

野百合碱诱导胰腺癌细胞 BxPC-3 呈巨型多倍体化研究

曾军英^{1,2}, 李胜华^{1,2}, 伍贤进^{1,2*}, 丁丹勇^{1,2}, 刘婷^{1,2}

1. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008

2. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008

摘要: 目的 观察野百合碱体外诱导人胰腺癌细胞株 BxPC-3 形成多倍体巨细胞的作用。方法 BxPC-3 细胞以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的浓度接种于含野百合碱 (0、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 RPMI 1640 培养液内 72 h, Giemsa 染色分析细胞形态, 流式细胞术分析 DNA 量, Annexin V-FITC/PI 双标法流式细胞术观察野百合碱对 BxPC-3 细胞凋亡的诱导作用, 染色体展示分析野百合碱处理后 BxPC-3 多倍体巨细胞的染色体组, Western blotting 检测周期蛋白 Cyclin B1 的表达。结果 Giemsa 染色显示, 多倍体细胞体积大, 多核。流式细胞仪检测细胞 DNA 量表明, 野百合碱处理 72 h 出现 4N、8N 巨型 BxPC-3 多倍体细胞, 诱导细胞凋亡, 下调 Cyclin B1 蛋白表达, 并与野百合碱的质量浓度呈依赖关系。染色体展示分析再次证明了巨型多倍体细胞的形成。结论 野百合碱通过抑制周期蛋白 Cyclin B1 的表达, 导致多倍体巨细胞增加, 出现 4N、8N 巨型 BxPC-3 多倍体细胞, 促使 BxPC-3 细胞凋亡或死亡。

关键词: 野百合碱; 胰腺癌细胞; 多倍体巨细胞; 周期蛋白 Cyclin B1; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2042-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.016

Effect of monocrotaline on induction of pancreatic cancer cell BxPC-3 into polyploid giant cells

ZENG Jun-ying^{1,2}, LI Sheng-hua^{1,2}, WU Xian-jin^{1,2}, DING Dan-yong^{1,2}, LIU Ting^{1,2}

1. Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua 418008, China

2. Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

Abstract: Objective To observe the effect of monocrotaline (MCT) extract from *Crotalaria sessiliflora* on inducing human pancreatic cancer cell BxPC-3 into polyploid giant cells *in vitro*. **Methods** BxPC-3 cells ($1 \times 10^4/\text{mL}$) were inoculated with MCT (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in RPMI-1640 for 72 h, respectively, then the cell morphology was observed by Giemsa staining, and the DNA content was measured by flow cytometry; BxPC-3 cells-induced apoptosis was checked by AnnexinV-FITC/PI double staining using flowcytometry, BxPC-3 polyploid giant cell genome was checked by chromosome spreading assay, and Cyclin B1 expression also was analysed by Western blotting. **Results** Giemsa staining and DNA content by flow cytometry showed that MCT induced BxPC-3 cell into polyploid giant cells *in vitro*. MCT treatment for 72 h appeared 4N, and 8N polyploid giant of BxPC-3 cells, induction of apoptosis, decreased the expression of cyclin B1 in a dose dependent manner. Chromosome analysis demonstrated once again that polyploid giant cell was mainly in 8N. **Conclusion** Monocrotaline might exert its antitumor effect by blocking the cell cycle, inducing apoptosis, and down-regulating Cyclin B1 protein.

Key words: monocrotaline; pancreatic cancer cells; polyploid giant cells; Cyclin B1; apoptosis

野百合为蝶形花科 (Papilionaceae) 猪屎豆属 *Crotalaria* Linn. 植物野百合 *Crotalaria sessiliflora* L. 的干燥全草, 别名农吉利、鼠蛋草、响铃草、芝麻响铃铃、细叶芝麻铃等, 其味淡, 性平, 功能为清热、利湿、解毒^[1]。在我国广泛用于多种疾病的

治疗, 主治痢疾、疮疖、耳鸣耳聋、头晕目眩及各种癌症如皮肤鳞状上皮癌、食管癌、宫颈癌等^[2]。野百合碱 (monocrotaline) 是野百合主要的活性成分。胰腺癌恶性程度高、预后差, 且发病率近年来有上升趋势。目前, 胰腺癌的早期诊断比较困难,

