

• 药理与临床 •

香加皮水提取物诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制

单保恩, 李俊新, 张 静

(河北医科大学第四医院 科研中心 暨河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 研究香加皮水提取物(CPE)诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制。方法 采用 Giemsa 染色观察细胞凋亡形态学变化;电子显微镜观察凋亡细胞的超微结构变化;流式细胞术和琼脂糖凝胶电泳方法检测 BGC-823 细胞凋亡率、细胞周期和细胞凋亡的 DNA 水平变化;RT-PCR 方法检测细胞凋亡相关基因 bcl-2、bax 和 survivin mRNA 表达水平变化;免疫细胞化学方法检测 bcl-2、bax 和 survivin 蛋白表达的变化。结果 经 CPE 作用后,人胃癌细胞 BGC-823 出现明显的细胞凋亡形态学变化及超微结构改变,细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现梯形图。经 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CPE 处理 48 h 后,多数 BGC-823 细胞被阻滞在 G_2/M 期,而且细胞发生明显的凋亡变化,BGC-823 细胞凋亡率可达 18.9%。CPE 可抑制 BGC-823 细胞 bcl 和 survivin mRNA 及蛋白的表达,促进 bax mRNA 及蛋白的表达。CPE 可明显延长 S_{180} 荷瘤小鼠生存期,且具有剂量依赖性。结论 CPE 通过阻滞 BGC-823 细胞于 G_2/M 期及诱导 BGC-823 细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,其作用机制与抑制细胞的 bcl-2 和 survivin 基因 mRNA 及蛋白表达、促进 bax 基因和蛋白的表达有关。

关键词:香加皮;人胃癌细胞 BGC-823; bcl-2; bax; survivin

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)08-1184-05

Inductive effect of *Cortex Periplocae* extract on apoptosis of human gastric cancer cells BGC-823

SHAN Bao-en, LI Jun-xin, ZHANG Jing

(Hebei Key Laboratory of Gene Diagnosis, Prophylaxis, and Therapy, Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: **Objective** To study the inductive effect of *Cortex Periplocae* extract (CPE) on apoptosis of human gastric cancer cells BGC-823 and its mechanism. **Methods** The cell morphology and super-microstructural changes of apoptosis were analysed by Giemsa staining and electric microscope, respectively. The BGC-823 apoptosis ratio, cell cycles, and changes of apoptosis in DNA level were studied by Flow Cytometry and agarose gel electrophoresis. The genes mRNA and protein expression of apoptosis-related genes bcl-2, bax, and survivin were studied by RT-PCR and immunology cell chemistry method. **Results** After treatment with CPE, BGC-823 cells showed some typical morphologic features and super-microstructural changes of apoptosis. DNA agarose gel electrophoresis showed characteristic "DNA ladder" pattern. Most BGC-823 cells were arrested at G_2/M phase. Some typical subdiploid peaks before G_0/G_1 phase were observed. The apoptotic rate of BGC-823 was 18.9% after 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CPE treated for 48 h. The gene mRNA and protein expression of bcl-2 and survivin were inhibited by CPE, whereas that of bax was up-regulated. CPE could enhance the life span of S_{180} bearing mice in a dose-dependent manner. **Conclusion** CPE can inhibit the tumor growth by arresting the BGC-823 cell cycle at G_2/M phase and inducing BGC-823 apoptosis. Its mechanism is related to the inhibition on gene mRNA and protein expression of bcl-2 and survivin, and enhancement of those of bax.

Key words: *Cortex Periplocae*; human gastric cancer cells BGC-823; bcl-2; bax; survivin

香加皮始载于《神农本草经》,系萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 的根皮,主产于东北和华北地区^[1]。临床应用主要为强心和祛风湿作用。有

关香加皮抗肿瘤及诱导细胞凋亡的作用尚未见报道。本实验室在抗肿瘤中药筛选中发现香加皮具有抗肿瘤作用,可明显延长 S_{180} 荷瘤小鼠生存期。为了

收稿日期:2004-12-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371753);河北省自然科学基金资助项目(C2004000610)

作者简介:单保恩(1962—),男,河北省广平县人,教授,博士,博士生导师,研究方向为肿瘤免疫学。

Tel: (0311) 6033941-283 或 290 E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

