

南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的实验研究

熊熙, 张馨, 李平, 汪茂荣 (解放军第81医院 全军肝病中心, 南京 210002)

摘要: 目的 探讨南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导肝癌细胞HepG2凋亡的作用。方法 Hoechst33342/PI染色后, 在荧光显微镜下观察经南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导的HepG2细胞凋亡后细胞及细胞核的形态变化; 应用琼脂糖凝胶电泳观察细胞晚期凋亡形成的“DNA梯带”。结果 随着南蛇藤乙酸乙酯提取物浓度的增加, HepG2细胞生长被抑制, 凋亡细胞增多。同时, 随着作用时间的延长, 细胞凋亡的数量增多; 30 $\mu\text{g/ml}$ 的南蛇藤乙酸乙酯提取物作用细胞24 h后, 可观察到明显的“DNA梯带”。随着南蛇藤乙酸乙酯提取物作用剂量的提高, DNA梯带更加明显。结论 南蛇藤乙酸乙酯提取物可诱导HepG2细胞凋亡, 具有量效关系和时间依存性。

关键词: 南蛇藤; 人类肝癌细胞HepG2; 细胞凋亡; 琼脂糖凝胶电泳

Study on acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. in inducing the apoptosis of human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2) *in vitro*

XIONG Xi, ZHANG Xin, LI Ping, WANG Mao-rong (Liver Disease Center of PLA, The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To investigate the inducing effect of acetoacetate extractive of *Celastrus orbiculatus* Thunb. on the apoptosis human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2). **Methods** HepG2 cells induced by the acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb. were observed under fluorescence microscope after Hoechst33342/PI ambi-fluorescent staining; the apoptotic HepG2 cells' degree of DNA were analyzed by agarose gel electrophoresis. **Results** The acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb. could obviously inhibit the cells growth and induced apoptosis of HepG2 cells in a time- and dose-dependent manner. While the control group had not been inhibited due to the gradual proliferation. There was obvious DNA ladder after a 24-hour treatment of 30 $\mu\text{g/ml}$ acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb. effect cell. As the dose of the acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb. increased, DNA ladder was more obvious. **Conclusions** Experiments showed that the acetoacetate extractive of *C. articulatus* Thunb. can induce the apoptosis of HepG2 cells in an obvious dose-and time-dependent manner.

Key words: *Celastrus orbiculatus* Thunb.; Human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2); Apoptosis; Agarose gel electrophoresis

南蛇藤 (*Celastrus orbiculatus* Thunb.) 为卫矛科南蛇藤属 (*celastrus*) 植物, 在世界各地广泛分布, 其藤茎、根、叶、果均可入药, 具有祛风、除湿、活血、解毒、消肿等功效^[1]。现代药物化学研究证实南蛇藤中提取的多种有效成分具有较好的抗肿瘤活性^[2-5]。目前国内外对南蛇藤抑制肿瘤细胞增殖、黏附、侵袭、迁移, 抑制肿瘤血管生成的研究有一些报道^[6-15], 但关于南蛇藤乙酸乙酯提取物诱

导肝癌细胞凋亡的研究尚不多见^[16]。为此, 本研究通过对HepG2细胞进行体外培养, 观察南蛇藤乙酸乙酯提取物对肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 南蛇藤乙酸乙酯提取物由扬州大学刘延庆教授惠赠。DMEM高糖液体培养基 (美国HyClong公司); 胎牛血清 (美国ExCell公司); Hoechst33324染色试剂盒 (日本株式会社同仁化学研究所); 碘化丙啶 (美国Sigma公司); 细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒 (美国Biovision公司)。荧光倒置相差显微镜 (日本OLYMPUS公

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.03.015

基金项目: 2006年南京军区“122工程”学术带头人培养基金 (122G20060108)

通讯作者: 汪茂荣 Email: maorongwang@gmail.com

司); 凝胶电泳槽(美国Bio-rad公司); 台式水平离心机(安徽科大创新公司); 超净工作台(苏州安泰公司); CO₂培养箱(美国NAPCO公司); MDF-1155ATN超低温冰箱(美国Revco公司); 低温离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 细胞系及培养 HepG2细胞购自中国科学研究院上海细胞研究所, 在含10%胎牛血清的DMEM(含100 U/ml的青霉素和100 U/ml的链霉素培养液), 在37℃、5% CO₂培养箱中培养, 按1:3的比例2天传代1次。

