

• 药理与临床 •

苦参碱诱导人肝癌细胞 BEL-7402 自吞噬性死亡

皇甫超申, 刘 彬, 马永超, 邓锦波

(河南大学医学院 神经生物学研究所, 河南 开封 475004)

摘要:目的 研究苦参碱诱导人肝癌 BEL-7402 细胞自吞噬和自吞噬性死亡作用。方法 体外培养人肝癌 BEL-7402 细胞,应用 MTT 法测定细胞增殖抑制率,流式细胞术测定细胞凋亡,自噬体标记物 LC3 免疫荧光定量检测自吞噬,透射电镜分析细胞自吞噬死亡超微结构改变。结果 苦参碱抑制细胞增殖呈质量浓度依赖性,作用 48 h 的 IC_{50} 值为 1.1 mg/mL;0.6~1.6 mg/mL 苦参碱作用 12 h 可诱导 BEL-7402 细胞凋亡逐渐增多,1.2 mg/mL 作用 12 h 时细胞凋亡率达 $(44.88 \pm 0.78)\%$;1.2 mg/mL 苦参碱持续作用可以诱导自吞噬阳性细胞逐渐增多,作用 12 h 时自吞噬阳性细胞达 $(63.16 \pm 0.29)\%$;超微结构显示细胞凋亡呈现自噬性细胞死亡特点。结论 苦参碱体外能诱导 BEL-7402 细胞自吞噬和自噬性死亡。

关键词:苦参碱;自噬;自噬性死亡;肝癌细胞 BEL-7402

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)09-1347-04

Autophagic death induced by matrine in BEL-7402 cells

HUANGFU Chao-shen, LIU Bin, MA Yong-chao, DENG Jin-bo

(Institute of Neurobiology, Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of matrine on inducing autophagy and autophagic death in BEL-7402 cells. **Methods** BEL-7402 cells were cultured in RPMI1640 alone or exposed to different concentration of matrine. Cell growth inhibition was assessed by MTT assay. Apoptosis was evaluated by flow cytometry. Autophagosome marker LC3 was examined by immunofluorescence microscopy. The ultrastructure change of cells was analyzed by transmission electron microscope. **Results** The cell proliferation was inhibited by matrine in a dose dependent manner. Its IC_{50} value was 1.1 mg/mL at 48 h. Treatment with 0.6–1.6 mg/mL matrine for 12 h induced apoptosis of BEL-7402 cells and the apoptosis rate reached $(44.88 \pm 0.78)\%$ at concentration of 1.2 mg/mL. The autophagy positive cells were greatly increased after 1.2 mg/mL matrine treated in BEL-7402 cells and the number of cells reached $(63.16 \pm 0.29)\%$. Morphological features of typical autophagic death were apparent in the cytoplasm at the ultrastructural level. **Conclusion** Matrine could induce autophagy and autophagic death of BEL-7402 cells *in vitro*.

Key words: matrine; autophagy; autophagic death; hepatoma cell BEL-7402

苦参碱是豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait., 苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 等中药的活性成分,是苦参类生物碱的代表,其诱导肿瘤细胞凋亡和分化作用受到极大关注^[1],目前苦参碱及多种苦参类生物碱已应用于临床肿瘤的治疗,但苦参碱诱导肿瘤细胞凋亡的形式尚未明了,特别是对肿瘤细胞自吞噬的影响尚未见报道,开展苦参碱对肿瘤细胞死亡形成的研究,有助于深入了解其药理作用。

细胞死亡形式除细胞坏死外,还有程序性细胞死亡。根据形态学可以把程序性细胞死亡分为凋亡和自吞噬死亡两类,凋亡清除单个细胞,而后由巨噬细胞通过胞吞作用清理细胞残骸。自吞噬则是一种胞质降解过程,负责清除包括细胞器在内的胞质组分,其标志性步骤是内质网来源的“分离膜”包裹住待降解部分形成自噬小体,最后通过非 caspase 依赖途径凋亡^[2],关于苦参碱诱导肝脏肿瘤细胞凋亡已有相关报道^[3],本研究进一步研究苦参碱诱导肝

收稿日期:2008-01-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670688);国家环保公益性行业科研专项经费项目(2008467115)

