

青蒿酯钠抗人肝癌(BEL-7402)与诱导凋亡

中山医科大学肿瘤研究所(广州 510060) 张 星* 杨小平 潘启超

摘 要 应用体内外抑瘤实验、细胞形态学观察、流式细胞仪、Western blot 实验进行检测和观察,探讨青蒿酯钠抗肿瘤作用及机制。结果表明,青蒿酯钠对人肝癌有体内、外抗肿瘤作用;诱导人肝癌细胞凋亡,可能是其抗肿瘤作用机制之一;诱导体外人肝癌细胞凋亡通过 P₅₃非依赖性途径。

关键词 青蒿酯钠 肝肿瘤 抗肿瘤活性凋亡 P₅₃非依赖性途径

青蒿素(artemisinin)是从菊科艾属植物黄花蒿 *Artemisia annua* Linn 中提得,为倍半萜内酯过氧化物,是一种新化学结构的抗疟药。青蒿酯钠(sodium artesunate)为青蒿素衍生物,具有水溶性好、抗疟活性高等特点。近年来发现青蒿酯钠有体内、外抗肿瘤作用,对小鼠艾氏腹水瘤细胞^[1]、人鼻咽癌细胞(SUNE-1 和 CNE-1)和人宫颈癌细胞(HeLa)^[2]生长有明显的抑制作用,但未见有青蒿酯钠对人肝癌体内、外抗肿瘤作用及其机制研究的报道。我们研究了青蒿酯钠对人肝癌细胞的体内、外抗肿瘤作用,并从诱导肿瘤细胞凋亡的角度来探讨其抗肿瘤作用机制,为青蒿酯钠在肿瘤治疗的新应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物:人肝癌 BEL-7402 细胞株在含有 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 RPMI-1640 培养液中培养。青蒿酯钠由广西桂林第二制药厂出品,系白色结晶,使用前以 5% NaHCO₃ 助溶,用生理盐水配成相应浓度溶液。

1.2 噻唑蓝还原法(MTT 法):将人肝癌细胞种植于 96 孔培养板中(2.5 × 10⁴ 个细胞/孔),加入不同浓度青蒿酯钠(20 μL/孔),对照组加等体积生理盐水。在 37 °C 5% CO₂ 孵箱中培养 48 h,实验结束前 4 h,加入 MTT 液(5 mg/mL PBS 液, Janssen Chimica 产

品)20 μL,继续孵育 4 h 后吸弃上清,加入二甲亚砷溶解甲臜,将培养板置酶联免疫检测仪在 540 nm 波长处测光密度值(OD 值),按以下公式计算抑制率。

抑制率 = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) × 100%,用 POMS 软件程序求出 IC₅₀。

1.3 青蒿酯钠对裸鼠异体移植人肝癌生长的作用:使用 2 月~3 月龄 BALB/cSPF 裸小鼠,由中山医科大学实验动物中心提供(合格证 26-018)。将人肝癌 BEL-7402 细胞接种至裸鼠腋窝皮下形成实体瘤,约 14 d,待肿瘤直径长至 3 mm~4 mm 时,用青蒿酯钠 100、180、324 mg/(kg · d) 3 个剂量 po,每日 1 次,连续 15 d,第 16 日处死小鼠,称体重,剖取瘤块称重,计算抑瘤率。

抑瘤率 = $\frac{(\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重})}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$

1.4 荧光显微镜检查:细胞经青蒿酯钠处理 8 h,胰酶消化离心,甲醇-冰醋酸固定, Hoechst 33258(Sigma 产品)染色,荧光显微镜观察,并计算凋亡率(计数 1 000 个细胞)。

凋亡率 = (凋亡细胞数/100 个细胞) × 100%

1.5 细胞超微结构观察:体内抑瘤实验结束时,取生理盐水对照组和青蒿酯钠高剂量组 324 mg/(kg · d)裸鼠瘤组织,按常规固定处理后^[3],透射电镜下观察超微结构的变化。

1.6 流式细胞仪分析:用 COUITEK ELITE 出品流式细胞仪。细胞经青蒿酯钠处理后,于 12、24 h 收集细胞,沉淀加入 PBS 液

* Address: Zhang Xing, Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou

张 星 女,1994 年 7 月毕业于河南医科大学临床医学系,学士;1997 年 7 月获中山医科大学肿瘤防治中心肿瘤药理学硕士。专业研究方向:肿瘤药理学,主要从事抗癌药物的筛选、增效减毒、作用机理方面的研究。

