

基于线粒体靶向机制的石蒜碱抗肝癌作用研究

辛国松^{1,2*}, 季宇彬^{1,2}, 于 淼¹, 魏 驰¹, 朱洪剑¹

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究石蒜碱诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的作用及其机制。方法 噻唑蓝 (MTT) 法检测石蒜碱对 HepG-2 细胞的生长抑制作用; 倒置显微镜、荧光显微镜观察 HepG-2 细胞凋亡形态; 透射电镜观察 HepG-2 细胞超微结构; 流式细胞术检测 HepG-2 细胞凋亡率; 激光共聚焦扫描显微镜检测线粒体膜电位; 激光共聚焦显微镜检测 HepG-2 细胞线粒体膜通透性转换孔 (MPTP); 酶标仪检测 Caspase-3 蛋白活性; Western blotting 法检测细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cyt-C、Caspase-9 的表达。结果 石蒜碱对 HepG-2 细胞具有生长抑制作用, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 5.73 $\mu\text{mol/L}$; 形态学观察发现石蒜碱作用 48 h 后, 细胞生长密度变疏、皱缩, 且细胞生长呈现不规则形状, 出现凋亡小体, 随着给药浓度升高, 凋亡小体也逐渐增多; 透射电镜下可见细胞出现典型的凋亡特征; 与对照组比较, 随着石蒜碱给药浓度的增加, 细胞凋亡率随之升高, 线粒体膜电位下降, MPTP 开放; 石蒜碱作用 48 h 后, HepG-2 细胞内 Caspase-3 蛋白相对活性升高, 细胞内 Cyt-C 蛋白、Caspase-9 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达量降低, Bax 蛋白表达量升高, 且呈浓度依赖性关系, 与对照组比较, 具有统计学意义; 结论 石蒜碱对 HepG-2 细胞具有生长抑制作用, 并可通过启动线粒体途径诱导 HepG-2 细胞发生凋亡。

关键词: 石蒜碱; 线粒体; 凋亡蛋白; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1132-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.022

Study on anti-hepatoma effect of lycorine based on mitochondrial targeting mechanism

XIN Guo-song^{1,2}, JI Yu-Bin^{1,2}, YU Miao¹, WEI Chi¹, ZHU Hong-jian¹

1. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of lycorine apoptosis in the human Liver cancer cell line HepG-2. **Methods** The inhibitory effect of Lycorine on HepG-2 cell growth was evaluated by the dimethylthiazol tetrazolium assay. Morphological apoptotic changes were characterized using an inverted microscope, Hoechst 33258 fluorescence staining and cell ultrastructure. The rate of cell apoptosis was determined by flow cytometry. Mitochondrial membrane potential and intracellular fluorescent intensity of MMP were detected using laser scanning confocal fluorescence microscopy. Expression of the proteins Bcl-2, Bax, cytochrome C, and Caspase-9 was assessed by western blotting. The activity of Caspase-3 protein was quantified using a Caspase-3 activity kit. **Results** Lycorine inhibited the growth of HepG-2 cell line with an IC₅₀ of 5.73 $\mu\text{mol/L}$. After 48 h lycorine radiata alkali treatment, morphological observation indicated that, the density of growth cell became thin, cell shrinkage and cell growth form an irregular shape, tend to appear apoptotic body. Moreover, with the drug concentration increases, the apoptotic body also gradually increased; Typical apoptosis characteristics of visible cells were observed under transmission electron microscopy. Compared with control group, with the increase of concentration of lycoris radiata alkali dosage, cell apoptosis rate increased, mitochondrial membrane potential decreased and MPTP membrane was open. After 48 h treatment of lycorine, relative activity of Caspase-3 increased in the HepG-2 cells, the expression of cytochrome C, Caspase-9 and Bax on the protein level were upregulated, and the expression of Bcl-2 protein was downregulated, and respectively into concentration dependence relationship, with statistical

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274067); 哈尔滨市科技局后备人才项目 (2016RQXJ124); 哈尔滨市科技局优秀学科带头人项目 (2016RAXXJ064); 黑龙江省高校创新人才项目 (UNPYSCT-2017208); 哈尔滨商业大学校级科研项目 (17XN008)

*通信作者 辛国松, 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: 13766801150@163.com

significance. **Conclusion** Lycorine radiata had growth inhibition effect on human liver HepG-2 cells, and induced apoptosis of HepG-2 cells through mitochondrial pathway.

