

野西瓜总生物碱诱导 Hep G2 细胞凋亡与 $[Ca^{2+}]_i$ 变化的相关性

于 蕾^{1,2,3}, 莫 科^{2,3}, 王 巍^{2,3}, 崔荣田^{2,3}, 邹 翔^{1,2,3}, 季宇彬^{1,2,3 *}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 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; 3. 抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨野西瓜总生物碱 (*Capparis spinosa* alkaloid, CSA) 对人肝癌 Hep G2 细胞的杀伤和诱导凋亡的作用机制。方法 MTT 法研究 CSA 对人肝癌 Hep G2 的杀伤作用; 荧光显微镜观察 Hep G2 细胞形态; 流式细胞仪研究 CSA 对 Hep G2 细胞的凋亡诱导作用; 激光共聚焦显微镜检测 CSA 对 Hep G2 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。结果 CSA 对人肝癌 Hep G2 有明显细胞毒性作用, 并且有剂量依赖性, IC_{50} 为 142.82 $\mu\text{g/mL}$; Hep G2 细胞在 CSA 作用后出现特征性凋亡形态特征, 凋亡细胞比率明显高于自然凋亡率; 且阻断细胞由 S 期向 G₂ 期的移行, CSA 明显升高 Hep G2 细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 并与药物质量浓度呈量效正相关。结论 CSA 对人肝癌 Hep G2 有明显的杀伤和促凋亡作用, 其机制可能与 CSA 造成肿瘤细胞内钙离子超载有关。

关键词:野西瓜总生物碱; 人肝癌 Hep G2 细胞; 细胞凋亡; 钙超载

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0255-04

Relationship between apoptosis and $[Ca^{2+}]_i$ in HepG2 induced by *Capparis spinosa* alkaloid

YU Lei^{1,2,3}, MO Ke^{2,3}, WANG Wei^{2,3}, CUI Rong-tian^{2,3}, ZOU Xiang^{1,2,3}, JI Yu-bin^{1,2,3}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Research Center of Life and Environment Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

3. Engineering Research Center of Natural Anti-cancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China)

Abstract : Objective To study the mechanism of killing and apoptosis-inducing effects of *Capparis spinosa* alkaloid (CSA) on human hepatocarcinoma cell line Hep G2. **Methods** The killing effect of CSA on human hepatocarcinoma cell line Hep G2 was studied by MTT method. Morphological observation of Hep G2 cells was carried out by fluorescence microscope. **Results** The CSA had obvious cytotoxicity on the Hep G2 in a dose-dependent manner and its IC_{50} value was 142.82 $\mu\text{g/mL}$. The Hep G2 cells showed the characteristic morphologic changes of apoptosis by the function of CSA and the apoptosis percentage is higher than that of the natural one. The progress of cells cycle from S phase to G₂ phase had been blocked by CSA. The intracellular Ca^{2+} level had been increased by the function of CSA, which was positively related with drug concentration. **Conclusion** CSA has obviously killing and apoptosis-inducing effects on human hepatocarcinoma cell line Hep G2 and calcium overload might also be involved in these events.

Key words: *Capparis spinosa* L. alkaloid (CSA); human hepatocarcinoma cell line Hep G2; apoptosis; calcium overload

野西瓜 *Capparis spinosa* L. 为白花菜科山柑属植物, 味辛苦, 性温, 具有祛风除湿、止瘀消肿、止痛活血之功效^[1]。据文献报道, 野西瓜具有抗炎、抗高血压、降血糖、治疗痛风、化痰、驱虫、利尿、通便等功效^[2]。研究表明野西瓜多糖可诱导人肝癌 Hep G2 细胞凋亡^[3]。本课题组的前期研究成果和文献报道均显示野西瓜中含有生物碱类成分^[4,5], 研究证明较多种类的生物碱有抗癌功效, 并且已有报道, 与野西瓜同科属的台湾山柑中含有一种生物

碱, 对 6 种人肿瘤细胞系表现出广泛而显著的抗肿瘤活性^[5]。而且, 还发现野西瓜乙醇提取物的氯仿萃取部位对人肝癌细胞 Hep G2 具有较好的抗肿瘤活性, 所以本实验以人肝癌细胞 Hep G2 为研究对象, 对野西瓜总生物碱抑制 Hep G2 细胞增殖的分子机制进行深入研究。

