

论著·桂药研究

苦参碱通过线粒体通路诱导 HepG2 细胞凋亡的机制研究[▲]周欢¹ 徐敏英² 雷宇¹ 梁凯¹ 郭晴¹ 胡天惠²

(1 广西医科大学附属肿瘤医院药学部, 南宁市 530021, E-mail: huan_chaos@hotmail.com;

2 福建省厦门大学医学院抗癌中心, 厦门市 361102)

【摘要】 目的 探讨苦参碱通过线粒体通路诱导 HepG2 发生凋亡的机制。方法 分别采用 MTT 法、PI 染色法、流式细胞术检测苦参碱对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制、周期调控、诱导凋亡作用; 采用 Western Blot 检测苦参碱诱导肝癌 HepG2 细胞抑凋亡蛋白 Bid、Bcl-2 的表达量。结果 苦参碱可抑制 HepG2 细胞的增殖作用和诱导凋亡, 呈时间和剂量依赖性, 并可将 HepG2 细胞周期阻滞在 G0/G1 期。苦参碱可引起线粒体膜电位崩溃, 同时诱导 Bid、Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调。结论 苦参碱通过调节细胞内 Bid、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达, 经线粒体信号转导途径诱导人肝癌细胞系 HepG2 发生凋亡。

【关键词】 苦参碱; HepG2; 线粒体通路**【中图分类号】** R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2014)11-1588-05**DOI:** 10.11675/j.issn.0253-4304.2014.11.24**Matrine Induces Apoptosis of HepG2 Cells via Mitochondrial Apoptotic Pathway**ZHOU Huan¹, XU Ming-ying², LEI Yu², LIANG Kai¹, GUO Qing¹, HU Tian-hui²

(1 Department of Pharmacy, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2 Cancer Research Center, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of matrine inducing apoptosis of HepG2 cells via mitochondrial apoptotic pathway. **Methods** MTT assay, PI staining, flow cytometry were used to evaluate the anti-proliferation, cell cycle regulation and inducing apoptosis effects of matrine on HepG2 cells. Western Blot assay was used to detect the expression levels of anti-apoptotic protein Bid and Bcl-2 in HepG2 cells. **Results** Matrine could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HepG2 cells in a time- and dose-dependent manner, and the cell cycle of HepG2 was arrested in G0/G1 phase. Apoptosis of HepG2 cells induced by matrine was associated with collapse of mitochondrial membrane potential, which made the Bid and Bcl-2 expression levels down-regulated but the Bax expression level up-regulated. **Conclusion** Matrine induces the apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 via the mitochondrial apoptotic pathway by regulating the expression levels of Bid, Bcl-2 and Bax proteins.

【Key words】 Matrine; HepG2; Mitochondrial apoptotic pathway

广西是我国肝癌的高发地区之一, 其发病率远高于全国平均水平, 近年来部分地区的病死率高达 104.9/10 万^[1]。肝癌恶性程度高, 预后不良, 目前临床采用的放化疗、血管栓塞、介入等常规治疗措施均疗效不佳, 目前尚未找到彻底根治的治疗方案, 其发病率和病死率呈向小年龄组推移的趋势^[2]。因此, 寻找新的有效的治疗方案迫在眉睫。

中药治疗中晚期肝癌有重要作用, 具有改善症状

明显、毒副作用小等特点。苦参碱类作为一种传统的中药成分在抗炎、抗心律失常等方面应用广泛, 近年来研究结果还表明其具有强大的抗肿瘤活性^[3-4]。目前有关苦参碱类抗肿瘤活性已成为抗癌中药研究的一个热点, 然而其诱导肿瘤细胞凋亡的机制仍未明确。本研究旨在初步探讨苦参碱诱导人肝癌细胞系 HepG2 发生凋亡可能的分子机制, 为苦参碱的临床应用提供理论依据。

[▲]基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172284); 福建省自然科学基金资助项目(2010J0615)