Key words: lycorine; mitochondrial; apoptosis proteins; apoptosis; mitochondrial membrane potential

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,是我国位居第 2 位的死亡“杀手”,主要分为原发性肝癌和转移性肝癌^[1]。根据肿瘤分期和患者体质不同,肝癌治疗方式分为手术切除、肝移植、放疗、化疗等^[2-3]。然而受到手术的适合性和放化疗对患者副作用大等的限制,研发具有高效、低毒、副作用小的天然抗肿瘤药物尤为迫切。石蒜碱广泛存在于石蒜科(Amaryllidaceae)植物中,具有抗肿瘤、抗病毒、镇静等多种药理活性^[4-5]。近年来有文献报道石蒜碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞^[6-7]、人早幼粒白血病 HL-60 细胞^[8-9]、人白血病 U937 细胞^[10]、人食管癌 Eca-109 细胞^[11]具有显著的抑制作用,但作用机制尚不明确^[12-13]。本课题以人肝癌 HepG-2 细胞为研究对象,通过体外实验从细胞水平和分子水平对石蒜碱抗肿瘤活性及其通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡的机制进行深入研究,为石蒜碱抗肿瘤新药的研究开发和临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

HepG-2 细胞株,由哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所提供。

1.2 药品与试剂

石蒜碱(批号 34296,质量分数 98%),阿拉丁试剂有限公司;羟基喜树碱(HCPT,质量分数 98%,批号 20130112),哈尔滨圣泰药业有限公司;RPMI 1640 细胞培养基,美国 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT,批号 2013212),北京索莱宝科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶、溴化丙啶(PI)、Rhodamine 123,美国 Sigma 公司;Hoechst 33258、鼠抗 β -actin、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L)、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体、鼠抗 Bax 多克隆抗体、鼠抗 Cyt-C 多克隆抗体、Caspase-3 蛋白活性检测试剂盒,碧云天生物技术研究;兔抗 Caspase-9 多克隆抗体,北京博奥森生物技术有限公司;预染蛋白 Ladder,美国 Fermentas 公司。

1.3 仪器

CO-150 型二氧化碳培养箱,美国 NBS 公司;EPICS-XL 型流式细胞仪、低温高速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;CKX-41-32 型倒置显微镜,

日本 Olympus 公司;荧光显微镜,德国 Leica 公司;SW-CJ-2F 型超净工作台,苏州净化设备厂;DYY-7C 型电泳仪、垂直电泳转印槽,北京六一仪器厂;680 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;Adventurer 万分之一电子天平,美国 Ohaus 公司;标准型 PB-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;TCS-SP2 激光共聚焦扫描显微镜,德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测石蒜碱对 HepG-2 细胞增殖的影响

取对数生长期的 HepG-2 细胞,0.25%胰酶消化后,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。给药组每孔加入 100 μL 不同浓度(1.55、3.10、6.20、12.40、24.80 $\mu\text{mol/L}$)的石蒜碱。对照组加入 100 μL RPMI 1640 培养液,阳性对照组加入 100 μL HCPT,浓度分别为 1.40、2.80、5.60 $\mu\text{mol/L}$ 。每组设 6 个平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后,每孔避光加入 200 μL 已配制好的 MTT 溶液,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中持续培养 4 h 后吸去孔内液体,每孔再避光加入 150 μL DMSO 溶液,振荡 5 min,用酶标仪测定吸光度(A)值,参考波长为 490 nm,检测波长为 570 nm。计算各组 HepG-2 细胞的增殖抑制率与石蒜碱对 HepG-2 细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{对照}}$$

2.2 倒置显微镜观察石蒜碱对 HepG-2 细胞形态学的影响

取对数生长期的 HepG-2 细胞,PBS 洗涤 3 次,0.25%胰酶消化后,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,每孔加入 1 mL 细胞悬液于灭菌后的 6 孔板中继续培养。培养 24 h 后给药,石蒜碱的浓度分别为 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组加入 1 mL RPMI 1640 培养液。阳性对照组加入 4 $\mu\text{mol/L}$ HCPT。每组设 3 个平行孔。培养箱中继续培养 48 h,倒置显微镜下观察细胞形态。

2.3 荧光显微镜观察石蒜碱对 HepG-2 细胞形态学的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后,

吸去 6 孔板中液体, 每孔加入 1 mL 多聚甲醛溶液, 放入冰箱 4 °C 固定 1 h, 吸去孔中固定液, PBS 清洗。每孔避光加入 200 μ L Hoechst33258 染色液, 37 °C 水浴中避光孵育 30 min, 荧光显微镜下观察细胞形态并拍照, 取 20 个荧光点, 计算荧光强度平均值。

2.4 透射电子显微镜观察 HepG-2 细胞超微结构

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 收集细胞, 每组分别加 10 mL PBS, 800 r/min 离心洗涤 3 次, 倒掉上清液, 收集沉淀的细胞, 2%戊二醛固定 2 h 以上, 锇酸进行双重固定。经乙醇梯度脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双重染色, 透射电镜下观察并拍照, 取 20 个荧光点, 计算荧光强度平均值。