研究香加皮水提取物 (*Cortex Periplocae extract*, CPE) 抗肿瘤的作用机制, 本实验对 CPE 诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 肿瘤细胞株及其培养: 人胃癌细胞株 BGC-823 由本室保存, 于 RPMI 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 100 U/mL), 置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养。待细胞进入对数生长期后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, Hank's 液洗涤后, 调节成相应的细胞浓度。

1.2 实验动物: 纯种 BALB/c 小鼠, 二级, 雌性, 6~8 周龄, 购自中国协和医科大学肿瘤医院动物研究所, 许可证编号: SCXK 京 2000。

1.3 CPE 制备: 香加皮购自安国市中药市场, 经河北医科大学生药教研室鉴定。称取香加皮 5 g 于 100 mL 蒸馏水中浸泡过夜, 回流提取 1 h, 用无菌滤器 (Nippon Millipore 公司) 滤过后即得 5.0% (含生药 50 mg/mL) CPE。经薄层色谱和质谱分析, CPE 符合《中国药典》2005 年版一部标准。

1.4 主要试剂: MTT 为美国 Sigma 公司产品; SDS 为美国 Biotec 公司产品; 胎牛血清为杭州四季青公司产品; RPMI 1640 培养液和胰蛋白酶为 Gibco 公司产品。蛋白酶 K、琼脂糖、EDTA、溴化乙锭、RT-PCR 混合酶为华美生物工程公司产品; 200 bp DNA ladder 为鼎国生物工程公司产品; 兔抗人 bcl-2 单克隆抗体、兔抗人 bax 单克隆抗体、免疫组化显色试剂盒为北京中山生物工程公司产品; 抗 survivin 抗体由美国 MD 公司提供; Giemsa 染液自制^[2]。

1.5 细胞凋亡分析

1.5.1 细胞凋亡的形态学分析: 采用 Giemsa 染色法^[2]。BGC-823 细胞 (5×10^6 /mL) 悬液 50 mL 接种于细胞培养瓶中, 加入终质量浓度分别为 250、125 和 62.5 μg/mL CPE, 置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞制备细胞涂片, 晾干, 以醋酸甲醇固定 30 min。Giemsa 染液染色 15 min, 自来水冲洗。晾干后光学显微镜下观察细胞形态变化。

1.5.2 细胞超微结构分析: 细胞处理同上, 37 ℃ 培养 48 h 后经 2.5% 戊二醛前固定, 1% 锇酸后固定, 逐级乙醇脱水, 树脂包埋, 超薄切片, 经醛酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 透射电镜 (日本日立公司 H-7500 型) 观察凋亡细胞的超微结构。

1.5.3 流式细胞仪分析: 细胞处理同上, 37 ℃ 培

养 48 h, 收集细胞, 用预冷的 70% 乙醇固定细胞, PBS 洗 3 次, 加入不含 DNase 的 RNA 酶及 PI, 室温反应 30 min, 用流式细胞仪 (美国 BD 公司 FACS Calibur) 及 Single histogram statistic 分析软件测定细胞周期 DNA 变化。

1.5.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳^[3]: 同上收集细胞, 经 Hank's 液洗涤, 加入细胞裂解液, 混匀后加入 10% SDS 和蛋白酶 K (终质量浓度 100 mg/L), 55 ℃ 水浴 3 h, 冷却后加等体积 Tris-HCl 饱和酚, 充分震荡, 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min。吸取上清液加等体积 Tris-HCl 饱和酚和氯仿-异戊醇 (24:1) 重复抽提。吸取上清液加等体积无水乙醇和 1/10 体积 NaAc 沉淀 DNA, 用 70% 乙醇洗去残留的有机物, 用去离子水溶解 DNA。取 DNA 与溴酚蓝混匀, 于 1.5% 琼脂糖凝胶中 (含 EB 终体积分数 5×10^{-5}), 在 80 V 电压下电泳 30 min, 用凝胶成像系统 (美国 Image 公司 Fotodyne) 分析 DNA 条带。

