

对叶百部总生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

林思^{1,2}, 朱华^{1,2*}, 秦慧真^{1,2}, 王孝勋¹, 许立拔², 邓玲玉^{1,2}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 广西中医药大学壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

[摘要] 目的:研究对叶百部总生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达的影响。方法:选择人肝癌 SMMC-7721 细胞,常规培养及传代,对叶百部总生物碱设置添加干预的质量浓度为 50, 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹,另设置仅添加 10% 胎牛血清作为空白组。采用噻唑蓝(MTT)比色法和细胞克隆实验观察细胞增殖的作用, Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 3 种凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达。结果:对叶百部总生物碱可抑制 SMMC-7721 细胞增殖,与空白组比较,细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.01$),作用 24, 48, 72 h 的 50% 细胞抑制浓度(IC₅₀)分别为(173.36±8.75), (112.14±16.50), (96.41±2.60) mg·L⁻¹,细胞集落形成抑制率显著升高($P < 0.01$),存在浓度依赖性。与空白组比较,对叶百部总生物碱可促进细胞凋亡, SMMC-7721 细胞凋亡数目和凋亡率显著增加($P < 0.01$),在荧光正置显微镜下可观察到典型细胞凋亡形态,如亮蓝色细胞核染色,细胞质浓缩和细胞核固缩等。与空白组比较,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调($P < 0.01$);与空白组比较,对叶百部总生物碱 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹ 促凋亡蛋白 Bax, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。结论:对叶百部总生物碱有很好的抑制 SMMC-7721 细胞增殖和促进凋亡的作用,其机制可能与抑制 Bcl-2 蛋白表达和促进 Bax, cleaved Caspase-3 蛋白表达有关。

[关键词] 对叶百部总生物碱; 人肝癌; SMMC-7721 细胞; 凋亡; B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax); 切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0073-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211921

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210730.1137.004.html>

[网络出版日期] 2021-07-30 16:01

Effect of *Stemona tuberosa* Alkaloids on Apoptosis of SMMC-7721 Cells and Expression of Bcl-2, Bax, and Cleaved Caspase-3

LIN Si^{1,2}, ZHU Hua^{1,2*}, QIN Hui-zhen^{1,2}, WANG Xiao-xun¹, XU Li-ba², DENG Ling-yu^{1,2}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on the apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells and the expression of apoptosis-related proteins including B lymphocytoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved Caspase-3).

[收稿日期] 20210617(013)

[基金项目] 广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);广西壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西重点学科(壮药学)(桂教科研[2013]16号);广西第八批特聘专家项目(壮瑶药质量标准研究,桂人才通字[2019]13号);广西一流学科中药学(民族药学)(桂教科研[2018]12号)

[第一作者] 林思,在读硕士,从事中药鉴定与分析研究, E-mail: 1751493407@qq.com

[通信作者] *朱华,博士,二级教授,从事中药品种、质量及资源开发研究, E-mail: zhuhuagx@163.com

Method: SMMC-7721 cells were routinely cultured, passaged, and treated with various concentrations (50, 75, 112, 167, and 250 mg·L⁻¹) of *S. tuberosa* alkaloids, while those in the blank control group were only treated with 10% fetal bovine serum. The cell proliferation was determined by tetrazolium bromide (MTT) colorimetry and colony assay and the cell apoptosis by Hoechst 33258 staining. The protein expression levels of Bcl-2, Bax, and cleaved Caspase-3 were detected by Western blot. **Result:** *S. tuberosa* alkaloids inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells, and the inhibition rate was significantly increased in comparison with that in the blank control group ($P<0.01$), with the half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) at 24 h, 48 h, and 72 h being (173.36±8.75), (112.14±16.50), and (96.41±2.60)mg·L⁻¹, respectively. The cell colony-inhibitory activity was significantly increased in a dose-dependent manner ($P<0.01$). Compared with the blank control group, *S. tuberosa* alkaloids promoted the apoptosis of SMMC-7721 cells, manifested as increased number of apoptotic cells and elevated apoptotic rate ($P<0.01$). The typical morphological changes such as brightly blue-fluorescent condensed nuclei, cytoplasmic shrinking, and karyopyknosis were found under the upright fluorescence microscope. As revealed by comparison with the blank control group, the expression of Bcl-2 was significantly down-regulated ($P<0.01$), while the protein expression levels of pro-apoptotic protein Bax and cleaved Caspase-3 in the 75, 112, 167, and 250 mg·L⁻¹ *S. tuberosa* alkaloids groups were significantly up-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** *S. tuberosa* alkaloids inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells and promote their apoptosis possibly by inhibiting Bcl-2 protein expression and promoting Bax and cleaved Caspase-3 protein expression.