收稿日期: 2013-11-19

基金项目: 湖南省教育厅平台项目 (11K052); 湖南省高等学校产业化培育项目 (13cy026); 湖南省科技计划项目 (2013FJ6090); 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室开放基金项目 (HHUW2010-65); 湖南省植物学重点建设学科 (20110101)

作者简介: 曾军英 (1971—), 男, 博士后, 主要从事药用植物活性成分及药理学研究。Tel: (0745)2851037 E-mail: junyingzeng@163.com

*通信作者 伍贤进 Tel: (0745)2851037 E-mail: hhuxianjin@163.com

确诊时多已是进展期,手术切除率低,化疗、放疗后仍易复发和转移,胰腺癌患者的平均生存期为6个月,位居癌症死亡的第5位^[3]。BxPC-3细胞系来源于低分化胰腺导管腺癌患者,其倍增时间为54 h,染色体数目为59条(2N),具有转移潜能。本研究选择人胰腺癌细胞株 BxPC-3 作为研究对象,探讨野百合碱对胰腺癌的抗肿瘤作用及相关机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

野百合碱(monocrotaline, MCT, 质量分数≥98%)购于美国 Sigma 公司,用二甲亚砜(DMSO)配成储存液, -20℃保存,实验时用 RPMI 1640 培养液稀释, DMSO 的体积分数小于 0.1%。噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清为杭州四季青生物公司产品; 培养液 RPMI 1640 购自 Gibco 公司; 鼠抗人 Cyclin B1 单克隆抗体、ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa cruz 公司; 羊抗鼠 HRP-IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 仪器

FACS calibur 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)、Thermo 细胞培养箱(美国 Thermo 公司)、Olympus 倒置相差显微镜(日本)、Thermo Varioskan Flash 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 细胞

人胰腺癌细胞株 BxPC-3 由德克萨斯理工大学王明海教授惠赠。

2 方法

2.1 细胞培养

BxPC-3 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 和一定湿度的培养箱中孵育,培养液中含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL,细胞生长达汇合状态时,0.25%胰蛋白酶消化后传代。全部实验均采用对数生长期细胞,重复3次实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

实验分为对照组(RPMI 1640)和不同质量浓度(5、10、20 μg/mL)野百合碱组。MTT 比色法^[4]分别测定野百合碱作用 24、48、72 h 后 BxPC-3 细胞的吸光度(A_{570})值,计算细胞增殖率(增殖率=实验组 A_{570} 值/对照组 A_{570} 值),每组均重复3次。

2.3 Giemsa 染色法观察 BxPC-3 细胞形态

细胞按“2.2”项加样品培养 72 h 后终止培养,取出盖玻片,0.01 mol/L PBS 洗 5 min,置于分析纯甲醇中固定 10 min 后取出,挥干甲醇。将吉姆萨(Giemsa)染液与 pH 7.2 的索伦森氏(Sorensen)磷酸缓冲液以 1:9 混成工作液,加于盖玻片上染色 10~20 min(镜下观察染色程度),待细胞充分显色后流水冲洗盖玻片,立即进行拍照和图像分析。

2.4 细胞倍性分析

5、10 μg/mL 野百合碱分别处理 BxPC-3 细胞 72 h 后,收集漂浮及贴壁细胞,70%冰乙醇固定后,置于-20℃储存备用。以单纯加入 0.1% DMSO 处理作为对照组。取出备用的收集细胞,用 PBS 洗涤及离心后,加入 1 mg/mL RNase A 和 50 μg/mL PI,反应并染色 30 min,流式细胞仪分析细胞倍性。

2.5 细胞染色体分析

取生长状态良好的细胞,接种于 96 孔细胞培养板内,细胞随机分为对照组和野百合碱(5、10、20 μg/mL)组,每组设 3 个重复,培养 72 h 后进行染色体分析。按常规方法制备染色体标本,于收集细胞前 2 h 加入秋水仙素(终质量浓度为 0.05 mg/mL),常规方法收集细胞,加入 0.075 mol/L KCl 溶液低渗作用 30 min,离心取沉淀细胞,再用甲醇-冰醋酸(3:1)混合液固定 2~3 次,每次 20 min。取 4℃洁净载玻片滴片制备染色体标本,用 Giemsa 染色后于光镜下进行核型及染色体数量分析。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