作者简介:皇甫超申(1964—),男,河南周口市人,副教授,医学硕士,硕士生导师,长期从事肝癌肿瘤生物学研究,负责国家环保公益性行业科研专项1项,在该领域发表论文12篇,出版专著2部,获省部级奖3项。

Tel: (0378) 3880585 E-mail: chaoshen6403@henu.edu.cn

癌细胞自吞噬性死亡及其与凋亡的关系,深入探讨其诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株:肝癌细胞株 BEL-7402 购自中国科学院医学科学研究所。生长在含 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置 5% CO₂、37 °C 恒温密闭式孵箱内培养传代。

1.2 药物及试剂:苦参碱注射液(商品名:斯巴德康) 10 g/L, 5 mL/只,批号 980304,购自广州明兴制药厂;RPMI-1640 购自 Gibco 公司;MTT 购自 Promego 公司,100 mg 溶于 20 mL PBS 滤过后避光保存。DMSO 购自 Solarbi 公司,Hoechst33258、兔抗人 MAP1-LC3-Ⅰ多克隆抗体、FITC 标记的羊抗兔 IgG、3-甲基腺嘌呤(3-MA) 购自 Sigma 公司。Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自北京生物技术有限公司。

2 方法

2.1 苦参碱对细胞增殖的影响:细胞用 0.25% 胰酶消化成细胞悬液,计数调整细胞数为 1×10^4 /mL,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L,重复 5 孔,于 37 °C、5% CO₂ 中培养 24 h 后换液,分别用不同质量浓度的苦参碱处理细胞,MTT 比色法测定分组:对照组,只加完全培养液;药物组,按照实验分组加入培养细胞悬液和终质量浓度分别为 0.6、0.8、1.2、1.6 mg/mL 苦参碱。设 5 个平行孔,继续培养细胞 48 h。每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,吸去培养液,每孔加入 DMSO 100 μ L,于振荡器上振摇,待蓝色晶体完全溶解后,在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度(A)值,实验重复 3 次。计算细胞生长抑制率[抑制率 = $1 - A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}} \times 100\%$]。根据药物效应中效方程式^[4]计算药物半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.2 实验分组:根据 MTT 结果得出的 IC₅₀值,实验分为对照组、苦参碱组、苦参碱+3-MA 组。对照组仅加入 RPMI-1640 细胞培养液;苦参碱组给予终质量浓度 1.2 mg/mL 的苦参碱;苦参碱+3-MA 组,3-MA 于苦参碱(终质量浓度为 1.2 mg/mL)处理前 1 h 加入,使 3-MA 终质量浓度为 4.5 μ g/mL,再与苦参碱共同作用不同时间。

2.3 细胞凋亡检测:采用 FITC-annexin V/PI 双染法。各组药物分别作用 6、9、12 h 收集细胞至 10 mL 的离心管中,每样本细胞数为 1×10^6 /mL, 1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。用孵育缓冲液洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,用 200 μ L 的

结合液重悬细胞,加入 Annexin V-FITC/PI 溶液 5 μ L 4 °C 下孵育 20 min,最后补 PBS 400 μ L,以流式细胞仪(FACS Calibur, BD 公司)检测细胞凋亡情况。每个样品检测 1×10^4 个细胞,实验重复 3 次,用 Cell Quest 软件进行细胞凋亡分析。

2.4 细胞自噬体免疫荧光检测:各组细胞接种于经多聚赖氨酸预处理的盖玻片于 6 孔板中,24 h 后加药处理,于不同时间点取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,固定的细胞用 PBS 洗两次后,加入 0.25% Triton-X100 冰上放置 5 min,然后加入 1% 牛血清白蛋白(BSA)处理 30 min,加入 BSA 稀释的兔抗人 MAP1-LC3-Ⅰ(1:100) 4 °C 孵育过夜,次日细胞用 PBS 洗 3 次后,加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1% BSA 以 1:20 比例稀释)室温下避光孵育 30 min,PBS 再次洗涤细胞后,双蒸水洗 2 次,阴性对照用 PBS 代替一抗,其余步骤相同,Olympus-BX51 荧光显微镜观察,实验重复 3 次,参考 Tamai 等方法^[5],细胞内出现两个以上亮染点为 LC3 阳性细胞,用阳性细胞占总细胞的百分比定量自噬细胞。

