

6'-羟基爵床素 A 对 HepG2 细胞内质网应激及胞内 Ca^{2+} 的影响

李玄¹, 贺晓丽², 童元峰³, 吴松³, 毕明刚^{2*}

(1. 河北北方学院 研究生部, 河北 张家口 075000; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的: 研究新型抗肿瘤药物 6'-羟基爵床素 A (6'-hydroxy justicidin A, JR6) 对 HepG2 细胞的内质网应激及胞内钙离子浓度变化的影响及其意义。方法: HepG2 细胞经过终浓度分别为 0, 0.615, 2.45, 9.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 JR6 处理 24h 后采用实时定量 RT-PCR 技术、蛋白印迹 (Western blot) 法检测细胞中 X-盒结合蛋白 1 (XBP-1) mRNA, IRE1 α (inositol-requiring enzyme-1 α), GRP78/BiP (glucose regulated protein/BiP), 及 Bcl-2 (B cell leukemia 2) 蛋白表达量的变化。激光扫描共聚焦显微镜测 JR6 作用 24h 后细胞内静息钙浓度变化及 IP3R 钙泵抑制剂光溜海绵素 C 干预后 JR6 的作用变化。结果: IRE1, XBP-1 mRNA, Bip, Bcl-2 蛋白的表达量均与 JR6 剂量负相关。高剂量组的各蛋白表达量与空白组相比, 均下降了 40% 左右。共聚焦显微镜观察结果显示 JR6 引起细胞内钙离子浓度升高了 2 倍左右; 加入 IP3R 钙泵抑制剂后, JR6 不能引起细胞内钙升高。结论: JR6 通过内质网钙泵 IP3R 升高细胞内的钙浓度, 破坏细胞内的钙稳态; 同时引起了内质网应激, 并抑制了未折叠蛋白反应的相关因子。

[关键词] HepG2; 肿瘤; 内质网应激; 钙稳态; 未折叠蛋白反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0212-04

[doi] 10.11653/syfy2013130212

Effect of 6'-hydroxy Justicidin A on Endoplasmic Reticulum Stress and Ca^{2+} in HepG2 Cells

LI Xuan¹, HE Xiao-li², TONG Yuan-feng³, WU Song³, BI Ming-gang^{2*}

(1. Department of Postgraduates, Hebei Northern University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Vegetations for Medicine Institute, Academy of Medical Science of China, Beijing 100193, China;

3. Institute of Pharmacy, Academy of Medical Science of China, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To research the effect of 6-hydroxy justicidin A (JR6) on endoplasmic reticulum stress (ERS) and Ca^{2+} in HepG2 cells. **Method:** Semiquantitative RT-PCR and Western blot were used to investigate the expression levels of X-box binding protein 1 (XBP-1) mRNA, Inositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α), Glucose regulated protein/BiP (GRP78/BiP), B cell leukemia 2 (Bcl-2) proteins in HepG2 cells which were treated with 0, 0.615, 2.45, 9.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JR6 separately for 24 h. Laser confocal scanning microscopy was used to study the difference of intracellular calcium between medicine group and IP3R (inositol 1, 4, 5-trisphosph-phate receptor) inhibited group. **Result:** The expression of IER1, GRP78/BiP Bip, Bcl-2 proteins and XBP-1 mRNA have a reduction in approximately 40% with high JR6 group. It is found that the JR6 could elevate the intracellular calciumion concentration more than two times, and this effect was disappeared with the IP3R inhibitor (Xestospongion C). **Conclusion:** JR6 through IP3R way elevates intracellular free Ca^{2+} concentration, and arouse

[收稿日期] 20130222(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873090)

[第一作者] 李玄, 研究生, 从事肿瘤药理学研究, Tel:13391979919, E-mail:li1605161@126.com

[通讯作者] * 毕明刚, 博士, 研究员, 从事肿瘤、神经免疫药理学研究, Tel:010-57833504, E-mail:biminggang@yahoo.com.cn

ERS. At the same time, JR6 can inhibit elements which related to unfolded protein response (UPR).