作者简介: 周欢(1988~), 女, 硕士, 药师, 研究方向: 肿瘤细胞凋亡信号通路和临床药理研究。

通信作者: 胡天惠(1973~), 男, 博士后, 教授, 研究方向: 消化道肿瘤发生发展的机制, E-mail: thu@xmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试剂 HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所; Bid、Bcl-2、Bcl-xl 和 Bax 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz Biotech 公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶及购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于 PAA 公司; 苦参碱、MTT 试剂购于 Sigma Chemical 公司; Annexin-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于凯基公司; 细胞实验用苦参碱溶液(50 mg/ml): 称取 0.25 g 苦参碱粉末, 溶解于 50 ml ddH₂O 中, 分装避光保存于 -20℃ 使用时无血清培养基将其按照需要稀释成不同浓度。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞系 HepG2 使用 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。DMEM 培养基中添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素。当细胞贴壁面积达培养皿底部面积的 80% ~ 90% 时进行传代。传代时吸除培养基, PBS 缓冲液洗两次, 用 0.5 ml 含 EDTA 的 0.25% 胰酶进行消化。根据实验需要, 将细胞接种于不同规格的培养板培养进行后续实验。实验时选用对数生长期细胞。

1.3 MTT 法测定细胞增殖存活率 取对数生长期的细胞, 按照 1×10^5 个/ml 细胞接种于 96 孔板进行培养, 每组设 4 个复孔。细胞接种 24 h 后, 实验组加入不同浓度的苦参碱进行处理(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml), 分别于 12、24、48 h 每孔加入 20 μ l 的 5 mg/ml MTT 溶液, 继续培养 4 h。吸除 MTT 溶液, 每孔加入 150 μ l 的 DMSO, 置于脱色摇床摇动 10 min 后, 用酶标仪检测检测吸收波长为 570 nm 处各孔的 OD 值, 校正波长为 630 nm。根据公式计算出各组细胞的增殖抑制率。对照组只加入无血清的完全培养基。

1.4 PI 单染法检测细胞周期 取对数生长期的细胞接种于六孔板 24 h 后, 实验组加入不同浓度的苦参碱进行处理(0.25、0.5、1.0 mg/ml) 24 h 终止药物处理, 并用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞。加入预冷的 70% 乙醇至离心管使细胞于 -20℃ 固定 12 h; 离心去除乙醇, 用无 DNase 的 RNase 重悬细胞, 置 37℃ 培养箱孵育 30 min。加入 5 μ l 工作浓度的 PI 室温避光染色 30 min。采用激发波长为 488 nm 流式细胞仪检测细胞的周期分布。对照组只加入无血清的完全培养基。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期的细胞接种于六孔板中 24 h 后, 用不同浓度苦参碱(0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml) 处

理 24 h 或用 1.0 mg/ml 苦参碱处理不同时间(0、12、24、36、48 h) 终止药物处理, 并用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞。根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的操作要求, 收集 3×10^5 细胞至离心管, 加入 500 μ l 的 Binding buffer 悬浮细胞。加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 室温下避光染色 15 min。1 h 内采用激发波长为 488 nm 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。对照组只加入无血清的完全培养基。

1.6 检测线粒体膜电位 取对数生长期的细胞接种于六孔板中 24 h 后, 经不同浓度苦参碱(0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml) 处理 24 h 终止药物处理, 收集细胞, 重悬于培养液中。加入终浓度为 10 μ g/ml 罗丹明 123 染液, 置 37℃ 细胞培养箱染色 15 min。离心后重悬细胞, 重复两次, 置 37℃ 细胞培养箱孵育培养 60 min。上流式细胞仪检测样品的平均荧光强度。

1.7 Western Blot 检测蛋白表达 分别收集实验组和对照组细胞蛋白样品, 根据蛋白量加入适量体积的 4x Loading buffer, 100℃ 变性 5 min。根据所需检测的蛋白分子量, 配制合适浓度聚丙烯酰胺凝胶。在上样孔内加入 marker 和蛋白样品后进行电泳, 采用湿转法进行转膜。转膜结束后, 用 TBS-T 洗膜 10 min。室温下用 0.25% 明胶溶液封闭 60 min。之后采用一抗、二抗进行孵育, ECL 反应 3 min 后显影。

1.8 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对实验数据进行分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测苦参碱对 HepG2 细胞增殖的影响 增加苦参碱浓度或延长处理时间, HepG2 细胞的增殖抑制率均明显增高 ($P < 0.05$), 说明苦参碱对 HepG2 有明显的增殖抑制作用, 其增殖抑制率与苦参碱呈剂量-时间依赖关系, 见表 1、图 1。

