

白屈菜红碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡及机制探讨

韩聪, 朱国福*

(上海中医药大学 中药学院, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究白屈菜红碱(CHE)体外诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的作用与机制。**方法:**以肝癌 HepG2 细胞为研究对象,通过噻唑蓝(MTT)法测定 CHE 对细胞的增殖作用,荧光染料 Hoechst 33285 染色观察 CHE 对人肝癌细胞 HepG2 凋亡形态的变化,免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),Bcl-2 家族的抑凋亡蛋白 Bcl-xl,促凋亡相关半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白和基因表达。**结果:**与溶剂组比较,CHE 能显著抑制 HepG2 细胞的增殖,其 6,12,24 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 12.98,10.53,11.21 μmol·L⁻¹,在 Hoechst 33258 染色结果中,CHE 组出现细胞凋亡的典型特征;与溶剂组比较,高浓度 CHE 能明显上调 Bax,Caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达,明显降低 Bcl-xl 蛋白及 mRNA 表达(P < 0.05)。**结论:**白屈菜红碱能抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖,并能上调促凋亡蛋白和 mRNA,下调抗凋亡蛋白和 mRNA 表达,进而诱导凋亡。

[关键词] 白屈菜红碱; HepG2 细胞; 凋亡; 机制; B 淋巴细胞瘤-2 家族; 半胱氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0127-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110127

Mechanism of Apoptosis Induced by Chelerythrine in HepG2 Cells

HAN Cong, ZHU Guo-fu*

(School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of apoptosis induced by chelerythrine (CHE) in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 *in vitro*. **Method:** With HepG2 cells as the study objects, the cell proliferation effect of CHE was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method, the effect of CHE on apoptotic morphology changes in HepG2 cells was observed by Hoechst 33258 staining, the expressions of X protein related to Bcl-2 (Bax), anti-apoptotic protein (Bcl-xl) in B lymphocyte tumor-2 genes (Bcl-2) family, and pro-apoptotic protein Caspase-3 in cysteine family were detected by Western blot. Detect Bax, Bcl-xl, Caspase-3 mRNA expression levels of influence of CHE by Real-time PCR. **Result:** Compared with control group, CHE could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 6, 12, 24 h was 12.98, 10.53, 11.21 μmol·L⁻¹ respectively. In Hoechst 33258 staining results, CHE group showed typical apoptosis characteristics. CHE in high concentration could up-regulate the protein and mRNA expression levels of Bax, Caspase-3, and decrease the protein and mRNA expression levels of Bcl-xl. As compared with the control group, there was statistically significant difference in above indexes (P < 0.05). **Conclusion:** Chelerythrine can inhibit the proliferation of HepG2 cells, and induce apoptosis by increasing the pro-apoptotic protein and mRNA expression levels and decreasing anti-apoptotic proteins and mRNA expression levels.

[Key words] chelerythrine; cancer line HepG2; apoptosis; mechanism; Bcl-2 family; Caspase-3

[收稿日期] 20151214(012)

[基金项目] 上海中医药大学“名师工作室”专项(P20802)

[第一作者] 韩聪,在读硕士,从事抗肿瘤中药药理药效研究,E-mail:hancwang1990@163.com

[通讯作者] *朱国福,博士生导师,教授,从事中医药教学及抗肿瘤中药研究,Tel:021-51322209,E-mail:gzf1998@163.com

飞龙掌血是一味收载于苗族、土家族等少数民族药物志中的常用民族药,其味辛、微苦,性温,有小毒。有祛风止痛、解毒消肿、散瘀止血之效^[1]。本课题组前期已对飞龙掌血总生物碱进行提取研究^[2],发现其有明显的抗炎镇痛及抗肿瘤作用^[3]。白屈菜红碱(CHE),又名白屈菜赤碱、白屈菜季铵碱,是从飞龙掌血分离的异喹啉类的苯并菲啶型生物碱^[4],是飞龙掌血主要的生物碱成分。有现代研究报道 CHE 有抗菌^[5]、抗炎^[6]、抗寄生虫^[7]等生物学活性,其抗肿瘤活性也越来越受到关注,有报道 CHE 对肺癌细胞 A549 的生长有抑制作用^[8],对宫颈癌 Hela 细胞具有抑制作用且可能与诱导细胞凋亡有关^[9]、也有报道 CHE 可能通过线粒体凋亡途径诱导胃癌 BGC-823 细胞的凋亡^[10]。但国内目前关于 CHE 对肝癌细胞的抑制作用研究鲜有报道,本研究选取肝癌细胞 HepG2 为研究对象,观察白屈菜红碱(CHE)对其增殖抑制、凋亡作用并阐明其凋亡机制。进一步探讨民族药中主要成分 CHE 的药理活性和作用机制,对传统民族药的现代研究和新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与细胞株 白屈菜红碱(上海源叶生物科技有限公司,批号 M25D3S1)用二甲基亚砜(DMSO)配制成 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$,临用前用培养液稀释至所需浓度。细胞株 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库,以 DMEM-HIGH GLU 完全培养基(含 10% 胎牛血清,1% 链霉素,1% 青霉素)培养,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2 主要试剂 胎牛血清(Gibcol 公司,批号 1438142),DMEM-HIGH GLU 培养基(Hyclone 公司,批号 NZK1242),Hoechst 33285 染液(碧云天生物科技有限公司,批号 C1011),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),Bcl-2 家族抑制凋亡蛋白 Bcl-x1,半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国 CST 公司,批号分别为 2772S,2762S,9665S,2118S),IRDye[®] 800CW anti-Rabbit IgG 荧光二抗(美国 LI-COR 基因公司,批号 C0121402);RNAisoPlus,PrimeScript RT Master Mix,SYBR Premix Ex Taq[™] II(Takara 公司,批号分别为 AKA1206,AK3802,AK7101)。引物序列由上海生工生物公司合成,Bax(19 bp):上游 5'-ATGGGCTGGACAT TGGAC-3',下游 3'-GGGACATCAGTCGCTTCAG-5'; Bcl-x1(20 bp):上游 5'-CTTGATGGCCACTTACC

