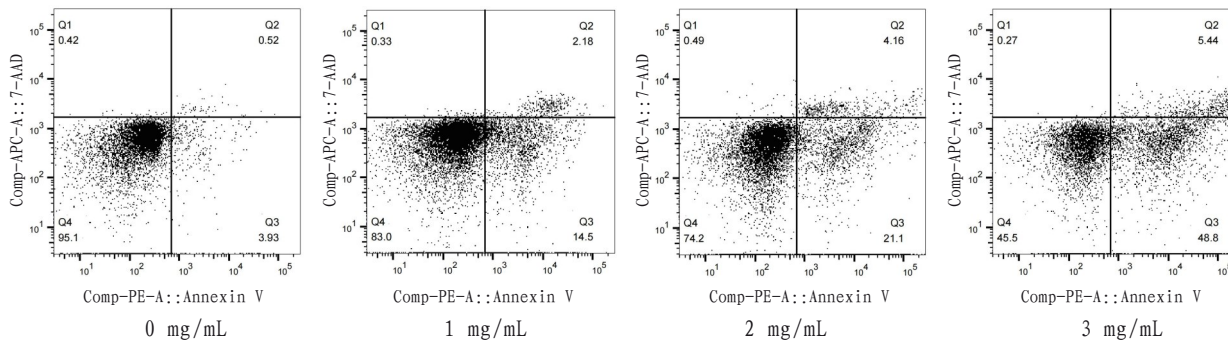


图 2 苦参碱对 BEL-7404 肝癌细胞凋亡的流式图

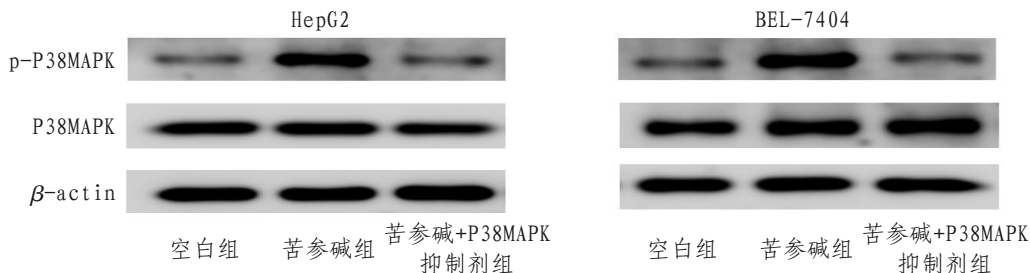


图 3 HepG2 和 BEL-7404 细胞中 P38MAPK 和 p-P38MAPK 蛋白表达水平

表1 不同组别HepG2细胞及BEL-7404细胞中P38MAPK和p-P38MAPK表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG2 细胞		BEL-7404 细胞	
	P38MAPK	p-P38MAPK	P38MAPK	p-P38MAPK
空白组	1.80 ± 0.09	1.52 ± 0.07	1.62 ± 0.06	1.51 ± 0.03
苦参碱组	1.92 ± 0.04 [#]	3.63 ± 0.08 [*]	1.61 ± 0.07 [#]	3.28 ± 0.09 [*]
苦参碱+P38MAPK抑制剂组	1.77 ± 0.03 [#]	1.68 ± 0.03 [#]	1.66 ± 0.07 [#]	1.58 ± 0.03 [#]

注:与空白组比较,*表示 $P < 0.05$, #表示 $P > 0.05$

2.3 苦参碱对HepG2和BEL-7404细胞中JNK/p-JNK表达水平的影响 两组细胞的苦参碱组与空白对照组比较,JNK表达无差异($P > 0.05$),p-JNK表达上调($P < 0.05$);苦参碱加JNK抑制剂组与空白组比较,JNK和p-JNK表达均无明显差异($P > 0.05$)。见图4、表2。

2.4 苦参碱对HepG2和BEL-7404细胞中Bax和

Bcl-2蛋白表达水平的影响 苦参碱组与空白组比较,促凋亡蛋白Bax表达水平增加($P < 0.05$),抗凋亡蛋白Bcl-2的表达则减少($P < 0.05$);苦参碱加P38MAPK抑制剂组或苦参碱加JNK抑制剂组与空白组比较,促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2均未见明显变化($P > 0.05$)。见表3、图5。