分组、给药与细胞培养时间同“2.4”项,每组设 5 个复孔。各组收集 BxPC-3 细胞 1×10^6 个,离心,弃上清,用冷 PBS 洗涤 2 次,按照 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒说明操作,分别加入缓冲液 185 μL、Annexin V 10 μL、PI 5 μL,混匀,避光 20 min,离心后弃去上清液,再加入冷 PBS 洗涤 1 次,用 PBS 400 μL 悬浮细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.7 蛋白表达检测

取生长状态良好的细胞,接种于 60 mm 细胞培养皿内,细胞随机分为对照组和野百合碱(5、10、20 μg/mL)组,每组设 3 个重复,培养 72 h 后进行蛋白表达分析。采用 1% NP40 冰上裂解细胞球 30 min,4℃条件下 $6500 \times g$ 离心 30 min 提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白定量。取各组细胞总蛋白 20 μg 上样,进行 8% SDS-PAGE 分离蛋白,电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。5%脱脂奶粉

封闭 2 h 后, 分别加入一抗 Cyclin B1、 β -actin (1 : 1 000), 室温反应 2 h, TBST 洗涤后加入相应二抗再反应 1 h, 膜经 TBST 洗涤后与电化学发光检测试剂反应, X 光胶片压片曝光, 显示结果。

2.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析。

3 结果

3.1 对 BxPC-3 细胞增殖的抑制作用

5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 野百合碱对 BxPC-3 细胞的增殖有明显的抑制作用, 且抑制作用呈剂量和时间依赖性, 见表 1。

3.2 对 BxPC-3 细胞形态的影响

与对照组比较, 5 $\mu\text{g/mL}$ 野百合碱处理 72 h 后

出现了巨型多核细胞, 体积是对照组细胞的 10~20 倍, 且 20 $\mu\text{g/mL}$ 野百合碱处理后, 90% 的细胞成巨型多核细胞, 见图 1。

表 1 野百合碱对 BxPC-3 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Inhibition of MCT on proliferation of BxPC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	增殖率 / %		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.0	100.0	100.0
野百合碱	5	77.2 $\pm$ 3.3*	64.4 $\pm$ 4.8*	41.5 $\pm$ 4.3*
	10	70.5 $\pm$ 7.1**	52.1 $\pm$ 5.4**	27.2 $\pm$ 6.4**
	20	64.8 $\pm$ 7.8**	42.9 $\pm$ 4.6**	18.6 $\pm$ 5.2**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

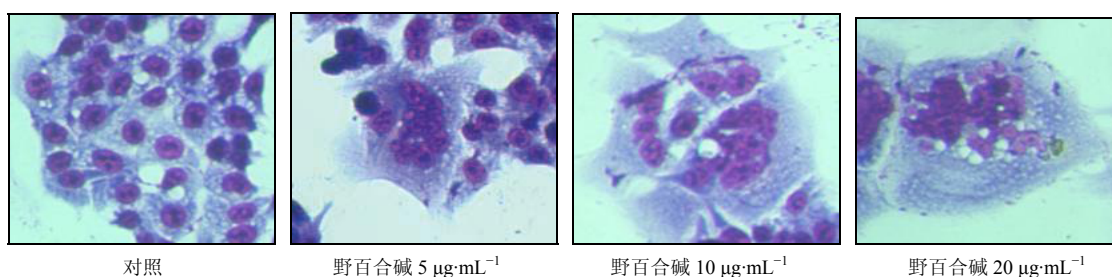


图 1 二倍体和多倍体 BxPC-3 细胞

Fig. 1 BxPC-3 cells of diploid and polyploid

3.3 对 BxPC-3 细胞倍性的影响

野百合碱诱导 BxPC-3 细胞的结果发现, 随着野百合碱质量浓度的增加, 多倍体细胞 (4N、8N) 逐渐增加, 存在剂量依赖关系 ($P < 0.05$), 见图 2。

3.4 对 BxPC-3 染色体组的影响

根据美国 ATCC 的数据显示, BxPC-3 细胞系的染色体数目为 59 条 (2N)。染色体分析结果表明, 野百合碱诱导 BxPC-3 细胞出现 4N (染色体

数目 118 ± 4) 和 8N (染色体数目 236 ± 6), 进一步验证了上述数据的可靠性, 见图 3。

3.5 对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双标法检测结果显示, 不同质量浓度的野百合碱均可诱导 BxPC-3 细胞凋亡, 凋亡率随野百合碱质量浓度的增加而增大, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 且野百合碱不同质量浓度组间 BxPC-3 细胞凋亡率比较也有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见图 4。

