

汉防己甲素诱导人肝癌SMMC7721细胞凋亡的机制研究

潘太彬*(台州市黄岩区第三人民医院,浙江台州 318000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2648-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.17

摘要 目的:研究汉防己甲素(Tet)诱导人肝癌SMMC7721细胞凋亡的机制。方法:以4、6、8、10 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后,MTT法测定细胞活力并计算抑制率。6 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后,流式细胞仪检测细胞凋亡率;线粒体膜电位(JC-1)染色工作液染色,荧光显微镜下观察细胞JC-1情况;酶标仪测定半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)活性;Western blot法测定胞浆细胞色素C(Cyto-C)、Caspase-3原酶(Pro-caspase-3)蛋白表达。试验均设空白对照(常规培养基或培养0 h)。结果:4、6、8、10 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后对细胞生长有明显抑制作用,且呈时间、剂量依赖关系。与空白对照比较,6 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后细胞凋亡率升高,细胞JC-1降低,且呈时间依赖关系;6 mg/L Tet培养细胞24、48 h后Caspase-3活性增强;6 mg/L Tet培养细胞24 h后Cyto-C蛋白表达增强,Pro-caspase-3蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:Tet可诱导SMMC7721细胞凋亡,其机制可能与线粒体凋亡途径的激活有关。

关键词 汉防己甲素;人肝癌SMMC7721细胞;凋亡;线粒体膜电位

Study on the Mechanism of Apoptosis of Hepatoma SMMC7721 Cells Induced by Tetrandrine

PAN Tai-bin(The Third People's Hospital of Taizhou Huangyan District, Zhejiang Taizhou 318000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of apoptosis of human liver cancer SMMC7721 cells induced by tetrandrine (Tet). METHODS: MTT assay was used to test the cells activity and calculate the inhibition rate after the cells were cultured by 4, 6, 8 and 10 mg/L Tet for 24, 48 and 72 h. Flow cytometry was used to test the cells apoptotic ratio after the cells were cultured by 6 mg/L Tet for 24, 48 and 72 h; Mitochondrial membrane potential (JC-1) was examined under an inverted fluorescence microscope; colorimetric method was used to detect the Caspase-3 activity; the protein expressions of Cyto-C and Pro-caspase-3 were examined by Western blot. All of the tests were operated with blank control (normal culture medium or cultivated for 0 h). RESULTS: There was an obvious inhibition on the proliferation of SMMC7721 cells in a time- and dose-dependent manner after cells were cultured by 4, 6, 8 and 10 mg/L Tet for 24, 48 and 72 h. Compared with the blank control, after cells were cultured by 6 mg/L Tet for 24, 48 and 72 h, the cells apoptotic ratio was increased, JC-1 was decreased in a dose-dependent manner. There was an increase in the Caspase-3 activity after cells were cultured by 6 mg/L Tet for 24 and 48 h. After cells were cultured by 6 mg/L Tet for 24 h, the Cyto-C protein expression was strengthened, and Pro-caspase-3 protein expression was decreased, with statistical differences ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Tet treatment can induce the apoptosis of SMMC7721 cells by a mechanism that is related to the activation of mitochondrial apoptotic pathway.

KEYWORDS Tetrandrine; Human liver cancer SMMC7721 cells; Apoptosis; Mitochondrial transmembrane potential

汉防己甲素(Tetrandrine, Tet)是从防己科千金藤属药用植物粉防己(*Stephania Tetrandra* S. Moore)的块根中提取的双苄基异喹啉类生物碱,又称粉防己碱。大量研究表明,Tet对风湿性关节炎、矽肺乃至高血压等具有临床治疗意义^[1]。近年来发现,Tet具有逆转肿瘤多药耐药,诱导胃癌、神经母细胞瘤等肿瘤细胞凋亡的药理作用^[2],因此Tet可能是较理想的抗癌药物。然而目前Tet在体内外抗肿瘤的作用机制不明,关于其诱导肝癌细胞凋亡的分子机制报道较少,其信号转导途径尚不明确。本研究以体外培养的人肝癌SMMC7721细胞作为对象,采用MTT法、流式细胞术、分光光度法和Western blot法,通过检测Tet对SMMC7721细胞凋亡、线粒体膜电位(JC-1)变化和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)活性以及胞浆细胞色素C(Cyto-C)和Caspase-3原酶(Pro-caspase-3)表达的影响,初步探讨Tet诱导SMMC7721细胞凋亡的信号转导途径,为其临床用于肝癌的治疗提供试验基础。