1.6 bcl-2、bax 和 survivin mRNA 表达的分析: BGC-823 细胞 (5×10^6 /mL) 悬液 1 mL, 加入终质量浓度为 250 μg/mL CPE, 37 ℃ 培养 48 h, 收集细胞, 按 Trizol 试剂说明常规提取各组细胞 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 应用 Gel-pro 凝胶分析软件对电泳谱带 mRNA 进行基因表达差异分析。各引物 (上海生物工程技术服务有限公司合成) 序列及其扩增条件见表 1。

表 1 bcl-2、bax 和 survivin 引物序列及其 PCR 扩增条件
Table 1 Sequence of bcl-2, bax, and survivin primers and conditions of PCR amplification

基因名称	引物序列	退火温度/℃	产物长度/bp
bcl-2 ^[2]	5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3'	65	388
	5'-ACTTGTGGCCGAGATAGGCCACCCAG-3'		
bax ^[3]	5'-GGCCCCACCAGCTCTGAGCAGA-3'	63	417
	5'-GCCACGTGGGCGTCCCAAAGT-3'		
survivin ^[4]	5'-CGGCATGGGTGCCCGACGCTTG-3'	62	447
	5'-TTGAGGCCTCTGGCCGAGC-3'		
β-actin ^[5]	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	60	838
	5'-CGTCATACCTCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'		

1.7 bcl-2、bax 和 survivin 蛋白表达的分析: 细胞处理同 1.6 项, 37 ℃ 培养 48 h, 收集细胞, 取 1~2 滴细胞悬液涂于载玻片, 晾干。95% 乙醇 4 ℃ 固定 30 min, 室温下用 0.3% 过氧化氢甲醇溶液作用 30 min (用以阻断内源性过氧化物酶的活性), 用 10% 羊血清封闭 20 min, 分别滴加抗 bcl-2、bax 和 survivin 抗体 (一抗), 4 ℃ 过夜, 用 PBS 冲洗 3 次, 滴加链霉素蛋白-过氧化酶溶液 (用以标记第二抗

体),孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,加入辣根酶标记链霉卵白素,DAB 溶液显色 15~20 min;流水冲洗后,苏木素染色 5 min,常规脱水、透明、封片。同时用正常羊血清取代第一抗体,作为阴性对照。bcl-2 和 bax 定位于细胞质和细胞膜,survivin 定位于细胞浆中。细胞染色呈棕褐色或棕黄色为阳性。光镜下随意选取 5 个高倍视野,计算阳性细胞比率。

1.8 CPE 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期的影响:收集 S₁₈₀ 细胞,调整细胞浓度为 5×10⁶/mL,小鼠右腋皮下局部消毒后,每只小鼠接种 0.2 mL。24 h 后,实验动物随机分为 5 组,空白组 ig 生理盐水 0.2 mL/10 g,阳性对照组 ig 环磷酰胺 10 g/kg,实验组各组分别 ig CPE 2.5、1.25、0.625 g/kg。连续 ig 10 d,记录小鼠死亡时间,计算生命延长率。

生命延长率=(实验组平均存活时间-空白组平均存活时间)/空白组平均存活时间×100%

1.9 统计学处理:所有实验均重复 6 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件对数据进行分析,计量资料统计采用 *t* 检验;相关性采用 Spearman 相关检验。

2 结果

2.1 CPE 可诱导 BGC-823 细胞发生凋亡的形态学和超微结构变化:CPE 作用后,倒置显微镜下可见 BGC-823 细胞发生凋亡的形态学变化,随药物质量浓度的增加,凋亡细胞数量也明显增加;而对照组细胞生长良好,细胞透明,颗粒较少,细胞核隐约可见。经 Giemsa 染色,CPE 作用过的细胞在光学显微镜下可见细胞质浓缩,细胞变圆,核着色不均匀,核物质边集成块状,部分核膜破裂,核物质外泄,并随药物质量浓度增加,形态学发生变化的细胞比例也显著增加。而对照组细胞呈菱形或梭形,形态饱满,较大,细胞核染色均匀,核仁清晰可见。透射电镜下(放大 5 000~20 000 倍)可见实验组细胞体积缩小,微绒毛减少,胞质浓缩,胞核局部向外呈锐角突起,核染色质高度浓缩,电子密度增高,边集于核膜下,有的核染色质呈半月形,有的出现核固缩和核碎裂,偶见凋亡小体。而对照组细胞未见细胞凋亡超微结构变化(图略)。