1 材料

1.1 肿瘤细胞株: 人肝癌细胞株 Hep G2 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

* 收稿日期: 2008-08-10

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C200610)

作者简介: 于 蕾 (1979—), 女, 黑龙江省巴彦人, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为抗肿瘤药物研究。

Tel.: (0451) 84866922 13936277007 E-mail: yulei@hrbcu.edu.cn

*通讯作者 季宇彬

细胞培养室传代保种,于含10%小牛血清的RPMI 1640培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱培养。

1.2 药物及试剂:野西瓜果实购于新疆西瓜开发部;野西瓜总生物碱(*Capparis spinosa* alkaloid, CSA,质量分数66.08%)由哈尔滨商业大学药物研究所提供;MTT购自Sigma公司;硫化罗丹明(SRB)购自Sigma公司;碘化吡啶(PI)购自Sigma公司;二甲基亚砜(DMSO)购自北京化工厂;RPMI 1640培养基及胰酶购自Gibco公司;胎牛血清(FCS)购自Hyclone公司;Hoechst 33258购自北京化学试剂公司;Fluo-3/AM购自Molecular probe公司;罗丹明123(Rhodamine 123)购自北京碧云天公司;2',7'-二氯氢化荧光素二脂(DCFH-DA)购自北京碧云天公司。

1.3 仪器:WELLSCAN MK3型酶标仪(美国Bio-Rad公司);荧光显微镜(德国Leica公司);CLOUTER EPICS-XL流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司);激光共聚焦显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 MTT比色法测定CSA对Hep G2细胞的细胞毒性作用:将对数生长期的细胞配制成浓度为 2×10^5 个/mL的细胞悬液,每孔加100 μ L。24 h加入含不同质量浓度(10、50、100、150、200、300 μ g/mL)CSA及相应溶剂对照的新鲜培养基,每孔加100 μ L(DMSO终体积分数<0.5%),另设空白对照、阳性对照组(阿霉素,0.01、0.1、1、10 μ g/mL),每组设6个平行孔,给药后于37℃继续培养72 h后,弃上清,每孔加100 μ L新鲜配制的含0.5 mg/mL MTT的无血清培养基,继续培养4 h,弃上清液,每孔加200 μ L DMSO溶解,用微型振荡器振荡混匀,用MK3型酶标仪在参考波长490 nm,检测波长570 nm条件下测定吸光度(A)值,以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,用下列公式计算药物对肿瘤细胞的抑制率,并按中效方程计算IC₅₀。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均A值} - \text{给药组平均A值}}{\text{对照组平均A值}} \times 100\%$$

2.2 荧光显微镜观察Hep G2细胞形态:取指数生长长期的人肝癌细胞Hep G2,加入适量0.25%胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。用含10%胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 /mL的细胞悬液,于6孔板中每孔接种1 mL。将平板置于37℃、5%CO₂培养箱。24 h后加入不同质量浓度(75、150、300 μ g/mL)的CSA;阳性对照组加阿霉

素,其终质量浓度为5 μ g/mL;对照组加相同体积的培养液。48 h后细胞用胰酶消化,加PBS洗1遍,加入固定液[甲醇-冰醋酸(3:1)],置4℃冰箱固定10 min后,加入5 mg/L的荧光探针Hoechst 33258,置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育15 min,将孔中的盖玻片取出,盖在已滴好甘油的载玻片上,置于荧光倒置显微镜上观察细胞形态并拍照。

2.3 流式细胞仪(FCM)测定Hep G2细胞凋亡率:取指数生长长期人肝癌细胞Hep G2,胰酶消化后制备成浓度为 3×10^5 /mL的细胞悬液,于6孔板中每孔接种1 mL。将平板置于37℃、5%CO₂培养箱。24 h后加入不同质量浓度(75、150、300 μ g/mL)的CSA,阳性对照组加阿霉素,其终质量浓度为5 μ g/mL;对照组加相同体积的培养液,每组设3个复孔。72 h后细胞用胰酶消化,离心收集细胞,细胞沉淀用70%乙醇悬浮,在4℃冰箱固定12 h以上。固定后的细胞用PBS洗两遍并悬浮,加入PI染液(终质量浓度为50 μ g/mL),37℃避光温育30 min,300目尼龙网滤过,流式细胞仪上计数10 000个细胞,测定细胞各期DNA水平,分析细胞周期分布(激发波长488 nm,发射波长630 nm)。