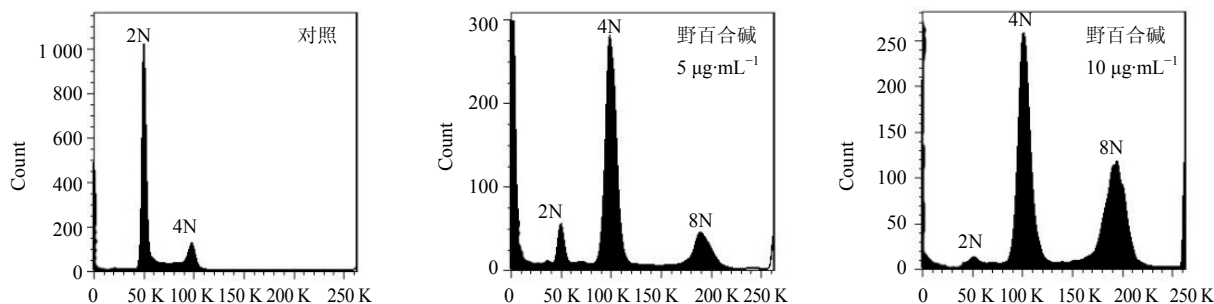


图 2 流式细胞仪检测野百合碱诱导的 BxPC-3 细胞 DNA 量

Fig. 2 DNA content in MCT-induced BxPC-3 cells analyzed by flow cytometry

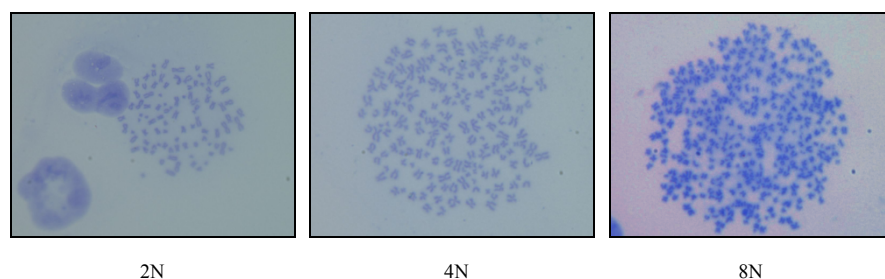


图3 染色体展示检测 BxPC-3 的染色体数目

Fig. 3 Chromosome number of BxPC-3 cells

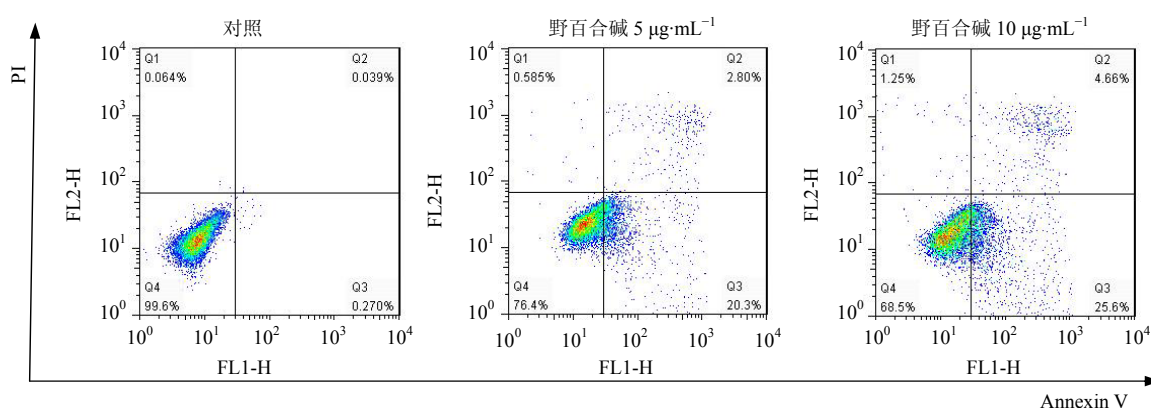


图4 经野百合碱处理后 BxPC-3 细胞的凋亡情况

Fig. 4 Induced apoptosis of BxPC-3 by MCT treatment

3.6 对 BxPC-3 细胞 Cyclin B1 蛋白表达的影响

与对照组比较,不同质量浓度的野百合碱作用于 BxPC-3 细胞 72 h 后 BxPC-3 细胞 Cyclin B1 的蛋白表达水平下降,差异显著 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性,见图 5。