[Keywords] *Stemona tuberosa* alkaloids; human hepatoma; SMMC-7721 cells; apoptosis; B lymphocytoma-2 (Bcl-2); Bcl-2-associated X protein (Bax); cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved Caspase-3)

肝癌是常见恶性肿瘤,目前在癌症中患者致死率位列世界第三,每年世界上超过60万人死于肝癌,其高发发病率、高死亡率及预后不良的现状,严重威胁人类生命健康^[1-2]。肝癌,主要由慢性肝炎、脂肪肝和其他肝脏疾病引发,发展快、侵袭性强,预后不良。因肝癌对化疗和射频消融治疗等治疗手段不敏感,治疗效果不明显,且化疗药的毒副作用和耐药性限制了其在临床的应用,目前最常用的治疗手段就是手术切除,但临床可诊断的肝癌一般为晚期,患者往往错过手术切除的最佳时期^[3-5]。故寻找高效、低毒的治疗肝癌药物,是世界范围内的研究热门。而中药及其有效成分,以其毒副作用小、多靶点、整体调节等优势,成为研究重点和热点。

对叶百部总生物碱是对叶百部中分离出来的一类生物碱,有研究表明,其有镇咳、抗氧化、驱虫、杀虫、抗菌、抗肿瘤等活性^[6-8]。本课题组前期掌握了对叶百部总生物碱的提取工艺和含量测定方法^[9]。前期研究发现,对叶百部总生物碱对肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的抑制作用,但其作用强度及机制尚不明确,其对肝癌的作用及机制目前也尚未见报道。因此,本实验观察对叶百部总生物碱在体外对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖,调亡及 B

细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达的影响,为其抗肝癌的深入研究和临床应用提供实验和理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 SMMC-7721 细胞,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,由广西壮瑶药重点实验室常规培养及传代(已传至10代)。

1.2 药物与试剂 对叶百部,采自广西壮族自治区百色市田林县高龙乡,经广西中医药大学韦松基教授鉴定为百部科百部属植物对叶百部 *Stemona tuberosa* 的块根。对叶百部总生物碱,由广西壮瑶药重点实验室提取及提供,经酸性染料比色法分析纯度为82.15%。结晶紫染色液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20210419);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号RNBj8184);青链霉素混合液(100×),噻唑蓝(MTT),磷酸盐缓冲液(PBS),30%制胶液,1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH6.8),1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH8.8),TBST 缓冲液(10×)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200429,715F053,20200905,20200422,20200927,20201120,20201110);过硫酸铵(上海麦

克林生化科技有限公司,批号C11707916);RPMI 1640培养液,0.25%胰蛋白酶,胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司,批号分别为8119267,2186976,2120135CP);Hoechst 33258染液(北京百灵威科技有限公司,批号LF20R04);十二烷基硫酸钠(SDS),脱脂奶粉(广州赛国生物科技有限公司,批号分别为EZ2811E133,EZ6789D156);BCA蛋白浓度测定试剂盒,蛋白酶抑制剂混合物(100×),RIPA裂解液,一抗稀释液,二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司,批号为090120201027,101320201119,092520201124,110420201126,102120201118);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),Bax,Bcl-2,cleaved Caspase-3抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗(美国Immunoway公司,批号分别为B2901,B1901,B4101,B3101,B0101)。