1 材料

*主管药师。研究方向:药理学。E-mail:459176271@qq.com

1.1 仪器

Imark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);BX51型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);Odyssey CLX型红外荧光扫描系统(美国Licor公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

Tet注射液(江西银涛药业有限公司,批号:20130315001,规格:15 mg/ml);Tet(美国Sigma公司,纯度: $> 98\%$);Annexin V-FITC细胞凋亡测试盒、JC-1测试盒、细胞裂解液、Caspase-3测试盒、Caspase-3抗体、Cyto-C抗体、 β -actin抗体(上海碧云天生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、RPMI1640培养基(美国Invitrogen公司);胎牛血清、青霉素、链霉素(杭州四季青生物技术公司);荧光标记二抗(美国Licor公司)。

1.3 细胞

SMMC7721细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

2 方法

2.1 细胞抑制率测定

取培养于含10%胎牛血清、青霉素和链霉素各100 u/ml的RPMI1640培养基的对数生长期SMMC7721细胞,以 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 细胞密度接种于96孔板,于37℃、饱和湿度、5%CO₂条件下培养24 h,待细胞贴壁后加入Tet至其终质量浓度分别为4、6、8、10 mg/L(给药质量浓度范围参考文献[2])。同一质量浓度重复5孔。分别继续培养24、48、72 h后每孔加40 μl 5 g/L MTT,继续于37℃下孵育4 h后小心吸出各孔上清液,加入160 μl DMSO,振荡10 min溶解MTT甲膜沉淀,通过酶标仪在参比波长450 nm、检测波长570 nm条件下测定光密度(OD)。每一质量浓度设5个复孔。空白对照为细胞和RPMI1640培养基。按下式计算抑制率:抑制率(%)=(OD空白对照-OD用药)/OD空白对照×100%。

2.2 细胞凋亡率测定^[3]

按“2.1”项下方法培养细胞,加入Tet至其终质量浓度为6 mg/L,分别继续培养0(空白对照)、24、48、72 h后收获细胞,以含0.02% EDTA的0.25%胰蛋白酶细胞消化液消化细胞,使贴壁细胞吹打下来;取约 5×10^4 重悬的细胞,1 000×g离心5 min,弃上清,加入195 μl Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞,加入5 μl Annexin V-FITC,室温(20~25℃)避光孵育10 min。1 000×g离心5 min,弃上清,重悬细胞后加入10 μl碘化丙啶(PI)染色液,混匀后冰浴避光放置5 min。通过流式细胞仪于488 nm波长处进行检测,计算细胞凋亡率。每个样品检测 1×10^4 个细胞,重复3次。

2.3 细胞JC-1

按“2.1”项下方法培养细胞,加入Tet至其终质量浓度为6 mg/L,分别继续培养0(空白对照)、24、48、72 h后在每孔中加入1 ml JC-1荧光探针染色工作液,充分混匀。于37℃下细胞培养箱中孵育20 min。按试剂盒说明制备适量JC-1染色缓冲液,并置于冰浴中。37℃孵育结束后,吸除上清,用JC-1染色缓冲液洗涤2次后加入2 ml细胞培养液,于倒置荧光显微镜下观察细胞JC-1状态。同一质量浓度重复5孔。

