

边区运动路程、周边区运动时间、周边区运动时间比率增加,而周边区静息时间、周边区静息时间比率明显减少。因此本系统的这些指标和阳性药的特点有很高的重合性。

Mauricette 等^[8]研究表明,抑郁小鼠在新奇环境的活动增加,抗抑郁药西酞普兰能剂量依赖性增加小鼠在新活动箱内的活动量。本实验使用抗抑郁模式对 ICR 小鼠变换实验环境前后的研究表明,正常动物在测试箱变换后,也表现出对新测试环境的新奇性,运动时间与之前相比,显著增加($P < 0.01$)。

开心散由人参、茯苓、远志、石菖蒲 4 味药组成,始载于唐·孙思邈之《备急千金要方》,为益气养心、安神定志之代表方剂。应用开心散对本套系统进行验证,结果表明,开心散 4 g/kg 可明显减少小鼠的运动总时间、总距离、运动时间比率,增加静息总时间、静息时间比率;减少小鼠中央区运动时间、中央区运动距离、中央区时间比率;增加周边区运动时间比率、减少周边区静息时间比率。与对照组和阳性药安定组相比,开心散 4 g/kg 在不增加周边区运动时间的基础上,减少周边区静息时间,说明开心散比安定有更为全面的镇静基础。其机制可能与中药的整体综合调节优于化学药的单一靶点有关。从而体现出本套系统在中药药理学研究中的应用优越性,能更为全面的反应这种成分复杂、多组分综合作用、且作用多途径、多靶点的中药及中药复方对动物行

为学影响的细微变化。

由于计算机、信息和图像分析处理等多种技术集成用于动物自主活动研究,不仅实现了系统运行状态、动物的活动图像及活动轨迹的实时监测,使得整个实验过程更为客观准确,更主要的是使得提取的信息量大大增加,获得了运动总路程、运动总时间、平均速度、各区的相关指标及比率等。这些指标客观、敏感、细微,对温和的中药药效研究有重要的价值。

参考文献:

- [1] Murphy J M, Horton N J, Laird N M, *et al.* Anxiety and depression: a 40-year perspective on relationships regarding prevalence, distribution, and comorbidity [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2004, 109: 355-375.
- [2] 彭 博,刘新民,王立为. 安神中药药理研究方法综述 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1257-1260.
- [3] Salmi P, Ahlinius S. Sedative effects of the dopamine D1 receptor agonist A68930 on rat open-field behavior [J]. *Neuro-report*, 2001, 11(6): 1269-1272.
- [4] Lalonde R, Lewis T L, Trazielle C S. Transgenic mice expression the β APP695 SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination [J]. *Brain Res*, 2003, 977(1): 38-45.
- [5] 李仪奎. 小动物自发活动计算机实时分析系统 [J]. 中国药理学通报, 1990, 6(2): 127-128.
- [6] 刘新民,陈善广,王圣平,等. 计算机控制的避暗自动测试系统 [J]. 中国医学科学院学报, 1995, 17(6): 466-469.
- [7] 刘新民,王圣平,于澎仁,等. 小鼠跳台的计算机自动管理系统 [J]. 中国实验动物学报, 1994, 2(1): 20-25.
- [8] Mauricette B, Dekeyne A, Veiga S, *et al.* Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71: 667-680.

龙葵碱调控还原型谷胱甘肽和活性氧氧化还原体系损伤线粒体超微结构诱导 HepG2 细胞凋亡

高世勇^{1,2},徐丽丽^{1,2},季宇彬^{1,2}

- (1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站,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 探讨龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡与线粒体损伤的关系。方法 倒置显微镜观察细胞形态,Annexin V/PI 双染激光共聚焦扫描显微术检测细胞凋亡,流式细胞仪检测细胞凋亡率。透射电镜观察细胞线粒体超微结构,CDFH-DA 染色激光共聚焦扫描显微术检测活性氧(ROS)相对量,比色法检测还原型谷胱甘肽(GSH)量。结果 龙葵碱组 HepG2 细胞贴壁细胞数量减少,部分出现死亡。Annexin V/PI 双染激光共聚焦扫描显微镜下观察发现龙葵碱组细胞 Annexin V-FITC 高染,细胞膜呈绿色荧光;PI 低染,细胞核呈红色荧光,呈现明显的早期凋亡特征。流式细胞术分析 0.4、2、10 μ mol/L 龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后,早期凋亡率分别为 4.0%、

