

虎皮楠生物碱 daphnioldhanin E 诱导 HepG2 细胞类凋亡研究

王 蓓, 戎瑞雪, 王 海, 王永丽, 张雷芳, 曹志然*

河北大学基础医学院, 河北 保定 071000

摘要: 目的 研究虎皮楠生物碱 daphnioldhanin E 诱导人肝癌 HepG2 细胞死亡的机制。方法 HepG2 细胞用 daphnioldhanin E (10、30 $\mu\text{g/mL}$) 处理后, 瑞姬氏染色法观察细胞形态变化, DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡情况, MTT 法检测细胞凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 对 daphnioldhanin E 抗癌活性的影响, 分光光度法检测 caspase-3 酶活性的变化。结果 瑞姬氏染色显示, HepG2 细胞经 daphnioldhanin E 处理 48 h 后, 细胞体积增大, 细胞核清晰可见, 周围出现大量的胞浆空泡, 但细胞膜仍保持完整; DNA 琼脂糖凝胶电泳结果可见大量 50~200 bp 的片段; MTT 法检测结果显示 Z-VAD-FMK 不能阻断 daphnioldhanin E 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用; 分光光度法测定显示, daphnioldhanin E 给药组与对照组 HepG2 细胞 caspase-3 酶活性无明显变化, 表明 daphnioldhanin E 对 HepG2 细胞的杀伤作用与 caspase-3 激活通路无关。结论 Daphnioldhanin E 可能通过类凋亡方式明显诱导 HepG2 细胞程序性死亡, 该过程不依赖于 caspase-3 途径。

关键词: 虎皮楠; daphnioldhanin E; HepG2 细胞; 类凋亡; caspase-3

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1789-05

Paraptosis in HepG2 cells induced by daphnioldhanin E from *Daphniphyllum oldhami*

WANG Bei, RONG Rui-xue, WANG Hai, WANG Yong-li, ZHANG Lei-fang, CAO Zhi-ran

College of Basic Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of HepG2 cell death induced by daphnioldhanin E from *Daphniphyllum oldhami*. **Methods** The HepG2 cells were treated with daphnioldhanin E (10 and 30 $\mu\text{g/mL}$), and the morphologic changes of cells were observed by Wright-Giemsa staining. DNA agarose gel electrophoresis, MTT assay, and spectrophotometric method were conducted to detect cell apoptosis, effect of Z-VAD-FMK on anticancer activity of daphnioldhanin E, and activity changes of caspase-3, respectively. **Results** Wright-Giemsa staining demonstrated that the volume of HepG2 cell increased after 48 h treatment with daphnioldhanin E, the nucleus was clearly visible and surrounded by a large number of cytoplasmic vacuoles, while the cell membranes remained intact. DNA ladder electrophoresis resulted in a large number of small fragments of 50—200 bp; MTT assay displayed that Z-VAD-FMK could not block the inhibition of daphnioldhanin E on the proliferation of HepG2 cells; Spectrophotometric results demonstrated that caspase-3 activity of HepG2 cells had no obvious change compared with the control group, which indicated that the lethal effect of daphnioldhanin E on HepG2 cells was unrelated to caspase-3 activation pathway. **Conclusion** Daphnioldhanin E could induce the programmed death of HepG2 cells by paraptosis and the process is not dependent on the caspase-3 pathway.

Key words: *Daphniphyllum oldhami* (Hemsl.) Rosenth.; daphnioldhanin E; HepG2 cell; paraptosis; caspase-3

虎皮楠科 (Daphniphyllaceae) 只有虎皮楠属 *Daphniphyllum* Bl. 1 个属, 其主要特征成分是生物碱类, 这类化合物因具有多变的骨架和复杂的多环结构而备受关注, 从该科植物中分离得到的生物碱已超过 120 种, 包括牛耳枫碱、虎皮楠碱和虎皮楠宁等^[1]。研究表明, 虎皮楠 *Daphniphyllum oldhami* (Hemsl.) Rosenth. 中某些生物碱对肿瘤细胞有抑制作用^[2-3]。本课题组曾采用多种色谱方法

