

青蒿琥酯对人结肠癌细胞 HCT-8 细胞凋亡和细胞周期的影响

黄伟炜¹, 刘宁^{1*}, 牛红军²

(1. 海南省人民医院普外科, 海口 570311; 2. 天津现代职业技术学院, 天津 300350)

[摘要] 目的: 研究青蒿琥酯对人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡和细胞周期的影响。方法: 实验分为 10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理组, 阴性对照组和空白对照组。采用透射电镜和流式细胞仪检测青蒿琥酯对 HCT-8 细胞的凋亡诱导效果; 采用流式细胞仪分析青蒿琥酯对 HCT-8 细胞周期的影响; 采用 Western blot 印迹法检测青蒿琥酯对细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。结果: 经青蒿琥酯处理后, 电镜下可见 HCT-8 细胞膜皱缩、染色质凝聚、核碎裂、凋亡小体形成。10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理组凋亡率分别为 17.1% \pm 3.8%, 29.5% \pm 5.1%, 41.4% \pm 5.8%, 显著高于空白对照组 5.1% \pm 1.4%, $P < 0.05$ 。在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理组, HCT-8 细胞 G_0/G_1 期所占比例随着药物作用时间延长而增加, S 期与 G_2/M 期细胞所占比例则下降。10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理组 Bax 蛋白表达水平分别为 0.20 \pm 0.03, 0.40 \pm 0.05 和 0.50 \pm 0.08 显著高于空白对照组 (0.06 \pm 0.02), $P < 0.05$; Bcl-2 蛋白表达水平未见明显变化, Bcl-2/Bax 呈下降趋势。结论: 青蒿琥酯可以抑制人结肠癌细胞 HCT-8 增殖, 诱导细胞凋亡, 其诱导凋亡作用机制可能与其阻滞结肠癌细胞周期和上调促癌基因 Bax 表达有关。

[关键词] 青蒿琥酯; HCT-8 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0225-04

Effect of Artesunate on Cell Apoptosis and Cell Cycle of Human Colon Cancer Cell HCT-8

HUANG Wei-wei¹, LIU Ning^{1*}, NIU Hong-jun²

(1. Department of General Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China;
2. Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of artesunate on apoptosis and cell cycle of human colon cancer HCT-8 cells. **Method:** The experimental groups were negative control group, blank control group, 10, 20 and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ artesunate-treated groups. transmission electron microscope (TEM) and flow cytometry (FCM) were used to analyze the apoptosis of the treated HCT-8 cells by artesunate. FCM was used to analyse cell cycle of the treated HCT-8 cells by artesunate. The levels of Bax and Bcl-2 involved in the different treated HCT-8 cells

[收稿日期] 20111212(001)

[第一作者] 黄伟炜, 硕士, 副主任医师, 从事肝胆胰脾胃肠外科, Tel: 0898-68642200, E-mail: sclm2005@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 刘宁, 硕士, 住院医师, 从事肝胆胰脾胃肠外科, Tel: 0898-68642200, E-mail: wenzhang2012@yeah.net

[2] Hong S, Morrow T J, Paulson P E, et al. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and-resistant sodium channels in dorsal rootganglion neurons in the rat[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 29341.

[3] Nassar M A, Stirling L C, Forlani G, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 12706.

[4] 刘鹏, 曹魏, 岳志军, 等. 中药复方“益糖康”抗糖尿病大鼠 DNA 损伤的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(10): 15.

[5] 吕悦, 石岩, 杨宇峰. 中药益糖康胶囊的药代动力学研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2212.

[6] 杨宇峰, 石岩, 吕悦. 中药新药益糖康胶囊毒理学实验研究[J]. 医学综述, 2007, 13(24): 2044.

[责任编辑 聂淑琴]

were detected by Western blot. **Result:** After treatment of artesunate, it had observed by TEM that the cell shape changed with cytomembrane shrink, karyopycnosis, nuclear fragmentation, and the formation of apoptotic bodies. The rates of apoptosis of 10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ artesunate-treated groups were $17.1\% \pm 3.8\%$, $29.5\% \pm 5.1\%$, $41.4\% \pm 5.8\%$, which was significantly higher than the apoptosis rare of blank control group ($5.1\% \pm 1.4\%$, $P < 0.05$). In 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ artesunate-treated group, G_0/G_1 cell proportion was increased with the prolonged drug effects, and S and G_2/M cell proportion was decreased. Bax protein expression levels of 10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ artesunate-treated groups were 0.20 ± 0.03 , 0.40 ± 0.05 , 0.50 ± 0.08 , which was significantly higher than that in blank control group (0.06 ± 0.02 , $P < 0.05$). The difference of Bcl-2 protein expression levels in the above-mentioned groups was not statistically significant. The protein expression ratio of Bcl-2/Bax showed downward trend. **Conclusion:** Artesunate can inhibit human colon cancer HCT-8 cell growth and induce apoptosis of HCT-8 cell lines by blocking cell cycle and regulating the expression of Bax genes.