2.4 激光共聚焦检测Hep G2细胞[Ca²⁺]_i:将6孔培养板内放上盖玻片,取对数生长期细胞接种于6孔培养板中,细胞浓度为 2×10^5 /mL,置于37℃、5%CO₂培养箱中,24 h后加入不同质量浓度(75、150、300 μ g/mL)的CSA;阳性对照组加阿霉素,其终质量浓度为2.5 μ g/mL;对照组加相同体积的培养液;药物作用24 h后吸出培养皿中的培养液,加胰酶消化,用无钙台氏液洗1遍;加入4 μ g/mL的Fluo-3/AM荧光探针200 μ L,37℃避光温育30 min;将孔中的盖玻片取出,盖在载玻片上,避光,激光共聚焦显微镜扫描观察。激发波长488 nm,发射波长540~570 nm。

2.5 统计学处理:所有数据用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对Hep G2细胞的细胞毒性作用:CSA对Hep G2细胞有明显的细胞毒性作用,药物的质量浓度-抑制率曲线呈S形,符合Logistic曲线,见图1。根据抑制率采用综合法计算IC₅₀,MTT结果显示CSA作用72 h对Hep G2细胞的IC₅₀值为142.82 μ g/mL,阿霉素的IC₅₀值为0.196 μ g/mL。

3.2 对Hep G2细胞凋亡形态的影响:荧光显微镜观察CSA(75、150、300 μ g/mL)作用48 h后肿瘤

细胞形态变化,从图 1 可见凋亡细胞特征性形态明显,细胞核固缩,染色体 DNA 广泛裂解断裂,并聚集成细小的凝聚块,核膜皱缩,崩解后包裹染色体片段弥散于细胞浆,可见凋亡小体。

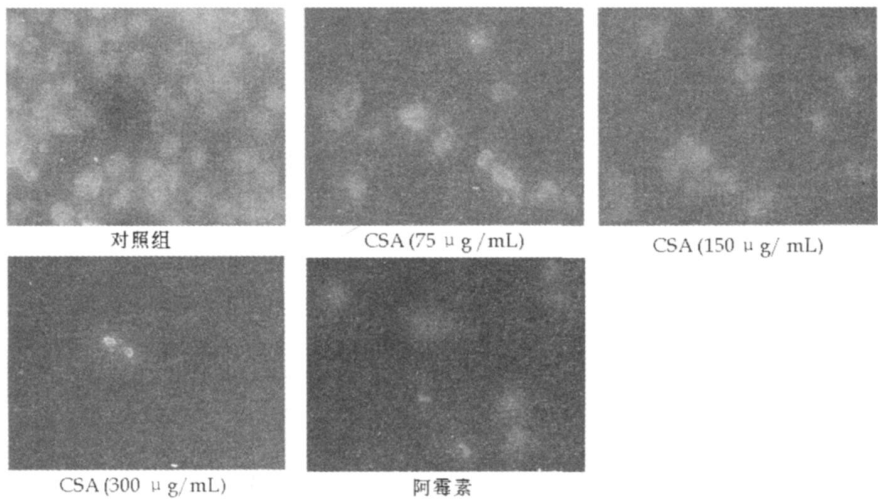


图 1 Hoechst 33258 荧光染色法测定 CSA 对 HepG2 诱导细胞凋亡作用
Fig. 1 Apoptosis of CSA on HepG2 by Hoechst 33258 fluorescence staining

3. 3 对 Hep G2 细胞凋亡率及细胞周期的影响:流式细胞仪测定 CSA 处理细胞 72 h 后,所有标本均显示“亚 G₁ 期”峰,提示细胞出现了凋亡,凋亡细胞比例明显高于自然凋亡率,阳性对照组(阿霉素 5 μg/mL),由于作用时间长,细胞均呈碎片,见表 1。CSA 各个剂量组均出现了 G₀/G₁ 期细胞比例显著下降, S 期细胞比例显著升高的趋势,在中剂量(150 μg/mL)组, G₂ 期细胞比例显著下降,并出现典型的凋亡峰。部分结果见图 2 和 3。

