

塔斯品碱衍生物 TasD1-6 对肝癌 Hep3B 细胞生长的抑制作用研究

马树琴², 杨天枫¹, 陈霞¹, 张东东^{1*}

1. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061

2. 榆林市第二医院, 陕西 榆林 719000

摘要: 目的 考察塔斯品碱衍生物 TasD1-6 对肝癌细胞株 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 的生长抑制作用及其作用机制。方法 应用 MTT 法和实时细胞分析 (RTCA) 技术检测 TasD1-6 对 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 细胞增殖的影响, 筛选敏感株后采用结晶紫染色进行细胞形态学观察, 根据 Annexin V FITC/PI 双染法和 Hoechst 33258 染色法考察 TasD1-6 对细胞凋亡的影响, 采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白表达, 流式细胞仪检测细胞周期变化。结果 MTT 法和 RTCA 结果均表明 TasD1-6 能明显抑制 Hep3B 细胞的增殖, MTT 检测其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 $(11.3 \pm 1.6) \mu\text{mol/L}$, 确定后续给药浓度分别为 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$; 形态学观察结果表明 TasD1-6 高浓度下能明显抑制 Hep3B 细胞增殖, 且细胞皱缩, 形态发生明显变化; Annexin V FITC/PI 双染法和 Hoechst 33258 染色法均表明 TasD1-6 可诱导细胞发生凋亡, 且呈剂量依赖性; Western blotting 结果表明 TasD1-6 可上调 p53 和促凋亡蛋白 Bax 表达, 并下调抑凋亡蛋白 Mcl-1 表达; 流式细胞仪检测细胞周期表明 TasD1-6 可将 Hep3B 细胞阻滞于 G_1 期。结论 TasD1-6 可抑制肝癌细胞增殖, 其对 Hep3B 细胞作用最为显著, 其作用机制可能为通过上调 p53 和促凋亡蛋白 Bax, 下调抑凋亡蛋白 Mcl-1 诱导细胞凋亡的产生, 同时将细胞周期阻滞于 G_1 期, 抑制细胞增殖。

关键词: 塔斯品碱衍生物; TasD1-6; 肝癌细胞; 实时细胞分析技术; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)19-4005-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.016

Inhibition effects of taspine derivatives TasD1-6 on human liver cancer cell of Hep3B

MA Shu-qin², YANG Tian-feng¹, CHEN Xia¹, ZHANG Dong-dong¹

1. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

2. The Second Hospital of Yulin, Yulin 719000, China

Abstract: Objective To analyze inhibitory effect of taspine derivative TasD1-6 on human liver cancer cells of Hep3B, HepG2, and BEL7402, and to study their preliminary mechanism of anticancer action. **Methods** Effect of TasD1-6 on cell growth of Hep3B, HepG2, and BEL7402 were determined by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) and real-time cellular analysis (RTCA) assay. Effect of TasD1-6 on Hep3B cell morphology was investigated with crystal violet staining. Next, Hep3B cell apoptosis was analyzed by Annexin V FITC/PI and Hoechst 33258 staining. Flow cytometry was used to determine Hep3B cell cycle. Effect of TasD1-6 on cell apoptosis protein expression in Hep3B cell was determined by Western blotting. **Results** MTT and RTCA assay demonstrated that TasD1-6 significantly inhibited the growth of Hep3B cell and the IC_{50} was $(11.3 \pm 1.6) \mu\text{mol/L}$. Hep3B cell morphology indicated the shrinkage and obvious morphology changes. And TasD1-6 induced the Hep3B cell apoptosis in dose-dependent manner. Cell was stopped as G_1 phase by TasD1-6. Western blotting analysis showed TasD1-6 could upregulate the protein expression of p53 and Bax and downregulate Mcl-1 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Taspine derivative TasD1-6 shows better inhibitory action on the growth of human liver cancer Hep3B cell than HepG2 and BEL7402 cells. At the same time, TasD1-6 can change cell cycle and induce cell apoptosis, which probably related to upregulation of p53 and Bax protein expression and downregulation of Mcl-1 protein expression.

