

网络出版时间: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20181126.1533.044.html> 网络出版地址: 2018-11-28 17:31

逆转素对人肝癌细胞 HepG2 增殖、克隆形成及凋亡的影响

朱玲玲¹ 林涛发^{2,3} 谢丽平^{2,3} 王少扬^{2,3}

(1. 皖南医学院弋矶山医院感染科, 安徽 芜湖 241001;

2. 厦门大学附属东方医院感染科, 福建 福州 350001; 3. 福州总医院传染病教研室, 福建 福州 350001)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.12.023

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2018)12-1740-05

中国图书分类号: R329.24; R329.25; R394.2; R735.702.2; R979.1

摘要: 目的 探讨逆转素(reversine)对人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、克隆形成和凋亡的影响。方法 人肝癌细胞 HepG2 经不同浓度 reversine(0.1 ~ 1.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后,应用 MTS 法检测其对细胞增殖能力的影响;克隆形成实验评估 reversine 作用于肝癌细胞 HepG2 的远期效应;流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 reversine 处理后肝癌细胞 HepG2 的凋亡率;Western blot 法检测凋亡相关蛋白 PARP、Bax、Bcl-2 及 Bcl-xL 表达水平的变化。结果 与对照组(DMSO)相比,不同浓度 reversine 对人肝癌细胞 HepG2 的增殖均有抑制作用($P < 0.05$),且呈剂量依赖关系,IC₅₀ 为 0.94

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Reversine 可以明显抑制 HepG2 细胞的克隆形成能力($P < 0.05$),且较高浓度 reversine 处理后, HepG2 细胞几乎不能形成肉眼可见的细胞克隆; reversine 可以诱导 HepG2 细胞凋亡($P < 0.05$),且细胞的凋亡率与 reversine 的浓度呈正相关; Western blot 结果显示, reversine 孵育 48 h 后, HepG2 细胞中活化 PARP、Bax 的表达明显上调;同时, Bcl-2 及 Bcl-xL 蛋白的表达下降。结论 Reversine 可以明显抑制人肝癌细胞 HepG2 细胞的增殖和克隆形成能力,并且可诱导 HepG2 细胞的凋亡,其诱导凋亡与线粒体凋亡途径相关。

关键词: 肝癌; 增殖; 克隆; 凋亡; HepG2; reversine

我国肝癌发病率居全球首位,每年超 38 万人死于肝癌,约占全球肝癌死亡人数一半^[1]。肝癌起病隐匿,发现时多为中晚期,且恶性程度高、侵袭性强,易复发和转移,因此,开发出有效的治疗药物具有重要意义。逆转素(reversine)是一种人工合成的小分子嘌呤类似物,在包括人前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中均表现出较强的抑制肿瘤细胞生

收稿日期: 2018-08-16 修回日期: 2018-09-19

基金项目: 福州总医院创新团队项目(No 2014cxt05)

作者简介: 朱玲玲(1992-),女,硕士,研究方向: 肝癌的发病机制与防治, E-mail: 1548613381@qq.com;

王少扬(1968-),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向: 肝癌,通讯作者, E-mail: wsyang2005@163.com

rats were randomly divided into control group, model group, ICS II low, medium and high dose group (ICS II-L, ICS II-M, ICS II-H, 4, 8, 16 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The rats in model and ICS II groups were injected subcutaneously with MCT to establish the model of pulmonary artery remodeling. Then the rats in ICS II groups were gavaged once daily from day 1 to day 28 after MCT injection. The other rats in control group and model group were given the equal volume of solvent. HE staining was used to observe the morphological changes of the pulmonary arterioles. TUNEL staining was applied to measure the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells. Western blot was employed to detect the protein expression of Bax, Bcl-2 and activated caspase-3 in lung tissue. **Results** Compared with control group, the pulmonary arterioles were thickened significantly, the apoptosis of pulmonary ar-

tery smooth muscle cells were observed and the TUNEL positive cells increased ($P < 0.05$); the protein expressions of Bax, Bcl-2 and activated caspase-3 in lung tissues were up-regulated ($P < 0.05$) in model group. Compared with model group, the pulmonary arterioles were thinned; the TUNEL positive cells increased ($P < 0.05$); the protein expression of Bcl-2 was significantly reduced ($P < 0.05$); the protein expression of Bax and activated caspase-3 markedly increased ($P < 0.05$) in ICS II-M, H group. **Conclusions** ICS II can promote the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells induced by MCT in rats, and the mechanism might be related to reducing the expression of Bcl-2 and increasing the expression of Bax and activated caspase-3.