TG-3',下游 3'-TGCTGCATTGTTCCCATAGA-5'; Caspase-3(21 bp):上游 5'-TGGAGGCCGACTTCTT GTAT-3',下游 3'-ACTGTTTCAGCATGGCACAA-5'A; GAPDH(20 bp):上游 5'-CGCTGAGTACGTCGT GGAGTC-3',下游 3'-AGAGGGGGCAGAGATGATG AC-5'。

1.3 主要仪器 311 型水套式 CO_2 培养箱, NanoDrop 2000c RNA 浓度测量仪(美国 Thermo 公司),Synergy HT 多功能酶标仪(美国 Bio-tech 基因公司),Power Pac[™] Basic 蛋白电泳及 041BR104950 型转印装置(美国 Bio-Rad 公司),Odyssey 型红光激光成像系统(美国 Li-Cor 公司),Lightcycler 480 II 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 噻唑蓝(MTT)法检测 CHE 的细胞毒性 取处于对数生长期的 HepG2 细胞 5.0×10^4 个/mL 接种于 96 孔板,分为空白(无细胞,无药)组、溶剂组(有细胞,无药)和白屈菜红碱($10, 5, 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,培养 24 h 后,空白组及溶剂组加入不含药的培养液,白屈菜红碱组加入相应浓度培养液,每组设 4 个复孔,继续培养 6, 12, 24 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$,培养 4 h,每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$,于酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度 A,实验重复 3 次。半数抑制浓度(IC_{50})由 IC_{50} 软件计算得出。用以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{用药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{溶剂组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

2.2 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡 取对数生长期 HepG2 细胞,调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL,接种于 6 孔培养板中,培养 24 h,加入 CHE(终浓度为 $10, 5, 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),设置不加药组,孵育 12 h 后,吸出培养液,加 4% 的多聚甲醛固定 10 min,漂洗后,每孔加入 Hoechst 染色液 0.5 mL,避光染色 5 min,再次漂洗,加入抗荧光淬灭剂,荧光显微镜检测。

2.3 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达

取对数生长期的细胞,接种在 6 孔培养板中, 2.0×10^5 个/孔,培养 24 h,加入 CHE(终浓度为 $10, 5, 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),设置不加药组,孵育 12 h 后,收集细胞裂解,离心收集蛋白上清液,测定蛋白浓度,蛋白变性,电泳,转膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,荧光二抗(1:5 000)室温避光孵育 2 h,洗膜后上机检测。

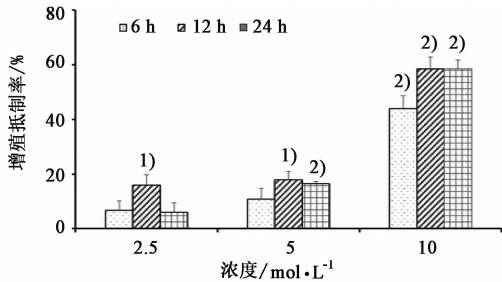
2.4 实时荧光定量 PCR 检测相关基因 加药处理

同 2.3, 将收集的细胞按 Trizol 法进行总 RNA 的提取, 测定 RNA 浓度, 调整 RNA 浓度使其终质量浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据试剂盒说明进行逆转录, 按引物浓度为 $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cDNA 的终体积为 10% 进行扩增, 收集 C_t , 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 每个样品设 3 个复孔, 重复 3 次。计算其相对表达量。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CHE 对细胞毒性的影响 不同浓度的 CHE 作用于 HepG2 细胞 6, 12, 24 h 后, 均能有效抑制 HepG2 细胞的增殖, 其中作用 12 h 时低浓度 CHE 就能显著抑制细胞的生长 ($P < 0.05$), 且抑制作用随着药物浓度的增加而增强, 具有浓度依赖性。其 6, 12, 24 h 时 IC_{50} 分别为 12.98, 10.53, 11.21 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 1。