1 mL 制成单细胞悬液,再加 70%乙醇 3 mL 固定。染色前用 PBS 液离心沉淀,加 200 μ L RNaseA37 $^{\circ}$ C 水浴,800 μ L 碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪上测试记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.7 青蒿酯钠对肝癌细胞中 P₅₃表达水平的影响:采用 Western blot 实验。经药物处理后 12 h 收集细胞,PBS 洗 2 次,加入 80 $^{\circ}$ C 预热 1 \times SDS 凝胶加样缓冲液(100 mmol/L Tris \cdot Cl, pH6.8, 200 mmol/L DTT, 4%SDS, 0.2%溴酚蓝,20%甘油)100 μ L 溶解细胞,收集细胞裂解液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。取 20 μ L 样品在 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳 5 h(50 mA 恒流条件下)。电转印至硝酸纤维滤膜,5%脱脂奶粉封闭过夜,加入 P₅₃单抗(1:200 稀释,Santa Cruz 产品)室温反应 2 h,二抗(HRP)室温反应 2 h,最后加入荧光底物,在暗室压片及冲洗胶片。另设 P₅₃突变

型细胞株 Fadu 和阿霉素为对照组。

2 结果

2.1 体外细胞生长抑制作用:青蒿酯钠对 BEL-7402 细胞生长有明显抑制作用。随着药物浓度的增加,抑制率越来越大。在 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL 浓度下,抑制率分别为 19.4%、29.0%、35.1%、50.9%、61.3%和 83.9%。用 POMS 软件程序求出 IC₅₀为 21.4 μ g/mL(52.5 μ mol/L)。

2.2 对裸鼠异体移植人肝癌生长的作用:实验结果表明,青蒿酯钠对裸鼠异体移植人肝癌的生长有明显抑制作用,青蒿酯钠各用药组瘤重均小于生理盐水对照组,而给药组裸鼠体重增长与对照组基本相同,各用药组裸鼠未见死亡。在 100、180 和 324 mg/(kg \cdot d)剂量下,抑瘤率分别为 44%、49%和 71%(P 值均 $<$ 0.01),阿霉素 1.5 mg/(kg \cdot d)剂量下的抑瘤率为 33%(P $<$ 0.01),见表 1。

表 1 青蒿酯钠对裸鼠异体移植人肝癌的抑制作用

组别	剂量 mg/(kg \cdot d)	次数 (次/日)	给药途径	动物数		体重变化 (g)	平均瘤重 ($\bar{x} \pm s$)(g)	抑瘤率 (%)
				开始	结束			
生理盐水	—	15	po	6	6	+1.90	1.08 \pm 0.13	
阿霉素	1.5	15	po	6	6	+0.85	0.72 \pm 0.21	33**
青蒿酯钠	100	15	po	6	6	+2.10	0.60 \pm 0.20	44**
	180	15	po	6	6	+1.90	0.55 \pm 0.36	49**
	324	15	po	6	6	+1.80	0.31 \pm 0.18	71**

与生理盐水组比较:** P $<$ 0.01

2.3 荧光显微镜检查:经不同浓度青蒿酯钠处理细胞 8 h,用 Hoechst33258 染色在荧光显微镜下可观察到细胞出现凋亡,细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光,荧光较强,典型可见新月形改变、固缩或片段化的核。而正常细胞核呈弥漫均匀荧光,荧光较弱。当青蒿酯钠浓度为 0、20、40、60、80、100 μ g/mL 时,3 次实验平均凋亡率依次为 3.7%、9.5%、21.4%、43.3%、53.4%和 66.2%。

2.4 超微结构观察:青蒿酯钠用药组 324 mg/(kg \cdot d)可观察到细胞凋亡特征的形态学改变:凋亡细胞在组织中常呈单个散在分布,核染色质浓缩、聚集于核膜呈境界分明的颗粒块状或新月形小体,胞质浓缩,细胞体积

缩小,内质网扩张,形成一系列膨胀小泡,胞质内细胞器及膜性结构保持完整。

2.5 流式细胞仪分析:在 DNA 直方图上,青蒿酯钠加药组细胞出现二倍体峰(G₁ 细胞峰)的减少,G₁ 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型即凋亡峰(亚 G₁ 峰),表明青蒿酯钠能诱导人肝癌 BEL-7402 细胞发生凋亡。青蒿酯钠浓度为 0、30、60 和 90 μ g/mL 时,12 h 凋亡率分别为 3.7%、14.8%、16.8%和 37.0%,24 h 凋亡率分别为 8.2%、16.0%、15.4%和 44.1%。

2.6 青蒿酯钠对 P₅₃蛋白表达的影响:肝癌细胞未经阿霉素处理时 P₅₃表达很低,经阿霉素刺激后表达大量增加,表明肝癌细胞中 P₅₃基因为野生型。与未经青蒿酯钠处理的肝癌