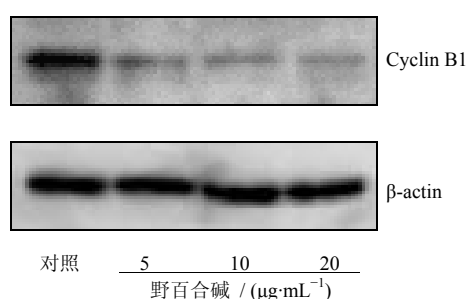


图5 野百合碱抑制 BxPC-3 细胞 Cyclin B1 蛋白的表达

Fig. 5 Inhibition of MCT on protein expression of Cyclin B1 in BxPC-3 cells

4 讨论

野百合碱是从中药野百合中分离得到的单体化合物。体外和动物实验表明,野百合碱能够抑制肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞的增殖与生长,其作用机制涉及直接杀伤肿瘤细胞、

抑制核酸代谢、抑制肿瘤血管生成、诱导细胞凋亡、促进细胞分化等诸多方面^[2],目前对于野百合碱抗肿瘤的作用机制还缺乏深入研究。本研究探索野百合碱对胰腺癌细胞的增殖抑制作用及其分子机制,以期寻找新抗癌药物提供有价值的信息。

在基因毒性化合物、放射线、应激等 DNA 损伤情况下,肿瘤细胞往往形成多倍体单核巨细胞和多核巨细胞,这些巨细胞大部分趋于死亡或凋亡,促进多倍体细胞形成是控制某些恶性肿瘤进展的一种途径,但目前对肿瘤巨细胞形成和演变仍存在很大争议^[5]。本研究表明,应用野百合碱诱导 BxPC-3 细胞多倍体化,在 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 随着野百合碱质量浓度的增加和作用时间的延长,多倍体化细胞逐渐增加,并且存在着明显的时间和剂量依赖关系。野百合碱诱导的多倍体 BxPC-3 细胞含有多个细胞核,而不是分叶核,说明其已发生了核分裂。实验通过细胞形态学和流式细胞术分析,野百合碱诱导 BxPC-3 细胞的体积增大,2N 和 4N 细胞逐渐减少,8N 细胞逐渐增多,也进一步证明了野百合碱诱导 BxPC-3 细胞巨型多倍体化。野百合碱处理

BxPC-3 细胞后,细胞核分裂,而胞质不分裂,提示细胞停滞在细胞周期的 G₂/M 期。

细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中有重要作用^[6]。Cyclin B 是作用于 G₂/M 期的重要周期蛋白,可以促进 G₂/M 期转换而加速细胞周期进程。随着正常细胞周期和肿瘤细胞周期的深入研究,可以认为 Cyclin B 的异常表达与多种肿瘤的发生、发展相关,是一个极好的肿瘤标志物,对肿瘤的恶性生物学行为,及肿瘤的预后有意义^[7]。Cyclin B1 在 G₂ 期表达增加,Cyclin B1 与 p34cdc2 形成激酶复合物,控制细胞由 G₂ 进入 M 期。本研究结果显示,野百合碱作用 72 h 后,BxPC-3 细胞 Cyclin B1 蛋白表达下降,提示野百合碱可能通过降低 Cyclin B1 蛋白表达将细胞阻滞在 G₂/M 期,抑制细胞增殖。

野百合碱通过抑制周期蛋白 Cyclin B1 的表达,导致多倍体巨细胞增加,出现 4N、8N 巨型 BxPC-3 多倍体细胞,促使 BxPC-3 细胞凋亡或死亡,然而其具体的作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [2] 李林珍, 朱海燕, 石京山, 等. 猪屎豆属植物化学成分及药理活性研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 724-730.
- [3] 胡海, 江卫华, 焦锋, 等. 胰腺癌干细胞研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(8): 801-804.
- [4] 刘岸, 邓姿峰, 胡金喜, 等. 大黄素对人胰腺癌 panc-1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 756-759.
- [5] Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 585-610.
- [6] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1821-1828.
- [7] Hu Y, Wang S, Wu X, *et al.* Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: A focus on hepatocellular carcinoma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3): 601-612.