[Key words] HepG2; tumor; endoplasmic reticulum stress; intracellular free Ca^{2+} concentration; unfolded protein response

鬼臼毒素最早在 1880 年被 Podwyssotzki 在美洲鬼臼树脂中发现,1942 年, Kaplan 证实了鬼臼脂素对肿瘤生长的治疗效果,其化学结构在 1951 年被 Hartwell 和 Schrecker 采用化学方法揭示。鬼臼毒素具有较强的抗肿瘤和抗病毒作用,但由于毒性大,不能口服而限制了其临床使用。其化学结构具有多个官能团,启发人们去改造这些基因^[1]。自 20 世纪 50 年代起,世界各国的医药工作者获得了数以千计衍生物,这些鬼臼毒素类的衍生物,相对于鬼臼毒素而言,毒性得到了很大的改善。并从中筛选出了以依托伯昔 (VP-16, etoposide) 和替尼伯昔 (VM-26, teniposide) 为代表的几种高活性的抗肿瘤药物^[2-3]。

6'-羟基甾床素 A (JR6) 为本课题组采用 MTT 体外筛选的方法,对甾床的不同部位进行了初筛,是首次从该植物中分离到的全新化合物。经结构鉴定,其母核与鬼臼毒素相似。本实验旨在进一步探讨 JR6 的抗肿瘤作用机制。研究了 X-盒结合蛋白 1 (XBP-1) mRNA, IRE1 α , GRP78/BiP, Bcl-2 等蛋白表达和细胞内钙稳态受到的影响^[4]。

1 材料

1.1 药物 JR6 由中国医学科学院药物研究所合成,纯度 95.34%。10 mg 的 JR6 溶解于 1 mL 的 DMSO 中,用不含 FBS 的 MEM 培养基稀释至 20 mL, -20 °C 储存,工作液稀释至 12.3 ~ 196 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 置 4 °C 保存备用。用量:50 μL JR6:1 mL MEM 培养液。

1.2 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 由中国医学科学院细胞中心购买。

1.3 试剂与仪器 胎牛血清, MEM 培养基 (GIBICO 公司, Lot 941273), 蛋白 1 抗 2 抗 (Cell Signaling, Lot 0005), 光溜海绵素 C (Tocris, Lot 1280), BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, Lot 19911A), 蛋白免疫印迹试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司, Lot 1912I), 钙离子荧光探针 Fluo-3 (Invitrogen, Lot 649214), c-DNA 第一链合成试剂盒及 PT-PCR 实时荧光定量试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, Lot 20428), TCS SP2 激光共聚焦显微镜 (Leica)。

2 方法

2.1 细胞培养 含 10% 胎牛血清的 MEM 在 37 °C, 5% CO_2 细胞培养箱中培养,实验时取对数生

长期细胞。

2.2 观察细胞内静息钙浓度变化 取对数生长期细胞 5×10^4 个接种于激光共聚焦小皿。实验分组 A:空白组 B:JR 组 (受试药终浓度 9.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); C:JR + 抑制剂组 (光溜海绵素 C 0.5 μg + 受试药 9.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); D:抑制剂组 (光溜海绵素 C 0.5 μg)。24 h 后按说明书装载荧光探针 Fluo-3。孵育 40 min 后以无钙台式液清洗小皿,上机检测。每组取 15 ~ 20 个细胞的荧光值进行分析。

2.3 测定 HepG2 细胞 IRE1, Bip, Bcl-2 等蛋白的表达量 取对数生长期细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁 24 h 后每孔加入受试药 50 微升,浓度分别为 0, 12.3, 49.2, 196.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞裂解提取总蛋白,取等量蛋白 20 μL 在十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulfate, SDS) 一聚丙烯凝胶中电泳,转膜,经封闭阻断后,参照产品说明书加入一抗 IRE1, Bip, Bcl-2 (1:1 000), 4 °C 过夜,洗膜后加入二抗 Anti-rabbit IgG (1:5 000) 室温孵育 2 h, 使用双色红外激光成像系统。膜成像后用蛋白再生液洗膜,然后依次加入内参蛋白的 1 抗 2 抗,测定内参蛋白表达量。以测得的各指标的灰度与内参照 β -actin 灰度的比值代表相对定量值。

