

# Exfoliazone 通过诱导细胞凋亡抑制 HepG2 细胞体外增殖

韦杨焯<sup>1</sup>, 徐岷涓<sup>2</sup>, 林文翰<sup>2</sup>, 邱彦<sup>3</sup>,  
张晓坤<sup>1</sup>, 曾锦章<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生物医学研究院, 福建 厦门 361005; 2. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083;  
3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 探讨 Exfoliazone 对肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡的影响. 采用细胞培养技术, 用不同浓度的药物在一定的时间内处理细胞株, 应用 MTT 比色法检测 Exfoliazone 对 HepG2 细胞体外生长的抑制作用; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 荧光染料染色, 显示凋亡细胞形态; 用 Western Blotting 检测聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 蛋白的表达; Annexin V/PI 双染检测 Exfoliazone 对 HepG2 细胞凋亡的影响. Exfoliazone 可抑制 HepG2 细胞的生长, 并呈现剂量和时间的抑制, 在药物处理 24、48 和 72 h 后, 半数细胞抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 35、16 和 8  $\mu\text{mol/L}$ . 进一步研究表明, Exfoliazone 可诱导 PARP 切割, 细胞出现核质浓集和凋亡小体等典型的凋亡形态学特征, Annexin V/PI 染色证实 Exfoliazone 能诱导 HepG2 细胞凋亡, 并且以早期凋亡为主. Exfoliazone 可能通过诱导 HepG2 细胞凋亡抑制癌细胞的生长.

**关键词:** 海洋药物; Exfoliazone; 肝癌; 凋亡

中图分类号: R 963

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)03-0423-05

肝癌是我国一种常见的恶性肿瘤, 目前除了少数早期的小肝癌可以通过手术的办法进行治疗外, 绝大部分的肝癌患者将死于肿瘤的快速恶化<sup>[1]</sup>. 因此, 人们积极寻找新的能够降低肝癌死亡率的方法.

细胞凋亡与肿瘤的发生、发展密切相关, 是现今肿瘤分子生物学研究的热点问题之一<sup>[2]</sup>. 细胞凋亡是细胞自身调节的主动性死亡过程, 不引起炎症反应, 机体不会因此发生不良反应, 因而利用细胞凋亡原理寻找新的抗癌药物是肿瘤治疗研究的一个重要领域<sup>[3]</sup>.

目前, 天然抗肿瘤药物的研制和开发受到国内外学者们的极大关注, 而海洋生物资源在天然药物资源中是保留最完整, 来源最丰富, 最具有抗肿瘤新药开发潜力的领域<sup>[4]</sup>. 生物碱是中草药及海洋生物中抗肿瘤的主要活性成分, 从海洋生物中发现了多种生物碱在体外或动物实验中显示了很好的抗肿瘤活性, 其中不少都具有临床应用的前景<sup>[5,6]</sup>. 本研究报道的 Exfoliazone (图 1) 是从海洋生物中提取的一种生物碱, Shirasaka 等<sup>[7]</sup>的研究表明, Exfoliazone 对鼠肝细胞系具有

促生长作用, 但未见其对癌细胞作用的报道. 本文以 HepG2 细胞为体外模型, 研究 Exfoliazone 对肝癌细胞增殖抑制及其诱导该细胞凋亡的能力, 以求为肝癌的治疗寻求新的有效方法、策略, 提供基础研究资料.

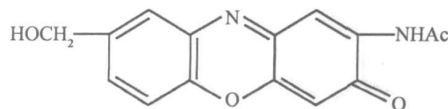


图 1 Exfoliazone 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Exfoliazone

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2 来源于美国 ATCC (American Type Culture Collection).

### 1.2 药品与试剂

Exfoliazone 为北京大学医学部林文翰教授的实验分离和鉴定; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)、紫杉醇 (Taxol) 为 Sigma 公司产品; DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所产品; 聚腺苷二磷

收稿日期: 2009-10-28

基金项目: 国家 863 项目 (2007AA09Z404); 国家自然科学基金项目 (30971445, 30931100431)

\* 通讯作者: jzeng@xmu.edu.cn

酸核糖聚合酶(PARP)抗体和 GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司;山羊抗鼠二抗和 ECL 均购自 Pirece 公司; Annexin V-FITC Apoptosis Detection 试剂盒购自 BD 公司.

### 1.3 仪器设备

CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo); 冷冻及常温离心机(Beckman); Model 3550 酶标仪(Thermo); PowerPac200 电泳仪(BIO-RAD); 荧光显微镜(Zeiss); Epics Altra 流式细胞仪(Backman Coulter).