Key words: icarisside II; pulmonary artery remodeling; apoptosis; Bax; Bcl-2; activated caspase-3

长的作用^[2-4]。Reversine 的抗癌作用可能与其抑制 Aurora 激酶的活性有关。D'Alise 等^[5]发现, reversine 可抑制白血病细胞的克隆形成, 且对正常细胞的毒性作用较另一种已处于 II 期临床试验阶段的 Aurora 激酶抑制剂 VX-680 更小。此外, Hua 等^[6]在裸鼠成瘤模型上也证实 reversine 可抑制肿瘤的生长。目前, reversine 在肝细胞癌中的影响作用研究较少, 本文就 reversine 对人肝癌 HepG2 细胞增殖、克隆形成及凋亡的影响进行探究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 Reversine 购于美国 MedChemexpress 生物科技公司, 用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 储存浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于 -20°C 冰箱保存。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、胰酶购于美国 Gibco 公司; MTS 细胞增殖试剂盒购于美国 Promega 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、BCA 蛋白检测试剂盒、ECL 化学发光试剂盒, 均购自美国 Millipore 公司; 兔抗活化多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 [poly(ADP-ribose) polymerases, PARP] (D64E10)、Bax (E63)、Bcl-2 (E17)、Bcl-x1 (E18) 抗体, 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 细胞裂解液、鼠抗人 β -actin (AC-74)、 β -tubulin (b-5-4-2) 及辣根过氧化物酶标记的二抗, 均购自碧云天公司。酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 凝胶扫描分析系统 (印度 Syngene 公司)。

1.2 细胞与培养 人肝癌细胞株 HepG2 购于美国标准培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 的条件下培养。用 0.25% 的胰酶消化。

1.3 细胞增殖能力检测 采用 MTS 实验检测 reversine 对 HepG2 细胞增殖的影响。取对数生长期的肝癌细胞制成细胞悬液, 按 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMEM 高糖培养基置于培养箱中。待细胞贴壁后, 每孔加入含不同浓度 reversine (0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.8 、 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DMEM 高糖培养基 $100 \mu\text{L}$, 对照组加入含 0.01% DMSO 的 DMEM 高糖培养基 $100 \mu\text{L}$, 每组设置 6 个复孔。分别于培养 24、48、72、96 h 后, 弃原培养基, 每孔加入含 MTS 标记试剂的 DMEM 高糖培养基 (培养基: MTS 标记试剂 = 5:1) 培养 2 h。用酶标仪检测并记录在 490 nm 及 690 nm 处的吸光度值。使用公式计数出抑制率: 抑制率/% = $(1 - \text{实$

验组细胞数/对照组细胞数) $\times 100\%$, 并计算出 IC_{50} 。

1.4 细胞克隆形成能力检测 为评估 reversine 对肝癌细胞 HepG2 的远期效应, 采用克隆形成实验来检测其作用。将 HepG2 细胞消化重悬后计数, 于 6 孔板中每孔接种 1 000 个细胞。待细胞贴壁后, 将各孔更换为含有不同浓度 reversine (0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.8 、 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基, 阴性对照组加入等量 DMSO, 各组设 3 个复孔。将细胞放入培养箱孵育 2 周后, 弃上清, 用结晶紫染色 30 min, PBS 冲洗 3 次, 统计克隆形成数目, 并比较各组克隆形成的差异。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 HepG2 细胞经不同浓度 reversine (0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.8 、 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育 48 h, DMSO 作为阴性对照。收集细胞沉淀, 用 $500 \mu\text{L}$ 的结合缓冲液重悬细胞, 加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ PI 混匀, 在室温避光条件下孵育 15 min, 然后采用流式细胞仪进行细胞凋亡率检测。

1.6 Western blot 法分析蛋白表达 HepG2 细胞经不同分组处理后, 收集细胞沉淀, 用 4°C 预冷的 PBS 洗涤 3 遍, 吸弃上清, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液充分混匀, 置于冰上裂解 30 min。随后于 4°C 、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白浓度测定, 并制备成蛋白样品。SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4°C 摇床孵育过夜, 次日用 TBST 洗涤 3 遍。加入 TBST 稀释的二抗, 室温摇床孵育 1 h。TBST 洗涤 3 遍, ECL 化学发光试剂于凝胶扫描分析仪中检测并分析结果。