2.5 流式细胞仪检测石蒜碱对 HepG-2 细胞凋亡率的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 收集细胞, 将悬液与收集的细胞全部转移至离心管中, 1 500 r/min 离心 8 min, 去除上清液, PBS 清洗 1 次, 离心去除上清液, -20 °C 的 70%乙醇溶液重悬细胞, 放置在 4 °C 的冰箱中固定过夜。1 500 r/min 离心 8 min, 弃掉上清液, 避光加入 PI 染色液 700 μ L, 轻轻吹均匀, 室温避光孵育 30 min, 300 目尼龙网滤过, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 激光共聚焦扫描显微镜检测石蒜碱对 HepG-2 细胞内线粒体膜电位变化的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 将 6 孔板中的上清液吸出加入标记好的离心管内, 并将消化后的细胞悬液加入相同的离心管内, 1 500 r/min 离心 8 min, 将离心管内上层清液弃掉, 用 PBS 洗涤 1 次, 避光加入 Rhodamine 123 染料, 使其终质量浓度为 10 μ g/mL, 室温避光孵育 3 min, 离心后去掉上清, PBS 洗涤 2 次, 加入 400 μ L PBS 重悬细胞后全部移入事先制好的小皿中, 用激光共聚焦扫描显微镜检测 HepG-2 细胞的线粒体膜电位, 激发波长 488 nm。

2.7 激光共聚焦显微镜检测石蒜碱对 HepG-2 细胞线粒体膜通透性转换孔 (MPTP) 的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 收集细胞, 每组分别加入 500 μ L 37 °C 预热的 Reagent A, 混匀细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 避光加入按说明书已混匀配好的染色工作液, 吹打均匀之后, 37 °C 避光孵育 20 min, 在 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 500 μ L 37 °C 预

热的 Reagent A 清洗细胞, 加入 500 μ L 37 °C 预热的 Reagent A 将细胞吹打均匀, 吸出 100 μ L 悬液放入小皿, 使用激光共聚焦扫描显微镜检测, 激发波长 488 nm。

2.8 酶标仪检测石蒜碱对 HepG-2 细胞内 Caspase-3 蛋白表达量的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 收集细胞, 取 2×10^6 个细胞加入 100 μ L 裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min, 4 °C、16 000 r/min 离心 15 min, 上清液转移到预冷的离心管中, 对照组中加入 90 μ L 检测缓冲液和 10 μ L Ac-DEVD-pNA, 总体积均为 100 μ L, 37 °C 孵育 60~120 min。酶标仪于波长 405 nm 下检测 A 值。

2.9 Western blotting 法检测石蒜碱对 HepG-2 细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cyt-C、Caspase-9 表达的影响

细胞分组及处理同“2.2”项下。给药 48 h 后, 收集细胞, 将悬液与收集的细胞全部转移至离心管中, 1 500 r/min 离心 8 min, 去除上清液, PBS 清洗 1 次, 离心去除上清液, 加入裂解液, 重悬细胞, 冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 把上清转移至 EP 管中, -80 °C 下保存待用。提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。10%分离胶和 5%浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉封闭 4 h, 4 °C 一抗 (1:200 稀释) 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。加 HRP 标记的二抗稀释液 (1:500 稀释) 温育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。避光用 DAB 显色液显色, 凝胶成像系统拍照并进行分析。

2.10 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 软件进行相关统计学分析, 采用 *t* 检验法进行组间差异比较。

3 结果

3.1 石蒜碱对 HepG-2 细胞增殖的影响

结果显示, 石蒜碱对 HepG-2 细胞具有增殖抑制作用, IC₅₀ 为 5.73 μ mol/L, 阳性对照 HCPT IC₅₀ 为 4.25 μ mol/L (表 1)。

3.2 石蒜碱对 HepG-2 细胞形态学的影响

倒置显微镜下观察石蒜碱对 HepG-2 细胞形态学的影响, 结果如图 1 所示, 对照组细胞基本贴壁生长, 且形态饱满、排列紧密。阳性对照组贴壁生长的细胞较稀疏, 大部分细胞悬浮于培养液中。石

表 1 石蒜碱对 HepG-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of lycopine on proliferation of HepG-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A 值	抑制率/%
对照	0	0.755 ± 0.127	—
石蒜碱	1.55	$0.547 \pm 0.081^{**}$	27.55
	3.10	$0.397 \pm 0.096^{**}$	47.42
	6.20	$0.348 \pm 0.064^{**}$	53.91
	12.40	$0.275 \pm 0.080^{**}$	63.58
	24.80	$0.283 \pm 0.074^{**}$	62.52
HCPT	1.40	$0.432 \pm 0.097^{**}$	42.78
	2.80	$0.424 \pm 0.084^{**}$	43.84
	5.60	$0.354 \pm 0.079^{**}$	53.11