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

HepG2 细胞采用含 10% (体积比) 小牛血清的 DMEM 培养基, 含 100 U/mL 链霉素和青霉素, 置于 37 °C 含 5% (体积比) CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养.

### 2.2 凋亡细胞形态观察

HepG2 细胞传代至 24 孔板中, 每孔  $2 \times 10^4$  个细胞, 加 0.5 mL 培养基, 24 h 后更换含 Exfoliazone 无血清新鲜培养基, 药物终浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$ , 继续培养 24 h, 吸去培养基, 进行 PBS 洗涤. 细胞经 0.04 g/mL 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次, 加入 50  $\mu\text{g/mL}$  DAPI 避光染色 10 min, 在荧光显微镜下观察并分析细胞凋亡情况.

### 2.3 MTT 检测

HepG2 细胞以  $1 \times 10^4$  /孔接种于 96 孔板, 5% (体积比) CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养 24 h 后, 加入浓度为 1、10、20、30 和 40  $\mu\text{mol/L}$  的 Exfoliazone, 以溶剂 DMSO 作为对照组, 每组均设置 6 个复孔. 药物分别处理 24、48 和 72 h 后, 加 MTT 液(5 mg/mL, 20  $\mu\text{L}$ /孔), 孵育 4 h 后加 DMSO(150  $\mu\text{L}$ /孔), 振荡 5 min, 显色. 用酶标仪在波长 490 nm 下读取吸光度, 采用公式: 细胞生存率 = (实验组吸光度平均值/对照组吸光度平均值)  $\times$  100%, 计算细胞生存率.

### 2.4 Westerr Blotting 分析

HepG2 细胞用蛋白裂解液(50 mmol/L Tris-Hcl, pH 7.4; 150 mmol/L NaCl; 5 mmol/L EDTA; 1% (体积比) NP-40; 0.005 g/mL 脱氧胆酸钠; 0.001 g/mL SDS) 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 酶标仪 570 nm 进行蛋白浓度定量后置 -20 °C 备用. 灌制 0.08 g/mL SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白质 100 °C 变性 10 min, 常规电泳分离蛋

白质, 转移到 PVDF 膜上, 经脱脂奶粉封闭 1 h, 加 PARP 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 孵育 2 min, X 片压片和显影. 图像以 BIO-RAD 图像分析系统分析, 用目的蛋白条带的平均光强度值与 GAPDH 条带的平均光强度值的比值表示该蛋白表达的相对强度.

### 2.5 流式细胞仪细胞凋亡分析

HepG2 细胞用 1、10 或 20  $\mu\text{mol/L}$  Exfoliazone 处理 24 h, 以 100 nmol/L 紫杉醇(Taxol) 为阳性对照, Annexin V/PI 染色, 采用流式细胞仪分析结果.

## 3 结果

### 3.1 Exfoliazone 对 HepG2 细胞生长的抑制作用

为了研究 Exfoliazone 是否对肝癌细胞的生长具有抑制作用, 我们用不同浓度的 Exfoliazone 处理 HepG2 细胞, 结果表明, Exfoliazone 可显著抑制 HepG2 细胞的生长, 这种作用呈现剂量依赖性和时间依赖性的关系(图 2), 在药物处理 24、48 和 72 h 后, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>) 分别为 35、16 和 8  $\mu\text{mol/L}$ .

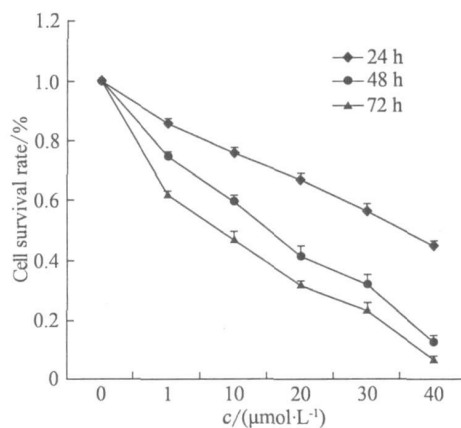


图2 Exfoliazone 对 HepG2 细胞生长的抑制作用  
Fig. 2 Exfoliazone induces growth inhibition of HepG2

### 3.2 Exfoliazone 诱导细胞凋亡的形态变化

HepG2 细胞经 30  $\mu\text{mol/L}$  Exfoliazone 处理 24 h, 用 DAPI 观察细胞核形态, 结果表明, 对照组细胞界限清晰, 胞浆丰富, 细胞核呈圆形或椭圆形, 饱满, 染色质均匀分布, 而 Exfoliazone 处理后, 细胞核变圆、缩

