

巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响

陈武*, 陈鹏英, 刘鹏, 廖艳林
(武汉市中医医院药学部, 武汉 430014)

[摘要] 目的: 研究巴豆生物碱(croton seed alkaloid, CA)对人肝癌 SMMC-7721 细胞的诱导凋亡作用并探讨其对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。方法: 不同浓度 CA 分别处理 SMMC-7721 细胞 24~48 h 后, MTT 法检测细胞的生长活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的表达。结果: 10~200 mg·L⁻¹ CA 均能抑制 SMMC-7721 细胞增殖($P < 0.05$), 其抑制率与作用时间及浓度相关; CA 作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 对照组凋亡率为(0.26 ± 0.14)%, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ CA 组细胞凋亡率分别为(5.85 ± 0.47)%, (17.70 ± 1.23)%, (33.25 ± 2.08)%, (49.52 ± 1.85)%, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Western blot 结果提示经 CA 作用 24 h 后, 随着药物浓度的增加, Bax 的表达逐渐增加, 而 Bcl-2 的表达逐渐减少。结论: CA 能抑制 SMMC-7721 细胞的生长并促进其凋亡, 其发生与 Bcl-2 蛋白的减少和 Bax 蛋白表达增多有关。

[关键词] 巴豆生物碱; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0199-03

Effect of Crotonis Fructus Alkaloid on Apoptosis of Human Hepatoma SMMC-7721 Cells and Bcl-2/Bax Expression

CHEN Wu*, CHEN Peng-ying, LIU Peng, LIAO Yan-lin

(Department of Pharmacy, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Crotonis Fructus alkaloid (CA) on apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Method:** After treatment with CA for 24–48 h, MTT assay was used to determine the cell growth inhibitory rate *in vitro*, flow cytometry was used to detect the apoptosis of SMMC-7721 cells before and after CA treatment. Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax. **Result:** CA inhibited the growth of SMMC-7721 cells in a dose- and time-dependent manner. After treatment with 50–200 mg·L⁻¹ CA for 24 h, the number of apoptosis cells was increased dose-dependently from (0.26 ± 0.14)% in the control group to (5.85 ± 0.47)%, (17.70 ± 1.23)%, (33.25 ± 2.08)% and (49.52 ± 1.85)% in CA groups, respectively. By Western blot analysis, we found the level of Bax was up-regulated, whereas, the level of Bcl-2 down-regulated. **Conclusion:** CA can efficiently inhibit the proliferation and induce apoptosis in SMMC-7721 cells. Its mechanism is likely related to the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax.

[Key words] Crotonis Fructus seed alkaloid; apoptosis; Bax; Bcl-2

原发性肝癌作为一种发病率较高的消化道肿

瘤, 国内外治疗效果一直都不理想^[1]。近年来顺铂等化疗药物的应用大大提高了药物对靶细胞的敏感性, 增强了对靶细胞的杀伤作用, 但临床治疗效果仍然不甚满意^[2]。巴豆生物碱(crotonis fructus alkaloid, CA)系大戟科植物巴豆种子的提取物。有

[收稿日期] 20110115(006)

[通讯作者] * 陈武, 主管中药师, 医学本科, 擅长于中药制剂中药饮片炮制, Tel: 13797040317, E-mail: 846173618@qq.com

研究表明,CA 能明显抑制肿瘤的生长^[3-5],但它能否抑制肝癌细胞的生长,目前尚无文献报道。本研究即从体外实验的角度,探讨其对肝癌细胞诱导凋亡作用及其对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 SMMC-7721 细胞由武汉大学中南医院肿瘤实验中心提供。

1.2 药物与试剂 巴豆生物碱(CA)(No. N100123)购自武汉谷歌生物化工有限公司(纯度 $\geq 99\%$),噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和碘化丙锭(PI)为南京凯基生物技术发展公司产品,Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司,胎牛血清和 RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司,蛋白酶 K (proteinase K)购于碧云天生物技术研究所,Bcl-2, Bax 鼠抗人单克隆抗体, β -actin 羊抗鼠单克隆抗体,购于 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 仪器 流式细胞仪(Beeton Dickson FACScan); Becton Dickinson 公司美国,二氧化碳培养箱 HH. CP-T 型:上海福玛公司,超净工作台 SW-CJ-1FD 型:江苏安泰,自动酶标测定仪:上海医用分析仪器厂。