从虎皮楠茎叶乙醇提取物中分离得到 8 种生物碱类成分, 并对其化学结构和抗肿瘤活性进行了系统研究, 结果表明 daphnioldhanin E 对人肝癌 HepG2 细胞增殖具有良好的抑制作用^[4]。本实验通过细胞形态学观察、DNA 琼脂糖凝胶电泳、MTT 法及蛋白酶学分析等方法, 初步探讨 daphnioldhanin E 抗肿瘤的作用机制, 为其进一步的生物活性研究奠定实验基础。

收稿日期: 2011-10-08

作者简介: 王 蓓 (1978—), 女, 讲师, 研究方向为肿瘤免疫及抗感染免疫。Tel: (0312)5075533 E-mail: wp780203@163.com

*通讯作者 曹志然 Tel: (0312)5075533 E-mail: caozhiran@163.com

1 材料

1.1 药品与试剂

虎皮楠生物碱 daphnioldhanin E, 质量分数 99.9%, 河北大学生命科学学院提供。瑞姬氏染料, Amresco 公司; 细胞凋亡-DNA Ladder 抽提试剂盒、DNA Ladder (BeyoRed)、DNA 上样缓冲液、caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK、蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂星形孢菌素 (staurosporine)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、caspase-3 活性检测试剂盒均为碧云天生物技术研究所产品。

1.2 细胞株

人肝癌 HepG2 细胞株, 中国医学科学院药物研究所提供。

1.3 主要仪器

CKX41 倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; DYY-11B 电泳仪, 北京市六一仪器厂; Fotodyne 型凝胶成像系统, 美国 Image 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

采用 RPMI 1640 完全培养液, 将 HepG2 细胞用贴壁细胞培养方法培养。取 5×10^5 /mL HepG2 细胞接种于 100 mL 培养瓶中, 在 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养, 每 2 天换液 1 次, 待细胞密度达到 80% 时, 胰酶消化细胞, 按 1:2 比例传代, 3~4 d 传代 1 次, 收集对数生长期的细胞进行实验。

2.2 瑞姬氏染色观察 HepG2 细胞形态学变化

设对照组和 daphnioldhanin E 低、高质量浓度组。分别取对数生长期 HepG2 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 接种于预置盖玻片的 24 孔板中, 每孔 1 mL, 37 °C 恒温、恒湿、5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h 后, 2 个给药组分别换成 daphnioldhanin E 终质量浓度为 10、30 μg/mL 的 RPMI 1640 完全培养液, 对照组加入等体积的含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液。继续培养 48 h, 弃去上清液后将盖玻片取出, 用 PBS 洗 2 次, 室温晾干, 瑞姬氏染液染色, 光镜下 (×400) 观察细胞形态。

2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡

设对照组和 daphnioldhanin E 低、高质量浓度组。分别取对数生长期 HepG2 细胞 1×10^6 个, 接种于 100 mL 培养瓶中, 置于 37 °C 恒温、恒湿、5% CO₂ 的培养箱孵育 24 h。弃上清液, 对照组加入含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液, 2 个给药组分别加入 daphnioldhanin E 终质量浓度为 10、30 μg/mL

的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 24 h, 收集细胞, DNA ladder 抽提并进行电泳, Bio-Rod 凝胶成像系统保存电泳结果。

2.4 MTT 法检测细胞凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 对 daphnioldhanin E 抗癌活性的影响

设对照组, 阳性对照组, Z-VAD-FMK+星形孢菌素组, daphnioldhanin E 10、30 μg/mL 组, daphnioldhanin E (10、30 μg/mL)+Z-VAD-FMK 组, 每组均设 3 个复孔, 实验重复 3 次。将 HepG2 细胞以 8×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 37 °C 培养 24 h, 细胞贴壁后, 吸弃上层培养基, 对照组每孔加入含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液 100 μL, 阳性对照组每孔加入星形孢菌素 (5 μmol/L) 10 μL 及 RPMI 1640 完全培养液 90 μL, Z-VAD-FMK+星形孢菌素组加入星形孢菌素 (5 μmol/L) 和 Z-VAD-FMK (20 μmol/L) 各 10 μL 及 RPMI 1640 完全培养液 80 μL, daphnioldhanin E 10、30 μg/mL 组分别加入相应药物各 10 μL 及 RPMI 1640 完全培养液 90 μL, daphnioldhanin E+Z-VAD-FMK 组分别加入 10、30 μg/mL 的 daphnioldhanin E 与 Z-VAD-FMK (20 μmol/L) 10 μL 及 RPMI 1640 完全培养液 80 μL, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。终止培养前 4 h 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 10 μL, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 DMSO 100 μL, 振荡 5 min, 待结晶物充分溶解后, 用酶标仪 (波长 490 nm) 测定各孔吸光度 (A) 值。按照公式计算细胞增殖抑制率 (IR)。