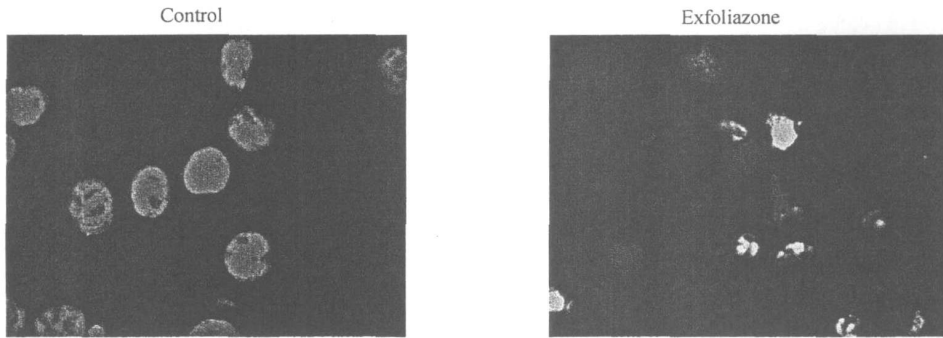


图 3 DAPI 染色观察 Exfoliazone 处理 24 h 后 HepG2 细胞核的形态变化

Fig. 3 DAPI staining for analysis of Exfoliazone induced apoptosis of HepG2 cells after 24 h treatment

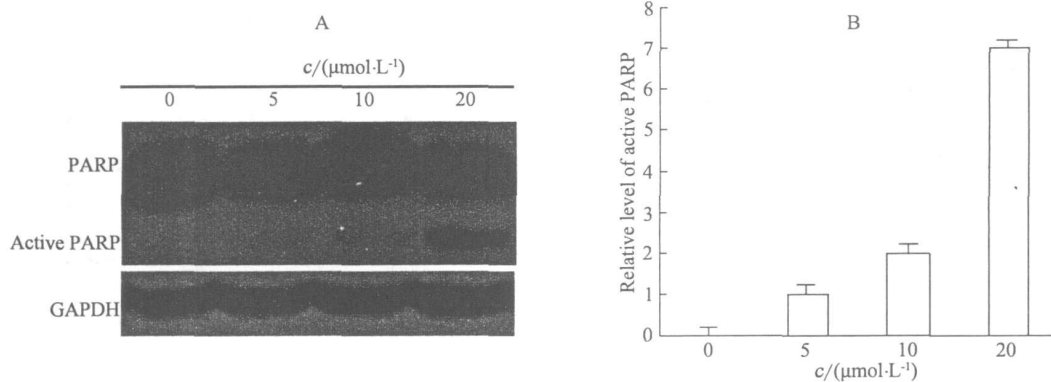


图 4 Exfoliazone 诱导 HepG2 细胞 PARP 蛋白切割

A. Western Blotting 分析; B. PARP 活化蛋白表达的半定量分析

Fig. 4 Exfoliazone induces PARP cleavage in HepG2 cells

小, 染色质浓缩呈斑块状, 呈现典型的凋亡形态学特征, 初步说明了 Exfoliazone 能够诱导 HepG2 细胞凋亡(图 3).

### 3.3 Exfoliazone 对 HepG2 细胞 PARP 蛋白表达的影响

PARP 广泛存在于真核细胞内, 是一种高度保守的核酶, 分子质量为 116 ku, 在细胞中以非活性形式存在. 在存在 DNA 链缺口或游离 DNA 末端时被激活, 以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)为底物, 对蛋白进行翻译后修饰, 即聚腺苷二磷酸化作用(PAR), 以 Active PARP 形式存在, 被认为是细胞程序死亡的一个早期分子标志. HepG2 细胞经 5、10 和 20 μmol/L Exfoliazone 分别处理 24 h 后, Active PARP 的表达增加, 半定量分析表明, 这种作用呈剂量依赖关系(图 4).

### 3.4 Exfoliazone 对 HepG2 细胞凋亡的影响

我们进一步采用 Annexin V/PI 双染检测 Exfoliazone 对 HepG2 细胞凋亡的影响. 流式 Annexin V

FITC/PI 双参数图(图 5), 早期凋亡细胞位于右下象限(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), 晚期凋亡细胞位于右上象限(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), 左下象限为活细胞(FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), 左上象限为坏死细胞(FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). 紫杉醇(Taxol)是治疗肿瘤的药物, 常见其诱导肝癌细胞凋亡的报道<sup>[8]</sup>, 本研究以紫杉醇为阳性对照. 结果表明, 用 100 nmol/L 的紫杉醇处理 HepG2 细胞 24 h, 可引起大量细胞死亡, 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 42.4% 和 15.9%. 而用 Exfoliazone 处理 HepG2 细胞, 细胞主要表现为早期凋亡, 并且呈明显的剂量依赖关系, 用 1、10 和 20 μmol/L 分别处理细胞 24 h 后, 细胞的早期凋亡率分别为 1.1%、10% 和 44.2%, 而晚期凋亡率则分别为 3.4%、4.9% 和 9.7%, 坏死细胞几乎检测不到, 这表明 Exfoliazone 能够诱导 HepG2 细胞凋亡, 而不是坏死.