2.5 透射电镜标本的制备:各组经处理后 12 h 收获细胞,用 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸双重固定,乙醇丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,德国 LEICA ULTRACUT UCT 超薄切片机切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后,JEM 100CX-Ⅰ透射电镜观察,拍照,记录。

2.6 统计学分析:数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS12.0 软件包处理,进行单因素方差分析及两两比较 *t* 检验。

3 结果

3.1 苦参碱对 BEL-7402 细胞生长抑制作用:不同质量浓度苦参碱作用 48 h 对肝癌细胞 BEL-7402 生长具有抑制作用,抑制率与药物质量浓度正相关,呈剂量依赖关系,IC₅₀为 1.1 mg/mL。结果见表 1。

表 1 苦参碱对肝癌细胞 BEL-7402 生长的抑制作用

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Inhibition of matrine on growth of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

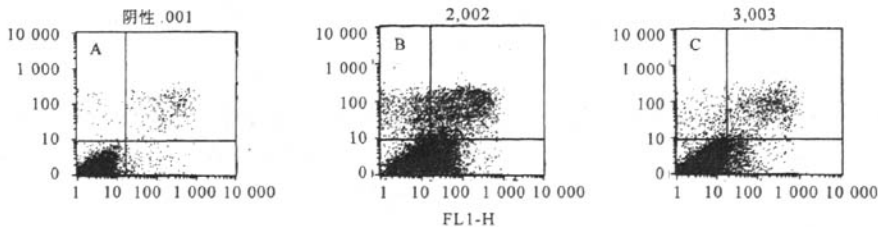
组别	ρ /(mg · mL ⁻¹)	A 值	抑制率/%
苦参碱	0.6	0.564 ± 0.009*	19.62
	0.8	0.430 ± 0.042*	36.07
	1.2	0.302 ± 0.030*	55.10
	1.6	0.286 ± 0.036*	57.64
对照	—	0.674 ± 0.026	—

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 苦参碱对 BEL-7402 细胞凋亡的影响:1.2 mg/mL 苦参碱作用 6、9、12 h,流式细胞术分析,与对照组相比,苦参碱组细胞凋亡率明显增加。苦参

碱+3-MA 组细胞凋亡率与苦参碱组相比明显下降。各组 12 h 时间点流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染细胞分布见图 1,各时间点定量结果见表 2。



A-对照组 B-苦参碱组 C-苦参碱+3-MA 组
A-control group B-matine group C-matine+3-MA group
图 1 苦参碱处理 12 h 对 BEL-7402 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of matrine on apoptosis of BEL-7402 cells treated for 12 h

表 2 苦参碱处理不同时间对 BEL-7402 细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of matrine treatment for different times on apoptosis of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	凋亡率/%		
		6 h	9 h	12 h
对照	—	2.35±0.37	2.97±0.22	3.11±0.04
苦参碱	1 200	37.29±0.16**	39.27±0.98**	44.88±0.78**
苦参碱+3-MA	1 200+4.5	34.21±0.73△	34.22±0.35△	35.63±0.48△

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与苦参碱组比较: △ $P<0.05$
** $P<0.01$ vs control group; △ $P<0.05$ vs matrine group

3.3 免疫荧光观察苦参碱对 BEL-7402 细胞自吞噬的影响:对照组细胞未加任何影响,只有极少量的 LC3 阳性颗粒位于个别细胞质内,呈亮绿色点状荧光,自吞噬阳性细胞数非常少。苦参碱组可见大部分细胞质内出现 LC3 阳性颗粒,亮绿色点状荧光密集,表明自吞噬体增多,自吞噬阳性细胞与对照组相比明显增多。自噬特异性抑制剂 3-MA 可明显抑制苦参碱诱导的 BEL-7402 细胞自吞噬,见表 3。

3.4 透射电镜观察苦参碱诱导的 BEL-7402 细胞自吞噬超微结构变化:正常 BEL-7402 细胞胞质丰富,核仁明显,自吞噬现象少见。苦参碱组可见许多

表 3 苦参碱对 BEL-7402 细胞自吞噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of matrine on autophagy of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	自噬阳性细胞/%		
		6 h	9 h	12 h
对照	—	2.17±0.16	2.74±0.13	2.61±0.23
苦参碱	1200	57.28±0.37**	61.12±0.43**	63.16±0.29**
苦参碱+3-MA	1200+4.5	31.24±0.46△	29.85±0.36△	29.17±0.26△