[**Key words**] artesunate; HCT-8 cell; cell apoptosis; cell cycle

青蒿素类药物是全世界范围内广泛采用的抗疟药;青蒿琥酯是青蒿素衍生物,具有更好的水溶性和抗疟效果,同时其表现出的强大抗肿瘤活性越来越引起国内外学者注意^[1]。多项研究结果显示青蒿琥酯具有很强的抗结肠癌作用^[1-2],但对于其抗癌机制则较少有报道。本课题组前期研究表明较低浓度($< 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)青蒿琥酯即可显著抑制体外培养的人结肠癌 HCT-8 细胞增殖^[3]。为明确其原因,本文继续观察其对结肠癌细胞凋亡的影响,并检测细胞周期和凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 表达的变化,以探讨其作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌 HCT-8 细胞由中国科学院生物化学与细胞生物学研究所提供。

1.2 制剂与试剂 青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司,批号 H10930195),先用 0.5% NaHCO_3 溶解后,再用生理盐水配置成所需浓度。Bax 鼠单抗和 Bcl-2 兔多抗(均购自 Santa Cruz 公司),EliViasionTM plus 鼠/兔通用试剂盒和 DAB 显色试剂盒(均购自迈新生物公司)。

1.3 仪器 JEM-200cx 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司),FACSCaliber 流式细胞仪(美国 BD 公司),AE-8130 电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 人结肠癌 HCT-8 细胞的培养 采用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液,置于 37°C ,5% CO_2 培养箱培养。待细胞处于对数生长期时,分别给与不同浓度青蒿琥酯处理(青蒿琥酯处理组)。阴性对照为单纯 RPMI-1640 培养基,空白对照组为无药物干预的结肠癌 HCT-8 细胞。

2.2 超微结构观察 调整人结肠癌 HCT-8 细胞浓

度,与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯共培养 10 h。收集细胞,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,4% 戊二醛过夜,PBS 漂洗,1% 锇酸固定 1 h,PBS 漂洗。梯度乙醇脱水,丙酮浸透,包埋,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬双染,电镜观察并拍照。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 按 FITC 试剂盒操作说明,不同浓度青蒿琥酯作用 48 h 后收集细胞,PBS 洗涤,调整细胞密度,取 400 μL 细胞悬液,加 5 μL 的 Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育,离心去上清,重悬细胞后加入 PI 使其终质量浓度为 $1 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,避光作用后上机检测。

2.4 流式细胞术检测细胞周期 采用终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯(近 IC_{50} 值)与人结肠癌 HCT-8 细胞共培养 0,12,24,48 h。收集细胞,70% 乙醇 4°C 固定, 37°C 水浴 30 min;加入 PI, 4°C ,15 min。流式细胞仪检测细胞周期。

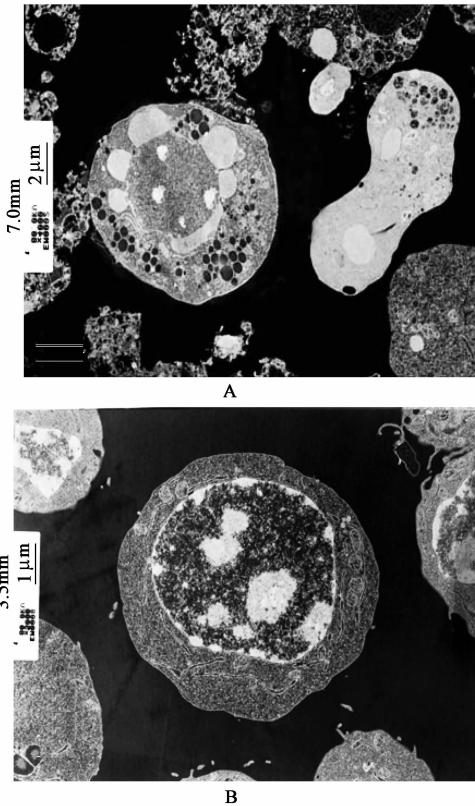
2.5 Western blot 法 青蒿琥酯作用 24 h 后,分别收集上述各组细胞,提取细胞总蛋白,蛋白定量后,加入等体积 $2 \times$ 上样缓冲液,煮沸备用。取部分蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉封闭,加入相应一抗 4°C 过夜(β -actin 为内参),洗涤后加入二抗室温孵育 2 h,DAB 显色。IPP 吸光度分析软件进行目的条带的表达检测及分析。