2.2 CPE 对 BGC-823 细胞凋亡率的影响:CPE 处理 48 h 的 BGC-823 细胞,经流式细胞仪分析,在 DNA 直方图的 G₁期峰前出现明显的细胞凋亡峰,随着 CPE 质量浓度的增加细胞凋亡率明显上升,呈剂量依赖关系。结果见表 2。

2.3 CPE 对 BGC-823 细胞周期的影响:经 CPE

处理 48 h 的 BGC-823 细胞的细胞周期发生明显变化(表 2),G₂/M 期细胞明显增多,G₀/G₁期细胞比率显著下降,多数细胞阻滞在 G₂/M 期。

2.4 CPE 诱导细胞凋亡可表现在 DNA 水平:细胞 DNA 经凝胶电泳后,对照组细胞 DNA 在加样孔附近有一条清晰条带,而经 CPE 处理的细胞 DNA 出现较典型的梯状电泳带(图 1)。

表 2 CPE 对 BGC-823 细胞凋亡率和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

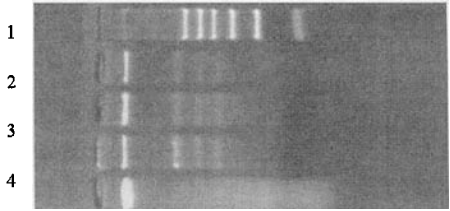
Table 2 Effect of CPE on apoptotic rate and cell cycles of BGC-823 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞周期/%			凋亡率/%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	—	55.6±7.2	23.1±5.6	21.3±5.7	0.89±0.25
CPE	250	48.5±6.4**	22.4±3.3	29.1±5.0**	18.9±0.71**
	125	50.1±3.1*	22.6±4.5	27.3±4.8*	16.7±0.55**
	62.5	53.9±4.5*	23.1±4.4	23.0±3.8*	7.6±0.62**

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

Marker



1~3-62.5、125、250 μg/mL CPE 组 4-对照组
1—3-62.5, 125, 250 μg/mL CPE group 4-control group

图 1 BGC-823 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of BGC-823 cells DNA

2.5 CPE 影响 BGC-823 细胞 bcl-2、bax 和 survivin mRNA 的表达:未经 CPE 作用的 BGC-823 细胞的 bcl-2、bax 和 survivin mRNA 校正值(bcl-2/β-actin、bax/β-actin 和 survivin/β-actin)分别为 0.722±0.335、0.224±0.120、0.649±0.320;而经 250 μg/mL CPE 作用后,BGC-823 细胞的 bcl-2、bax 和 survivin mRNA 校正值分别为 0.127±0.219、0.645±0.240、0.159±0.160。CPE 作用后细胞中的 bcl-2 和 survivin 基因表达水平明显低于对照组细胞(*P*<0.01),而 bax 基因表达水平明显高于对照组(*P*<0.01)。

2.6 CPE 对 BGC-823 细胞 bcl-2、bax 和 survivin 蛋白表达水平的影响:CPE 作用前后 BGC-823 细胞中均可见到棕黄色颗粒,但是 CPE 作用后细胞内 bcl-2 和 survivin 蛋白表达水平明显较对照组减少,而 bax 蛋白表达水平明显增加。结果见表 3。

2.7 CPE 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期的影响: CPE 可明显延长 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期, 结果见表 4。

表 3 CPE 对 BGC-823 细胞 bcl-2、bax 和 survivin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of CPE on protein expression of bcl-2, bax, and survivin in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	蛋白表达阳性细胞/%		
		bcl-2	bax	survivin
对照	—	88.32±9.28	29.83±7.54	93.54±7.65
CPE	250	43.55±6.77**	91.33±9.18**	48.17±8.56**

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

表 4 CPE 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of CPE on life span of S₁₈₀ bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	生存期/d	生命延长率/%
对照	—	16±3	—
CPE	2.5	27±2*	68.75±6.9*
	1.25	24±3*	50.00±5.8*
	0.625	18±5	12.50±2.3
环磷酰胺	10	25±3*	56.25±6.4*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