Key words: taspine derivatives; TasD1-6; liver cancer cells; RTCA; proliferation; apoptosis

肝癌是威胁人类生命健康的主要恶性肿瘤之一。2015 年, 我国死于肝癌的患者约有 38.3 万, 占全球肝癌死亡病例数的 51%^[1]。近几年来, 随着抗肿瘤药物研究的不断创新, 除传统的单一用药, 如

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (21305106)

作者简介: 马树琴 (1970—), 女, 陕西榆林米脂人, 主管护师。

*通信作者 张东东 (1982—), 男, 副教授, 从事药物作用过程分析研究。E-mail: ddzhang@xjtu.edu.cn

细胞毒性药物、分子靶向药物、基因治疗外,联合用药也逐步发展起来^[2],但在临床上大多数药物由于其严重的不良反应以及耐药性的产生,治疗效果并不尽如人意,这给抗肝癌药物的研发提出了巨大的挑战。随着分子生物学、细胞生物学、有效成分分离提取以及活性筛选等技术的发展,从天然植物中筛选有效的抗肿瘤先导化合物,通过结构优化,筛选发现高效、低毒、特异性强的新型靶向抗癌药物,已成为研究开发抗肿瘤药物的一个重要途径^[3]。塔斯品碱是本实验室从秦巴山区特有药用植物红毛七 *Caulophyllum robustum* Maxim. 中提取的一种阿朴啡类生物碱,研究表明其具有抗菌、抗炎、抗病毒的药理活性^[4]。但因其脂水分配系数较大,溶解性差,不具有成药性。因此,本实验室前期以塔斯品碱的结构为基础,合成了塔斯品碱衍生物 TasD1-6 (结构见图 1),以期在增加抗肿瘤活性的同时,降低其毒性^[5]。本实验通过对肿瘤细胞凋亡和细胞周期的检测探讨 TasD1-6 抑制肝癌细胞生长的初步作用机制。

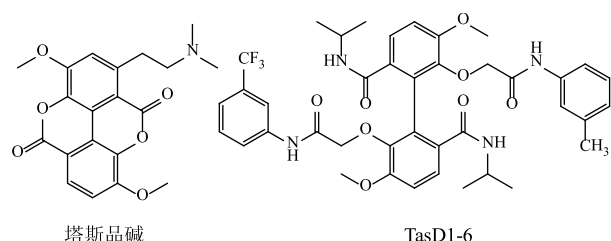


图 1 塔斯品碱及其衍生物 TasD1-6 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of taspine and its derivative TasD1-6

1 材料

1.1 药品与试剂

TasD1-6 由西安交通大学食品药品研究与检测中心合成(质量分数 99.5%);RPMI 1640 培养基(干粉)和 DMEM 培养基(干粉)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清(批号 20160718)购自杭州四季青生物有限公司;胰蛋白酶购自美国 Amresco 公司;Annexin V FITC/PI 双染试剂盒购自南京凯基生物有限公司;SDS-PAGE 制胶试剂盒购自陕西先锋生物有限公司。

1.2 细胞

肝癌细胞株 Hep3B(TCHu 106)、HepG2(TCHu 72)和 BEL7402(TCHu 10)均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,代数依次为 10、15、18 代。

1.3 仪器

RTCA S16 实时无标记细胞功能分析仪和流式细胞仪均购自杭州艾森生物有限公司;自动细胞计数仪及细胞计数板均购自美国 Nexcelom 公司;MCO-15AC CO₂ 恒温培养箱购自日本 Sanyo 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将本实验室保存的 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 细胞,培养于含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素与链霉素的培养基中,其中 Hep3B、HepG2 所用培养基为 DMEM 培养基,BEL7402 所用培养基为 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养,隔天换液,3~4 d 胰酶消化传代培养。

2.2 MTT 实验

将对数生长期的肿瘤细胞 Hep3B、HepG2、BEL7402,用 0.25%胰蛋白酶溶液消化制成单个细胞悬液,以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,每孔 180 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。接种细胞培养 24 h,待细胞贴壁后,实验组加入 TasD1-6,每孔 20 μ L (使药物浓度达到预先设定浓度),对照组加入无血清培养基,每孔 20 μ L,每组设 10 个平行复孔,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。培养 48 h 后,小心吸弃孔板中的培养基,加入 180 μ L 培养基和 20 μ L MTT 的混合液(注意避光),于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱孵育 6 h。吸弃孔板中上清液,加入 150 μ L DMSO,将孔板置于摇床上,充分振荡 15 min,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长下测定吸光度(A)值,并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