$$IR = 1 - A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.5 Caspase-3 酶活性测定

设对照组、阳性对照组和 daphnioldhanin E 给药组。取对数生长期 HepG2 细胞 1×10^6 个, 对照组加入含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液, 阳性对照组加入含星形孢菌素 (5 μmol/L) 的 RPMI 1640 完全培养液, 给药组加入终质量浓度为 30 μg/mL 的 daphnioldhanin E 的 RPMI 1640 完全培养液, 培养 24 h 后收集细胞, 提取蛋白, Bradford 法测定蛋白的量, 分光光度法检测各组 caspase-3 酶活性。

2.6 数据处理

所有数据处理采用 SPSS 16.0 软件, 采用单因素方差分析和 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞形态的影响

HepG2 细胞经 daphnioldhanin E 10 μg/mL 处理

48 h 后, 细胞体积增大, 胞质内细胞核周围出现大量空泡, 但细胞膜及细胞核仍保持完整; 而经 daphnioldhanin E 30 $\mu\text{g/mL}$ 处理后, 细胞破坏严重, 细胞膜完整性遭到破坏, 胞浆内有空泡形成, 细胞核破碎且密度降低。结果见图 1。

3.2 对 HepG2 细胞凋亡的影响

Daphnioldhanin E 10 $\mu\text{g/mL}$ 作用于 HepG2 细胞后, 电泳图中出现了大量 50~300 bp 小片段, 而经

daphnioldhanin E 30 $\mu\text{g/mL}$ 作用后, 未见特征性的 DNA 梯状条带。结果见图 2。

3.3 Z-VAD-FMK 对 daphnioldhanin E 抗癌活性的影响

阳性对照组星形孢菌素与 HepG2 细胞作用 24 h 后, IR 为 $(66.206 \pm 0.106)\%$; Z-VAD-FMK+星形孢菌素组 IR 为 $(0.187 \pm 0.015)\%$ 。与阳性对照组相比, Z-VAD-FMK+星形孢菌素组 A 值明显增大

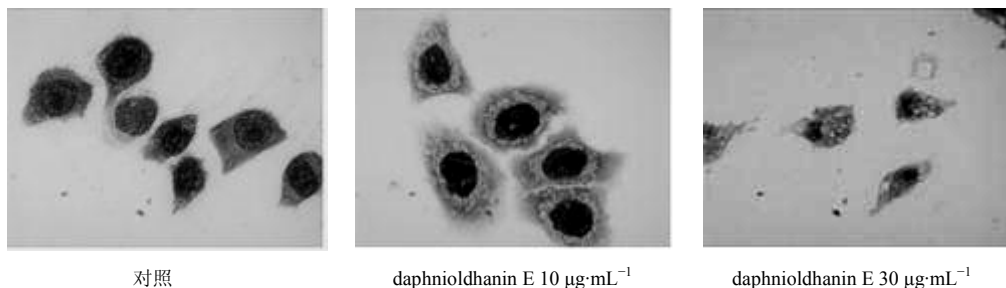


图 1 各组 HepG2 细胞瑞姬氏染色形态学观察

Fig. 1 Morphology of HepG2 cells in each group by Wright-Giemsa staining

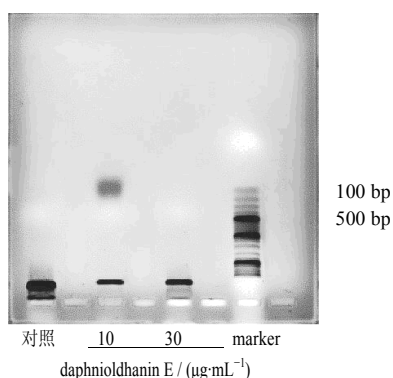


图 2 Daphnioldhanin E 作用 24 h HepG2 细胞 DNA 电泳结果
Fig. 2 DNA electrophoresis of HepG2 cells treated by daphnioldhanin E for 24 h