表 1 不同浓度苦参碱对 HepG2 增殖率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

苦参碱浓度(mol/L)	12 h	24 h	48 h
0.25	18.23 \pm 1.57	29.13 \pm 0.87*	31.79 \pm 2.67*
0.5	27.78 \pm 2.16*	36.27 \pm 2.38*	41.65 \pm 2.42*
1.0	33.47 \pm 2.49*	53.19 \pm 3.53*	52.98 \pm 3.51*
1.5	42.23 \pm 2.03*	59.25 \pm 3.26*	63.15 \pm 4.10*
2.0	58.38 \pm 5.61*	70.69 \pm 4.33*	80.12 \pm 4.57*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

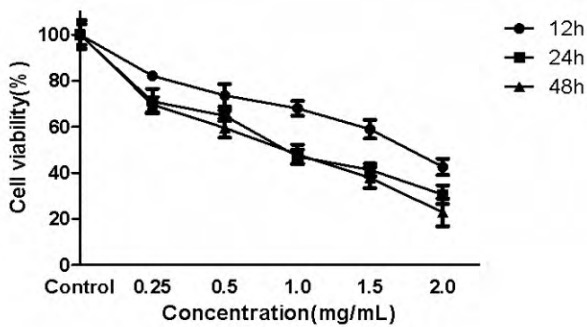


图1 苦参碱对 HepG2 细胞增殖具有抑制作用

2.2 苦参碱将 HepG2 细胞阻滞于 G0/G1 期 流式细胞仪所得结果显示: 不同浓度苦参碱(0.25、0.5、1.0 mol/L) 组的 HepG2 细胞的 G0/G1 期所占比例分别为 (71.197 ± 2.54) % 、 (74.487 ± 0.64) % 、 (77.223 ± 0.14) % , 对照组为 (66.772 ± 0.65) % , 苦参碱各浓度组 G0/G1 期细胞比例均明显高于对照组 ($F = 45.579$, $P = 0.000$) , 并且苦参碱能将 HepG2 细胞阻滞于 G0/G1 期呈剂量依赖性 ($P < 0.05$) , 见图 2A。为深入研究细胞周期阻滞的分子机制, 我们采用 Western Blot 检测调控 G0/G1 期 p27 蛋白的表达情况。结果显示, 随着苦参碱浓度增大, p27 蛋白表达量逐步上调, 见图 2B。

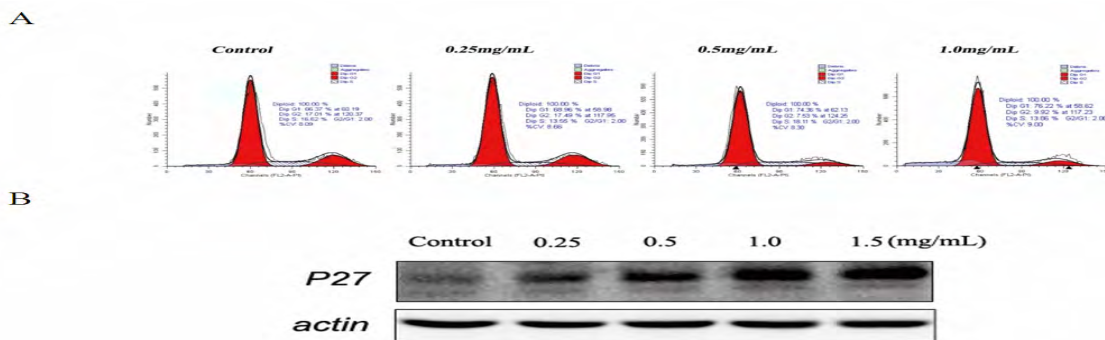


图2 苦参碱对 HepG2 细胞周期分布的影响

2.3 苦参碱诱导 HepG2 细胞发生凋亡 0.5、1.0、1.5、2.0 mol/l 苦参碱作用 24 h 后, HepG2 细胞的凋亡率分别为 (22.471 ± 3.42) % 、 (33.654 ± 1.33) % 、 (43.833 ± 2.63) % 、 (63.026 ± 5.61) % , 对照组的凋亡率为 (11.167 ± 0.57) % , 苦参碱各浓度组的凋亡率均明显高于对照组 ($F = 22.281$, $P < 0.001$) , 并且呈明显剂量依赖关系 ($P < 0.05$) , 见图 3A。经