2.6 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。采用 SPSS 10.0 统计软件,以 Dunnett's t 检验分析样本均数间的差异。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 青蒿琥酯处理后人结肠癌 HCT-8 细胞超微结构观察 经 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯作用 10 h 后,可观察到细胞膜皱缩起泡、染色质凝聚、核碎裂、凋亡

小体形成等典型形态学改变(图 1A)。空白对照人结肠癌 HCT-8 细胞电镜下未见明显凋亡形态学变化(图 1B)。



A. 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯组; B. 对照组

图 1 青蒿琥酯处理后人结肠癌 HCT-8 细胞超微结构观察

3.2 青蒿琥酯处理后人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡率变化 随青蒿琥酯浓度增加,青蒿琥酯处理组凋亡率递增。与空白对照组 $5.1\% \pm 1.4\%$ 相比,10,20,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理组凋亡率分别为 $17.1\% \pm 3.8\%$, $29.5\% \pm 5.1\%$ 和 $41.4\% \pm 5.8\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.3 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理后人结肠癌 HCT-8 细胞周期变化 在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理人结肠癌 HCT-8 细胞后, G_0/G_1 期细胞所占比例随着药物作用时间的延长而增加,细胞的增殖指数(即 S 期与 G_2/M 期细胞所占比例)则呈时间依赖性下降(表 1)。

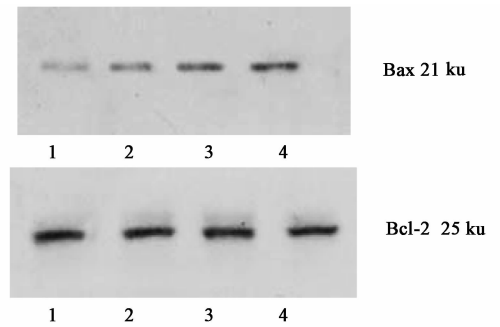
3.4 青蒿琥酯对结肠癌 HCT-8 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 采用目的蛋白与内参蛋白的吸光度比值表示目的蛋白的表达水平。10,20,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯作用 24 h 后,结肠癌 HCT-8 细胞 Bax 蛋白的表达水平依次为 0.20 ± 0.03 , 0.40 ± 0.05 , 0.50 ± 0.08 , 与空白对照组 0.06 ± 0.02 比较呈现升高趋势,各组间有统计学差异 ($P < 0.05$)。各青蒿

表 1 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青蒿琥酯处理后 HCT-8 细胞细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间/h	细胞周期分布/%		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	43.4 ± 8.74	52.3 ± 11.33	4.3 ± 1.15
12	46.8 ± 9.49	49.6 ± 8.67	4.0 ± 0.93
24	49.3 ± 10.28	45.4 ± 7.36	$5.3 \pm 1.49^{1,2)}$
48	$61.4 \pm 14.53^{1,2)}$	$35.2 \pm 6.27^{1,2)}$	$3.4 \pm 3.12^{1,2)}$

注:与 0 h 比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 12 h 比较²⁾ $P < 0.05$ 。

琥酯处理组 Bcl-2 蛋白表达水平与对照组相比无显著差异。随青蒿琥酯浓度升高,Bcl-2/Bax 呈下降趋势(图 2)。



1. 对照组; 2. 青蒿琥酯 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 3. 青蒿琥酯 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4. 青蒿琥酯 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 2 青蒿琥酯对结肠癌 HCT-8 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

4 讨论

近年来我国结肠癌发病率呈上升趋势,手术切除仍是治疗该疾病的首选方法,但由于术后局部复发和转移率较高,患者 5 年生存率仍较低,故深入研究其发病机制、寻找新的治疗方法尤为必要。众多研究表明,结肠癌细胞无序增殖与细胞凋亡紊乱密切相关^[4]。本研究结果显示:非药物处理的结肠癌细胞对照组未出现典型细胞凋亡形态学改变,促凋亡因子 Bax 低表达,细胞凋亡率非常低。进一步证实凋亡异常是结肠癌发病的重要原因。青蒿琥酯是近年被发现具有抗肿瘤功效的传统抗疟药,其可诱导脑胶质瘤细胞、白血病 K562 细胞、骨髓瘤细胞等肿瘤细胞发生凋亡^[1,5-6]。本研究采用不同浓度青蒿琥酯处理体外培养的人结肠癌 HCT-8 细胞,结果在透射电镜下观察到典型凋亡形态学改变;进一步通过流式细胞术分析凋亡细胞,发现随青蒿琥酯作用时间延长及药物浓度的加大,细胞凋亡率增加。总之,不管是形态学观察还是流式细胞学分析,上述实验结果均提示青蒿琥酯具有诱导体外培养的人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡的作用。