与溶剂组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3, 4 同)

图 1 CHE 对 HepG2 细胞增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

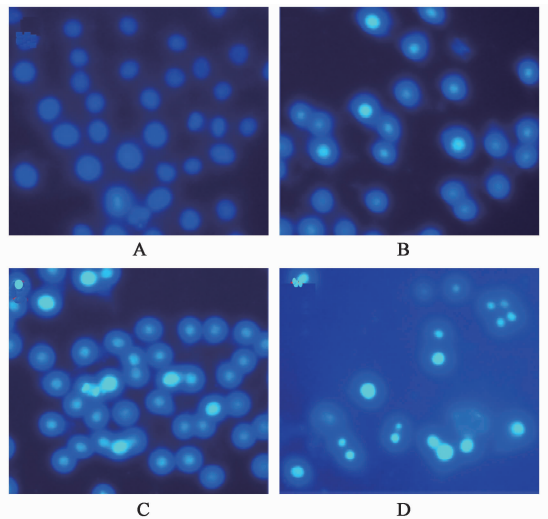
Fig. 1 Inhibitory effect of CHE on proliferation of HepG2 cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 CHE 对细胞凋亡的形态影响 不同浓度的 CHE 作用于 HepG2 细胞 12 h 后, 溶剂组在视野中呈均匀弱蓝色, 核呈圆或卵圆形, CHE 组凋亡细胞明显增多, 表现为染色质凝集, 细胞核着色深, 核固缩、变形、碎裂等典型细胞凋亡特征性变化。见图 2。

3.3 CHE 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 不同浓度 CHE 作用于 HepG2 细胞 12 h 后。与溶剂组比较, CHE ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 Bcl-xl 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), Bax, Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 CHE 对细胞凋亡相关基因表达的影响 CHE 作用 HepG2 细胞 12 h 后, 与溶剂组比较, CHE ($10, 2.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 Bcl-xl mRNA 相对表达明显降低 ($P < 0.05$); Bax, Caspase-3 mRNA 相对表达明显升高 ($P < 0.05$), CHE ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组升高显著 ($P < 0.01$)。见图 4。



A. 溶剂组, B ~ D. CHE ($2.5, 5, 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 (图 3, 4 同)

图 2 CHE 对细胞凋亡的形态影响 (荧光显微镜, $\times 200$)

Fig. 2 Effects of CHE on apoptotic morphology of cancer cells (fluorescent microscope, $\times 200$)

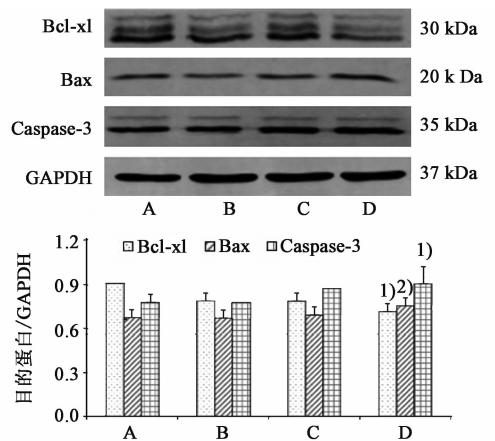


图 3 CHE 作用 HepG2 细胞 12 h 后对 Bcl-xl, Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CHE on Bcl-xl, Bax and Caspase-3 protein expressions of HepG2 cells after 12 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

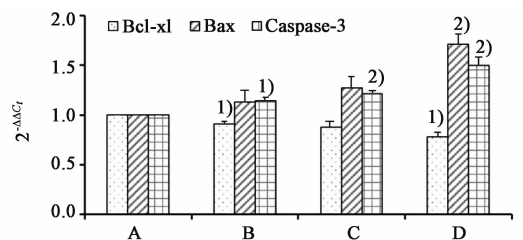


图 4 CHE 作用 HepG2 细胞 12 h 后对 Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of CHE on Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA relative expression of HepG2 cells after 12 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

癌症是公认的危害人类健康最常见和最危险的杀手。仅 2012 年就有大约 1 410 万个新癌症病例

发生,820 万例死亡,而且癌症的发生呈逐年上升趋势^[11],开发治疗癌症的新药物亟待解决。目前,西医治疗肿瘤的方法主要有手术治疗、放射治疗、化学治疗等。虽能取得一定疗效,但也存在不少问题,如手术后遗症及并发症^[12];放射治疗的常见并发症有全身损伤和局部组织受损包括骨髓抑制和局部组织炎症等^[13];化疗常见副作用有骨髓造血功能的抑制和消化道反应等^[14]。因此,寻找高效、低毒的药物已成为抗癌药物研发的研究重点。