2.4 检测细胞中 XBP-1 mRNA 的表达 取对数生长期细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁 24 h 后每孔加入受试药 50 μL , 浓度分别为 0, 12.3, 49.2, 196.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞裂解提取总 RNA。

目的基因 XBP-1, 上游引物 5'-CCATGGATTCTGGCGGTATGAC-3'; 下游引物 5'-TGGGTAGACCTCTGGGAGCTCCT-3'; 预增片断为 142 bp 内参照 β -actin 引物序列上游 5'-CACTATTGGCAACGAGCGGTTTC-3'; 下游 5'-ACTTGCGGTGCACGATGGAG-3'; 预扩增片段为 372 bp。方法:总 RNA 提取及逆转录严格按照说明书进行 在由总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增 PCR 的终反应体积为 20 μL , 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s 40 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 冷却,实时荧光定量待测样本 mRNA 相对表达水平。

实验同时以双蒸水代替模板为阴性对照。以管家基因 β -actin 的转录数量作为内源性 RNA 参照。

分组与 2.3 相同。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因的相对表达量:待测基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{基准}} = (\text{样品待测基因 } Ct \text{ 值} - \text{样品 } \beta\text{-actin } Ct \text{ 值}) - (\text{基准待测基因 } Ct \text{ 值} - \text{基准 } \beta\text{-actin } Ct \text{ 值})$ 。

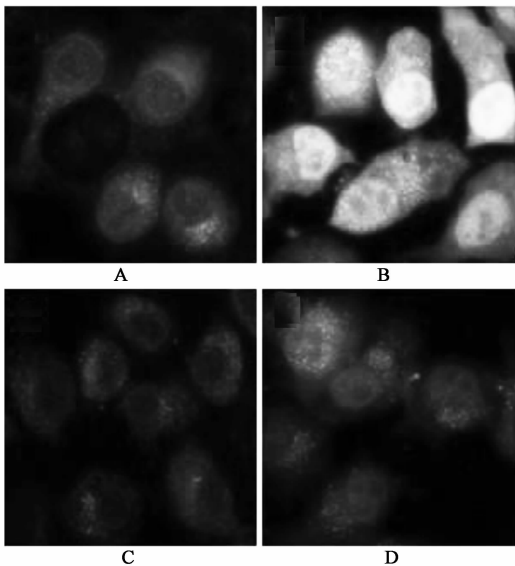
2.5 统计学方法 数据使用 SPSS 16.0 处理各测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析使用单因素方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 JR6 对 HepG2 细胞钙稳态的影响 (钙离子浓度越高, 荧光越强)

3.1.1 JR6 对 HepG2 细胞内钙的升高作用 JR6 作用 24 h 后激光共聚焦观察结果显示 $9.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 JR6 能明显提高 HepG2 细胞内的钙浓度, 与空白对照组相比, JR 组荧光值提高 2 倍以上且有统计学差异 ($P < 0.05$), 见图 1A, B; 图 2。

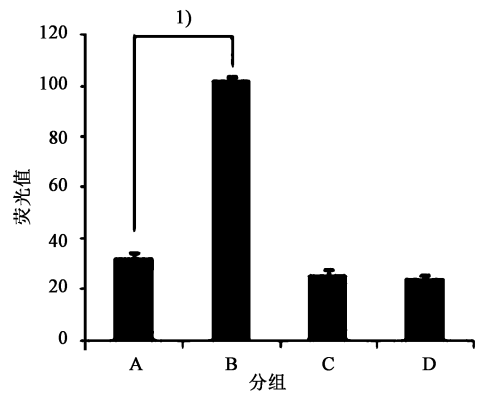
3.1.2 IP3R 钙泵抑制剂光溜海绵素 C 干预后 JR6 的作用变化 共聚焦观察结果显示: 24 h 时间点抑制剂组与 JR + 抑制剂组钙离子荧光结果无统计学差异。当 IP3R 钙泵被抑制后, JR6 不能引起 HepG2 细胞内钙升高。见图 1C, D; 图 2。