1.0 mol/l 苦参碱处理 24、36、48 h 后, HepG2 细胞凋亡率分别为 (26.120 ± 1.81) % 、 (34.063 ± 2.43) % 、 (45.453 ± 2.92) % , 均高于对照组的 (5.159 ± 0.75) % ($F = 41.665$, $P < 0.001$) , 苦参碱处理后 HepG2 细胞发生凋亡, 呈明显的时间依赖关系 ($P < 0.05$) , 见图 3B。

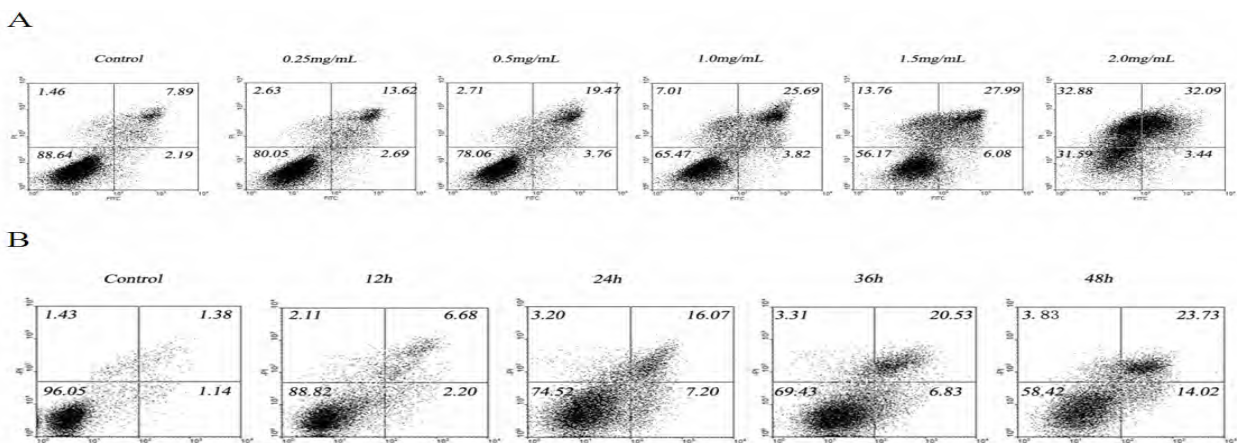


图3 苦参碱诱导 HepG2 细胞发生凋亡

2.4 苦参碱可降低 HepG2 细胞的线粒体膜电位 流式细胞仪结果显示, 与对照组相比, 经 1.0 mg/L 苦参碱处理后, 出现了明显的弱荧光峰, 见图 4。经 1.0、1.5、2.0 mol/l 苦参碱处理后, 弱荧光峰的比例分别为

(21.233 ± 3.91) % 、 (30.074 ± 4.82) % 、 (38.573 ± 5.89) % , 对照组为 (2.267 ± 0.72) % , 高浓度组苦参碱能诱导 HepG2 细胞线粒体膜电位去极化 ($F = 36.529$, $P < 0.001$) , 药物处理浓度越大, 弱荧光峰比例越高 ($P < 0.05$) , 且平

均荧光强度降低。见图 4。

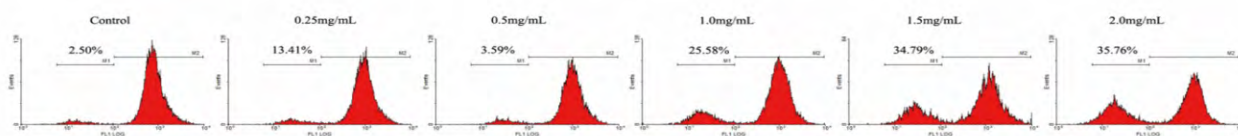


图 4 苦参碱对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

2.5 苦参碱通过线粒体通路介导 HepG2 细胞发生凋亡 为进一步研究苦参碱诱导 HepG2 细胞发生凋亡的分子机制,采用 Western Blot 方法,对线粒体介导的凋亡通路所涉及的一系列信号分子进行检测。结果显示:抑凋亡蛋白 Bid、Bcl-2 蛋白的表达量均随苦参碱处理浓度的增加而明显下调,促凋亡蛋白 Bax 的表达上调,PARP 蛋白出现剪切,但 Bcl-xl 和 AIF 蛋白的表达量未发生明显变化。见图 5。