($P < 0.05$), 而与对照组相比则无明显差异, 表明 Z-VAD-FMK 对星形孢菌素细胞凋亡诱导作用产生抑制。在 daphnioldhanin E 存在的情况下, 加入或不加入 Z-VAD-FMK, 对 daphnioldhanin E 的 IR 无明显影响, 表明 daphnioldhanin E 对 HepG2 细胞的杀伤作用与 caspase 激活通路无关。结果见表 1。

3.4 对 caspase-3 酶活性的影响

对照组、daphnioldhanin E 30 $\mu\text{g/mL}$ 组和星形孢菌素组 HepG2 细胞 caspase-3 酶活力分别为 0.038 0、0.048 7、0.200 9 U/ μg 。结果见图 3。表明 daphnioldhanin E 对 HepG2 细胞 caspase-3 酶活力无显著影响。

表 1 Z-VAD-FMK 对 daphnioldhanin E 抗癌活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of Z-VAD-FMK on anticancer activities of daphnioldhanin E ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	给药量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A 值	IR / %
对照	—	0.349 ± 0.011	
星形孢菌素	5	$0.117 \pm 0.002^{\Delta}$	66.206 ± 0.106
星形孢菌素+Z-VAD-FMK	5+20	$0.349 \pm 0.013^*$	$0.187 \pm 0.015^*$
daphnioldhanin E+Z-VAD-FMK	10+20	$0.140 \pm 0.011^{\Delta}$	59.276 ± 0.111
	30+20	$0.126 \pm 0.004^{\Delta}$	63.266 ± 0.110
daphnioldhanin E	10	$0.133 \pm 0.001^{\Delta}$	61.296 ± 0.112
	30	$0.126 \pm 0.005^{\Delta}$	63.306 ± 0.113

与星形孢菌素组比较: $^*P < 0.05$; 与对照组比较: $^{\Delta}P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs staurosporine group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs control group

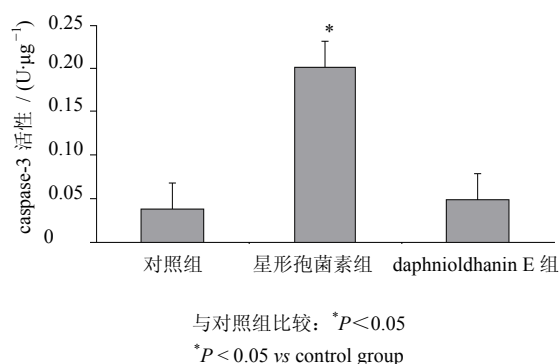


图 3 Daphnioldhanin E 对 HepG2 细胞 caspase-3 活性的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of daphnioldhanin E on caspase-3 activity
in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