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

蒜碱各剂量组细胞随着给药剂量加大, 贴壁生长的细胞数量逐渐减少, 悬浮于培养液中的细胞数量逐渐增加, 生长也越稀疏, 高剂量组该现象最为明显, 同时还伴有细胞膜普遍破裂等现象。

在荧光显微镜下观察 (图 2), 对照组细胞轮廓清晰明确, 细胞核形态规则并且发出均匀荧光; 阳性对照组细胞核缩小, 细胞膜破裂, 细胞间轮廓模糊不清; 随着给药剂量加大, 石蒜碱各剂量组细胞生长趋于稀疏, 细胞膜破裂现象越明显, 细胞间轮廓越模糊, 细胞核发出较强荧光, 其周围凋亡小体逐渐增多。

3.3 石蒜碱对 HepG-2 细胞超微结构的影响

结果显示 (图 3), 对照组细胞核周围细胞器发达, 细胞核明显, 核内染色质分布均匀, 细胞膜表面的细胞微绒毛比较丰富。石蒜碱各剂量组细胞表

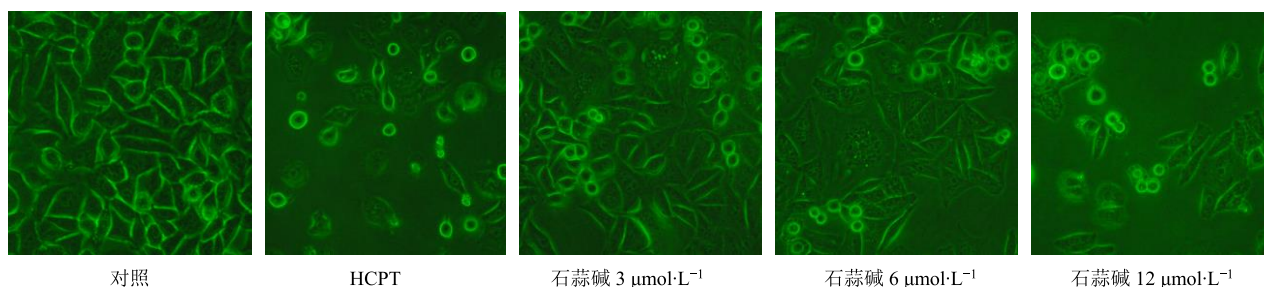


图 1 倒置显微镜观察 HepG-2 细胞凋亡形态 (10×40)

Fig. 1 Morphological appearance of HepG-2 cells by optical microscope (10 × 40)

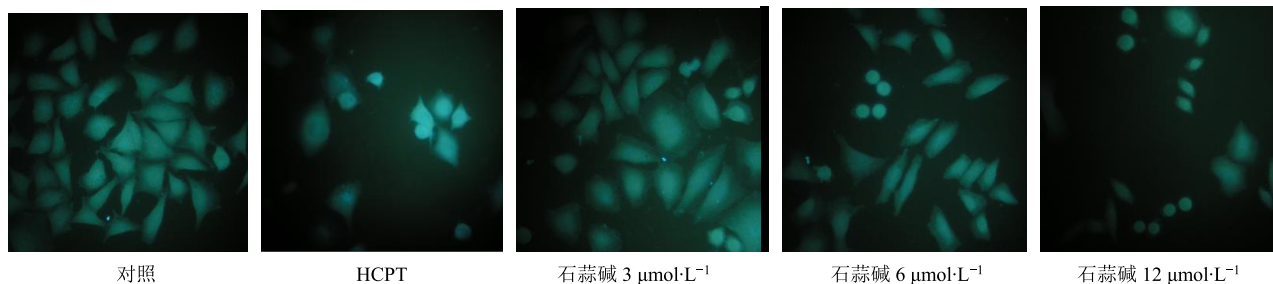


图 2 荧光显微镜观察 HepG-2 细胞凋亡形态 (10×40)

Fig. 2 Morphological appearance of HepG-2 cells by fluorescence microscope (10 × 40)