1.7 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 Reversine 抑制 HepG2 细胞的增殖 HepG2 细胞经不同浓度 reversine ($0.1 \sim 1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 各组细胞在倒置相差显微镜下观察发现, 随 reversine 浓度增加, 细胞密度及细胞状态逐渐下降, 圆形悬浮细胞增加, 且细胞核有变大趋势 (Fig 1A)。MTS 检测结果显示, reversine 浓度越高, 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用越明显, 并且呈剂量和时间依赖关系 (Fig 1B)。根据 MTS 实验数据, HepG2 的 IC_{50} 值为 $0.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 Reversine 抑制 HepG2 细胞的克隆形成能力 Fig 2 的克隆形成实验结果显示, HepG2 细胞经不

同浓度 reversine ($0.1 \sim 1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 细

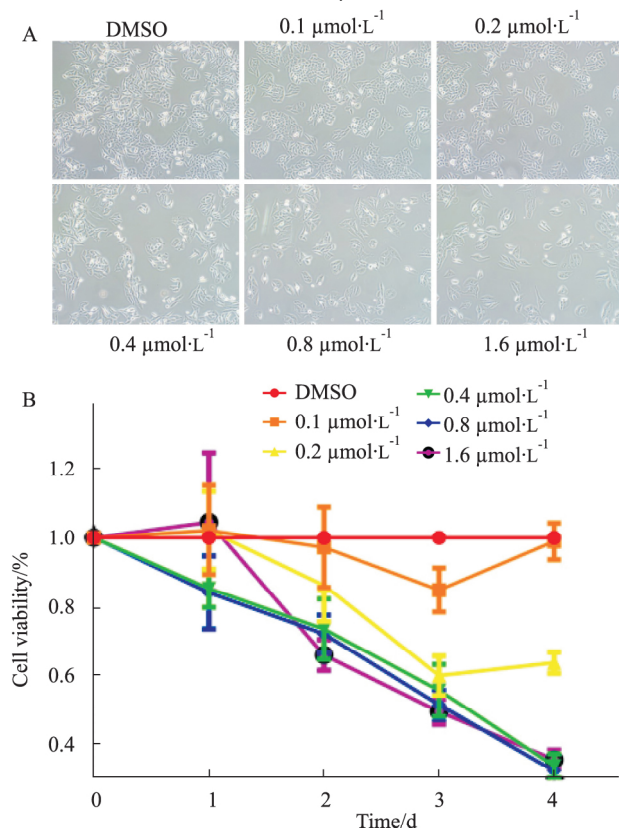


Fig 1 Effect of reversine on cell viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: HepG2 cells were treated with different concentrations of reversine; B: HepG2 cells were incubated with different concentrations of reversine for 24, 48, 72, 96 h, and the relation of cell viability was analyzed by MTS.

胞的克隆形成能力明显下降 ($P < 0.05$), 且较高浓度 reversine 处理组 ($0.2 \sim 1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 HepG2 细胞几乎不能形成肉眼可见的细胞克隆。

2.3 Reversine 诱导 HepG2 细胞凋亡 HepG2 细胞经不同浓度 reversine ($0.1 \sim 1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。如图 Fig 3 所示, 与对照组 (DMSO) 相比, HepG2 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均随 reversine 浓度增加而增加, 呈剂量依赖关系。

2.4 Reversine 对凋亡相关蛋白表达的影响 Fig 4 结果显示, 随 reversine 浓度的增加, 活化的 PARP 水平明显增加, 说明 reversine 可以诱导 HepG2 细胞发生凋亡。同时, 促凋亡蛋白 Bax 的表达增加, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 Bcl-xL 蛋白表达下降, 提示 reversine 诱导 HepG2 细胞凋亡可能是通过线粒体凋亡途径。