表 1 CSA 作用 72 h 后对 HepG2 细胞周期分布及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 1 Effect of CSA on cell cycle distribution and apoptosis of HepG2 cells for 72 h ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞周期分布/ %			凋亡率/ %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	-	64.507 $\pm$ 0.458	27.540 $\pm$ 0.090	7.953 $\pm$ 0.521	-
CSA	75	55.870 $\pm$ 1.913 *	34.475 $\pm$ 1.415 *	10.089 $\pm$ 0.013	17.98 $\pm$ 0.01 **
	150	42.169 $\pm$ 0.305 **	55.154 $\pm$ 3.066 **	2.671 $\pm$ 2.770 *	37.39 $\pm$ 1.09 **
	300	54.109 $\pm$ 0.054 **	35.900 $\pm$ 0.050 **	10.089 $\pm$ 0.013	25.69 $\pm$ 0.30 **
阿霉素	5	0	0	0	100.00 $\pm$ 0.16 **

与对照组比较: * P < 0. 05 ** P < 0. 01 表 2 同

* P < 0. 05 ** P < 0. 01 vs control group; Table 2 is same

3. 4 对 Hep G2 细胞 [Ca²⁺]_i 的影响:CSA 作用 24 h 后, Hep G2 细胞内 [Ca²⁺]_i 升高, CSA 在 150、300 μg/mL 质量浓度下可非常显著地升高 Hep G2 细胞 [Ca²⁺]_i (P < 0. 01), 并且随着 CSA 剂量的增加, [Ca²⁺]_i 增幅也相应地增大, 二者具有显著正相关性 (r = 0. 998 2)。结果见表 2。

4 讨论

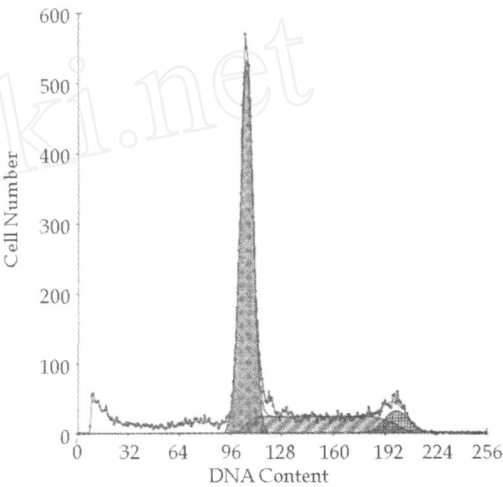


图 2 对照组流式图
Fig. 2 FCM Graph of control group

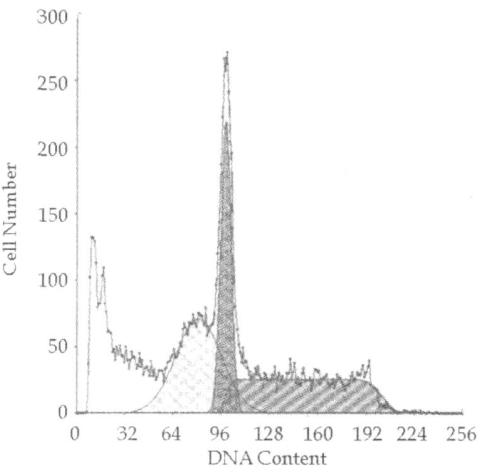


图 3 CSA 中剂量组 (150 μg/mL) 流式图
Fig. 3 FCM Graph of CSA 150 μg/mL group

表 2 CSA 作用 24 h 后对 HepG2 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of CSA on variation of $[Ca^{2+}]_i$
of HepG2 cells for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho/(\mu g \cdot mL^{-1})$	$[Ca^{2+}]_i$ (荧光强度)
对照	-	15.758 $\pm$ 2.339
阿霉素	2.5	148.012 $\pm$ 28.344 **
CSA	75	30.358 $\pm$ 2.987
	150	48.232 $\pm$ 2.826 **
	300	76.574 $\pm$ 7.543 **

形态学观察是检测细胞凋亡最可靠的方法^[6], 本实验采用 Hoechst 33258 荧光染色方法观察了被不同质量浓度 CSA 作用 48 h 后的肿瘤细胞形态上的变化。从结果可知随着药物质量浓度的加大, 镜下凋亡细胞比例逐渐增加, 凋亡细胞特征性形态明显, 染色体 DNA 断裂并聚集成细小的凝聚块, 并可见到凋亡小体, 说明细胞在药物作用下产生凋亡。