牛耳枫、交让木和虎皮楠 3 种虎皮楠科植物为我国传统的民间药用植物,常以根、叶入药,其味苦涩,入药后内服外敷,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛的功效。虎皮楠科生物碱类化合物对多种肿瘤细胞有抑制作用,但有关其抗肿瘤作用机制的研究较少。本实验结果表明,人肝癌 HepG2 细胞经低质量浓度的 daphnioldhanin E 处理后,细胞体积增大,细胞核清晰可见,周围出现了大量的胞浆空泡,但细胞膜仍保持完整;而随着其质量浓度的增加与作用时间的延长,细胞膜完整性受到破坏,最终导致细胞核破碎,且伴随着整个细胞的密度大幅降低,从形态学观察结果推断 daphnioldhanin E 诱导 HepG2 细胞死亡的方式与类凋亡 (paraptosis) 相似。类凋亡是近年来发现的一种新的程序性细胞死亡方式^[5-7],其典型特征是细胞肿胀以及由于线粒体和内质网肿胀所造成的胞浆空泡化,但细胞膜仍保持完整。类凋亡在形态学上与凋亡的区别是缺少染色质的新月形凝集和凋亡小体,而与坏死的区别是细胞膜未遭到破坏^[8-10]。通过琼脂糖凝胶电泳观察染色质 DNA 降解情况,认为细胞凋亡的 DNA 降解片段规则,呈特征性的 DNA 梯形分子条带 (片段大小 180~200 bp);细胞坏死的 DNA 降解片段较大,且不甚规则,未见典型的梯状 DNA 条带;而类凋亡的降解片段不规则,可能出现 50~300 bp 的 DNA 片段,亦未见典型的梯状 DNA 条带^[11-12]。在本实验中琼脂糖凝胶电泳表明, daphnioldhanin E 10 μg/mL 作用 HepG2 细胞 24 h 后,电泳中出现了大量 50~200 bp 小片段,这表明 daphnioldhanin E 更可能是以类

凋亡方式诱导 HepG2 细胞死亡。

根据激活 caspase 的启动因素不同,细胞凋亡激活途径分为 3 种,第一种是内源性途径或线粒体途径,主要由细胞色素 C 启动,导致 caspase-9 的激活;第二种是外源性途径或死亡受体途径,主要由细胞表面死亡受体启动,导致 caspase-8 的激活;第三种是内质网途径,主要是内质网应激反应,导致 caspase-12 的活化,后者再激活 caspase-9。上述 3 种途径均通过激活 caspase-3 最终导致细胞凋亡^[13-14]。Caspase 蛋白酶抑制剂可抑制细胞经凋亡途径死亡,而类凋亡细胞则不受凋亡抑制剂的影响。Z-VAD-FMK 是一种最常用的细胞凋亡抑制剂,可以穿透细胞膜,抑制由 caspase 激活而导致的细胞凋亡。星形孢菌素是一种广谱的细胞凋亡诱导剂,可以通过细胞膜,抑制蛋白激酶 C,从而诱导细胞凋亡^[15-16]。本实验结果显示, daphnioldhanin E 的细胞凋亡诱导作用未受 Z-VAD-FMK 的影响,对 HepG2 细胞的杀伤作用明确;同时, daphnioldhanin E 处理组与对照组 HepG2 细胞 caspase-3 酶活力无明显差异,表明细胞死亡过程中 caspase-3 未被活化。这些都进一步证明了 daphnioldhanin E 可能通过类似类凋亡的方式,而非 caspase-3 依赖途径诱导 HepG2 细胞程序性死亡。Daphnioldhanin E 的抗肿瘤机制是否与其类凋亡方式诱导肿瘤细胞程序性死亡有关,还有待进一步深入研究。

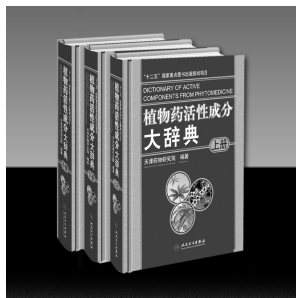
参考文献

- [1] 李震宇,郭跃伟.虎皮楠生物碱研究进展[J].有机化学,2007,27(5):565-575.
- [2] Zhang H, Yang S P, Fan C Q, et al. Daphniyunnines A-E, alkaloids from *Daphniphyllum yunnanense* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 553-557.
- [3] Jossang A, Bitar H E, Pham V C, et al. Daphcalycine, a novel heptacycle fused ring system alkaloid from *Daphniphyllum calycinum* [J]. *J Org Chem*, 2003, 68(2): 300-304.
- [4] 曹志然,王海,唐志远,等.4 种源于虎皮楠的生物碱对人肝癌细胞株 HepG-2 增殖的影响[J].医学教育与研究,2010,27(6):6-10.
- [5] 洪振亚. Caspase 非依赖性细胞程序性死亡[J].国际输血及血液学杂志,2006,29(2):137-139.
- [6] 陈同生,王小平,孙磊,等.紫杉醇诱导 ASTC-a-1 细胞的程序性死亡机制研究[J].光电子激光,2008,19(12):1706-1709.
- [7] 陈同生,王小平,孙磊,等.紫杉醇诱导不依赖于 Caspase-3 细胞类似 Paraptosis 的荧光光谱分析[J].光