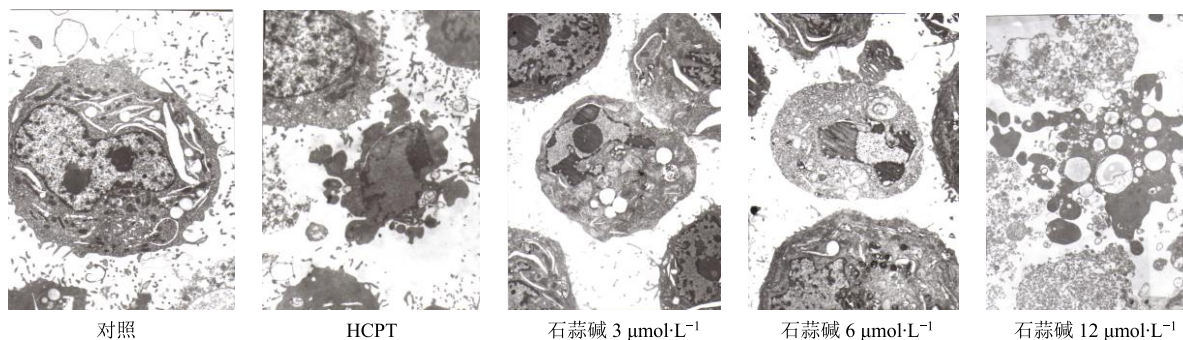


图 3 石蒜碱对 HepG-2 细胞超微结构的影响 (×5 000)

Fig. 3 Effects of lycarine on ultrastructure of HepG-2 cells (× 5 000)

面微绒毛明显比对照组少,可见大量凋亡细胞,早期凋亡细胞完整,结构清晰,基质出现空泡化,细胞核染色质轻度凝集,线粒体增多、肿胀,基质有致密物质沉积;凋亡中期出现出芽特征,细胞核周间隙变大,细胞核裂解,核内染色质形成颗粒状,出现明显的凋亡小体,细胞固缩;凋亡晚期胞浆空泡与胞膜融合,导致膜发泡,形成凋亡小体。

3.4 石蒜碱对 HepG-2 细胞凋亡率的影响

结果如图 4、表 2 所示,经流式细胞仪 PI 单染

法检测出现明显的凋亡峰,表明 DNA 的合成受到抑制。石蒜碱低、中、高浓度组细胞凋亡率分别为 $(8.442 \pm 0.114) \%$ 、 $(10.518 \pm 0.102) \%$ 、 $(14.855 \pm 0.148) \%$,随着石蒜碱给药浓度的增加,凋亡峰越明显,凋亡率也呈上升趋势,与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。阳性对照组凋亡率为 $(16.292 \pm 0.227) \%$,与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。