3 讨论

肝癌严重危害人类健康, 目前以手术为主的治疗方案疗效仍不甚理想。人工合成的小分子嘌呤类

似物 reversine 被发现具有抗肿瘤作用, 研究证实

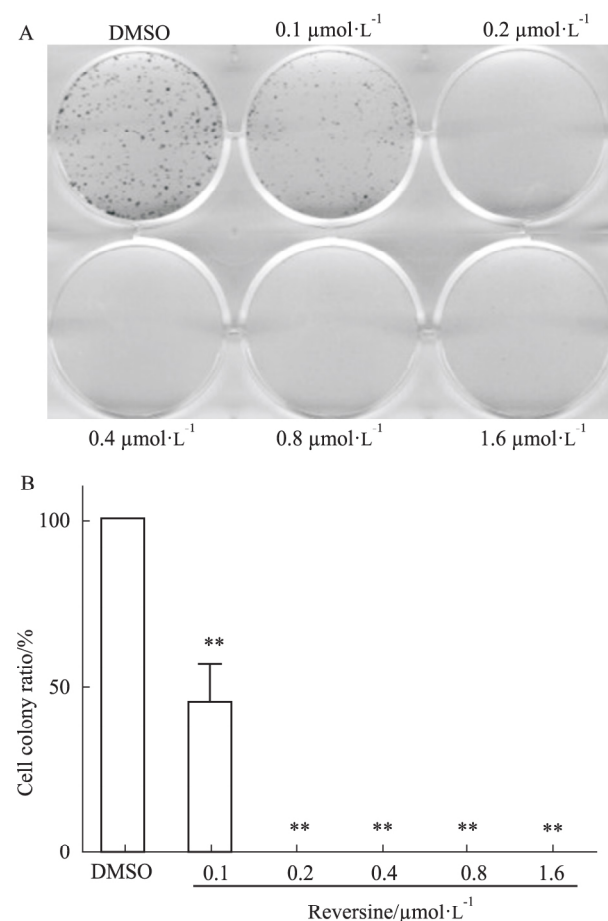


Fig 2 The colony formation ratio of HepG2 after treatment with different concentrations of reversine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: HepG2 cells were exposed to different concentrations of reversine, colony formation was determined by crystal violet staining; B: Reversine suppressed colony formation in HepG2 cells. $** P < 0.01$ vs DMSO group.

reversine 可抑制前列腺癌、宫颈癌、白血病、人口腔鳞状细胞癌、甲状腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、人尿路上皮细胞肿瘤等肿瘤细胞生长。通过对文献回顾所知, 目前 reversine 对肝癌的研究还未见系统报导。原发性肝癌中肝细胞癌占 85% ~ 90%, 在本研究中, 我们探讨了 reversine 对人肝癌细胞 HepG2 生长的影响作用。我们通过细胞增殖实验 (MTS)、细胞克隆形成实验及细胞凋亡实验, 论证了 reversine 对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用。结果显示, reversine 可以明显抑制肝癌细胞 HepG2 的细胞增殖和克隆形成, 并诱导 HepG2 细胞的凋亡, 且与 reversine 的剂量呈正相关。

PARP 具有蛋白修饰和 DNA 修复功能, 在细胞凋亡中起到重要作用^[7]。在凋亡过程中, PARP 可被活化的 caspase-3 裂解为两个分子量较小的片段,