收稿日期:2009-06-05

基金项目:教育部博士点基金项目(200802400001);黑龙江省博士后基金资助项目;国家自然科学基金资助项目(30400591);哈尔滨市青年基金资助项目(2004AFQXJ035)

作者简介:高世勇(1975—),男,博士,副研究员,研究方向为肿瘤药理学。E-mail: sygao2002@163.com

8.5%、20.1%。透射电镜观察发现龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h, 细胞线粒体超微结构出现肿胀, 嵴排列紊乱、嵴消失, 重度空泡样变性等变化; 细胞内 ROS 水平升高, GSH 的水平降低。结论 龙葵碱通过降低 HepG2 细胞内 GSH 量, 使 ROS 不能被及时清除而损伤线粒体结构, 导致 HepG2 细胞凋亡。

关键词: 龙葵碱; 细胞凋亡; 线粒体; 活性氧 (ROS); 还原型谷胱甘肽 (GSH)

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)11-1779-06

Solanine on apoptosis by regulating glutathione hormone and reactive oxygen species to damage mitochondrial structure in HepG2 cell

GAO Shi-yong^{1,2}, XU Li-li^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

(1. Postdoctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Center for Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. MOE Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To study the relationship between apoptosis and mitochondria damage. **Methods** The cell morphology was observed under inverted microscope. Staining with Annexin V/PI, the cell apoptosis was observed by laser confocal scan microscope and the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. Transmission electron microscope (TEM) was used to observe mitochondrial structure. ROS was determined by confocal. Colorimetry assay was adopted to determine the reduced glutathione hormone (GSH). **Results** The cell number in solanine groups was fewer than that in control group, and some died. Staining with Annexin V/PI, Annexin V-FITC was high fluorescent in solanine groups, which is obviously apoptosis features. The early apoptosis rate is 4.0%, 8.5%, and 20.1% inducing by 0.4, 2, and 10 mol/L solanine for 24 h, respectively. Swelling mitochondria, absence of mitochondria crests and vesicles were found in mitochondria of HepG2 cell treated by solanine for 24 h. The ROS levels increased and GSH level decreased in solanine groups. **Conclusion** Solanine could induce the apoptosis and the effect may be attributed to decrease GSH, which interrupts the immediate remove of ROS so as to damage the mitochondria.

Key words: solanine; apoptosis; mitochondria; reactive oxygen species (ROS); reduced glutathione hormone (GSH)

龙葵碱 (solanine) 别名茄碱, 主要存在于茄科植物马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 的块茎及龙葵 *Solanum nigrum* Linn. 的全草中。在马铃薯的绿色果皮及芽中的量较高, 毒性较大, 是引起中毒的主要成分。龙葵全草及未成熟的果实中含澳洲茄边碱、 β -澳洲茄边碱、澳洲茄碱、茄微碱及茄达碱等多种生物碱^[1]。本课题组前期研究发现龙葵碱体内能够延长 H_{22} 荷瘤小鼠的生存时间^[2], 体外研究发现龙葵碱对人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒作用较强^[3,4]。机制研究表明龙葵碱通过诱导肿瘤细胞凋亡途径达到抗人肝癌 HepG2 的作用^[5,6], 并且与细胞内 $[Ca^{2+}]$ 和膜电位等线粒体途径有关^[7]。本实验主要是在前期工作的基础上, 进一步研究龙葵碱通过线粒体途径诱导 HepG2 细胞凋亡^[8]的过程中对线粒体本身及相关因素的影响。

1 材料与仪器

1.1 药品及试剂: 龙葵碱, 质量分数 99%, 由黑龙江省药品检验所提供; RPMI 1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有

限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、活性氧 (ROS) 检测试剂盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究。

1.2 肿瘤细胞株: 人肝癌细胞株 HepG2 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection), 黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所保种提供。

1.3 仪器: CO-150 型二氧化碳培养箱, 美国 NBS 公司; SW-CJ-2F 型超净工作台, 苏净集团苏州净化设备厂; SP2 型激光共聚焦扫描显微镜, 德国 Leica 公司; CKX-41-32 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; H-600 型透射电镜, 日本日立公司; EPICS XL-MCL EPICS XL-MCL 流式细胞仪, 美国 Beckman-Coulter 公司; 6R 型台式冷冻离心机, 美国 Beckman-Coulter 公司。