2 方法

2.1 细胞培养 SMMC-7721 细胞接种于含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中,1~2 d 传代 1 次。所有实验操作均采用对数生长期的细胞。

2.2 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用 MTT 法测定 CA 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用:取处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞,0.25% 胰酶消化,调整细胞密度为 1×10^5 /mL,以每孔 200 μ L 接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃去培养液,加入不同质量浓度 CA 使终浓度为 0 mg·L⁻¹(A 组),10 mg·L⁻¹(B 组),50 mg·L⁻¹(C 组),100 mg·L⁻¹(D 组)和 200 mg·L⁻¹(E 组),每浓度 3 个复孔,分别培养 24, 36, 48 h 后,弃上清。每孔加入 MTT (5 g·L⁻¹) 20 μ L,培养 4 h,弃去培养液。每孔加入 DMSO 150 μ L,于室温在摇床上摇晃 10 min,至孔中颜色均匀后,用全自动酶标仪比色,570 nm 波长测定各孔吸光度(A),计算细胞生长抑制率(IR)。

$$IR = (1 - \text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$$

2.3 亚细胞结构形态 取对数生长期 SMMC-7721

细胞接种于 6 孔培养板,每孔细胞数为 1×10^6 个。培养 24 h 后,用含 100 mg·L⁻¹ CA 的培养液培养。同时设空白对照。培养 24 h 后终止培养,胰酶消化收集细胞,加入 1 mL 戊二醛固定,制作超薄切片,在透射电镜下观察亚细胞结构形态。

2.4 细胞凋亡率的测定 取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板,每孔细胞数为 1×10^6 个。培养 24 h 后弃去上清液加入不同的处理因素后,再培养 24 h 后消化收集细胞。参照 Annex in V-FITC 试剂盒说明书操作,检测细胞早期凋亡率。

2.5 凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 的表达 离心收获细胞,用预冷的 PBS 洗两遍,加入适量的细胞裂解液,置冰上 30 min 后,以 12 000 r·min⁻¹ 于 4 °C 离心 20 min,调整蛋白含量,加入等量 2 × SDS-PAGE 加样缓冲液,置 95~100 °C 沸水中变性 5 min,行 SDS-PAGE 垂直电泳,电转 PVDF 膜,加 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉于 4 °C 冷库封闭过夜,PBST 洗膜后,分别加一抗 Bcl-2, Bax 鼠抗人单克隆抗体, β -actin 羊抗鼠单克隆抗体(均为 1:1 000 稀释) 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗膜;加 HRP 标记羊抗鼠 IgG 及兔抗羊 IgG 二抗,37 °C 孵育 1 h, PBST 洗膜,等量的 ECL 反应液 A 和 B 混合后加至膜上 1 min,最后 X 片显影。

2.6 统计学方法 实验均重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 13.0 统计分析软件进行方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 CA 对肝癌细胞的生长抑制作用 10~200 mg·L⁻¹ CA 作用于 SMMC-7721 细胞 24, 36, 48 h 后测定抑制率。如表 1 所示,随着药物浓度的增加及作用时间的延长,细胞抑制率明显增加,其中 200 mg·L⁻¹ CA 对细胞的抑制作用最明显。各实验浓度及时段的结果与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 CA 对 SMMC-7721 细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率/%		
		24 h	36 h	48 h
对照	0	0.00 ± 0.10	0.00 ± 0.12	0.00 ± 0.08
CA	10	15.07 ± 0.71 ¹⁾	24.60 ± 1.42 ¹⁾	26.92 ± 1.16 ¹⁾
	50	34.23 ± 1.62 ¹⁾	36.85 ± 2.31 ¹⁾	48.56 ± 1.87 ¹⁾
	100	43.95 ± 2.28 ¹⁾	49.54 ± 3.11 ¹⁾	62.13 ± 2.55 ¹⁾
	200	58.10 ± 3.30 ¹⁾	71.15 ± 4.52 ¹⁾	80.26 ± 3.3 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 CA 诱导肝癌细胞凋亡 与正常细胞相比,凋亡细胞体积缩小,核质比例增大,可见核仁或较大浓缩核小体,染色质浓聚成块状和球状沿核膜排列,如图 1。