- 谱学与光谱分析, 2008, 28(11): 2623-2627.
- [8] 冷玉芳, 金海燕. 大鼠坐骨神经慢性压迫损伤后脊髓感觉神经元发生非凋亡性细胞程序性死亡 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2009, 15(1): 23-26.
- [9] Yoon M J, Kim E H, Lim J H, *et al.* Superoxide anion and proteasomal dysfunction contribute to curcumin-induced paraptosis of malignant breast cancer cells [J]. *Free Rad Biol Med*, 2010, 48(5): 713-726.
- [10] Asare N, Landvik N E, Lagadic-Gossman D, *et al.* 1-Nitropyrene (1-NP) induces apoptosis and apparently a non-apoptotic programmed cell death (paraptosis) in Hepal1c7 cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230(2): 175-186.
- [11] 曹献英. 纳米羟基磷灰石诱导肝癌细胞死亡的作用靶点及机理研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2005.
- [12] 金海燕. 神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 P2X-3 受体的表达与感觉神经元变化的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2005.
- [13] 周建华, 丛国正, 高闪电, 等. 细胞凋亡的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(2): 274-276.
- [14] 何立丽, 孙桂芝, 张培彤. 凋亡蛋白酶活化因子 1 诱导细胞凋亡及相关的抗肿瘤治疗的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(1): 251-254.
- [15] Li Y, Li Q, Wang Z, *et al.* 15-HETE suppresses K (+) channel activity and inhibits apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(1): 42-51.
- [16] Cai L, Wang H, Li Q, *et al.* Salidroside inhibits H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40(9): 796-802.

“十二五”国家重点图书出版规划项目

《植物药活性成分大辞典》(上、中、下册)



植物中的活性成分是植物药发挥疗效的物质基础,植物活性成分研究是阐释植物药的生物活性、临床疗效和毒性的必要手段,也是新药发现和创制的可行途径,更是中药药物质基础研究、质量控制以及配伍合理性及作用规律研究的前提和基础。近些年来,随着国际上植物化学以及天然药物化学学科的迅速发展,大量的植物活性成分被研究和报道,形成大量、丰富的植物活性成分研究的信息源。但是,这些资料作为原始文献散在于成千上万的中外学术期刊上,不能满足读者对植物活性成分的系统了解、方便查阅和迅速掌握的需要。

天津药物研究院在国家科技部和原国家医药管理局新药管理办公室支持下,在建立“植物活性成分数据库”的基础上,组织科研人员经过几年的艰苦努力编纂了大型工具书《植物药活性成分大辞典》。本套书分上、中、下共三册,共收载植物活性成分 8 719 个,共约 700 万字。正文中每个活性成分包含英文正名、中文正名、异名(异名之间用分号隔开)、化学名、结构式、分子式和分子量、理化性状(晶型、熔点、溶解性、旋光、紫外、红外、质谱、氢谱和碳谱)、植物来源、生物活性等项内容。并于下册正文后附有三种索引——植物药活性成分中文名、植物药活性成分英文名和植物拉丁名索引。全书涵盖大量国内外专业期刊的翔实数据,内容丰富、信息量大,具有反映和体现信息趋时、简便实用的特色;作者在注重数据科学性、系统性的同时,着眼于全球药物研发前沿需求与我国市场实际应用的结合,为新药研究人员选题、立项、准确评价成果提供快速、简便、有效的检索途径,为植物药的开发生、利用提供疗效优异、结构独特的活性分子或先导化合物。

本套书的出版必将为我国“十二五”医药事业发展和天然药物产业发展提供翔实而可靠的科学数据和技术支撑,为促进植物药资源的利用,重大创新药物的研究以及促进特色产业的可持续发展提供趋时的数据资源和检索途径。

该书已批准列入“十二五”国家重点图书出版规划项目,于 2011 年 11 月由人民卫生出版社出版发行,大 16 开精装本,每套定价 588 元。