2.4 细胞Caspase-3活性测定

按“2.1”项下方法培养细胞,加入Tet至其终质量浓度为6 mg/L,分别继续培养0(空白对照)、24、48、72 h后用含0.02% EDTA的0.25%胰酶细胞消化液消化细胞,使贴壁细胞吹打下来;取约 1×10^6 重悬的细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,按试剂盒说明加入细胞裂解液,冰浴裂解15 min,于4℃下16 000×g离心10 min。将上清液转移到冰浴预冷的离心管中,立即测定Caspase-3活性。加入相应显色底物,37℃孵育120 min,通过酶标仪于405 nm波长处测OD。计算 $\Delta\text{OD}_{405} = \text{OD}_{405}(\text{用药}) - \text{OD}_{405}(\text{空白对照})$,以 ΔOD_{405} 代表Caspase-3相对活性。试验设阴性对照(细胞+培养基)。同一质量浓度重复5孔。

2.5 凋亡相关蛋白表达测定

以Western blot法测定蛋白表达。按“2.1”项下方法培养细胞于6孔板上,加入Tet至其终质量浓度为6 mg/L,分别继续培养0(空白对照)、24、48、72 h后每孔加入100 μl细胞裂解液,于4℃下裂解细胞20 min以提取总蛋白,12 000×g离心10 min收集上清液;95~100℃加热10 min后,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶(5%浓缩胶,12%分离胶)上电泳分离蛋白后,湿法电转移至PVDF膜;将膜浸润在含5%

脱脂奶粉的TBST中2 h封闭非特异性结合位点,加入Caspase-3抗体(1:500)、Cyto-C抗体(1:1 000)、β-actin抗体(1:2 000)4℃过夜,TBST洗膜3次,加入荧光标记的二抗室温孵育2 h。TBST洗膜3次后置于红外荧光扫描系统上拍照,β-actin蛋白作为内参照以显示相同的上样量,测定Pro-caspase-3、Cyto-C蛋白表达水平。细胞浆中Cyto-C的提取方法参考文献[4]。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率测定结果

4、6、8、10 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后对细胞生长有明显抑制作用,且呈时间和剂量依赖性。细胞抑制率测定结果见表1。

表1 细胞抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Determination results of inhibition rate of cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度,mg/L	各时间点抑制率,%		
	24 h	48 h	72 h
4	34.1 ± 2.8	48.3 ± 3.9	68.1 ± 4.3
6	42.7 ± 3.9	58.5 ± 4.8	78.4 ± 5.9
8	49.3 ± 4.6	80.3 ± 6.7	86.3 ± 7.1
10	61.3 ± 4.9	84.1 ± 7.3	89.0 ± 7.5

3.2 细胞凋亡率测定结果

Annexin V-FITC检测细胞凋亡时,正常的活细胞不被Annexin V-FITC和PI染色(左下象限);凋亡早期的细胞Annexin V-FITC染色呈阳性而PI染色呈阴性(右下象限);凋亡晚期的细胞可同时被Annexin V-FITC和PI染色(右上象限);PI呈阳性表示坏死细胞(左上象限)。6 mg/L Tet培养细胞24、48、72 h后细胞出现明显凋亡,与空白对照比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。处理48 h与24 h比较,虽然总凋亡率差异无统计学意义,但晚期凋亡率明显升高,说明细胞逐渐从凋亡的早中期走向凋亡晚期及坏死。细胞凋亡率测定结果见图1。