## 4 讨论

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞主动性、程序

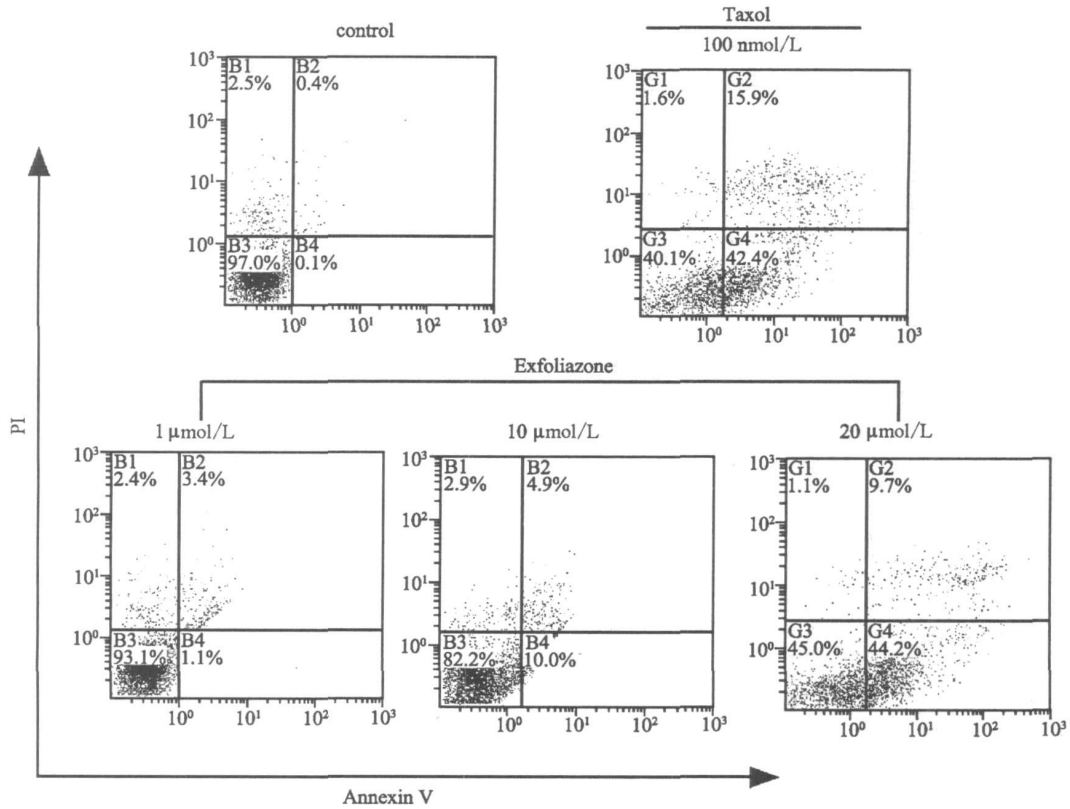


图5 Annexin V/PI 双染检测 Exfoliazone 对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Annexin V/PI staining for analysis of Exfoliazone induced apoptosis of HepG2 cells

性死亡的过程,是机体保持组织细胞平衡的一种重要机制<sup>[3]</sup>.细胞凋亡功能的抑制与肿瘤的发生发展有密切关系,恢复肿瘤细胞的凋亡调控机制可有效抑制肿瘤的生长,业已证明,目前大多数抗肿瘤药物都可诱导敏感肿瘤细胞凋亡,并且其效能与肿瘤细胞在药物诱导下发生细胞凋亡的内在活性有关<sup>[2]</sup>.因而,利用细胞凋亡原理寻找新的抗癌药物是肿瘤治疗研究的一个重要方向.