2 方法

2.1 细胞培养及给药: HepG2 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 5% CO_2 、37℃ 条件下培养, 3~4 d 传代 1 次。当细胞生长状态稳定, 呈对数生长时, 0.25% 胰酶消化细胞后用含 10%

胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$, 于 6 孔板中每孔接种 1 mL。将平板置于 37°C 、5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养。24 h 后加入不同浓度的龙葵碱, 终浓度分别 10、2、0.4 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照组加入喜树碱, 其终浓度为 1.15 $\mu\text{mol/L}$, 阴性对照组加入相同体积的 RPMI 1640 培养液。二氧化碳培养箱中培养 24 h。

2.2 倒置显微镜观察龙葵碱对 HepG2 细胞形态的影响: 细胞培养 24 h 后, 置于倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.3 Annexin V-FITC/PI 染色激光共聚焦扫描术观察龙葵碱对 HepG2 细胞凋亡的影响: 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒方法操作。步骤如下: 细胞培养 24 h 后收集细胞, 用 PBS 重悬细胞并计数。取 1×10^5 个重悬的细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞。然后加入 5 μL Annexin V-FITC 染液, 轻轻混匀后, 室温避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞。加入 10 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 100 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞, 激光共聚焦扫描显微镜下观察。

2.4 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术测定早期细胞凋亡率: 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒方法操作。步骤如下: 细胞培养 24 h 后收集细胞, 用 PBS 重悬细胞并计数。取 1×10^5 个重悬的细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀后, 室温避光孵育 10 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞, 加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 100 μL Annexin V-FITC 结合液 (1 $\times$) 轻轻重悬细胞, 300 目尼龙网滤过后, 流式细胞仪测定凋亡细胞率, 激发波长 488 nm, 检测细胞数为 10 000 个。

2.5 龙葵碱对 HepG2 细胞线粒体超微结构的影响: 培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗 3 遍, 预冷的 2% 戊二醛 4°C 固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1.5 h, 常规系列丙酮脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染, 透射电镜观察。

2.6 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞内 ROS 的影

响: 按 ROS 检测试剂盒方法操作, 具体如下: 细胞培养 24 h 后, 调整各组细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 各组取细胞悬液 1 mL, 无血清 RPMI 1640 培养液悬浮细胞, 加入 CDFH-DA 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 37°C 避光孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次, 激光共聚焦扫描显微术检测荧光强度 (FI), 激发波长 485 nm, 发射波长 (530 ± 20) nm。

2.7 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞内 GSH 的影响: 按 GSH 检测试剂盒方法操作, 具体如下: 细胞培养 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入细胞沉淀体积 3 倍量的蛋白去除试剂 S 溶液, 然后利用液氮和 37°C 水浴对样品进行两次快速的冻融。 4°C 放置 5 min 后, 4°C 、10 000 $\times g$ 离心 10 min。取 5 μL 上清液考马斯亮蓝法测定蛋白的量, 另取一定量上清用于总谷胱甘肽的测定。根据试剂盒说明配制 GSH 检测液, 分别加入样品和标准品中, 25 min 后于酶标仪测定 A_{405} , 并绘制标准曲线。对照标准曲线计算出样品总谷胱甘肽的量。

2.8 数据处理: 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理, 样本采用 t 检验。

3 结果

3.1 倒置显微镜观察龙葵碱对 HepG2 细胞形态的影响: 龙葵碱作用 24 h 后, HepG2 细胞形态结果见图 1。细胞的贴壁能力减弱, 由贴壁生长而逐渐脱落, 悬浮于培养液中, 贴壁细胞数量减少, 悬浮细胞增多, 细胞体积缩小, 变圆, 部分出现死亡。且随着浓度的增加, 贴壁细胞数量相应减少、体积缩小, 变圆的现象越明显, 呈现一定的剂量依赖效应。阳性对照组细胞形态也发生上述形态学改变。阴性对照组细胞贴壁生长良好, 细胞轮廓清晰、饱满, 形态规则, 生长致密、旺盛, 且部分可见伪足, 几乎无脱落。