1.3 仪器 C170型CO₂培养箱(德国Binder公司);CKX53型倒置生物显微镜(日本Olympus公司);Epoch2型全波长酶标仪(美国Bio Tek公司);JIMBIO-FIL型流式图像细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司);HR1200-IIB2型智能生物安全柜(青岛海尔股份有限公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell型垂直电泳仪,Mini Trans-Blot Cell型蛋白转印模块(美国Bio-Rad公司);5424R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);ZWYR-2102C型台式恒温培养振荡器摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);Tanon 5200型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);ECLIPSE Ni-U型正置荧光生物显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肝癌SMMC-7721细胞,培养于CO₂培养箱内,37℃,5%CO₂,饱和湿度,培养液为含10%FBS,1%青链霉素RPMI 1640完全培养液(pH7.2~7.4)。

2.2 对叶百部总生物碱制备和药液配制 取对叶百部,自然晾干,粉碎,粉末过50目筛,称取粉末1 000 g,放入带塞的锥形瓶中,加入甲醇10 L,40 kHz条件下超声40 min,冷却,充分摇匀,过滤,滤液置于旋转蒸发仪中,挥干溶媒至浸膏,所得浸膏加入4%盐酸2 500 mL,充分溶解,过滤,所得滤液用氨水调节至pH 9~10,并转移至分液漏斗,加入三氯甲烷4 L,充分萃取,分层,取三氯甲烷层萃取液,挥干溶媒即得对叶百部总生物碱浸膏,得膏率0.87%,浸膏1 g相当于原药材114.94 g。对叶百部总生物碱用DMSO配制成储存液(250 g·L⁻¹),

置于-20℃冰箱避光冷冻保存,使用前融溶,用RPMI 1640培养液稀释至所需浓度(DMSO终体积分数不超过0.1%)。

2.3 MTT比色法检测细胞增殖 取对数生长期人肝癌SMMC-7721细胞,调节密度为5×10⁴个/mL,接种于96孔板中,每孔5×10³个。培养24 h,吸弃孔中液体,在对应孔中加入含不同浓度对叶百部总生物碱(结合预实验干预质量浓度设定为0,50,75,112,167,250 mg·L⁻¹)的RPMI 1640完全培养基,每孔200 μL,重复6个复孔。培养24,48,72 h后采样,加入5 g·L⁻¹ MTT染液,每孔20 μL,继续孵育4 h,吸弃孔中液体,加入DMSO每孔150 μL,振荡10 min,在490 nm波长处测定各孔吸光度A,计算细胞增殖抑制率,并利用增殖抑制率计算半数抑制浓度(IC₅₀)^[10]。细胞增殖抑制率=(1-A_{给药组}/A_{空白组})×100%。

2.4 结晶紫染色法观察细胞克隆能力 将SMMC-7721细胞接种至6孔板(每孔1 000),培养24 h,吸弃孔中液体,在对应孔中加入含对叶百部总生物碱(0,50,75,112,167,250 mg·L⁻¹)的RPMI 1640完全培养基每孔1 mL,重复6个复孔。培养48 h,更换新鲜完全培养液,3 d换液1次。继续培养12 d后,吸弃孔中液体,PBS清洗3次,加入10%甲醛每孔0.5 mL,20 min后,PBS清洗3次,加入结晶紫染色液每孔1 mL,20 min后,PBS清洗3次,晾干,拍照,计数集落数(计数1个集落细胞数>50个细胞的集落),并计算集落形成抑制率^[11]。集落形成抑制率=(1-集落数/接种细胞数)×100%。