流式细胞仪检测结果表明 CSA 处理 HepG2 细胞 72 h 后, 所有标本均出现“亚 G_1 期”峰, 提示细胞出现了凋亡, 凋亡细胞比率明显高于自然凋亡率。本实验还研究了不同质量浓度 CSA 作用于 HepG2 细胞 72 h 对其细胞周期的影响。实验结果发现, 各个剂量组均出现了 G_0/G_1 期细胞比例显著下降, S 期细胞比例显著升高的趋势, 在中剂量 (150 $\mu g/mL$) 组, 出现了 G_2 期显著下降的现象, 提示 CSA 能够阻断细胞由 S 期向 G_2 期的移行, 导致细胞在 S 期大量堆积, 从而减少进入 G_2/M 期的细胞数目, 减少其有丝分裂和进入下一个细胞增殖周期, 并最终导致肿瘤细胞快速凋亡。

Ca^{2+} 与细胞凋亡的关系极其密切, 细胞钙信号是与细胞凋亡关系比较密切的信号分子^[7]。肿瘤细胞内 Ca^{2+} 浓度的持续性升高, 会通过不同途径诱导凋亡。本实验发现 CSA 在 150、300 $\mu g/mL$ 可非常显著地升高 HepG2 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ ($P < 0.01$), 并且随着药物剂量的增加, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增幅也相应地增大, 二者具有显著正相关性 ($r = 0.9982$), 说明细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 与药物质量浓度呈量效正相关。结果提示, CSA 能够引起线粒体内 Ca^{2+} 缓慢积累导致线粒体 Ca^{2+} 超载, 能启动高导电性 PT 孔开放, 线粒体膜电位下降, 线粒体膨胀, 外膜破裂, 诱导凋亡。

CSA 能够引起 HepG2 细胞凋亡, 并能够阻断细胞由 S 期向 G_2 期的移行, 导致细胞内钙超载是其引起细胞凋亡的机制之一, 进一步的机制还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] 朱江丽. 荨麻、老鼠瓜治风湿 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1996, 20: 24-25.
- [2] Rhizopoulou S, Psaras G K. Development and structure of drought-tolerant leaves of the mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. [J]. Ann Bot, 2003, 92: 377-383.
- [3] 季宇彬, 东方, 高世勇, 等. 野西瓜多糖诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1364-1367.
- [4] 美丽万, 阿不都热依木, 张晓玲. 正交设计法优选维药老鼠瓜生物碱提取工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 344-345.
- [5] 姜薇, 林文翰, 郭守东. 野西瓜果实的化学成分研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2005, 21(16): 684-689.
- [6] 刘镭, 邢达, 陈同生, 等. 利用荧光探针 DsRed-Mit 的细胞凋亡形态学研究 [J]. 激光生物学报, 2006, 15(3): 267-270.
- [7] 郭静, 蒲咏梅, 张东才. 钙离子信号与细胞凋亡 [J]. 生物物理学报, 2005, 1: 112-114.

海马不同提取物对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响

陈素红¹, 吕圭源^{2*}, 范景², 颜美秋², 叶合², 方哲², 汤小华¹, 吴海峰¹

(1. 温州医学院, 浙江 温州 325035; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 观察海马 4 个提取物(水、正丁醇、醋酸乙酯、石油醚提取物)对雌二醇致肾阳虚模型小鼠的影响, 认识其“甘、温、入肝、肾经”药性的现代科学内涵。方法 采用 ip 苯甲酸雌二醇造成小鼠肾阳虚模型, 对小鼠体征、肛温、抓力、游泳时间、自主活动、血清肌酐 (Cr) 及尿素 (UR)、血液学指标、睾丸和精囊腺指数进行测定。结果 海马 4 个提取物均能改善肾阳虚小鼠体征, 升高精囊腺指数和血液 RBC、Hb、PLT, 降低血清 UR 水平; 海马水提取物、石油醚提取物均能提高肾阳虚小鼠肛温、抓力、游泳时间、自主活动次数、睾丸指数、WBC、淋巴细胞 (LY)、单核细胞 (MO)、嗜中性粒细胞 (NE); 正丁醇提取物能提高小鼠自主活动次数、NE; 醋酸乙酯提取物能提高小鼠抓力、游泳时间。结论 海马的药效可作为改善肾阳虚证之腰膝酸软、性欲减退、畏寒肢冷、精神萎靡、阳虚水泛, 以

* 收稿日期: 2008-05-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划), 资助项目 (2007CB512603)

作者简介: 陈素红 (1973—), 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药药理及产品开发。

* 通讯作者 吕圭源 Tel: (0571) 86613601 E-mail: lv.gy@263.net