即可导致损伤DNA无法及时修复,促使细胞凋亡,

加,从蛋白水平也证实了reversine可以诱导HepG2

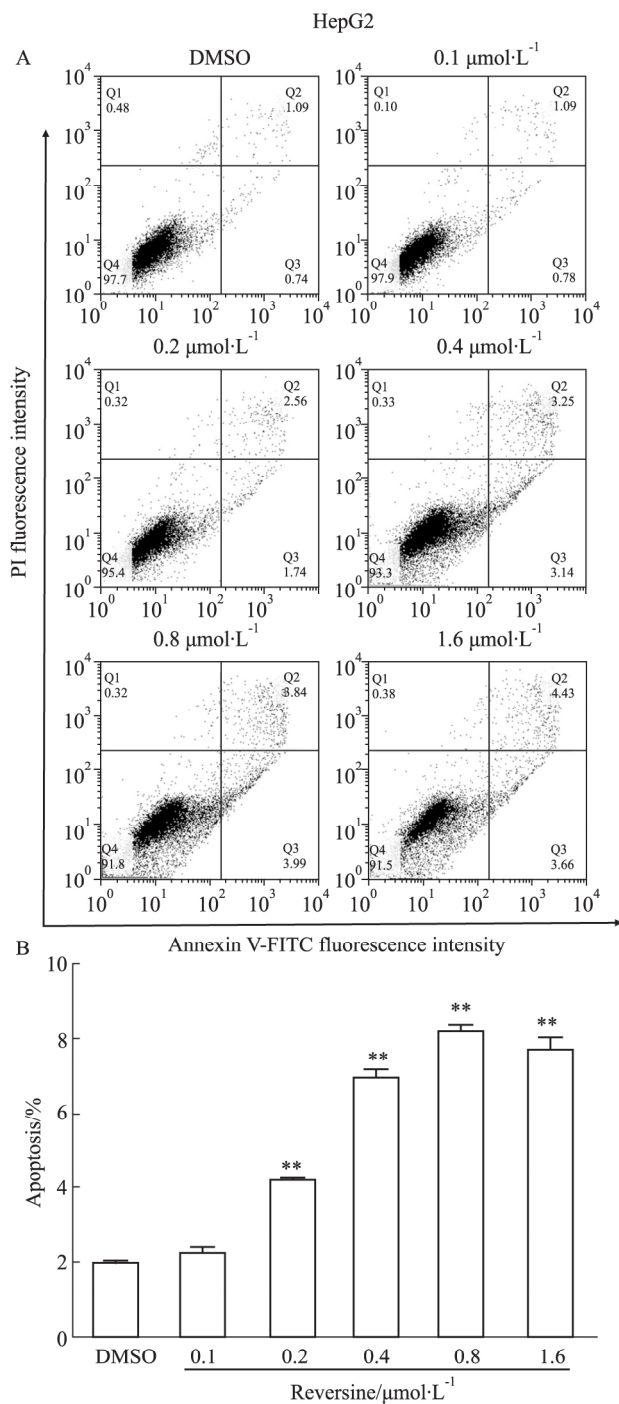


Fig 3 Apoptotic rate of HepG2 cells under different concentrations of reversine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: HepG2 cells were treated with DMSO or reversine, and the apoptotic cells were assessed by flow cytometry; B: The rates of apoptosis in HepG2 cells treated with or without reversine. ** $P < 0.01$ vs DMSO group.

又为细胞凋亡储备了更多能量。真核细胞核内 PARP 含量丰富,在凋亡早期就可检测到 PARP 裂解片段,可作为检测凋亡的指标之一^[8]。本研究 Western blot 检测结果发现,活化的 PARP 水平增

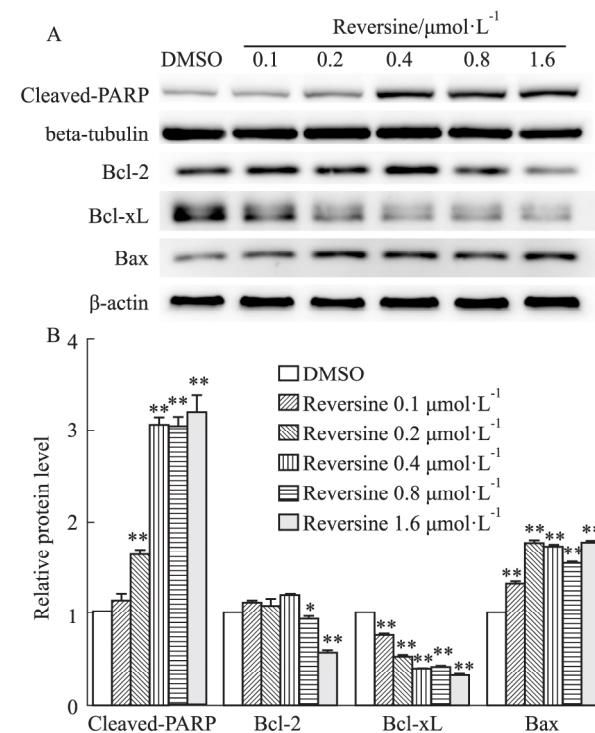


Fig 4 Expression of Bcl-2, Bcl-xL, Bax and cleaved-PARP in HepG2 cells after treatment with different concentrations of reversine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO group

细胞的凋亡。

线粒体是机体发生凋亡的重要场所, Bcl-2 蛋白家族中的促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 是主要的调控蛋白,可致线粒体外膜透性化,紧接着向胞质内释放细胞色素 C 和凋亡蛋白酶激活因子,形成凋亡复合体,进一步活化 caspase-9、caspase-3 和 caspase-7,最终细胞降解死亡^[9]。Bcl-2 蛋白家族的另外两大成分抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 可与促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 相互作用,参与线粒体凋亡途径^[10]。本研究 Western blot 检测结果显示, Bax 的表达增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 Bcl-xL 表达下降,提示 reversine 诱导 HepG2 细胞凋亡可能是通过线粒体凋亡途径。可通过进一步检测 caspase-9、caspase-3 和 caspase-7 的表达来验证。