2.5 Hoechst 33258染色法观察细胞核凋亡形态 取对数生长期SMMC-7721细胞,调整细胞密度为1×10⁶个/mL,接种于6孔板(内置无菌盖玻片)中,每孔1×10⁶个,培养24 h,吸弃孔中液体,在对应孔中加入含不同质量浓度对叶百部总生物碱(0,50,75,112,167,250 mg·L⁻¹)的RPMI 1640完全培养基,每孔1 mL,重复3个复孔。培养24 h,吸弃孔中液体,PBS清洗3次,加入10%甲醛,每孔0.5 mL,15 min后,吸弃固定液,PBS清洗3次,加入Hoechst 33258染色液,每孔0.5 mL,用锡箔纸包裹,避光染色15 min,吸弃孔中液体,PBS液清洗3次,取出盖玻片,用抗荧光淬灭封片液(PBS-甘油9:1)封片,于荧光显微镜下观察细胞核凋亡形态并拍照,每个复孔连续计数1 000个细胞,统计1 000个细胞中凋亡细胞数目,并计算凋亡率^[12]。凋亡率=(凋亡细胞数目/1 000)×100%。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测细胞中 Bax, Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 将对数生长期 SMMC-7721 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 待细胞生长汇合度达 80% 时, 吸弃瓶中液体, 加入含对叶百部总生物碱 (0, 50, 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹) 的 RPMI 1640 完全培养基, 每瓶 3.0 mL, 培养 48 h, 吸弃瓶内液体, PBS 清洗 3 次, 加入细胞裂解液 300 μL, 冰上裂解 30 min, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 离心半径 6 cm, 收集上清液, BCA 法测蛋白浓度。加入适量上样蛋白缓冲液, 混匀, 沸水浴, 高温变性 8 min。蛋白上样量为 30 μg, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 40 min, 将膜置于抗体 Bax (1:1 000), Bcl-2 (1:1 000), cleaved Caspase-3 (1:1 000) 中, 4 °C 孵育过夜, TBST 室温避光清膜 3 次, 二抗 (山羊抗鼠 1:5 000) 孵育 60 min, TBST 清洗 3 次, 凝胶图像分析仪扫描, 内参为 GAPDH, 采用灰度分析计算各目的蛋白条带灰度值/内参灰度值,

分析蛋白 Bax, Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 表达水平^[13]。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 当 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。符合正态分布和方差齐性, 采用 One-way ANOVA 进行多组间分析, 采用最小显著差数法 (LSD) test 进行两组间分析; 非正态或方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 进行多组间分析, 采用 Mann-Whitney U 进行两组间分析。

3 结果

3.1 对细胞增殖的影响 与空白组比较, 对叶百部总生物碱 50 mg·L⁻¹ 及以上质量浓度在作用 24, 48, 72 h 后细胞抑制率均显著升高 ($P < 0.01$), 对叶百部总生物碱作用 24, 48, 72 h 对 SMMC-7721 细胞的 IC₅₀ 分别为 (173.36±8.75), (112.14±16.50), (96.41±2.60) mg·L⁻¹, 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用随浓度的增加而增强, 呈浓度和时间相关性。见表 1。

表 1 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Inhibition of *S. tuberosa* alkaloids on proliferation of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
对叶百部总生物碱	50	26.16±5.52 ¹⁾	19.92±12.32 ¹⁾	18.87±3.36 ¹⁾
	75	37.36±3.02 ¹⁾	37.35±17.80 ¹⁾	39.83±3.85 ¹⁾
	112	49.64±4.75 ¹⁾	65.92±3.13 ¹⁾	77.18±4.32 ¹⁾
	167	52.05±2.21 ¹⁾	81.52±1.56 ¹⁾	91.85±0.76 ¹⁾
	250	55.54±1.44 ¹⁾	84.22±2.08 ¹⁾	91.43±2.31 ¹⁾

注: 空白组细胞增殖抑制率为 0; 与同时间点空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对细胞集落形成的影响 与空白组比较, 对叶百部总生物碱 50 mg·L⁻¹ 及以上质量浓度细胞集落形成数及细胞集落形成率均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 细胞集落形成抑制率均显著升高,

差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且随着药物浓度的增加, 集落形成抑制率升高呈正相关, 其中对叶百部总生物碱 250 mg·L⁻¹ 无集落形成, 细胞集落形成抑制率为 100%。见表 2, 图 1。