3.5 石蒜碱对 HepG-2 细胞内线粒体膜电位的影响

实验结果显示(图 5、表 3),与对照组比较,

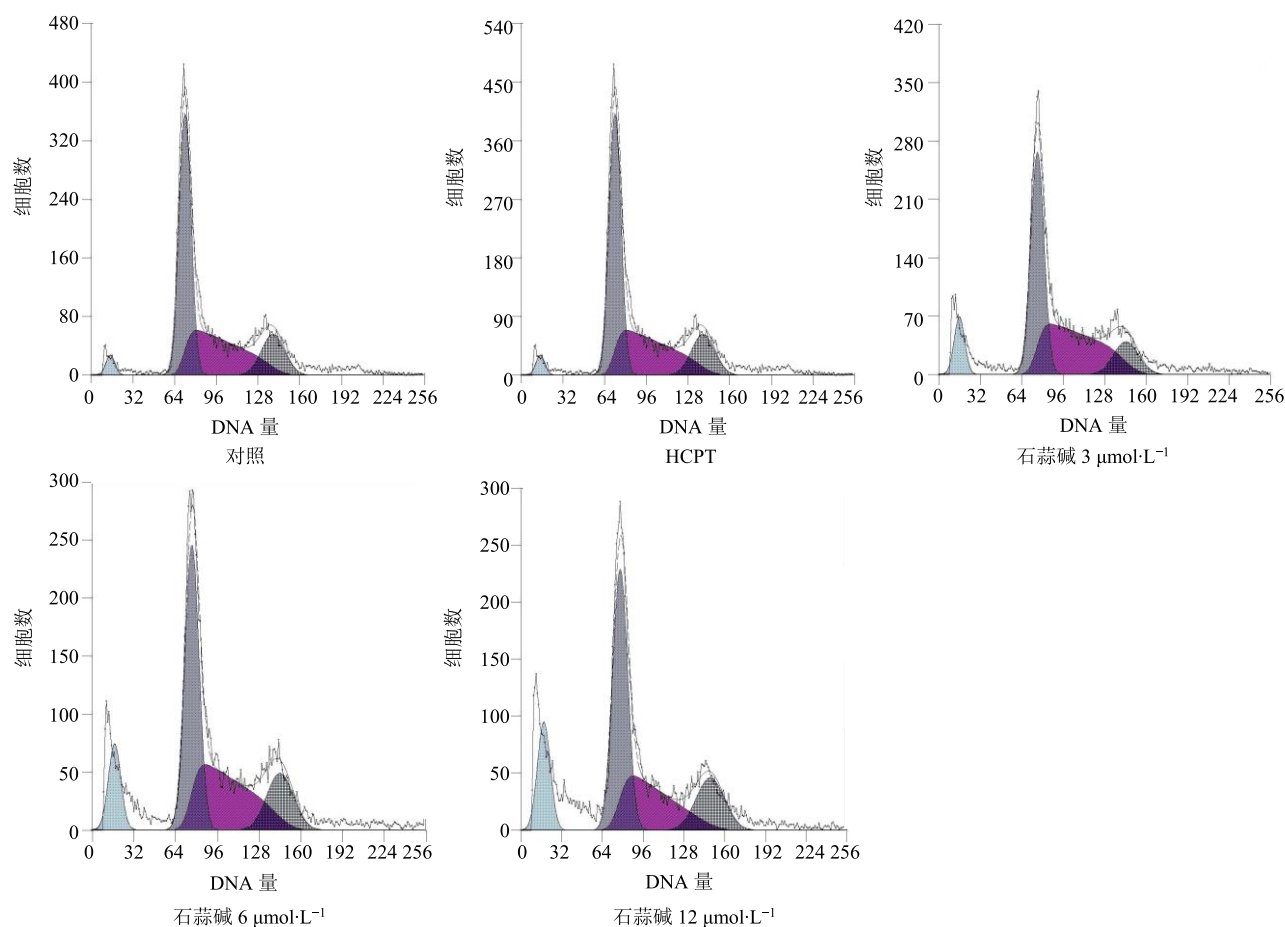


图 4 石蒜碱对 HepG-2 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of combined use of lycorine on HepG-2 cells apoptosis

表 2 石蒜碱对 HepG-2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of lycorine on HepG-2 cells apoptosis rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%
对照	0	2.564 ± 0.213
HCPT	4	$16.292 \pm 0.227^{**}$
石蒜碱	3	$8.442 \pm 0.114^{**}$
	6	$10.518 \pm 0.102^{**}$
	12	$14.855 \pm 0.148^{**}$

不同浓度的石蒜碱作用于 HepG-2 细胞可以降低细胞内的线粒体膜电位 ($P < 0.05, 0.01$)。给药 48 h 后,石蒜碱低、中、高浓度组细胞内荧光强度有所减弱,并且随着药物浓度增加,荧光强度减弱越明显,说明细胞内线粒体膜电位水平降低。

3.6 石蒜碱对 HepG-2 细胞 MPTP 的影响

实验结果(图 6、表 4)显示,与对照组比较,石蒜碱作用于 HepG-2 细胞 48 h 后,随着给药浓度增加,细胞荧光强度明显减弱,表明细胞内的 MPTP

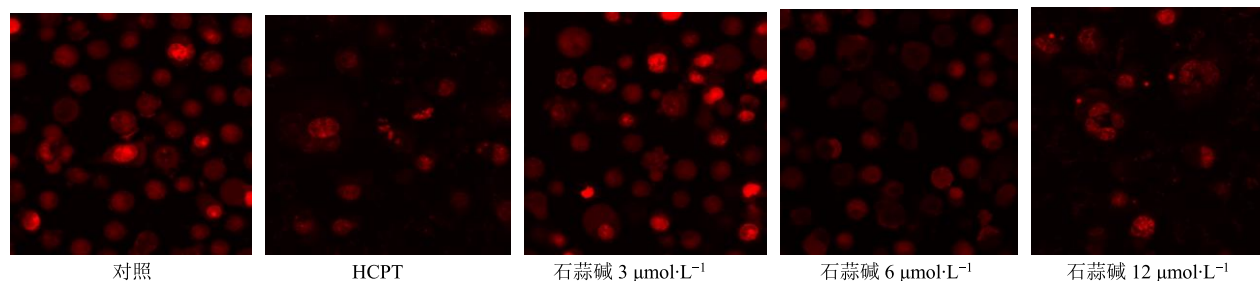


图 5 石蒜碱对 HepG-2 细胞内线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effect of lycorine on mitochondrial membrane potential of HepG-2 cells

表 3 石蒜碱对 HepG-2 细胞内线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 3 Effect of lycorine on mitochondrial membrane potential of HepG-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	膜电位 (荧光强度)
对照	0	25.08 ± 0.81
HCPT	4	$16.53 \pm 0.87^{**}$
石蒜碱	3	$20.34 \pm 0.78^*$
	6	$17.58 \pm 0.75^{**}$
	12	$15.24 \pm 0.39^{**}$