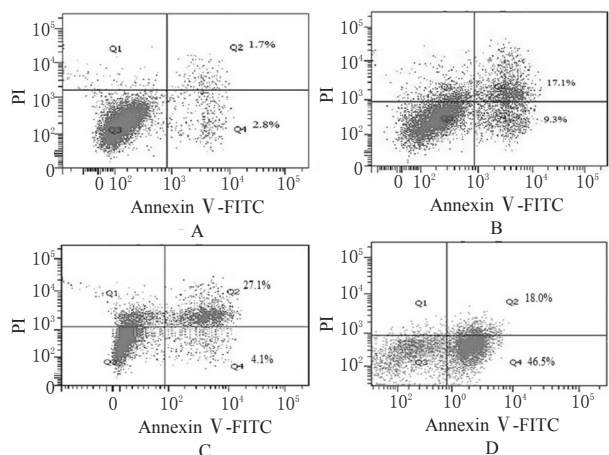


图1 细胞凋亡率测定结果

A.空白对照;B.24 h;C.48 h;D.72 h

Fig 1 Determination result of the cell apoptosis rate

A. blank control; B. 24 h; C. 48 h; D. 72 h

3.3 细胞JC-1结果

JC-1荧光探针是一种可以检测细胞或纯化的JC-1的理想荧光探针。在JC-1较高时,JC-1荧光探针以聚合物形式聚集在线粒体的基质中,产生红色荧光;在JC-1较低时,JC-1荧光探针不能聚集在线粒体的基质中,而以单体形式存在,产生绿色荧光。JC-1的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件,可以用从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标。6 mg/L Tet 培养细胞24、48、72 h后,细胞经染色后红色荧光逐渐转变为绿色荧光,且随着Tet作用时间延长,红绿荧光的相对比例明显下降,表明线粒体去极化的比例随着Tet作用时间延长而逐渐增高。因此,Tet诱导细胞凋亡过程中伴随着JC-1的逐渐下降。细胞JC-1结果见图2。

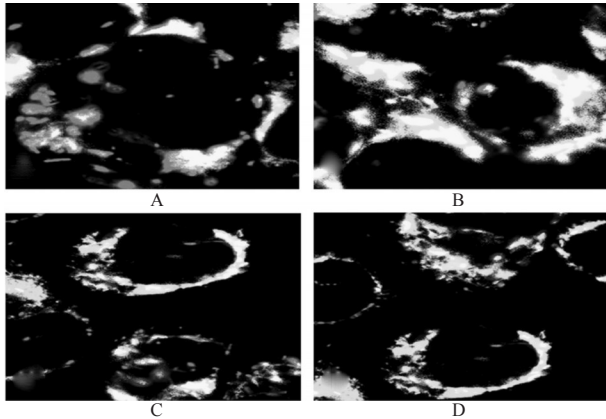


图2 细胞JC-1结果($\times 1\ 000$)

A.空白对照;B.24 h; C.48 h;D.72 h

Fig 2 Result of JC-1 in cells($\times 1\ 000$)

A. blank control; B. 24 h; C. 48 h; D. 72 h

3.4 细胞Caspase-3活性测定结果

6 mg/L Tet培养细胞24、48 h后,细胞Caspase-3活性增强,峰值时间约在48 h,与空白对照比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);而在72 h时,细胞Caspase-3活性与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),可能是因为此时大量细胞凋亡或坏死,胞内蛋白及酶发生降解。细胞Caspase-3活性测定结果见表2。

表2 细胞Caspase-3活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Determination result of Caspase-3 activity in cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

时间, h	细胞Caspase-3相对活性	
	阴性对照	Tet
0(空白对照)	0.16 \pm 0.035	0.12 \pm 0.040
24	0.22 \pm 0.036	0.48 \pm 0.034*
48	0.24 \pm 0.050	0.58 \pm 0.050*
72	0.09 \pm 0.040	0.32 \pm 0.032

注:与空白对照比较, * $P < 0.01$

Note: vs. blank control, * $P < 0.01$

3.5 凋亡相关蛋白表达测定结果

6 mg/L Tet培养细胞24、48、96 h后,胞浆Cyto-C表达逐渐增强,Pro-caspase-3蛋白表达逐渐减弱,表明Tet培养细胞24 h后胞浆Cyto-C出现明显表达,同时Pro-caspase-3被逐渐降解。凋亡相关蛋白表达测定结果见图3。