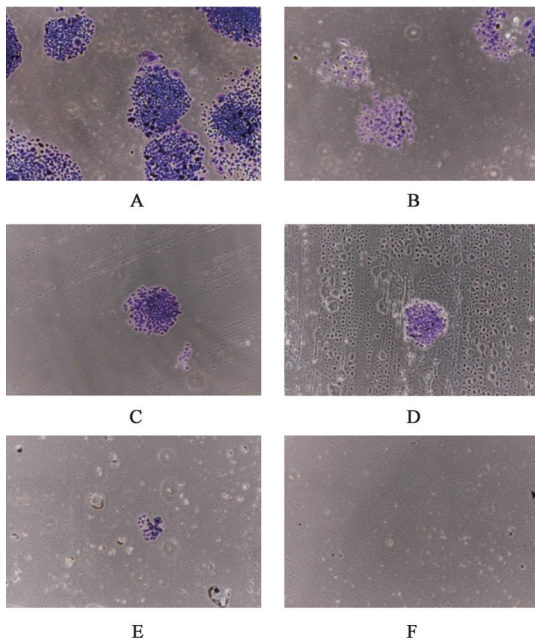
表 2 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞集落形成率和集落形成抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of *S. tuberosa* alkaloids on colony formation rate of SMMC-7721 cells and corresponding inhibitory rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	集落数/个	集落形成率/%	集落形成抑制率/%
空白		634±158	63.42±15.84	36.58±15.84
对叶百部总生物碱	50	283±91 ¹⁾	28.27±9.13 ¹⁾	71.73±9.13 ¹⁾
	75	94±30 ¹⁾	9.37±2.98 ¹⁾	90.63±2.98 ¹⁾
	112	30±23 ¹⁾	2.95±2.28 ¹⁾	97.05±2.28 ¹⁾
	167	2±1 ¹⁾	1.67±1.37 ¹⁾	99.83±0.14 ¹⁾
	250	0 ¹⁾	0 ¹⁾	100 ¹⁾

3.3 对细胞凋亡形态的影响 空白组 SMMC-7721 细胞核均匀分布, 呈淡蓝色染色, 荧光微弱, 偶见亮蓝色染色细胞核; 与空白组比较, 对叶百部总生物

碱 (50, 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹) 干预 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 细胞核呈亮蓝色染色的数目明显增多, 细胞核因染色质浓缩, 部分呈不规则形态, 如新



A. 空白组;B~F. 对叶百部总生物碱(50, 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹)组(图2, 3同)

图1 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞集落形成形态的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of *S. tuberosa* alkaloids on colony morphology of SMMC-7721 cells(Inverted microscope, ×100)

月形、梭形等, 偶见细胞核染色质碎片状, 细胞凋亡数目与药物浓度呈正相关, 浓度越大, 细胞凋亡数目显著增多, 细胞数目显著减少, 细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$)。见图2, 表3。

3.4 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较, 对叶百部总生物碱组(50, 75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹)抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调($P < 0.01$); 对叶百部总生物碱组(75, 112, 167, 250 mg·L⁻¹)促凋亡蛋白 Bax, cleaved Caspase-3 表达显著上调($P < 0.01$)。见表4, 图3。

4 讨论

细胞增殖和细胞凋亡是维持生物生命稳态平衡两个重要的本质属性, 而肝癌是一种最常见的恶

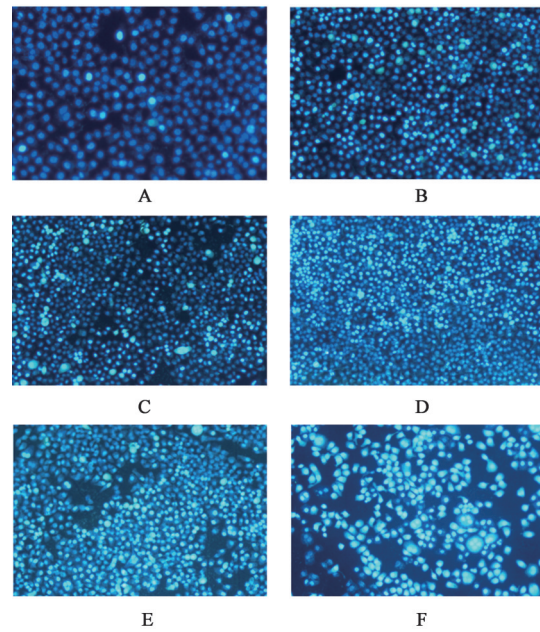


图2 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞形态的影响(荧光正置显微镜, ×200)

Fig. 2 Effect of *S. tuberosa* alkaloids on apoptotic morphology of SMMC-7721 cells(fluorescence positive microscope, ×200)