3.2 Annexin V-FITC/PI 染色激光共聚焦扫描显微术检测细胞凋亡: 采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法染色, 激光共聚焦扫描显微镜观察, 正常活细胞 Annexin V 和 PI 均为低染; 细胞凋亡早期的细胞膜完整, Annexin V-FITC 高染, 细胞膜呈绿色荧光, PI 低染; 凋亡中, 晚期细胞则 Annexin V-FITC 和 PI 均高染, 细胞膜呈绿色荧光, 细胞核呈红色荧光。实验结果见图 2, 不同浓度龙葵碱作用 24 h 后, 部分细胞 Annexin V-FITC 高染, 细胞膜呈绿色荧光, 结果提示, 龙葵碱作用 24 h 后 PS 外翻, Annexin V-FITC 高染为典型的细胞凋亡形态。阳性对照组也明显凋亡形态。阴性对照组的 HepG2 细胞 Annexin V-FITC 和 PI 均为低染, 未见凋亡形态的细胞。

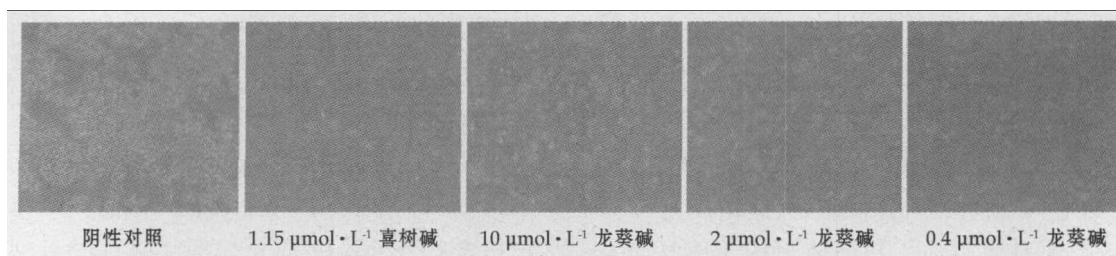


图 1 倒置显微镜观察 HepG2 细胞形态

Fig. 1 HepG2 Cell morphology observed by inverted microscope

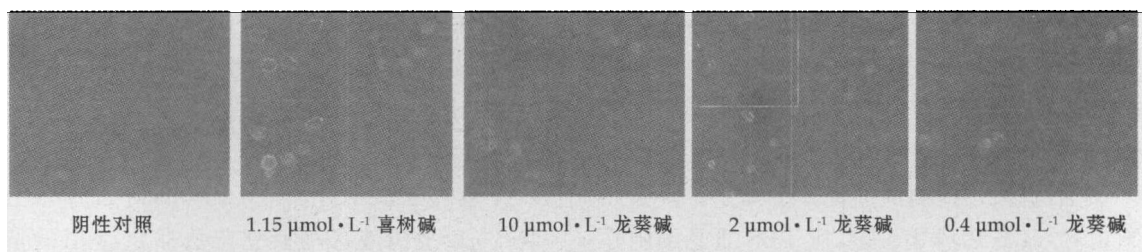


图 2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测龙葵碱对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of solanine on apoptosis of HepG2 cell analyzed by Annexin V-FITC/PI staining assay

3.3 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞早期凋亡率:用 Annexin V-FITC 和 PI 染色后,结果见图 3。正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色(如图左下角);凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,PI 染色呈阴性(如图右下角);坏死细胞和凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色(如图右上角)。0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱作用于 HepG2 细

胞 24 h 早期凋亡率分别为 4.0%、8.5%、20.1%,且呈一定的剂量依赖性。

3.4 龙葵碱对 HepG2 细胞线粒体超微结构的影响:电镜观察结果显示,阴性对照组细胞线粒体丰富、嵴、膜清晰。药物作用 HepG2 细胞 24 h 后,龙葵碱组及阳性对照组细胞线粒体均出现肿胀,部分线粒体嵴排列紊乱、部分嵴消失,部分线粒体出现重度空泡样变性,见图 4。