4 讨论

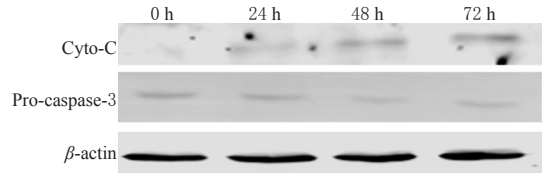


图3 凋亡相关蛋白表达测定结果

Fig 3 Determination result of the protein expression of apoptosis-related proteins

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡,是一种主动的、有序的自主性细胞死亡方式。Hickman JA^[5]首次提出诱导细胞凋亡是抗肿瘤药发挥作用的重要方式。有研究表明,线粒体是细胞凋亡调控的活动中心,Caspase激活是引导细胞凋亡过程中最为重要的一步^[6]。正常情况下线粒体外膜通透性高于内膜,促凋亡因子可导致线粒体通透性转变孔过度开放,从而降低跨膜电位,使Cyto-C、Bcl-2家族等从线粒体释放到膜间隙中,激活Caspase的级联反应,从而诱导细胞凋亡^[4]。Caspase-3是多条细胞凋亡信号通路下游共同的关键执行分子,因此其前体的活化作为凋亡的启动尤其重要。

Tet是一种有很高潜在价值的临床抗癌活性成分,但其抗肿瘤的作用机制及其信号转导途径的报道则较少。Jing XB等^[7]发现Tet可剂量依赖性地抑制肝癌细胞的增殖,引起肝癌细胞DNA片断化,并诱导细胞内活性氧的产生。许湘^[8]应用原位末端标记(TUNEL)法研究Tet对人肝癌HepG2细胞凋亡的影响;应用免疫组化法研究Tet对HepG2细胞Bax、Caspase-3的影响。结果表明,Tet作用24 h后,HepG2细胞核染色质浓缩,Bax、Caspase-3的表达明显增强,因此认为Tet可抑制HepG2细胞的增殖,主要与其阻滞G期细胞周期和增强Bax、Caspase-3的表达有关。在Tet的作用信号通路方面,Wang G等^[9]认为Tet阻碍了胞内Ca²⁺泵、L-型Ca²⁺通道、大电导Ca²⁺激活的K⁺通道从而在影响肿瘤的增殖、血管生成、调节细胞周期、诱导凋亡和刺激免疫反应等方面发挥着重要作用。Wu JM等^[10]指出Tet诱导BALB/C裸鼠体表结肠癌肿瘤凋亡,很可能是通过激活P38/MAPK信号通路实现的。

本研究发现Tet可随时间和剂量依赖性地抑制SMMC7721细胞的增殖并且诱导其发生细胞凋亡,这种凋亡机制很可能与其诱导SMMC7721细胞JC-1下降,使Cyto-C等从线粒体释放到膜间隙中,激活Caspase-3活性及Caspase所依赖的线粒体途径有关。以上研究结果为进一步深入研究Tet抗肝癌的分子机制提供了试验依据。但Tet的抗癌作用还可能存在其他途径,且在哺乳动物中存在导致Caspase激活的外源性死亡受体途径和内生性线粒体凋亡途径两个主要信号通路,因此其诱导肝癌细胞凋亡的具体信号通路还有待进一步的研究验证。

参考文献

- [1] 张华楠,辛洪涛,张维东,等.中草药与汉防己甲素对大鼠矽肺转化生长因子- $\beta 1$ 信号传导通路的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2007,25(6):336.
- [2] 秦蓉,曹渊,方悦,等.汉防己甲素对胃癌BGC-823细胞增殖和凋亡的影响[J].现代肿瘤医学,2013,21(9):1 911.
- [3] 陶黎阳,黎渐英,张建业,等.氧化苏木素诱导人乳癌MCF-7细胞凋亡及其作用机制[J].中山大学学报:医学

黄芩提取物对阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化作用

刘晓明*, 崔晓燕, 甄晓兰(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2651-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.18