表3 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of *S. tuberosa* alkaloids on apoptotic rate of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	凋亡细胞数/个	凋亡率/%
空白		145±46	14.52±4.63
对叶百部总生物碱	50	346±41 ¹⁾	34.61±4.09 ¹⁾
	75	423±53 ¹⁾	42.34±5.32 ¹⁾
	112	620±30 ¹⁾	61.96±3.04 ¹⁾
	167	653±27 ¹⁾	65.26±2.71 ¹⁾
	250	863±39 ¹⁾	86.32±3.90 ¹⁾

性肿瘤, 其主要特点就是异常增殖, 较少凋亡, 细胞异常增殖和抗凋亡是其最典型的恶性生物学特征^[14], 故抑制癌细胞增殖和诱导其凋亡是治疗肝癌的关键。

表4 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of *S. tuberosa* alkaloids on expression of apoptosis-related proteins in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	cleaved Caspase-3/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
空白		0.31±0.01	0.13±0.02	1.25±0.03
对叶百部总生物碱	50	0.32±0.01	0.15±0.02	0.34±0.05 ¹⁾
	75	0.47±0.01 ¹⁾	0.44±0.02 ¹⁾	0.70±0.02 ¹⁾
	112	0.52±0.03 ¹⁾	0.64±0.04 ¹⁾	0.65±0.01 ¹⁾
	167	0.56±0.02 ¹⁾	0.39±0.02 ¹⁾	0.56±0.01 ¹⁾
	250	0.54±0.01 ¹⁾	1.24±0.04 ¹⁾	0.67±0.05 ¹⁾

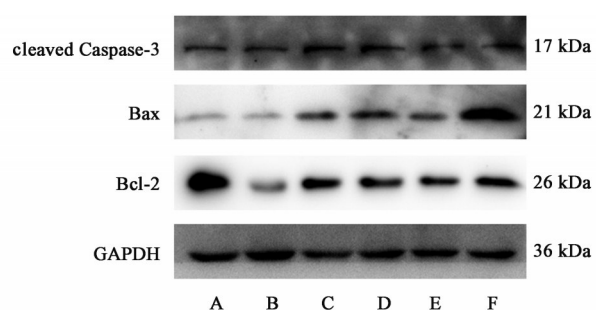


图3 对叶百部总生物碱对 SMMC-7721 细胞凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of *S. tuberosa* alkaloids on expression of apoptosis-related proteins in SMMC-7721 cells

抑制肝癌细胞增殖,可延缓肝癌的生长和转移。采用MTT比色法检测SMMC-7721细胞增殖及结晶紫染色法观察SMMC-7721细胞单细胞克隆能力,结果表明,对叶百部总生物碱对SMMC-7721细胞抑制增殖活性强,呈浓度依赖性,对单细胞克隆能力亦效果明显,可明显降低细胞集落形成数及细胞集落形成率,升高细胞集落形成抑制率,其中对叶百部总生物碱 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 无集落形成,细胞集落形成抑制率为100%。

诱导细胞凋亡是治疗肝癌促进癌细胞死亡的关键手段。细胞凋亡是细胞内外多因子调控,多信号传递途径共同作用,使多种天冬氨酸蛋白水解酶活化而诱导细胞死亡。Hoechst 33258染色是检测细胞死亡及凋亡有关的常用方法之一。在荧光显微镜环境下,活细胞细胞核被染成淡蓝色,可观察到微弱荧光,凋亡细胞细胞核被染成亮蓝色,可观察到强荧光,而死亡细胞核不被染色,无法检测^[15]。本实验结果显示,经对叶百部总生物碱处理后,SMMC-7721细胞细胞核被染成亮蓝色的数目明显增多,因染色质浓缩或核固缩,可观察到新月形、梭形等不规则细胞核,细胞凋亡率显著增加。表明对叶百部总生物碱能够抑制SMMC-7721细胞增殖,这可能与其诱导SMMC-7721细胞凋亡有关。