3 讨论

本实验结果表明, 香加皮提取物 (CPE) 作用于 BGC-823 细胞后, 可诱导细胞发生较典型的凋亡形态学变化及超微结构改变, 如胞体缩小, 胞质浓缩, 胞核向外呈锐角突起, 染色质浓缩, 密度增高, 边集于核膜下或呈新月形, 核碎裂以及凋亡小体形成等。流式细胞仪检测结果显示, CPE 作用过的细胞, 其 DNA 直方图上可见 G₁ 期峰前出现明显的细胞凋亡峰亚 G₁ 期峰, 可诱导凋亡, 凋亡率可达 18.9%。

肿瘤发生发展的基础是基因的改变, 如基因突变、失活以及过度表达或表达降低等, 进而引起肿瘤细胞周期变化。CPE 能明显抑制 BGC-823 细胞的周期转换, 使 G₂/M 期细胞明显增多。G₂/M 期阻滞, 使肿瘤细胞停止在 G₂ 期限限制点进行自身修复, 以决定是否能否克服 G₂ 期限限制点以继续完成细胞分裂, 还是停留在 G₂/M 期发生凋亡。药物作用过的肿瘤细胞在一定时间内无法克服 G₂/M 期阻滞时, 就会发生 G₂/M 期细胞凋亡^[6]。细胞凋亡时的主要生化特征是细胞核内限制性内切酶活化, 将 DNA 链在核小体之间切口, 使核内 DNA 断裂, 形成 180~200 bp 整倍数的核酸片段。本实验结果显示, CPE 作用后, BGC-823 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现典型的细胞凋亡梯形改变。

为探讨 CPE 诱导细胞凋亡的机制, 本实验研究

了 CPE 作用前后 BGC-823 细胞 bcl-2、bax 和 survivin 基因和蛋白表达的变化。bcl-2 蛋白是一种细胞内膜蛋白, 主要位于线粒体膜、内质网和核膜上^[7], 在多种肿瘤组织中表达, 具有抗凋亡作用^[8]。bax 基因编码一种相对分子质量为 21 000 的蛋白质, 属于 bcl-2 家族成员。该蛋白的组织表达与分布与 bcl-2 相似但作用相反, 可以促进细胞凋亡^[9]。其促细胞凋亡机制可能是直接激活死亡效应因子 caspases^[10]或通过改变细胞膜通透性, 引起细胞色素 C 释放并使某些离子和小分子物质通过细胞膜^[11,12]。survivin 基因是一个新近发现的细胞凋亡抑制基因^[13,14], 其编码的蛋白质是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的成员, 是一种胞浆蛋白。survivin 表达于胚胎和发育期的胎儿组织, 而在终末分化的成人组织中则表达减少乃至消失, 但在转化细胞系和许多人类肿瘤组织中再度表达^[15,16]。survivin 通过直接抑制 caspase-3 和 caspase-7, 使二者分离, 从而抑制 caspase 蛋白酶活性^[17]。本实验结果显示, CPE 作用后, BGC-823 细胞的 bcl-2 和 survivin mRNA 表达减少, 而 bax mRNA 表达增加; 免疫细胞化学结果显示, bcl-2 和 survivin 蛋白表达减少, bax 蛋白表达增加, 蛋白水平和基因水平结果相符。

前期实验研究了 CPE 对小鼠脾细胞 (作为正常细胞和免疫细胞) 的作用, 显示出 CPE 对脾细胞的增殖反应有促进作用, 表明 CPE 对正常细胞无抑制作用 (该结果在本实验中未显示, 将另文发表)。

为了进一步证实 CPE 的体内抗肿瘤作用, 本实验还研究了 CPE 对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期的影响。结果表明 CPE 可明显延长 S₁₈₀ 荷瘤小鼠生存期, 且具有剂量依赖性。高、中剂量组荷瘤小鼠生存期明显延长, 与对照组相比差异显著, 而低剂量组与对照相比差异不显著。

本实验结果提示, CPE 抑制肿瘤细胞 BGC-823 细胞增殖, 使其阻滞于 G₂/M 期; 可诱导肿瘤细胞凋亡, 其机制可能是通过下调 bcl 和 survivin 基因和蛋白的表达, 上调 bax 基因和蛋白表达来实现的, 这些作用的进一步研究, 有利于香加皮抗肿瘤作用的开发和利用。

References:

[1] Li H G. The state of *Periploca* plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(3): 150-155.
[2] Wen J K, Han M. *Theory and Technique of Medical Molecular Biology* (医学分子生物学理论与研究技术) [M]. Beijing: Science Press, 2002.