A. 空白组; B. JR 组 (JR6 终浓度 $9.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);
C. JR + 抑制剂组 (光溜海绵素 $0.5 \mu\text{g}$ + JR6 终浓度 $9.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); D. 抑制剂组 (光溜海绵素 $0.5 \mu\text{g}$), 图 2 同

图 1 不同分组细胞内钙离子浓度变化

3.2 JR6 对 IRE1, GRP78/BiP, Bcl-2 蛋白的影响 Western blot 结果显示: 不同剂量 JR6 作用 24 h 后, IRE1 α , GRP78/BiP, Bcl-2 这些蛋白的表达均受到不同程度的抑制作用 ($P < 0.05$), 且呈剂量关系, 见图 3, 图 4。即 JR6 可通过下调 HepG2 细胞



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (图 4 同)

图 2 钙离子荧光值对比 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

IRE1, GRP78/BiP, Bcl-2 蛋白的表达, 阻断未折叠蛋白反应 UPR 的效应。

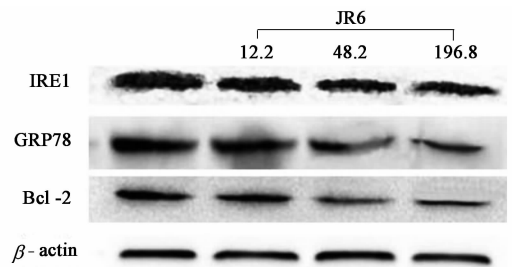


图 3 各组 Western blot 蛋白条带对比

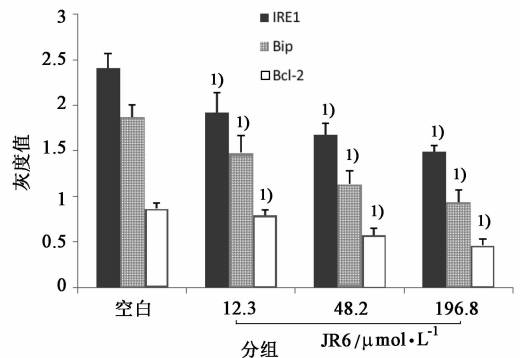


图 4 各组 IRE1, BiP, Bcl-2 蛋白灰度梯度 ($\bar{x} \pm s$)

3.3 JR6 对 XBP-1 mRNA 的影响 RT-PCR 显示: 与对照组相比, 细胞受 JR6 刺激 24 h 后 XBP-1 mRNA 的表达下调 ($P < 0.05$), 且呈剂量关系。JR6 可特异性引起 HepG2 细胞 XBP-1 mRNA 表达降低。见表 1。

4 讨论

细胞凋亡的调控由十分复杂的信号网络系统控制。近年来研究认为, 钙超载是细胞凋亡信号转导的起点, 引起并参与目前已知的 3 条主要信号通路 (线粒体通路、内质网通路、死亡受体通路) 的信号转导^[5]。Bcl-2 是一种定位于 18q21, 编码 26 kD 的线粒体膜整合蛋白。它主要作用在线粒体水平, 少

表 1 XBP-1mRNA 相对表达量(近似值)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Ct 值; β -actin	Ct 值:XBP-1	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	anova 检验(相对空白组)
<i>n</i>		1	3	3	-
空白	-	16.95	18.65 \pm 0.12	-	-
JR6	12.3	16.32	18.29 \pm 0.18	1.73 \pm 0.04	<i>P</i> < 0.05
	49.2	17.04	19.21 \pm 0.24	1.53 \pm 0.12	<i>P</i> < 0.05
	196.8	17.96	20.39 \pm 0.21	1.27 \pm 0.08	<i>P</i> < 0.05

量存在于核膜、内质网膜上,通过阻止线粒体细胞色素 C 的释放而发挥抗凋亡作用。Lam 等曾报道钙泵特异性抑制剂 Thapsigargin (TG) 诱导的 WEH17.2 等细胞的凋亡可被 Bcl-2 所抑制,其原因是 Bcl-2 抑制了 Ca²⁺ 的跨膜流动,Bcl-2 能直接抑制 Ca²⁺ 通过 IP3R 通道从内质网的释放,同时通过降低内质网腔内 calreticulin 以及钙泵的表达来降低内质网内的钙离子浓度^[6]。受试药 JR6 抑制 Bcl-2 蛋白与开放 IP3R 钙通道的先后顺序有待进一步研究。