孔开放水平增强。($P < 0.01$)。

3.7 石蒜碱对 HepG-2 细胞内 Caspase-3 蛋白活性的影响

与对照组比较, 阳性对照组 A 值明显升高 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白的相对活性达到 143.75%。与对照组比较, 石蒜碱各浓度组 A 值明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.05), 随着石蒜碱浓度的增加, Caspase-3 蛋白的相对活性逐渐升高, 低、中、高浓度石蒜碱组 Caspase-3 蛋白的相对活性分别为 118.75%、134.38%、

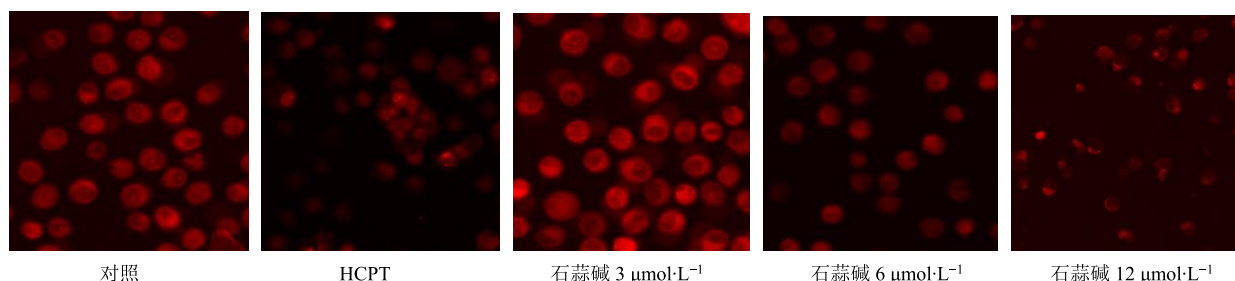


图 6 石蒜碱对 HepG-2 细胞 MPTP 的影响

Fig. 6 Effects of lycorine on intracellular fluorescent intensity of MPTP in HepG-2 cells

表 4 石蒜碱对 HepG-2 细胞 MPTP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 4 Effect of lycorine on MPTP of HepG-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	MPTP (荧光强度)
对照	0	92.05 ± 1.57
HCPT	4	$45.09 \pm 2.63^{**}$
石蒜碱	3	$68.16 \pm 1.60^{**}$
	6	$51.93 \pm 1.53^{**}$
	12	$36.14 \pm 1.87^{**}$

150.00% (表 5)。

3.8 石蒜碱对 HepG-2 细胞内凋亡相关蛋白表达的影响

Tannon 凝胶成像系统 GIS-2019 分析 HepG-2 细胞中凋亡相关蛋白表达的情况。与对照组比较, 随着给药浓度的增加, 石蒜碱组 Bcl-2 蛋白表达量降低, Bax 蛋白表达量升高, Bcl-2/Bax 均显著降低;

表 5 石蒜碱对 HepG-2 细胞 Caspase-3 蛋白活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Effect of lycorine on Caspase-3 activity of HepG-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A 值	Caspase-3 相对活性/%
对照	0	0.064 ± 0.004	—
HCPT	4	$0.092 \pm 0.003^{**}$	143.75
石蒜碱	3	$0.076 \pm 0.005^*$	118.75
	6	$0.086 \pm 0.006^{**}$	134.38
	12	$0.096 \pm 0.004^{**}$	150.00

Cyt-C、Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$, 图 7、表 6)。

4 讨论

近年来, 由于中药具有多靶点、多效应、毒副作用小、不易产生耐药性、安全有效等特点, 成为抗肿瘤药物的研究热点, 石蒜碱作为异喹啉类天然

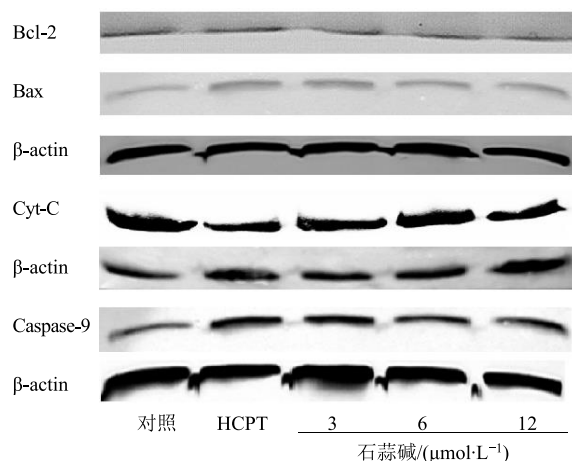


图 7 石蒜碱对 HepG-2 细胞内凋亡相关蛋白表达的影响
Fig. 7 Effect of lycorine on apoptosis associated protein expression of HepG-2 cells