摘要 目的:研究黄芩提取物(SBE)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠的抗氧化作用。方法:ip给予D-半乳糖(150 mg/kg)和亚硝酸钠(100 mg/kg),每天1次,连续60 d以复制小鼠AD模型。60只小鼠随机均分为正常对照(等容氯化钠注射液)组、模型(等容氯化钠注射液)组、雌二醇(0.4 mg/kg)组与SBE高、中、低剂量(500、250、125 mg/kg)组,除正常对照组外,其余各组复制模型同时ig给药,每天1次,连续60 d。测定小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量,以及血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织SOD、CAT活性减弱,MDA含量增加,血清中GSH-Px活性减弱,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,SBE高、中剂量组小鼠脑组织SOD、CAT活性增强,MDA含量减少,血清中GSH-Px活性增强,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:SBE可增强AD模型小鼠抗氧化能力,其机制可能与改善脑组织与血清中相关抗氧化指标水平有关。

关键词 黄芩;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;过氧化氢酶;丙二醛;小鼠

Antioxidant Effects of Extracts from *Scutellaria baicalensis* on Model Mice with Alzheimer's Disease

LIU Xiao-ming, CUI Xiao-yan, ZHEN Xiao-lan(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the antioxidant effects of *Scutellaria baicalensis* (SBE) on the model mice with Alzheimer's disease. METHODS: All mice were treated by D-gal (150 mg/kg) and NaNO_2 (100 mg/kg) for 60 d to reproduce the AD model mice, ip, once a day. Totally 60 mice were randomly divided into normal control group (isovolumetric sodium chloride injection), model group (isovolumetric sodium chloride injection), estradiol (0.4 mg/kg) group, and SBE high, medium and low doses (500, 250 and 125 mg/kg). The mice were intragastrically administrated while modeling except normal control group, once a day, for continuous 60 d. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum of mice were determined. RESULTS: Compared with normal control group, the SOD, CAT activities in brain tissue, and GSH-Px activity in serum of mice in model group were decreased, MDA content in brain tissue were increased, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$); compared with model group, the SOD, CAT activities in brain tissue and GSH-Px activity in serum of mice in SBE high and medium dose groups were increased, MDA content was decrease, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: SBE can enhance the antioxidant capacity in AD model mice by a mechanism that may be related to the improvement of related oxidation indicators' levels.

KEYWORDS *Scutellaria baicalensis*; SOD; GSH-Px; CAT; MDA; Mouse

- 科学版,2011,32(4):449.
- [4] 姚金成,刘颖,胡领,等.雷公藤甲素对Caspase诱导人肝细胞L-02凋亡机制的研究[J].中国药房,2012,23(43):4 036.
- [5] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs[J]. *Cancer Metastasis Rev*,1992,11(2):121.
- [6] Yan F, Liu Y, Wang WB. Matrine inhibited the growth of rat osteosarcoma UMR-108 cells by inducing apoptosis in a mitochondrial-caspase-dependent pathway[J]. *Tumor Biol*,2013,34(4):2 135.
- [7] Jing XB, Li T, Yang QH, et al. Inhibitory mechanism on proliferation of hepatocellular carcinoma cell line by tetrandrine[J]. *World Chin J Digestol*,2003,11(8):1 223.
- [8] 许湘.汉防己甲素诱导人肝癌细胞株HepG2凋亡及对Bax、Caspase-3的影响[D].武汉:湖北中医学院,2006.
- [9] Wang G, Lemos JR, Iadecola C. Herbal alkaloid tetrandrine: from an ion channel blocker to inhibitor of tumor proliferation[J]. *Trends Pharmacol Sci*,2004,25(3):1 207.
- [10] Wu JM, Chen Y, Chen JC, et al. Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice [J]. *Cancer Lett*,2010,287(2):187.

* 主管药师。研究方向:药物对中枢神经细胞的药理作用。
E-mail:lxmbby2008@163.com

(收稿日期:2014-11-23 修回日期:2014-12-26)
(编辑:张静)