细胞中 P₅₃ 表达无明显差异,表明青蒿酯钠对肝癌细胞中 P₅₃ 表达水平无影响。对照组 Fad_u 在阿霉素刺激前后均显示 P₅₃ 高度表达,无明显差异。

3 讨论

青蒿酯钠是青蒿素衍生物,是一种新型的抗疟药物,近年来发现其具有抗肿瘤作用。继 Woerdenbag 和杨小平等人研究报道之后,本研究结果显示,青蒿酯钠体外对人肝癌 BEL-7402 细胞及体内对裸鼠异体移植人肝癌生长均有明显的抑制作用。1993 年 Woerdenbag 等报道用 MTT 法检测与青蒿素有关的内过氧化物对艾氏腹水癌细胞有细胞毒性;杨小平等报道青蒿酯钠对人 HeLa 细胞和人 SUNE-1 和 CNE-1 细胞均有体外杀伤作用,且对裸鼠异体移植人鼻咽癌细胞生长有抑制作用。实验结果与上述报道一致,进一步证实青蒿酯钠的抗肿瘤作用。

细胞凋亡在肿瘤的治疗中具有重要的意义,凋亡调节紊乱与肿瘤的发生发展有着密切的关系,凋亡功能丧失或抑制可能导致癌症的发生和肿瘤细胞耐药性的出现,许多肿瘤促进剂能明显抑制肿瘤细胞凋亡,而多种抗肿瘤的化学药物具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[4,5]。

我们通过光镜、电镜、流式细胞仪等实验研究表明青蒿酯钠能诱导人肝癌细胞发生凋亡,并从诱导细胞凋亡的角度探讨了青蒿酯

钠抗肿瘤作用机制。细胞凋亡是基因调控下的细胞主动死亡过程,目前认为细胞凋亡途径可分为两种:P₅₃ 依赖型和 P₅₃ 非依赖性途径^[6~8]。分化诱导细胞因子如白细胞介素-6 (IL-6)、白血病抑制因子(LIF)、生长抑制因子如转化生长因子(IGF-β)、DNA 损伤剂 MMS(Methylmethane Sulfate)介导 P₅₃ 非依赖性途径的凋亡,并且研究发现 MyD116、MyD118 家族的 MyD118、Gadd45、CR6 以及 P₂₁、Bax 和 Bcl-2 等基因参与调控此种类型的凋亡途径^[9]。Western Blotting 实验结果显示青蒿酯钠诱导的凋亡细胞中 P₅₃ 表达并不升高,表明青蒿酯钠诱导 BEL-7402 细胞凋亡是通过 P₅₃ 非依赖性途径。有关青蒿酯钠诱导 P₅₃ 非依赖性凋亡途径的机制是否与 MyD118 家族 P₂₁、Bax 和 Bcl-2 等基因的调控有关,还有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Woerdenbag H J, et al. J Nat Prod, 1993; 56(6): 849
- 2 杨小平,等. 中国肿瘤临床, 1995; 22(增刊): 101
- 3 Racker DK, et al. Transmission Electron Microscopy. Illinois, Charles C Thomas Publisher, 1983; 14
- 4 Williams G T, et al. Cell, 1991; 65: 1097
- 5 Bosman-F T, et al. Path Res Pract, 1996; 192: 676
- 6 Macfarlane M, et al. Mol Pharmacol, 1996; 50: 900
- 7 Tamura T, et al. Nature, 1995; 376(17): 596
- 8 Gartenhaus R B, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 265
- 9 Liebermann D A, et al. Oncogene, 1995; 11: 199

(1998-01-08 收稿)

Studies on the Antitumor Effect and Apoptosis Induction in Human Liver Cancer Cell Line (BEL-7402) by Sodium Artesunate

Zhang Xing, Yang Xiaoping, Pan Qichao (Cancer Institute, Sun Yatsen University of Medical Science, Guangzhou 510060)

Abstract To study the antitumor activity of sodium artesunate (SA) and its mechanism of action, antitumor experiments *in vitro* and *in vivo*, cell morphology, flow cytometry and Western blot were performed. Several conclusions can be obtained: 1. SA had antitumor effects on human liver cancer cells (BEL-7402) *in vitro* and *in vivo*. 2. SA induced apoptosis in human liver cancer cells, which may be one of the mechanisms of its antitumor effects. 3. Apoptosis in BEL-7402 cells by SA may be induced by P₅₃-independent pathway.

Key words Sodium artesunate (SA) Human BEL-7402 liver cancer cell line apoptosis in liver cancer cell P₅₃-independent pathway