Bcl-2家族是细胞凋亡的关键调节分子,主要作用于线粒体,调节膜通道开放和促凋亡物质流动。Bax和Bcl-2均为其家族成员,Bax是癌凋亡过程的关键蛋白,可促进癌细胞凋亡,Bcl-2是癌细胞关键的保护蛋白,可抑制癌细胞凋亡^[16]。Caspase家族蛋白活化是细胞凋亡典型的生物学特征,Cleaved Caspase-3能够破坏细胞功能,促进细胞凋亡;Caspase-3是其家族成员之一,可激活凋亡信号的传递,是促进细胞凋亡的关键蛋白^[16-17]。Bax和Bcl-2

结合可形成凋亡二聚体,促进凋亡诱导因子的释放,与Caspase蛋白级联反应,诱导细胞凋亡^[18]。本实验结果显示,对叶百部总生物碱能够下调Bcl-2的表达,上调cleaved Caspase-3及Bax的表达,说明对叶百部总生物碱通过Bcl-2,cleaved Caspase-3和Bax 3种途径来诱导SMMC-7721细胞凋亡。

综上所述,本研究表明,对叶百部总生物碱有很好的抑制SMMC-7721细胞增殖和促进凋亡的作用,其机制可能与抑制蛋白Bcl-2表达和促进蛋白Bax,cleaved Caspase-3表达有关。但对叶百部总生物碱中具体的有效成分尚未确定,其促凋亡的更多机制尚有待进一步深入研究发现。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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] KONG C Q, CHEN X C, QIU G H, et al. Effects of miRNA-140 on the growth and clinical prognosis of SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cell line[J]. Bio Med Res Int, 2021, 2021(1):1-14.
- [3] CHENGZ, LI X, DING J. Characteristics of liver cancer stem cells and clinical correlations[J]. Cancer Lett, 2016, 379(2):230-238.
- [4] CHENG B, HUANG Z, WU L, et al. Activation of human hepatic stellate cells enhances the metastatic ability of hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of interleukin-1 β [J]. J Buon, 2021, 26(2): 435-443.
- [5] FREDDIE B, JACQUES F, ISABELLE S, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [6] CHUNG H S, HON P M, LIN G, et al. Antitussive activity of stemona alkaloids from *Stemona tuberosa*[J]. Planta Med, 2003, 69(10):914-920.
- [7] LEE K Y, JEONG E J, SANG H S, et al. Stemona alkaloids isolated from *Stemona tuberosa* roots and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production[J]. Rec Nat Prod, 2015, 10(1):109-112.
- [8] BUT P H, SHAW P C, LIN G E, et al. Authentication and quality assessment of the antitussive Herb Baibu

- (Radix Stemonae) [J]. *Adv Bot Res*, 2012, 2012 (62):1-33.
- [9] 樊兰兰,李丽,张秋玲,等. 酸性染料比色法测定百部流浸膏中的总生物碱[J]. *华西药学杂志*, 2019, 34 (6):627-631.
- [10] 杨玉,王帅,孟宪生,等. 赤芍总苷对人肝癌 SMMC-7721 细胞迁移的影响及作用机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(6):108-112.
- [11] 韦立群,徐成飞,李婉婷,等. NF- κ B 和 MAPK 信号通路参与金雀异黄酮诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的体外研究[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(5): 690-694.
- [12] 杨静波,李宏杰. 苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34 (9):1067-1069.
- [13] 李婉婷,韦立群,李清,等. 迷迭香酸类似物-11 通过 EGFR-JNK 通路抑制人胃癌 MGC-803 细胞增殖和迁移[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4):504-509.
- [14] ACHIM W, REGINA B, BINJE V, et al. Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice[J]. *Hepatology*, 2010, 51(4):1226-1236.
- [15] LIU M, YANG S, JIN L, et al. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) dc roots and their antitumor activities [J]. *Molecules*, 2012, 17(5):6156-6169.
- [16] HOU X L, TONG Q, WANG W Q, et al. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways [J]. *Life Sci*, 2015, 130(14):38-46.
- [17] MANNING B D, TOKER A. Akt/PKB signaling: navigating the network [J]. *Cell*, 2017, 169 (3) : 381-405.
- [18] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SAN P J M, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression [J]. *Embo J*, 2015, 34 (7) : 856-880.

[责任编辑 张丰丰]