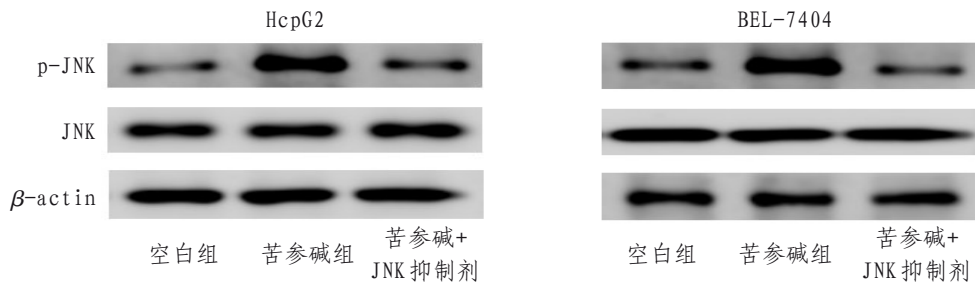


图4 HepG2和BEL-7404细胞JNK和p-JNK的表达水平

表2 不同组别HepG2细胞及BEL-7404细胞中JNK和p-JNK水平表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG2 细胞		BEL-7404 细胞	
	JNK	p-JNK	JNK	p-JNK
空白组	1.31 ± 0.05	2.12 ± 0.03	1.70 ± 0.02	1.68 ± 0.05
苦参碱组	1.32 ± 0.03 [#]	3.64 ± 0.05 [*]	1.73 ± 0.05 [#]	3.53 ± 0.09 [*]
苦参碱+JNK抑制剂组	1.34 ± 0.04 [#]	1.92 ± 0.06 [#]	1.72 ± 0.02 [#]	1.69 ± 0.03 [#]

注:与空白组比较,*表示 $P < 0.05$, #表示 $P > 0.05$

表3 不同组别HepG2肝癌细胞及BEL-7404肝癌细胞中Bax和Bcl-2表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	HepG2 肝癌细胞		BEL-7404 肝癌细胞	
	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2
空白组	0.76 ± 0.04	1.81 ± 0.05	0.37 ± 0.02	1.21 ± 0.01
苦参碱组	1.25 ± 0.05 [*]	0.78 ± 0.02 [*]	0.85 ± 0.03 [*]	0.89 ± 0.02 [*]
苦参碱+P38MAPK抑制剂组	0.81 ± 0.02 [#]	1.83 ± 0.4 [#]	0.40 ± 0.02 [#]	1.20 ± 0.02 [#]
苦参碱+JNK抑制剂组	0.72 ± 0.04 [#]	1.71 ± 0.02 [#]	0.35 ± 0.02 [#]	1.22 ± 0.05 [#]

注:与空白组比较,*表示 $P < 0.05$, #表示 $P > 0.05$

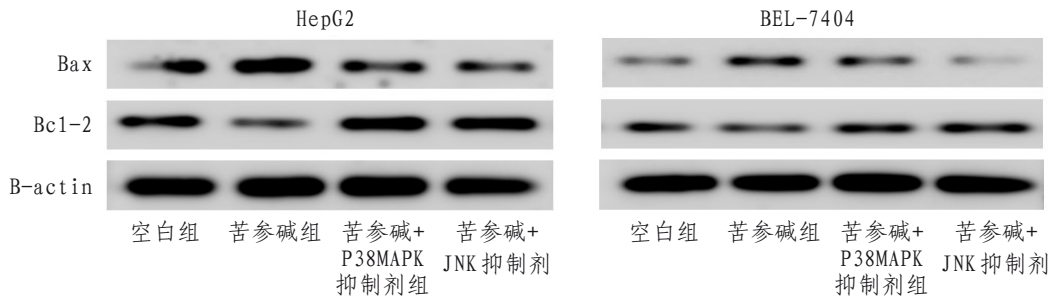


图5 HepG2和BEL-7404细胞中Bax和Bcl-2表达水平

3 讨论

苦参碱作为具有抗肿瘤效能的中草药提取物,与许多其他提取物一样可通过促进细胞凋亡抑制肿瘤生长^[7-9],其可通过调控相关信号通路促进细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。ZHUANG等^[10]研究发现苦参碱可通过上调miR-22的表达,从而通过Wnt/ β -catenin和MEK/ERK信号通路,抑制结肠癌细胞凋亡。而P38MAPK和JNK信号通路作为MAPK通路中的两条亚通路,与肿瘤细胞增殖、凋亡、自噬等密切相关。LIANG等^[11]研究提示苦参碱可显著上调卵巢癌细胞CAOV-3中P38MAPK、pERK/ERK和pJNK/JNK的表达水平,进而抑制卵巢癌细胞CAOV-3的增殖,同时发现苦参碱组卵巢癌细胞的促凋亡蛋白Caspase-8和死亡受体Fas表达水平升高,而抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-x1表达水平下降,该研究结果表明苦参碱可通过P38MAPK和JNK信号通路促进肿瘤细胞凋亡。