1.3 细胞形态的观察 将 1×10^5 处于对数生长期的HepG2细胞接种于含有玻片的12孔板中, 待细胞生长至约80%时, 分别加入终浓度为60 μg/ml、120 μg/ml和240 μg/ml的南蛇藤乙酸乙酯提取物100 μl, 同时设阴性对照组, 应用等体积DMEM培养液替代南蛇藤乙酸乙酯提取物。用PBS制备30 μmol/L的Hoechst33342染液, 按1:9比例(V/V)加入到12孔板中, 每孔100 μl 33342染液和5 μl PI, 895 μl DMEM培养液; 37℃, 5% CO₂孵育10分钟, 将玻片取出, 用PBS小心洗涤细胞2次, 在荧光显微镜下分别用350 nm和460 nm波长激发进行观察。

1.4 琼脂糖凝胶电泳DNA梯度检测 取正常对数生长期的HepG2细胞, 重悬于10%胎牛血清培养液, 置入37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h, 使细胞生长同步化。用倍比稀释浓度120 μg/ml、60 μg/ml、30 μg/ml、15 μg/ml的南蛇藤乙酸乙酯提取物处理

对照组以同体积细胞培养液替代。培养24 h后, 1%胰酶消化液消化, 离心收集细胞, 冷PBS进行冲洗, 再次进行冲洗离心, 弃上清。PBS重悬细胞, 并对细胞进行计数, 使各样品中细胞数约 2×10^6 个, 500 g离心5分钟。室温下, 每样品中加入50 μl DNA提取液, 混匀, 裂解10秒钟。1600 g(4500 rpm)离心5分钟, 收集上清, 为充分裂解细胞重复第3步, 混合上清。加入5 μl酶A到上清中, 剧烈混匀, 37℃培养箱中孵育10分钟。加入5 μl酶B到上清中, 剧烈混匀, 50℃水浴箱中消化过夜。缓慢吸出上清液约110 μl, 加入5 μl醋酸铵和100 μl异丙醇, 混匀。此时可见DNA沉淀产生, 置入-20℃冰箱, 冻存过夜。溶解上清, 4℃离心10分钟(16 000g), 弃上清。沉淀物加入70%乙醇500 μl, 轻轻混匀。4℃离心10分钟(16 000g), 弃上清。尽量吸除残余的乙醇, 加入TE30 μl溶解DNA^[17]。取5 μl DNA样品于1.2%琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色后, 紫外灯下观察。

2 结果

2.1 南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的形态学观察 对照组细胞经Hoechst染色后, 细胞核形态呈圆形, 淡蓝色, 内有较深的蓝色颗粒, 不被PI染色。经南蛇藤乙酸乙酯提取物处理后HepG2细胞见到典型的细胞凋亡形态变化: 细胞体积缩小, 细胞核呈分叶、碎片状、边集, 凋亡小体形成等。南蛇藤乙酸乙酯提取物HepG2细胞经药物干预后逐渐出现凋亡, 且凋亡数量及程度与南蛇藤乙酸乙酯

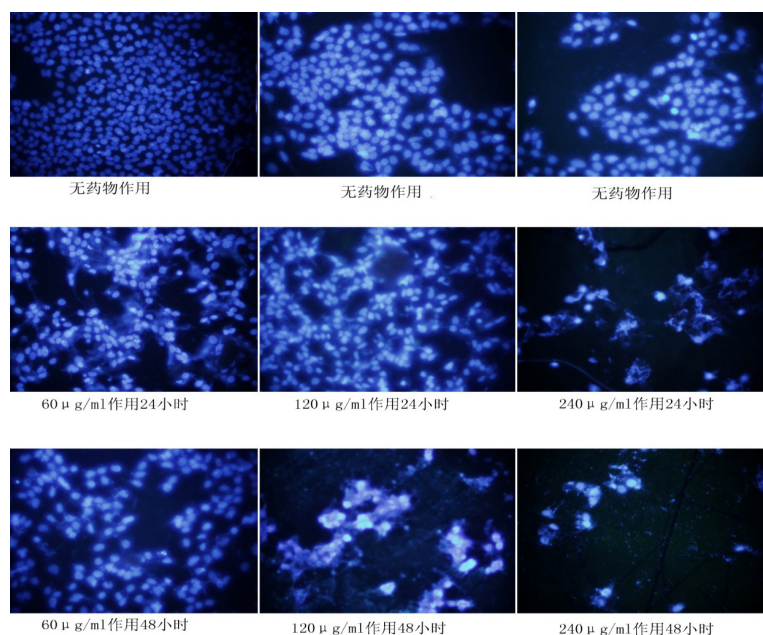


图1 南蛇藤乙酸乙酯提取物对HepG2细胞凋亡的影响

注: 随着南蛇藤乙酸乙酯提取物浓度的增加和作用时间的延长, HepG2细胞凋亡程度逐渐增加(Hoechst 33342/PI双染色, $\times 400$)