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与苦参碱组比较: △ $P<0.05$
** $P<0.01$ vs control group; △ $P<0.05$ vs matrine group

自噬体,自噬溶酶体和凋亡小体,自噬体由囊泡包裹线粒体、内质网等细胞器;自噬溶酶体较自噬体电子密度高,隐约可见遗留的线粒体嵴的痕迹;碎块的核被包裹形成凋亡小体,细胞退变表现为内质网核糖体脱颗粒,细胞器高尔基体解体,线粒体嵴扩张,粗面内质网扭曲,细胞浆空泡化,核染色质浓缩边集,附在核膜周边,以后细胞核固缩成均一的致密物,进而核碎裂,胞膜完整,微绒毛减少,可见细胞膜出泡的凋亡改变。在苦参碱 3-MA 组,细胞中自噬体明显减少,个别细胞胞浆空泡化,但仍可诱导细胞凋亡,凋亡细胞核皱缩变小,异染色质边集,可见凋亡小体,见图 2。



A-对照组 B-苦参碱 C-苦参碱+3-MA 组 标尺=1 μm
A-control group B-matine group C-matine+3-MA group Bar=1 μm

图 2 BEL-7402 细胞自吞噬和凋亡超微结构变化

Fig. 2 Ultrastructural changes of autophagy and apoptosis in BEL-7402 cells

4 讨论

研究发现,肿瘤细胞系中自吞噬的水平总比正常细胞中的低^[6],在哺乳动物癌症发生实验中,可以观察到自吞噬能力的下降^[7]。同时,自吞噬体基因 Beclin-1 异质性的断裂也可以增加小鼠肿瘤的发生^[8]。这意味着自吞噬能力的下降打破了细胞蛋白质合成与自噬降解长寿蛋白的平衡,促进了肿瘤的发生,反之,自噬能力的增加可防止肿瘤的发生。

从流式细胞术结果分析,苦参碱可以明显诱导 BEL-7402 人肝癌细胞凋亡,自噬特异性抑制剂 3-MA 可以抑制部分细胞凋亡,说明自吞噬参与了细胞凋亡。用早期自吞噬体特异性标志物微管结合蛋白轻链 LC3-Ⅰ^[9]免疫荧光检测发现,苦参碱在早期即可诱导细胞发生自吞噬,在作用 9 h 达到高峰,用 3-MA 与苦参碱共同作用可以明显抑制自吞噬的发生,透射电镜结果也证实了这一点。

从超微结构分析凋亡和自吞噬是目前公认的主观指标,结果表明,苦参碱可以诱导典型的细胞凋亡,即Ⅰ型凋亡,同时还可见到形态学表现为既有自噬又有凋亡的程序性细胞死亡特征,根据文献报道,这种死亡形式可以认为是自吞噬性死亡,即Ⅱ型凋亡^[10],本实验发现 3-MA 可明显抑制自噬,与此同时,凋亡也明显减少,提示自吞噬和凋亡之间有密切联系。有实验显示,在特定条件下,自吞噬体可以转化为凋亡小体,当细胞通过自吞噬无法清除损伤的细胞器就会转为凋亡,因为他们有共同的膜包裹机制,有共同的包含物^[11],从两种细胞死亡的膜包裹行为可以看出,主动的细胞死亡是一种保护性机制,防止了内容物溢出而产生有害作用,有利于凋亡小体以散离的形式解体,因此较出泡的形式更能节省能量。

实验中发现,应用 3-MA 虽可明显抑制自吞噬,但不能完全抑制凋亡发生,仍可以见到部分细胞发生凋亡。关于这种现象,有报道 3-MA 可以延迟凋亡但并不能阻断凋亡,不管诱导或抑制自吞噬,对凋亡的发生未产生明显的影响,相反也有报道一旦

自吞噬启动,即使应用凋亡抑制剂仍然发生自噬性的细胞死亡^[12],认为自吞噬与凋亡没有因果关系,自吞噬与凋亡是两条不同的程序性细胞死亡路径。本研究表明苦参碱既能够诱导自吞噬也可以诱导凋亡,结果一样都可以表现凋亡的形态改变。