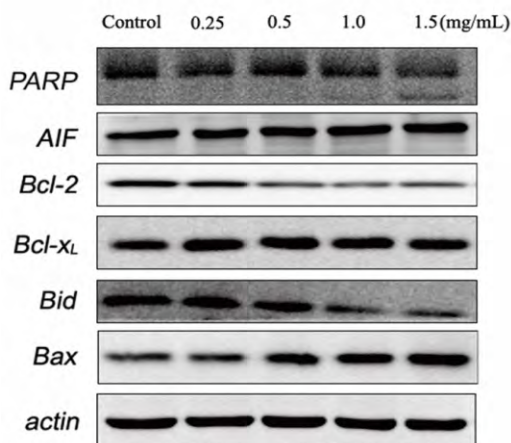


图 5 苦参碱对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白的调控

3 讨论

苦参碱是从我国传统中药苦参根中提取到的有效成分。近年来,许多研究发现苦参碱具有抗肿瘤作用,可能是较理想的抗癌药物,可抑制视网膜瘤细胞增殖并促进其良性分化^[5],或诱导胰腺癌 BxPC-3、PANC-1 细胞和肝癌 SMMC-7721 细胞发生凋亡^[6-7];也有研究证实苦参碱类对白血病、肝癌和胃癌治疗有效^[8]。许多研究较为深入探讨了苦参碱的抗肿瘤机制,诸如抑制 Akt 和 ERK1/2 信号通路^[9],死亡受体通路^[10],或通过调控 c-myc、p53 等信号分子阻止肿瘤细胞增殖或转移等活动^[11-12]。

本研究发现,苦参碱在体外明显抑制人肝癌细胞系 HepG2 的增殖作用,其增殖抑制率与苦参碱呈剂量-时间依赖关系。同时发现,随着苦参碱浓度增大,G0/G1 期细胞比例明显升高,S 期细胞比例相应下降。细胞周期的长短主要取决于 G0/G1 期,苦参

碱使细胞增殖周期阻滞,从而诱导 HepG2 分化。研究发现细胞的生长依赖于 p27 基因及其产物调控作用,促使细胞从 G1 期进入 S 期。p27 蛋白在某些肿瘤细胞株和肿瘤组织中常常会发生异常表达,提示其参与肿瘤的发生发展^[13]。以上研究提示,苦参碱将 HepG2 细胞周期阻滞在 G0/G1 期可能受 p27 蛋白调控。Western Blot 结果显示,HepG2 经苦参碱处理 24 h 后,细胞中 p27 蛋白随处理浓度增加表达逐步上调。进而推测苦参碱可能诱导 p27 快速增长而对 G0/G1 期进程负性调节,但周期阻滞作用的确切机制有待于深入研究。

线粒体是细胞凋亡的调控中心,线粒体跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 反映线粒体内膜完整性,正常的 $\Delta\psi_m$ 是细胞生存所必需的,部分依赖于线粒体通透性转运孔 (MMP)。研究发现,当细胞受到凋亡刺激因子作用后,早期可检测到 $\Delta\psi_m$ 的降低,使得 ATP 合成受阻,导致线粒体膜渗透性开放,细胞即进入不可逆的凋亡过程^[14-15]。我们采用 Rhodamine 123 作为荧光染料检测苦参碱处理 HepG2 细胞线粒体膜电位,实验发现, $\Delta\psi_m$ 下降呈药物浓度依赖性。该结果表明,苦参碱可诱导 HepG2 细胞的线粒体膜电位发生去极化。我们推测苦参碱可能通过改变线粒体膜电位 MMP 通道的结构,使得 MMP 通道处于开放状态,诱导细胞发生凋亡。

Bcl-2 蛋白家族参与 MMP 的形成,在线粒体水平上决定着细胞的命运,通过线粒体通路的信号传导诱导细胞凋亡^[16]。Bcl-2 和 Bcl-XL 通过维持膜的完整性发挥抗凋亡作用。相反,Bax 和 Bak 通过破坏线粒体膜的完整性发挥促凋亡作用^[17]。Bik、Bad、Bid 等具有 BH3 结构的蛋白,则通过结合和调控抗凋亡的 Bcl-2 家族发挥作用^[17]。AIF(细胞凋亡诱导因子)是保守的黄素蛋白,存在于线粒体内外膜间隙,主要作为一个凋亡效应分子。当细胞受到诱导凋亡信号刺激后,从线粒体释放入核,引起染色体核周边凝集和 DNA 呈大片断裂导致核凝集^[18]。我们的研究发现,HepG2 细胞经苦参碱处理后,线粒体介导的凋亡通路所涉及的一系列信号分子,如抑凋亡蛋白 Bid、