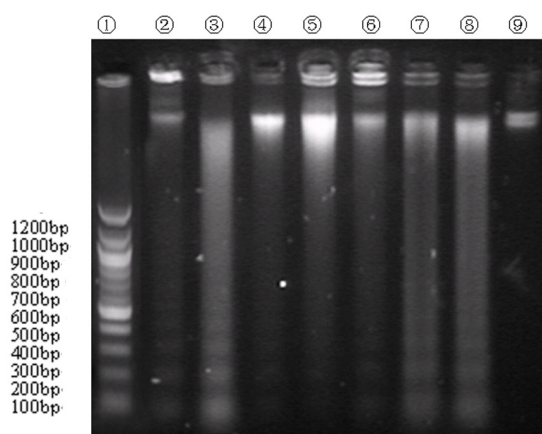


图2 不同浓度的南蛇藤乙酸乙酯提取物作用 HepG2 细胞 (24 h、48 h) 后 DNA 电泳结果

注: 南蛇藤乙酸乙酯提取物和 DNA 梯带之间存在一定的量效和时效关系。① DNA Marker; ② 30 $\mu\text{g/ml}$ 作用 24 h; ③ 60 $\mu\text{g/ml}$ 作用 24 h; ④ 120 $\mu\text{g/ml}$ 作用 24 h; ⑤ 240 $\mu\text{g/ml}$ 作用 24 h; ⑥ 30 $\mu\text{g/ml}$ 作用 48 h; ⑦ 60 $\mu\text{g/ml}$ 作用 48 h; ⑧ 120 $\mu\text{g/ml}$ 作用 48 h; ⑨ 阴性对照

提取物作用时间和作用浓度呈正相关(图1)。

2.2 南蛇藤乙酸乙酯提取物对HepG2细胞DNA的影响 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用于HepG2细胞24 h后,可以观察到明显的DNA梯带形成。随着南蛇藤乙酸乙酯提取物剂量的提高,DNA梯带更加明显,存在一定的量效关系。在相同南蛇藤乙酸乙酯提取物作用浓度条件下,48 h作用下形成的DNA梯带比24 h条件下形成的DNA梯带更加明显,即存在一定的时效关系(见图2)。

3 讨论

真核细胞在不利的生长环境下均可出现细胞凋亡^[18],肿瘤细胞也不例外。目前所用的抗癌药物对敏感细胞都诱导凋亡^[19,20]。细胞凋亡不仅表现在细胞形态学上的变化,同时伴随有胱冬蛋白酶和效应胱冬蛋白酶的激活、细胞质膜外表面磷脂酰丝氨酸的暴露(可通过锚定蛋白V的结合而被检测到)、多聚ADP-核糖聚合酶(PARP)的降解和核DNA的断裂等生物化学反应的发生。一般将磷脂酰丝氨酸的暴露作为早期凋亡的指标,核DNA断裂(形成“DNA梯带”)作为晚期凋亡的指标^[18]。正是这些细胞凋亡过程的特有表现——生物化学伴随着生物信号转导的全过程,为研究细胞发生早、中、晚三期的凋亡事件提供条件。通过形态学的差异来评估细胞凋亡指数的定量检测有一定的局限性,故有必要对细胞凋亡的比例等情况进行进一步分析,并对南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导的HepG2凋亡或细胞坏死进行鉴别。

本研究通过观察细胞形态学变化发现,南蛇

藤乙酸乙酯提取物具有明显的诱导HepG2细胞发生细胞凋亡的作用,并呈现明显的药物剂量关系及时间依赖性。结合南蛇藤诱导HepG2细胞早期凋亡(Annexin V-PI检测数据)^[16]和晚期凋亡(细胞DNA降解分析)观察表明,随着南蛇藤乙酸乙酯提取物剂量的提高与作用时间的延长,凋亡细胞的数量和程度在一定范围内逐渐增强,提示南蛇藤引起的肝癌细胞的凋亡呈时间依赖性与剂量依赖性。经南蛇藤乙酸乙酯提取物处理48 h后,凋亡与剂量的关系并不明显,120 $\mu\text{g/ml}$ 南蛇藤乙酸乙酯提取物作用HepG2细胞形成的“DNA梯带”在这一时间点最明显。