综上所述,苦参碱通过唤起原本很低水平的自吞噬,诱导自吞噬性死亡是抑制肝癌细胞增殖的机制之一。这种自吞噬性死亡的信号传导途径尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 何於娟,蒋纪恺,张彦,等. 苦参碱诱导 K562 细胞分化的差异表达基因的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 224-228.
- [2] Christopher R, Arthur J T, Gupton G E, *et al.* Autophagic cell death, polyploidy and senescence induced in breast tumor cells by the substituted pyrrole JG-03-14, a novel microtubule poison [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(7): 981-991.
- [3] 张立明,郑传莉. 苦参碱诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的实验研究 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22(3): 128-129.
- [4] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [5] Tamai K, Tanaka N, Nara A, *et al.* Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res*, 2007, 360(4): 721-727.
- [6] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Internat J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [7] Broker L E, Kruyt F A, Giaccon G. Cell death independent of caspases: A review [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9): 3155-3162.
- [8] Qu X, Yu J, Bhagat G, *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [9] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2491-2502.
- [10] Yan Y Q, Zhang B, Wang L, *et al.* Induction of apoptosis and autophagic cell death by the vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c-Myc oncoprotein in HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(2): 280-289.
- [11] Yousefi S, Simon H U. Apoptosis regulation by autophagy gene 5 [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 63(3): 241-244.
- [12] Gozuacik D, Kimch I A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-2906.

苦参碱诱导人肝癌细胞BEL-7402自吞噬性死亡

作者：[皇甫超申](#)，[刘彬](#)，[马永超](#)，[邓锦波](#)，[HUANGFU Chao-shen](#)，[LIU Bin](#)，[MA Yong-chao](#)，[DENG Jin-bo](#)
作者单位：[河南大学医学院神经生物学研究所, 河南, 开封, 475004](#)
刊名：[中草药](#)[ISTIC](#)[PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(9)
被引用次数：2次

参考文献(12条)

1. 何於娟;蒋纪恺;张彦 [苦参碱诱导K562细胞分化的差异表达基因的研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2005(02)
2. Christopher R;Arthur J T;Gupton G E [Autophagic cell death, polyploidy and senescence induced in breast tumor cells by the substituted pyrrole JG-03-14, a novel microtubule poison](#)[外文期刊] 2007(07)
3. 张立明;郑传莉 [苦参碱诱导人肝癌细胞SMMC-7721凋亡的实验研究](#)[期刊论文]-[西北药学杂志](#) 2007(03)
4. 韩锐 [抗癌药物研究与实验技术](#) 1997
5. Tamai K;Tanaka N;Nara A [Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells](#)[外文期刊] 2007(04)
6. Tanida I;Ueno T;Kominami E [LC3 conjugation system in mammalian autophagy](#) 2004(12)
7. Broker L E;Kruyt F A;Giaceon G [Cell death independent of caspases: A review](#)[外文期刊] 2005(09)
8. Qu X;Yu J;Bhagat G [Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene](#)[外文期刊] 2003(12)
9. Mizushima N [Methods for monitoring autophagy](#)[外文期刊] 2004(12)
10. Yan Y Q;Zhang B;Wang L [Induction of apoptosis and autophagic cell death by the vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c-Myc oncoprotein in HepG2 cells](#)[外文期刊] 2007(02)
11. Yousefi S;Simon H U [Apoptosis regulation by autophagy gene 5](#)[外文期刊] 2007(03)
12. Gozuacik D;Kimch I [A Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism](#)[外文期刊] 2004(16)

本文读者也读过(1条)

1. [王国征](#). [孙明](#). [郭坤元](#). [余妙容](#). [周健](#). [李章球](#). [周雪云](#) [苦参碱对白血病KG1a细胞增殖及凋亡的影响](#)[期刊论文]-[山东医药](#)2008, 48(37)

引证文献(2条)

1. [郭斌](#). [申洪波](#). [李智](#) [苦参碱对小鼠Lewis肺癌的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(12)
2. [张靖](#). [杨柳](#). [高文远](#) [天然抗肿瘤药物研究进展](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010(6)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809024.aspx