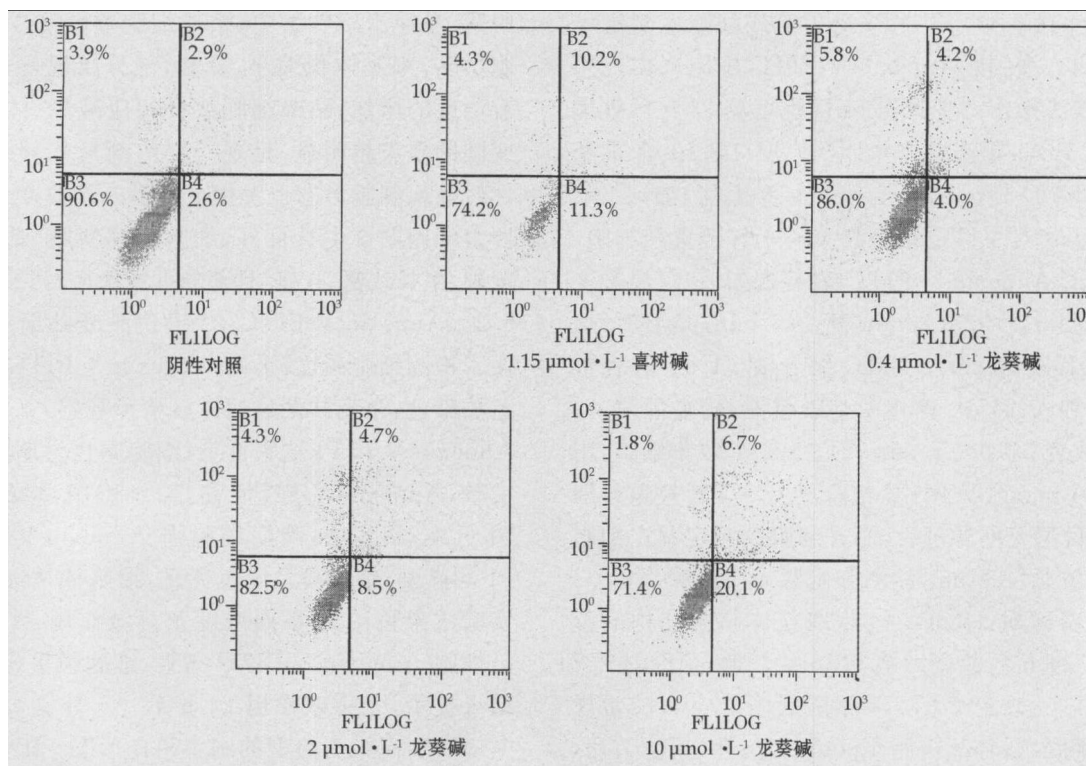


图 3 流式细胞术检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的早期凋亡率

Fig. 3 Effect of solanine on apoptosis rate analyzed by flow cytometer

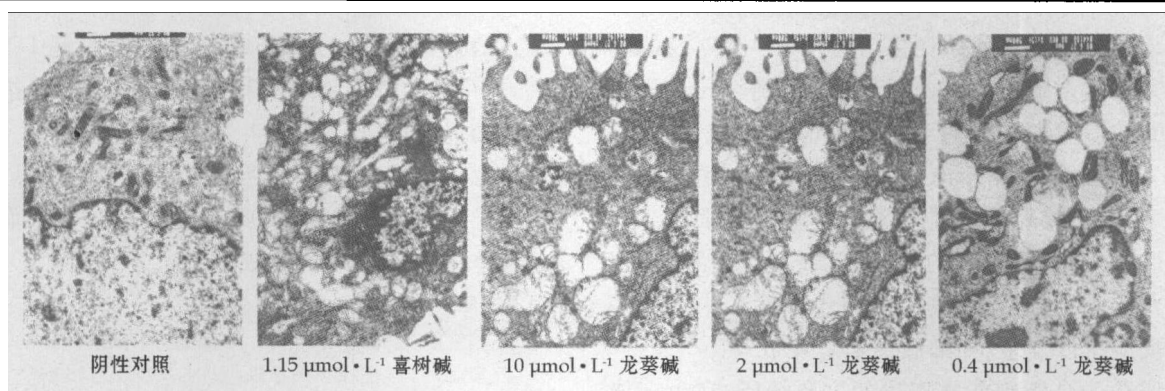


图 4 龙葵碱对 HepG2 细胞线粒体超微结构的影响

Fig. 4 Effect of solanine on mitochondrial ultrastructure in HepG2 cell

3.5 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞内 ROS 的影响:龙葵碱作用人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,龙葵碱各组 ROS 显著高于阴性对照组,10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱组与阴性对照组比较统计学差异非常显著 ($P < 0.01$),2 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱组与阴性对照组比较统计学差异显著 ($P < 0.05$)。3 个剂量组升高 ROS 的强度具一定的剂量依赖性,随着龙葵碱剂量的增大而升高。结果见表 1 和图 5。