IRE1,ATF6,PERK 为内质网应激 ERS 感受蛋白,本实验通过 IRE1 蛋白特异表达来判定发生了 ERS^[7]。受试药 JR6 引起了内质网应激并抑制了未折叠蛋白反应的关键因子 GRP78/BiP,XBP-1。未折叠蛋白反应是内质网应激的一种类型,它通过引起靶基因转录上调和蛋白质翻译水平下调,排解内质网内的错误折叠与未折叠蛋白质,促进细胞生存。参与未折叠蛋白反应的信号分子主要有 GRP78/BiP,XBP-1 等。XBP-1 是参与细胞分化的一个调控因子,促进细胞分化,也是未折叠蛋白反应元件的一个重要组分,分为 XBP-1U,XBP-1S 两种形式,同样具有广泛的表达性,具体功能尚待研究^[8];有实验结果^[9]指出:缺氧可以诱导肿瘤细胞中 XBP-1 高表达,XBP-1 缺失可增加由缺氧造成细胞死亡的敏感性,明显降低肿瘤转移抑制肿瘤细胞生长。GRP78/BiP 在未折叠蛋白反应信号传导通路中处于核心地位,被认为是未折叠蛋白反应的标志性分子,具有帮助错误折叠的蛋白恢复成正确折叠方式的作用,是目前研究最多的 UPR 途径转录的靶分子。此外有文献^[10]指出:高表达的 GRP78 同时对肿瘤血管生成也有一定的辅助促进作用,有利于肿瘤的发生与发展。GRP78/BiP,XBP-1 蛋白表达是否调节其他凋亡相关因子仍不清楚。在前期工作中笔者也发现 JR6 可诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡并磷酸化 JNK^[11],并推测其可能对 CHOP 凋亡通路有一定的影响^[12]。总之,鬼臼毒素类化合物作为抗肿瘤药物仍具有良好的开发前景,为我国开发具有自主知识产权的新型抗肿瘤药物提供了新的思路和靶点。

[参考文献]

- [1] 陈毓亨.我国鬼臼类植物资源的研究[J].药学学报,1979,14(2):101.
- [2] 陈小蒙,刘成梅,刘伟,等.百合多糖的药理作用及其作用机制研究进展[J].农产品加工.学刊,2007,8(8):7.
- [3] 卢贺起,丁家欣,魏难川,等.紫草粗多糖粗提物的药效作用研究[J].中国药理学学会通讯,2000,17(4):26.
- [4] 杨玥,张加英.实验方剂学研究思路探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):224.
- [5] Kadenbach B, Arnold S, Lee I, et al. The possible role of cytochrome oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1655(1/3):400.
- [6] Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses[J]. Oncogene, 2003, 22(53):8619.
- [7] Zhang K, Kaufman R J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease[J]. Neurology, 2006, 66(2 Suppl 1):S102.
- [8] Kaufman R J, Scheuner D, Schroder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 3(6):411.
- [9] Kraskiewicz H, Fitz Grealid U. Partial XBP-1 knockdown does not affect viability of oligodendrocyte precursor cells exposed to new models of hypoxia and ischemia *in vitro* [J]. J Neurosci Res, 2011, 89(5):661.
- [10] 余先祥,谢本俊,张林杰,等.胃癌组织中 GRP78 的表达与临床病理特征的相关性分析[J].安徽医科大学学报,2012,47(6):681.
- [11] Wang H, Ye Y, Chui J H, et al. Oridonin induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells [J]. Oncol Rep, 2010, 24(3):647.
- [12] Wang H, Ye Y, Chu J H, et al. Proteomic and functional analyses reveal the potential involvement of endoplasmic reticulum stress and α -CPI in the anticancer activities of oridonin in HepG2 cells [J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(2):160.

[责任编辑 聂淑琴]