本研究表明南蛇藤乙酸乙酯提取物促进肝癌细胞凋亡可能是体外抗肿瘤作用的主要途径之一,但仍需进一步在活体内验证其抗肝癌及诱导肝癌凋亡的作用。同时,通过研究胱冬蛋白酶(caspase)激活通路及不依赖胱冬蛋白酶激活通路,从而揭示南蛇藤乙酸乙酯提取物体外诱导HepG2细胞凋亡的机制,为从分子水平揭示中药的作用机制、筛选新的抗癌中药提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第5分册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 375.
- [2] Guo YQ, Li X, Xu J, et al. Sesquiterpene esters from the fruits of *Celastrus orbiculatus*[J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52: 1134-1136.
- [3] 刘佳佳, 李晓如. 南蛇藤种油中的倍半萜成分[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13: 5-7.
- [4] Jin HZ, Hwang BY, Kim HS, et al. Antiinflammatory constituents of *Celastrus orbiculatus* inhibit the NF-kappaB activation and NO production[J]. J Nat Prod, 2002, 65: 89-91.
- [5] Ly TN, Shimoyamada M, Yamauchi R. Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity[J]. J Agr Food Chem, 2006, 54: 3786-3793.
- [6] 张丽娟, 朱润庆, 费雁, 等. 南蛇藤素对肿瘤血管的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32: 719-720.
- [7] 张舰, 许运明, 王维民, 等. 南蛇藤提取物体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31: 1514-1516.
- [8] 张华, 员林, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物含药血清对人肝癌SMMC 7721细胞增殖、迁移和黏附作用的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27: 44-48.
- [9] 员林, 张华, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepa1-6细胞的增殖能力和VEGF-c表达水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17: 151-160.
- [10] 钱亚云, 曹玲, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物增强抑癌基因Maspin抑制人胃癌细胞株MGC803侵袭能力的研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 11: 2470-2474.
- [11] 朱耀东, 钱亚云, 马慧, 等. 南蛇藤总萜对MGC-803细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18: 180-183.
- [12] 侯莹, 聂春兰, 刘延庆. 南蛇藤总萜对Hepa1-6荷瘤小鼠VEGF、CECs的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2012, 34: 324-326.

[13] 汪茂荣, 张馨, 刘延庆. 南蛇藤乙酸乙酯提取物对荧光蛋白标记的HepG2细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 中华肝脏病杂志,2012,20:377-380.

[14] 张馨, 熊熙, 汪茂荣, 等. 南蛇藤乙酸乙酯提取物对肝癌原位荧光动物模型肿瘤VEGF表达影响的研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2013,5:1-5.

[15] Wang M, Zhang X, Xiong X, et al. Efficacy of the Chinese traditional medicinal herb Celastrus orbiculatus Thunb on human hepatocellular carcinoma in an orthotopic fluorescent nude mouse model[J]. Anticancer Res,2012,32:1213-1220.

[16] 熊熙, 汪茂荣. 南蛇藤乙酸乙酯提取物诱导HepG2细胞凋亡的实验研究[J]. 实用肝脏病杂志,2011,14:249-252.

[17] Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease[J]. Lab Invest,1998,78:893-913.

[18] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology[J]. Int Rev Exp Pathol,1991,32:223-254.

[19] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy[J]. Blood,2001,98:2603-2614.

[20] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy[J]. Exp Cell Res,2000,256:42-49.

收稿日期: 2015-02-27

· 消息 ·

本刊对来稿图片格式的要求

本刊要求来稿中照(图)片, 每张照(图)片均应有必要的图题及说明性文字置于图的下方, 并在注释中标明图中使用的全部非公知公用的缩写; 图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记, 病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度, 并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短, 不应超过50字, 所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用jpg格式, 分辨率不低于300像素/英寸, 并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像: 分别按其在正文中出现的先后次序连续编码, 文中应标记为“动态图×”。视频资料要求图像清晰稳定, 剪接顺畅, 保持可能获得的最高清晰度模式, 视频文件采用AVI格式, 大小在5M以内。 每个文件名均应与文中的名称相符, 如“动态图×”。

本刊编辑部