表 1 龙葵碱对 HepG2 细胞内 ROS 量的影响

Table 1 Effect of solanine on ROS content in HepG2 cell

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞数	ROS (FI)
阴性对照	—	20	6.55 $\pm$ 0.43
喜树碱	1.15	20	34.33 $\pm$ 0.41**
龙葵碱	0.4	20	11.16 $\pm$ 0.92
	2	20	18.28 $\pm$ 0.43*
	10	20	24.67 $\pm$ 0.47**

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

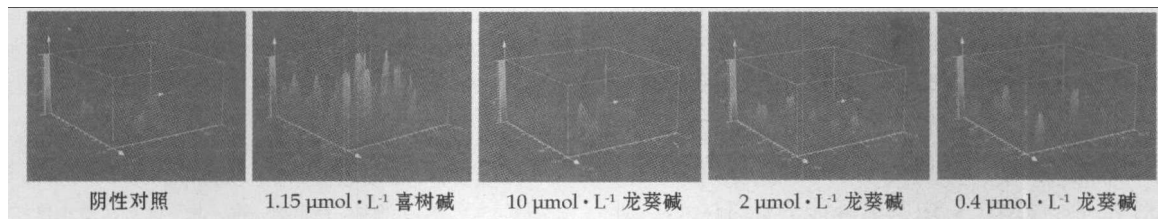


图 5 龙葵碱对 HepG2 细胞内 ROS 荧光强度的影响

Fig. 5 Effect of solanine on ROS fluorescence in HepG2 cell

3.6 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞内 GSH 量的影响:龙葵碱作用肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,细胞内 GSH 量显著低于阴性对照组,0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱组与阴性对照组比较统计学差异非常显著 ($P < 0.01$),3 个剂量组降低 GSH 的强度具一定的剂量依赖性,GSH 水平随龙葵碱剂量的增大而降低。结果见表 2。

表 2 龙葵碱对 HepG2 细胞内 GSH 量的影响

Table 2 Effect of solanine on GSH content in HepG2 cell

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH/($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
阴性对照	—	8.52 $\pm$ 3.42
喜树碱	1.15	4.14 $\pm$ 2.31**
龙葵碱	0.4	6.70 $\pm$ 4.12**
	2	5.56 $\pm$ 3.57**
	10	3.80 $\pm$ 4.64**

与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs negative control group

4 讨论

本课题组对龙葵碱抗肿瘤作用及机制进行了很

多研究^[9,10],发现龙葵碱对消化道肿瘤的部分肿瘤细胞株有很好的抑制作用,机制研究表明龙葵碱对人肝癌 HepG2 的细胞毒作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[5],并且诱导细胞凋亡的途径为线粒体途径^[7]。那么龙葵碱在通过线粒体途径诱导凋亡的过程中对线粒体本身有何影响,本实验在此基础上,进一步研究了龙葵碱对线粒体本身及相关因素的影响。

首先采用 Annexin V/PI 双染法对细胞进行染色,然后采用激光共聚焦扫描显微术检测龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的情况,此为一个定性实验,发现 0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱能够诱导细胞凋亡,同时采用流式细胞术检测细胞凋亡率,即对诱导凋亡的情况进行定量,发现 0.4、2、10 $\mu\text{mol/L}$ 龙葵碱作用于 HepG2 细胞 24 h 早期凋亡率分别为 4.0%、8.5%、20.1%。同时结合光学显微镜下龙葵碱作用后细胞形态学的变化进一步确认了龙葵碱能够诱导 HepG2 细胞凋亡。

由于线粒体在细胞凋亡中起关键作用,在凋亡

早期出现结构和功能的变化。因此在以上实验的基础上采用透射电镜观察龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞线粒体超微结构的变化,发现龙葵碱能够使 HepG2 细胞线粒体结构和功能发生改变,主要表现为出现肿胀,线粒体嵴排列紊乱,嵴消失,重度空泡样变性等,线粒体形态的变化是线粒体途径诱导细胞凋亡的基础,形态学的改变使得本途径中的某些生化反应得以发生,如细胞色素 C 释放等。