中药应用于临床已有几千年的历史,具有多种生物学活性,其有效成分是中药活性的物质基础,CHE 是我国传统民族药飞龙掌血、博落回、白屈菜等的主要有效成分,目前国内有关 CHE 的药效作用已有相关报导,探究其抗肿瘤作用的机制正在成为一个重要的研究方向。

细胞凋亡涉及一系列基因激活、表达以及调控等主动过程,是机体为了更好地适应生存环境而主动采取的一种死亡过程^[15],而细胞凋亡的失调是人体致癌的一个常见机制。本实验观察了 CHE 对肝癌 HepG2 细胞株的毒性作用,结果显示 CHE 对 HepG2 细胞株的生长有很好的抑制作用。Hoechst 33258 是一种膜通透性的荧光染料,正常细胞和中期早期凋亡细胞均可被 Hoechst 着色,但是正常细胞核 Hoechst 染色的形态呈圆形,淡蓝色,而凋亡细胞的细胞核由于浓集而呈亮蓝色,或核呈分叶,碎片状,边集,本研究显示 CHE 组可明显诱导细胞凋亡。细胞凋亡的调控受 Bcl-2 家族成员及 Caspase 的调控,包括抗凋亡的 Bcl-xl 以及促凋亡的 Bax 和 Caspase-3 等^[16],本研究显示 CHE 可以上调 Bax, Caspase-3 蛋白及 mRNA 的相对表达,降低 Bcl-xl 蛋白及 mRNA 的相对表达。

综上所述,CHE 能诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,但哺乳动物的细胞凋亡途径主要有以线粒体为核心的凋亡途径和以肿瘤坏死因子受体(TNFR)为代表的膜死亡受体途径^[17],所以 CHE 诱导肝癌细胞凋亡的具体机制有待进一步的研究,这也是本课题组接下来的研究重点。总之,CHE 是一种很有开发前景的细胞凋亡诱导剂,对抗肿瘤药物的新药研发具有指导作用。

[参考文献]

[1] Li J C, Shen X F, Meng X L. Analgesic effect and mechanism of the three TCM-herbal drug-combination Tou Feng Yu pill on treatment of migraine [J].

Phytomedicine, 2011, 18(8/9): 788-794.

[2] 范圣洁,李文龙,崔文霞,等. 酸性染料比色法测定飞龙掌血提取物中总生物碱的含量[J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(1): 85-89.

[3] 陆怡,朱元章,郭晨旭,等. 飞龙掌血提取物的镇痛作用及相关机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(7): 82-86.

[4] 王培卿,尹震花,康文艺. 白屈菜红碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2745-2745.

[5] Miao F, Yang X J, Zhou L, et al. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity[J]. Nat Prod Res, 2011, 25(9): 863-875.

[6] 周重楚. 白屈菜中季苯并类生物碱的抗炎作用[J]. 国外药学:植物药分册, 1982(5): 37.

[7] Li X L, Yao J Y, Zhou Z M, et al. Activity of the chelerythrine, a quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus* L. on *Dactylogyrus intermedius*[J]. Parasitol Res, 2011, 109(1): 247-252.

[8] 贺云鹏. 白屈菜红碱抗肿瘤活性及其相关机制[J]. 中国老年学杂志, 2012, 31(23): 4690-4691.

[9] 刘帆,张正付,魏雄辉. 白屈菜红碱对宫颈癌细胞的抑制作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(3): 514-516.

[10] Zhang Z, Guo Y, Zhang L, et al. Chelerythrine chloride from Macleayacordata induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012, 2(5): 464-471.

[11] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. Ca Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[12] 李辉. 护理干预对预防乳腺癌根治术后病人淋巴水肿的效果观察[J]. 护理研究, 2012, 26(2): 545-546.

[13] 杨双,李一琼. 恶性肿瘤放疗后副作用的中西医结合护理探讨[J]. 中国医学创新, 2012, 9(7): 60-61.

[14] 王会志,董驹,郑毛根,等. 中药扶正合剂对降低肺癌患者化疗副作用的疗效观察[J]. 华北煤炭医学院学报, 2005, 7(2): 182-183.

[15] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Brit J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.

[16] 弓娟琴,陈志强,李文忠,等. Fas 介导的凋亡与 Caspase 家族[J]. 国外医学:皮肤病学分册, 2001, 27(5): 279-281.

[17] Hajra K M, Liu J R. Apoptosome dysfunction in human cancer[J]. Apoptosis, 2004, 9(6): 691-704.

[责任编辑 张丰丰]