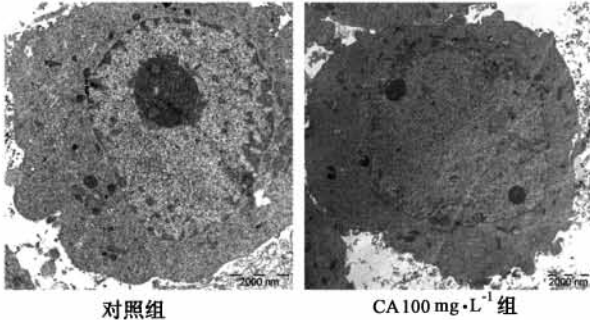


图 1 CA 诱导肝癌细胞凋亡 (×5 000)

3.3 CA 对肝癌细胞凋亡率的影响 流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,经 CA 作用 24 h 后,细胞凋亡率明显增高,对照组凋亡率为 $(0.26 \pm 0.14)\%$, 10, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CA 组细胞凋亡率分别为 $(5.85 \pm 0.47)\%$, $(17.70 \pm 1.23)\%$, $(33.25 \pm 2.08)\%$, $(49.52 \pm 1.85)\%$, 与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.4 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达 如图 2 所示 CA 作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后,随着 CA 药物浓度的增加, Bax 的表达逐渐增加,而 Bcl-2 的表达逐渐减少。

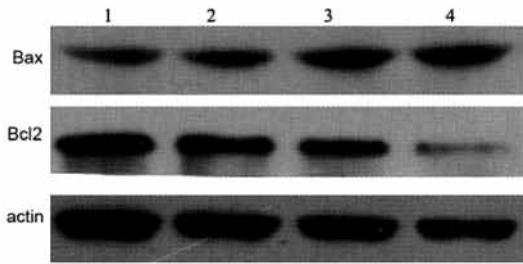


图 2 不同浓度 CA 作用 SMMC-7721 细胞后 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达

1. 对照组; 2~4. CA 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

4 讨论

肝癌术后复发是外科医生必须面对的难题,只有探索出新的综合治疗模式,才能进一步提高肝癌的治疗效果^[6]。近年来,生物碱类药物在肿瘤防治方面的作用越来越受到人们的重视。CA 是从大戟科植物巴豆中提取出来的有效抗癌成分,其对甲状腺癌、胃癌、肝癌^[3-5]等多种肿瘤具有治疗作用,但

因目前尚缺乏严格的现代科学资料和数据,因此,CA 的推广应用存在着局限性。

本研究通过检测 CA 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡作用发现,CA 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,其抑制作用与作用时间及作用浓度相关,同时研究结果还表明 CA 可以诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,此作用存在剂量效应依赖性。透射电镜观察显示 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CA 作用 SMMC-7721 细胞 24 h 后,细胞核体积缩小,染色质呈团块聚集于核膜周围,出现了典型的凋亡形态学改变。以上结果表明:CA 可诱导 SMMC-7721 细胞产生凋亡。在证实 CA 抑制 SMMC-7721 细胞增殖并诱导其凋亡的基础上,利用 Western-blot 法检测了 CA 对 SMMC-7721 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响,结果发现 CA 能增加促凋亡蛋白 Bax 的表达,减少抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。而此作用可能是 CA 抑制肝癌细胞增殖并诱导其凋亡的机制之一,从而发挥 CA 的抗肿瘤作用。

综上所述,本试验证明 CA 对人肝癌 SMMC-7721 细胞有较强的增殖抑制及诱导凋亡能力,为临床应用提供了实验依据,CA 在肝癌的治疗方面是一种有应用前景的抗肿瘤药物。

[参考文献]

- [1] 韩丹,叶胜龙,刘彬彬,等. Survivin 在原发性肝细胞癌中的表达及其与侵袭、转移的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(12): 1502.
- [2] 曹军,孙权,刘志苏. 维生素 E 联合顺铂抑制肝癌细胞 BEL-7402 体外增殖作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(11): 1456.
- [3] 许冬青,詹臻,王明艳,等. 巴豆生物碱诱导人胃癌细胞 SGC-7901 分化及分子机制的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(7): 545.
- [4] 朱均,吴智南,徐卫东,等. 巴豆生物碱对人骨肉瘤细胞细胞周期凋亡及对 Bcl-2 基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7): 1450.
- [5] 徐立生,曲长芝,马志仕,等. 抗癌药物巴豆生物碱、顺铂对红细胞膜的作用[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(2): 115.
- [6] 陈孝平,张万广. 肝细胞肝癌实验研究的热点与展望[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(3): 264.

[责任编辑 聂淑琴]