表 6 石蒜碱对 HepG-2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of lycorine on apoptosis associated protein expression in HepG-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量/%		
		Bcl-2/Bax	Cyt-c	Caspase-9
对照	0	217.38 $\pm$ 2.06	82.17 $\pm$ 2.25	89.32 $\pm$ 2.25
HCPT	4	53.65 $\pm$ 2.12**	150.24 $\pm$ 0.96**	147.24 $\pm$ 0.96**
石蒜碱	3	85.11 $\pm$ 3.10**	113.79 $\pm$ 1.48**	125.37 $\pm$ 1.48**
	6	62.79 $\pm$ 1.46**	137.01 $\pm$ 1.23**	149.69 $\pm$ 1.23**
	12	37.25 $\pm$ 2.04**	158.39 $\pm$ 1.27**	172.39 $\pm$ 1.27**

Bax 降低, 从而促进 MPTP 开放, 降低线粒体膜电位。线粒体膜电位的降低导致线粒体膜内相对高渗, 线粒体基质膨胀, 由于线粒体内膜比外膜面积大, 所以外膜破裂, 释放出 Cyt-C。Cyt-C 释放入胞质后, Caspase-9 被激活, 引发 Caspase 级联反应, 激活的 Caspase-9 可以活化处于细胞凋亡信号转导过程中下游的 Caspase-3, 最终诱导细胞凋亡。此外, Cyt-C 的释放不仅仅受 Bcl-2/Bax 的影响, 活化的 Caspase-3 也可以使 Cyt-C 释放, 这可能是由于 Cyt-C 释放和 Caspase 是相关联的, Cyt-C 经过 Caspase 级联反应又可使 Caspase-3 激活。本课题系统地研究了石蒜碱抗肿瘤作用及其作用机制, 明确了其通过线粒体途径介导细胞凋亡, 为石蒜碱的进一步实验研究和临床应用提供了重要的理论指导和实验依据。

参考文献

- [1] 郑国银, 凌昌全. 中医药防治肝癌机制研究进展 [J]. 肿瘤, 2008, 28(9): 813-816.
- [2] 杨浩, 杨连粤. 肝癌术后复发转移相关因素研究进展 [J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(10): 868-870.
- [3] 黄艳, 何健. 肝细胞肝癌骨转移在病理生理学及放射治疗中的研究进展 [J]. 肿瘤, 2015, 35(2): 225-231.

生物碱, 广泛分布于石蒜科植物中, 含有多种独特的生物活性和药理活性。石蒜碱具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗过敏等药理作用。目前已有专家学者对石蒜碱的抗肿瘤作用进行了研究与讨论, 但其作用机制尚不明确, 因此有必要对石蒜碱的抗肿瘤作用及其作用机制进行更深一步的研究, 为开发天然药物提供重要的理论基础。

基于石蒜碱的抗肿瘤作用, 结合课题组前期实验中的细胞活性筛选, 发现石蒜碱对 HepG-2 细胞较为敏感, 因此本课题以 HepG-2 细胞为研究对象, 对石蒜碱诱导肝癌细胞凋亡机制进行深入研究。结果发现石蒜碱可以通过线粒体途径诱导 HepG-2 细胞凋亡, 并且可以下调 HepG-2 细胞中 Bcl-2 蛋白的表达水平, 上调 Bax 蛋白的表达水平, 引起 Bcl-2/

- [4] 刘颖杰, 丁泽洋, 谭冲, 等. 石蒜碱的全合成及结构修饰研究进展 [J]. 有机化学, 2015, 35(5): 1009-1021.
- [5] 抗晶晶, 王辉. 石蒜碱抗炎作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(6): 1-3.
- [6] 张新红, 朱佳, 徐水凌. 龙葵碱通过线粒体途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(16): 1404-1409.
- [7] 石碧炜. 石蒜碱对人乳腺癌细胞 MCF-7 存活率及线粒体膜电位的影响 [J]. 医学综述, 2010, 16(16): 2524-2525.
- [8] 胡济梁. 石蒜碱诱导 HL-60 细胞凋亡的分子机制探讨 [D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [9] 石碧炜. 石蒜碱通过上调 p21 基因表达抑制 HL-60 细胞增殖的分子机制初步研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [10] 刘小珊, 蒋纪恺. 石蒜碱对人白血病 U937 细胞的凋亡诱导及作用机制 [J]. 山东医药, 2008, 48(2): 35-37.
- [11] 彭聪, 徐佳, 伍春莲. 盐酸石蒜碱对人食管癌细胞 Eca-109 增殖及凋亡的影响 [J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2015, 36(1): 7-11.
- [12] 齐玲, 赵东海, 王玮瑶, 等. Caspase-8 和 Bcl-2 在脑肿瘤干细胞肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体耐药中的作用研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(2): 152-156.
- [13] 齐雪静, 郑楠楠, 高亚男, 等. 线粒体靶向分子抗肿瘤应用的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(9): 741-744.