线粒体是细胞能量产生的主要场所,在生产能量的过程中不可避免地产生大量的自由基,而 ROS^[11]是其中的一个重要代表,即线粒体是 ROS 产生的主要场所,而 GSH 是线粒体中消除 ROS 的抗氧化防御体系的一种主要物质^[12]。一定量的 ROS 可以通过有效的抗氧化防御机制—GSH 等消除,两者之间维持一定的平衡,则线粒体的生理功能得以正常的发挥,但当 ROS 产生过多或细胞抗氧化能力下降,生理平衡遭到破坏,则线粒体就会受到 ROS 的氧化攻击,造成线粒体损伤^[13]。因此接下来深入观察龙葵碱对线粒体的损伤是否与破坏这种平衡有一定的关系。主要观察了龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后对细胞内 ROS 水平及 GSH 水平的变化情况。采用激光共聚焦扫描显微镜技术检测不同浓度龙葵碱作用 HepG2 细胞 24 h 后对细胞内 ROS 水平的影响,发现龙葵碱能升高 HepG2 细胞内 ROS 的水平,高剂量与阴性对照组比较有非常显著性的差异 ($P < 0.01$),且呈一定的剂量依赖关系。比色法检测不同浓度龙葵碱作用 24 h 后对 HepG2 细胞内 GSH 水平的影响,发现龙葵碱组 HepG2 细胞内 GSH 水平明显降低。本实验结果显示,龙葵碱通过降低 GSH 酶的量,使原有的平衡破坏,导致 ROS 水平升高,当 ROS 产生过多或 GSH 细胞抗氧化能力下降,线粒体又会受到 ROS 的氧化攻击,引起线粒体发生膨胀,ROS 通过氧化线粒体内膜、线粒体 DNA 及重要的蛋白质,造成线粒体电子传递链功能障碍、膜电位下降、线粒体膜通透性转换孔开放和细胞色素 C 等凋亡相关因子的释放,释放到细胞浆的细胞色素 C 在 dATP 存在的条件下能与凋亡相关因子 1 (Apaf-1) 结合,使其形成多聚体,并促使 caspase-9 与其结合形成凋亡小体,caspase-9 被激活,激活后的 caspase-9 能激活其他的 caspase,如 caspase-3 等;caspase-3 参与细胞

凋亡的执行,激活的 caspase-3 蛋白能引起 DNA 断裂,核染色质浓缩,最终引起细胞凋亡,这些指标的变化与以往的研究一致^[14,15]。

综上所述,龙葵碱诱导细胞凋亡与其降低 GSH 活性导致肿瘤细胞内 ROS 不能被及时清除而破坏线粒体结构有着直接的关系。

参考文献:

- [1] 季宇彬,王胜惠,高世勇. 龙葵活性成分的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2004, 20(6): 638-641.
- [2] 季宇彬,王胜惠,高世勇,等. 龙葵碱对 H₂O₂ 肿瘤细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 79-81.
- [3] Ji Y B, Gao S Y, Ji C F, et al. Induction of apoptosis in HepG2 cells by solanine and Bcl-2 protein [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 115(2): 194-202.
- [4] 高世勇,季宇彬. 龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞 N-乙酰基转移酶活性的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1688-1691.
- [5] 高世勇,邹翔,汲晨峰,等. 龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的观察 [J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2007, 23(6): 644-650.
- [6] 高世勇,徐丽丽,季宇彬. 龙葵碱调控 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达及 caspase-3 活性诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1607-1612.
- [7] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cell and [Ca²⁺]_i in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 21(6): 3359-3367.
- [8] 季宇彬,高世勇. 龙葵碱诱导 HepG2 细胞凋亡的线粒体通路研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(4): 272-275.
- [9] 季宇彬,万梅绪,高世勇,等. 龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 412-414.
- [10] 季宇彬,万梅绪,高世勇,等. 龙葵碱对 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1052-1053.
- [11] Chen T, Wong Y S. Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(17): 2763-2775.
- [12] Bragado P, Armesilla A, Silva A, et al. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 alpha MAPK activation through ROS generation [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(9): 1733-1742.
- [13] Huang J, Wu L, Tashiro S, et al. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107(4): 370-379.
- [14] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cell and [Ca²⁺]_i in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 21(6): 3359-3367.
- [15] 高世勇,王秋娟,季宇彬. 龙葵碱对 HepG2 细胞内 caspase-3 及 Bcl-2 蛋白含量的影响 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(3): 224-229.