Aurora 激酶是有丝分裂过程中关键性调节酶^[11]。在哺乳动物中的 Aurora 激酶包括 3 个家族成员,即 Aurora A、Aurora B、Aurora C。Aurora A 主要参与调节中心体成熟和分离,促进有丝分裂纺锤体装配,同时可通过调控 cyclin B/CDK1 复合物来干预细胞有丝分裂。Aurora B 可调控纺锤体稳定性和染色体凝结、排列及胞质分裂。目前关于 Aurora C 的功能尚无明确的研究证据。多项研究发现, Auro-

ra 激酶在包括肝癌等诸多肿瘤中高表达^[12-14],因此 Aurora 激酶成为抗肿瘤的重要靶点之一。Reversine 作为一种新型 Aurora 激酶的抑制剂,在肝癌中是否可通过抑制 Aurora 激酶活性来干预肝癌细胞的有丝分裂,导致肝癌细胞周期阻滞,从而抑制肝癌细胞增殖,有待于进一步探讨。此外,在活体内 reversine 是否同样可以抑制肿瘤生长,也可通过裸鼠成瘤模型来验证。

综上所述, reversine 可以有效抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖和克隆形成,并诱导肝癌细胞发生凋亡,从而抑制肝癌 HepG2 细胞的生长,但其深入的机制有待于进一步研究。

(致谢:本研究是在厦门大学附属东方医院中心实验室完成,在此致以由衷的感谢!)

参考文献:

- [1] Wang F S, Fan J G, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. *Hepatology*, 2014, **60**(6): 2099-108.
- [2] Hsieh T C, Traganos F, Darzynkiewicz Z, et al. The 2 β -disubstituted purine reversine induces growth arrest and polyploidy in human cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2007, **31**(6): 1293-300.
- [3] Kuo C H, Lu Y C, Tseng Y S, et al. Reversine induces cell cycle arrest, polyploidy, and apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer*, 2014, **21**(3): 358-69.
- [4] Lu Y C, Lee Y R, Liao J D, et al. Reversine induced multinucleated cells, cell apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(7): e0158587.
- [5] D'Alise A M, Amabile G, Iovino M, et al. Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(5): 1140-9.
- [6] Hua S C, Chang T C, Chen H R, et al. Reversine, a 2 β -disubstituted purine, as an anti-cancer agent in differentiated and undifferentiated thyroid cancer cells [J]. *Pharm Res*, 2012, **29**(7): 1990-2005.
- [7] de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, **19**(4): 172-6.
- [8] Duriez P J, Shah G M. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death [J]. *Biochem Cell Biol*, 1997, **75**(4): 337-49.
- [9] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, **35**(4): 495-516.
- [10] Garcia-Saez A J. The secrets of the Bcl-2 family [J]. *Cell Death Differ*, 2012, **19**(11): 1733-40.
- [11] Nigg E A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(1): 21-32.
- [12] Jeng Y M, Peng S Y, Lin C Y, et al. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(6): 2065-71.
- [13] Lin Z Z, Jeng Y M, Hu F C, et al. Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B overexpression in HCC [J]. *BMC Cancer*, 2010, **10**: 461.
- [14] Li D, Zhu J, Firozi P F, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(3): 991-7.

Effect of reversine on cell proliferation, colony formation and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell HepG2

ZHU Ling-ling¹, LIN Tao-fa^{2,3}, XIE Li-ping^{2,3}, WANG Shao-yang^{2,3}

(1. Dept of Infectious Diseases, The first Affiliated Hospital, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001, China;

2. Dept of Infectious Diseases, Dongfang Hospital of Xiamen University, Fuzhou 350001, China;

3. Teaching-research Office of Infectious diseases, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract: Aim To investigate the suppressive effect of reversine on human hepatocellular carcinoma cell HepG2. **Methods** In this study, the antitumor effect of reversine was evaluated via cell proliferation assay, colony formation assay, apoptosis assay and Western blotting. **Results** Our data showed that reversine significantly suppressed the proliferation in HepG2 cell line in a time and dose-dependent manner ($P < 0.05$). The IC_{50} of reversine in HepG2 was $0.94 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. After incubation with reversine for 10 days, the colony formation of HepG2 was also inhibited. Furthermore, the macroscopic cell colony was virtually impossible to form with high-concentration of reversine

treatment. In addition, our results showed that reversine could induce cell apoptosis in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Moreover, using Western blot assay, the increased levels of cleaved-PARP and Bax were detected after incubation with reversine, and the expression level of Bcl-2 and Bcl-xL decreased in the meantime. **Conclusion** Reversine could effectively inhibit the cell proliferation and cell colony formation of human hepatocellular carcinoma cell HepG2 by inducing cell apoptosis via mitochondria-dependent pathway.

Key words: hepatocellular carcinoma; proliferation; colony formation; apoptosis; HepG2; reversine