Bcl-2 的表达下调,促凋亡蛋白 Bax 的表达上调,但 Bcl-xL 和 AIF 蛋白的表达量没有明显变化。AIF 总蛋白表达量未发生改变的主要原因是,该蛋白发挥促凋亡的作用是通过转位入核实现的,并未发生剪切或降解。研究结果证明了苦参碱能够诱导人肝癌细胞系 HepG2 发生凋亡,更具体阐明了苦参碱是依赖于线粒体通路来诱导人肝癌细胞系 HepG2 发生凋亡。但各个蛋白在诱导凋亡作用中的比重及相互调控关系仍不清楚,在未来的研究中,需要进一步深入的探讨。

参 考 文 献

- [1] 梁 焕,吴继周,李国坚,等. P53 抗体在慢性 HBV 感染不同临床类型中的表达水平研究[J]. 广西医学, 2013, 35(8): 961-964.
- [2] 叶家才,崔书中,巴名臣. 原发性肝癌的流行病学特征及其危险因素[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(10): 1839-1841.
- [3] Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, et al. Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2 [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69(2): 317-331.
- [4] Luo SX, Deng WY, Wang XF, et al. Molecular mechanism of indirubin-3'-monoxime and Matrine in the reversal of paclitaxel resistance in NCI-H520/TAX25 cell line [J]. Chin Med J(Engl), 2013, 126(5): 925-929.
- [5] Zhao B, Li B, Bai S, et al. Effects of matrine on proliferation and apoptosis of cultured retinoblastoma cells [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250(6): 897-905.
- [6] Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(10): 1740-1745.
- [7] Zhang Y, Zhang H, Yu P, et al. Effects of matrine against the growth of human lung cancer and hepatoma cells as well as lung cancer cell migration [J]. Cytotechnology, 2009, 59(3): 191-200.
- [8] 王 颖,刘德新,姚丽红,等. 吗特灵治疗原发性肝癌 128 例分析[J]. 牡丹江医学院学报, 1997, 18(3): 31-32.
- [9] Zhang S, Zhang Y, Zhuang Y, et al. Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46853.
- [10] 张淑君,戚基萍,成秉林,等. 苦参碱引起 C6 胶质瘤细胞凋亡及其对 TRADD 表达的影响[J]. 现代生物医学杂志, 2008, 8(4): 643-645, 634.
- [11] Müller M, Strand S, Hug H, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53 [J]. J Clin Invest, 1997, 99(3): 403-413.
- [12] Nagao T, Kondo F, Sato T, et al. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with cell proliferative activity indices including mitotic index and MIB-1 immunostaining [J]. Hum Pathol, 1995, 26(3): 326-333.
- [13] Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27Kip1, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest [J]. Genes Dev, 1994, 8(1): 9-22.
- [14] Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, et al. Mitochondria, calcium, and calpain are key mediator of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer [J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(6): 1466-1475.
- [15] Kroemer G, Zamzai N, Susin SA. Mitochondria control of apoptosis [J]. In: Inununol Today, 1997, 18(1): 44-51.
- [16] Shangary S, Johnson DE. Peptides derived BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death [J]. Biochemistry, 2002, 41(30): 9485-9495.
- [17] De Falco M, De Luca L, Acanfora F, et al. Alteration of the Bcl-2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds [J]. Histochem J, 2001, 33(7): 421-425.
- [18] Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, et al. AIF: not just an apoptosis-inducing factor [J]. Ann NY Acad Sci, 2009, 1171: 2-11.

(收稿日期: 2014-08-05 修回日期: 2014-09-23)

● 自治区政府增加爱心保险补助

自治区政府增加我区明年爱心保险的财政预算,预算经费从往年的 1 300 万元增加到 2 500 万元,每户补助从 30 元增加到 50 元,目前已完成 2015~2016 年爱心保险项目的政府采购。