当前,肝癌已成为严重威胁我国人民健康的头号敌人,迄今,手术切除治疗仍是肝癌的主要治疗方法,临床上仍缺乏有效的治疗药物,我国肝癌的死亡率居高不下<sup>[1]</sup>.因而,寻找新的肝癌治疗方法已迫在眉睫.在本研究中,我们利用体外培养的肝癌细胞 HepG2,从海洋天然产物中寻找和筛选能够诱导 HepG2 凋亡的化合物,以发现潜在抗肝癌药物.我们报道的 Exfoliazone 是从海洋生物中分离的一种生物碱,能够显著抑制 HepG2 细胞体外生长,诱导 PARP 切割,并使 HepG2 细胞出现核质浓集和凋亡小体等典型的凋亡形态学特征.另外,Annexin V/PI 双染检测进一步证明了 Exfoliazone 能诱导 HepG2 细胞凋亡,而不是坏

死.据此,Exfoliazone 可能通过诱导 HepG2 细胞的凋亡,从而抑制癌细胞的生长.

细胞凋亡调控机制非常复杂,至少涉及两套系统,一是通过细胞膜死亡受体,即由肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的受体所引发的<sup>[9]</sup>,另一个是通过调控线粒体 Bcl-2 家族的表达及功能所引发的<sup>[10]</sup>.尤其是,激活线粒体死亡途径是许多化学药物的重要机制,我们最近的研究表明,某些天然和合成的药物可诱导核受体如 Nur77<sup>[11]</sup>出核,通过作用于线粒体而诱导癌细胞的死亡.我们将在后续的研究中,继续探讨 Exfoliazone 及其类似物诱导肝癌细胞死亡是否也通过这种分子机制,为发展特异性的抗肝癌药物奠定基础.

参考文献:

[1] 谢渭芬,蔡洪培.原发性肝癌的治疗进展[J].中国实用内科杂志:临床前沿版,2006(12):1931-1933.  
 [2] Zhang J Y. Apoptosis based anticancer drugs[J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1: 101-102.  
 [3] Reed J C. Apoptosis based therapies[J]. Nat Rev Drug

- Discov, 2002, 1: 111-121.
- [4] Schwartzmann G, Ratain M J, Cragg G M, et al. Anticancer drug discovery and development throughout the world [J]. J Clin Oncol, 2002, 20: 47-59.
- [5] 黄丽波, 徐石海, 岑颖洲. 海绵中抗肿瘤抗病毒生物活性的生物碱研究进展[J]. 广州医药, 2001, 32(1): 325.
- [6] 刘家峰, 郭松坡, 姜标. 海洋溴吡咯生物碱的研究进展[J]. 有机化学, 2005, 25(7): 788-799.
- [7] Shinsuke I, Tadashi N, Haruo S, et al. Exfoliazone and lavanducyanin, potent growth promoting substances of rat liver cell line, RLN-8, produced by streptomyces exfoliatus and streptomyces aeriouvifer[J]. J Antibiot, 1993, 46(8): 1232-1238.
- [8] Yuan J H, Zhang R P, Zhang R G, et al. Growth inhibiting effects of taxol on human liver cancer in vitro and in nude mice[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6(2): 210-215.
- [9] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [10] Reed J C. Bcl2 family proteins[J]. Oncogene, 2002, 17: 3225-3236.
- [11] Liu J, Zhou W, Li S S, et al. Modulation of orphan nuclear receptor Nur77 mediated apoptotic pathway by acetylshikonin and analogues[J]. Cancer Res, 2008, 68(21): 8871-8880.

## Exfoliazone Inhibits the Growth of HepG2 Cells by Inducing Apoptosis

WEI Yangye<sup>1</sup>, XU Mirjuan<sup>2</sup>, LIN Werrhan<sup>2</sup>, QIU Yan<sup>3</sup>,  
ZHANG Xiaokun<sup>1</sup>, ZENG Jirzhang<sup>1\*</sup>

(1. Institute for Biomedical Research, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China; 3. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** This study is to investigate the anti-proliferation effect of Exfoliazone on liver cancer cell line HepG2 by inducing apoptosis. The test of anti-proliferation effect was performed by MTT assay, apoptotic cells were identified by DAPI staining and AnnexinV/PI staining. The expression of the poly ADP ribose polymerase protein and its activated fragment were detected by Western Blotting assays. Exfoliazone treatment significantly inhibited the growth of HepG2 cells in a time and dose dependent manner. The  $IC_{50}$  for Exfoliazone was about 35, 16 and 8  $\mu\text{mol/L}$  after treatment for 24, 48 and 72 h, respectively. Exfoliazone treatment could greatly induce apoptosis of HepG2 as indicated by DAPI staining, PARP cleavage and AnnexinV/PI staining. Exfoliazone inhibits the growth of HepG2 cells by inducing apoptosis.

**Key words:** marine drug; Exfoliazone; liver cancer; apoptosis