- [3] Maria M, Simona M, Daniela D R, *et al.* Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample [J]. *Biol Proced Online*, 2001, 3(1): 19-25.
- [4] Wang L, Zhang G M, Feng Z H. Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 24(12): 1235-1240.
- [5] Adel B, Akira Y, Yuji W, *et al.* Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22: 59-64.
- [6] Lock R B, Rose W E. Inhibition of p34cdcL kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 3761-3766.
- [7] Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, *et al.* Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma [J]. *Science*, 1985, 228(4706): 1440-1443.
- [8] Lam M, Dubyad G, Chen L, *et al.* Evidence that bcl-2 repress apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1994, 91: 6569.
- [9] Susin S A, Zamzami N, Castedo M, *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(4): 1331-1341.
- [10] Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [11] Rosse T, Olivier R, Monney L, *et al.* Bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [12] Jurgensmeier J M, Xie Z, Deveraux Q, *et al.* Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 251: 45-52.
- [13] Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, *et al.* Inhibition of bax channel-forming activity by bcl-2 [J]. *Science*, 1997, 277(5324): 370-372.
- [14] Fengzhi A G, Chu E Y. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396: 580-588.
- [15] Mahotka C, Wenzel M, Springer E, *et al.* Survivin-delta EX3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor surviving with different anti-apoptotic properties [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 6097-6103.
- [16] Amdrosini G, Adida C, Altieri D. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 917-921.
- [17] Kawasaki H, Alteieri D C, Lu C D, *et al.* Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 5071-5074.

Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism

LIU Jia-jun¹, LI Qiao², PAN Xiang-lin³, PENG Jun³, WU Xiang-yuan¹,

LI Ming-guan¹, LIN Dong-jun¹, LIN Qu¹, HUANG Ren-wei¹

(1. Department of Hematology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. Department of Biomedical Engineering, Medical College of Shandong University, Jinan 250012, China;

3. Department of Hematology and Oncology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanisms of oridonin inducing apoptosis on acute leukemia NB4 cells and its mechanism. **Methods** NB4 cells in culture medium *in vitro* were given with different concentrations (8, 16, 24, and 32 $\mu\text{mol/L}$) of oridonin. The inhibitory rate of the cells was measured by MTT assay, cell apoptotic rate was detected by flow cytometry (FCM), morphology of apoptosis was observed by Hoechst 33258 fluorescence staining, DNA fragmentation was assayed by agarose gel electrophoresis, caspase-3 expression was detected by Western blotting, and caspase-3 activity was assayed with colorimetric assay kit before and after apoptosis occurred. **Results** Oridonin (over 16 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit the growth of NB4 cells and cause apoptosis significantly, the suppression was both in a time- and dose-dependent manner. Marked changes of apoptosis including condensation of chromatin and nuclear fragmentation were observed very clearly by Hoechst 33258 fluorescence staining and a characteristic “ladder” of DNA fragments was elicited by agarose gel electrophoresis; Western blot analysis revealed that caspase-3 was activated by the loss of caspase-3 proenzyme (32 kDa) and the appearance of its 20 kDa subunit, and that along with the apoptotic process caspase-3 activity was increased concurrently. **Conclusion** Oridonin can induce apoptosis in NB4 cells via activation of caspase-3. These results will provide laborato-

收稿日期: 2005-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300312)

作者简介: 刘加军(1966—), 山东省日照市人, 主治医师, 讲师, 硕士生导师, 山东大学博士, 中山大学博士后, 主要从事血液肿瘤的分子生物学及细胞凋亡机制等研究。Tel: (020) 85516867-2227