阻断细胞增殖周期进程可引起细胞凋亡。细胞周期也是众多抗癌药物作用的靶点。新藤黄酸可影响人结肠癌 HCT116 细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 Cyclin E 表达,使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,抑制肿瘤细胞恶性增殖^[7]。胡桃楸可上调子宫颈癌 Hela 细胞 Cyclin A 表达,阻滞细胞周期于 S 期,进而诱导细胞凋亡^[8]。本实验通过流式细胞仪对青蒿琥酯处理后的结肠癌 HCT-8 细胞进行细胞周期分析,结果显示:在凋亡细胞数目增加的同时,青蒿琥酯处理组 G₀/G₁ 期细胞比例增加,S 期细胞比例减低,即青蒿琥酯阻滞结肠癌 HCT-8 细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期移行,阻断细胞的 DNA 合成和复制,形成 G₁ 期阻滞。而这种分裂期前阻滞可能正是青蒿琥酯诱发人结肠癌 HCT-8 细胞发生凋亡的重要原因。

线粒体介导的细胞凋亡是较为常见细胞凋亡方式^[9-10]。其主要过程是线粒体释放细胞色素 C,细胞色素 C 进入细胞胞浆后经一系列级联反应,最终激活凋亡执行者——Caspase-3,导致细胞发生凋亡。线粒体对细胞色素 C 的通透性主要受促凋亡因子 Bax 和抑凋亡因子 Bcl-2 调控,Bcl-2/Bax 表达变化决定凋亡发生与否^[11-12]。本研究采用 Western blot 法检测青蒿琥酯对人结肠癌 HCT-8 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达影响。结果显示:随药物浓度增加,Bax 蛋白表达显著增加,Bcl-2 蛋白表达无明显差异,Bcl-2/Bax 呈下降趋势。提示线粒体介导的细胞凋亡可能是青蒿琥酯诱导人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡的主要方式;而青蒿琥酯对人结肠癌 HCT-8 细胞 Bax 基因表达的下调正是其根本原因。

综上所述,青蒿琥酯不但可以抑制结肠癌细胞增殖,还可诱导其发生凋亡。青蒿琥酯的凋亡诱导作用与其阻滞结肠癌细胞周期和上调促癌基因 Bax 表达有关。

[参考文献]

[1] He R R, Zhou H J. Progress in research on the anti-

tumor effect of artesunate [J]. Chin J Integr Med, 2008,14(4):312.

[2] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. Int J Oncol, 2001,18(4):767.

[3] 黄伟炜,牛红军,刘宁. 青蒿琥酯对人结肠癌 HCT-8 细胞侵袭能力影响及机制研究[J]. 中成药, 2011, 33(12):34.

[4] Huerta S, Goulet E J, Livingston E H. Colon cancer and apoptosis[J]. Am J Surg, 2006,191(4):517.

[5] Chen H, Shi L, Yang X, et al. Artesunate inhibiting angiogenesis induced by human myeloma RPMI8226 cells[J]. Int J Hematol, 2010,92(4):587.

[6] Zhou H J, Wang W Q, Wu G D, et al. Artesunate inhibits angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells[J]. Vascul Pharmacol, 2007,47(8):131.

[7] 周兰贞,晏烽根,李庆林. 新藤黄酸诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用机制研究[J]. 肿瘤, 2011, 31(7):580.

[8] 文姝,刘纪文,包永明,等. 胡桃楸提取液对肿瘤细胞细胞周期的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(7):626.

[9] Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Life Sci, 2001, 69(25/26):2957.

[10] 范颖,才丽平,于彩娜,等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(8):135.

[11] Oberst A, Bender C, Green D R. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals[J]. Cell Death Differ, 2008,15(7):1139.

[12] 秦伟夫,贺菊乔. 益气复元汤联合化疗药含药血清对大肠癌 Lovo 细胞 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(17):158.

[责任编辑 聂淑琴]