本研究结果显示,苦参碱促进HepG2和BEL-7404细胞凋亡的最宜浓度为3 mg/mL,该浓度的苦参碱可上调促凋亡蛋白Bax的表达,下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达。同时,该浓度的苦参碱作用于实验组肝癌细胞,发现P38MAPK和JNK蛋白的表达与空白对照组和阳性对照组比较无差异,但p-P38MAPK和p-JNK,以及Bax显著增加,Bcl-2的表达明显减少。研究表明,当抑制剂促进肿瘤细胞的相关蛋白发生磷酸化时,才能发挥抑制肿瘤的作用^[12]。本研究结果提示,苦参碱与P38MAPK和JNK的抑制剂一样可以促进P38MAPK和JNK发生磷酸化,进而促进细胞凋亡,发挥抑制肝癌细胞生长的作用。

综上所述,苦参碱作为一个具有抗肿瘤作用的中草药有效提取物,可通过促进P38MAPK和JNK信号通路发生磷酸化,进而促进肝癌细胞凋亡,达到抑制肿瘤生长的作用,这可能为抗HCC新药研发提供一定的理论依据和实验平台,值得进行深入研究。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SHI J, HAN G, WANG J, et al. Matrine promotes hepatic oval cells differentiation into hepatocytes and alleviates liver injury by suppression of Notch signalling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 261: 118354.
- [3] ZHAO B, HUI X, WANG J, et al. Matrine suppresses lung cancer metastasis via targeting M2-like tumour-associated-macrophages polarization[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(9): 4308-4328.
- [4] ZHANG H, CHEN L, SUN X, et al. Matrine: a promising natural product with various pharmacological activities[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 588.
- [5] TIAN X, WANG Y, LI S, et al. ZHX2 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human lung cancer cells through targeting p38MAPK pathway[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(1): 75-84.
- [6] JI K Y, KIM K M, KIM Y H, et al. Serum starvation sensitizes anticancer effect of anemarrhena asphodeloides via p38/JNK-Induced cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(4): 1001-1016.
- [7] ZHAO X, LIU Z, REN Z, et al. Triptolide inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration via down-regulating PLAU based on network pharmacology of *Tripterygium wilfordii* Hook F[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880: 173225.
- [8] JIA W Q, ZHU J W, YANG C Y, et al. Verbascoside inhibits progression of glioblastoma cells by promoting Let-7g-5p and down-regulating HMGA2 via Wnt/ β -catenin signalling blockade[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2901-2916.
- [9] WANG Y, LIU Y, ZHANG Y, et al. Effects of the polysaccharides extracted from Chinese yam (*dioscorea opposita thunb.*) on cancer-related fatigue in mice[J]. *Food Funct*, 2021, 12(21): 10602-10614.
- [10] ZHUANG X, DONG A, WANG R, et al. Ursolic acid benzaldehyde chalcone, leads to inhibition of cell proliferation and arrests cycle in G₁/G₀ phase in colon cancer[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(8): 1762-1766.
- [11] LIANG X, JU J. Matrine inhibits ovarian cancer cell viability and promotes apoptosis by regulating the ERK/JNK signaling pathway via p38MAPK[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(5): 82.
- [12] LE H T T, CHO Y C, CHO S. Inhibition of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 by PTP inhibitor XIX: Its role as a multiphosphatase inhibitor[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(6): 329-334.

收稿日期: 2024-11-10

*基金项目: 甘肃省科技厅重点研发计划-社发类资助项目(20YF8FA099, 22YF7FA105); 甘肃省科技计划项目-省青年科技基金计划(21JR7RA012); 兰州市人才创新项目资助(2020-RC-111); 兰州市科技计划项目(2024-9-166)。

作者简介: 王盼(1994—), 男, 硕士学位, 主治医师。研究方向: 消化系统肿瘤的基础与临床研究。

△通讯作者: 于晓辉(1965—), 女, 博士后, 博士研究生导师, 主任医师。研究方向: 消化系统肿瘤的基础与临床研究。Email: yuxiaohui528@126.com。