2.3 实时细胞分析实验

将对数生长期的 3 种肿瘤细胞消化、计数后,配制成实验需要的细胞浓度 2×10^5 个/mL。在 S16 E-plate (16 孔) 中每孔分别加入 53 μ L 含 10%胎牛血清培养基,放置于 RTCA S16 系统测试台上测基线,RTCA 程序设置为每 15 分钟采集 1 次细胞指数(CI)值。然后取出 E-plate,每孔分别加入细胞悬液 100 μ L,将其置于超净台中室温放置 30 min 后,放置于 RTCA S16 系统测试台检测细胞增殖曲线。用培养基将 TasD1-6 以 2 倍系列稀释,共制备 8 个浓度的工作液,得到最高药物浓度为 500 μ mol/L,最低药物浓度为 4 μ mol/L。待增殖曲线达对数期时取出 E-plate,每孔分别加入配好的工作液 17 μ L,

重新将其放入 RTCA S16 系统测试台, 持续监测 72 h。

2.4 细胞形态学观察

将对数生长期的 Hep3B 细胞消化、计数后, 以一定浓度接种于 12 孔板中 (每孔 2×10^5 个), 细胞悬液体积为每孔 900 μL 。每组设置 3 个平行孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。培养 24 h, 待细胞贴壁后, 实验组加入 TasD1-6 (3、6、12 $\mu\text{mol/L}$), 每孔 100 μL , 对照组加入无血清培养基每孔 100 μL 。作用 48 h, 吸弃培养基, 加入 4% 多聚甲醛溶液, 每孔 1 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min。吸弃多聚甲醛, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次。加入结晶紫染色液, 每孔 1 mL, 染色 5 min。吸弃染色液, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次。将孔板置于荧光显微镜下, 观察细胞形态变化。

2.5 Hoechst 33258 染色

取对数生长期的 Hep3B 细胞消化、接种于 24 孔板 (密度 2×10^5 个/mL, 体积 500 μL), 培养 24 h 贴壁后加入 TasD1-6 (3、6、12 $\mu\text{mol/L}$), 对照组加入相应体积的无血清培养基。培养 48 h 后 PBS 缓冲液洗 2 次, 每次 3 min, 每孔加 300 μL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min 后, 三蒸水冲洗干净, 在 340 nm 波长紫外光下激发拍照。

2.6 细胞凋亡率检测

将对数生长期的 Hep3B 细胞消化、计数后, 以一定浓度接种于 6 孔板中 (每孔 6×10^5 个), 细胞悬液体积为每孔 1.8 mL。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。培养 24 h, 待细胞贴壁后, 实验组加入 TasD1-6 (3、6、12 $\mu\text{mol/L}$), 每孔 200 μL , 对照组加入无血清培养基, 每孔 200 μL , 每组设置 3 个平行孔。作用 48 h, 吸弃培养基, 用预冷的 PBS 缓冲液冲洗 2 次。0.25% 的胰蛋白酶溶液消化细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次。每个样品中加入 200 μL 结合缓冲液重悬。先加入 5 μL AnnexinV-FITC 溶液, 轻轻混合均匀, 室温避光孵育 5 min; 再加入 10 μL PI 溶液 (20 $\mu\text{g/mL}$), 混合均匀后, 室温避光孵育 10 min; 再加入 300 μL 结合缓冲液, 轻轻混合均匀, 用流式细胞仪检测。

2.7 Western blotting 实验

取对数生长期的 Hep3B 细胞接种于 6 孔板 (密度 2×10^5 个/mL, 体积 2.0 mL), 培养 24 h 贴壁后加入 TasD1-6 (3、6、12 $\mu\text{mol/L}$), 对照组加入相应体积的无血清培养基。药物作用 48 h 后, PBS 缓冲

液洗 2 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 于细胞破碎仪中冰上破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度。其余蛋白加入上样缓冲液, 沸水中煮沸变性 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳, 半干电转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 (TBST 缓冲溶液稀释) 室温封闭 2 h 后, 加入相应的一抗 (兔抗人) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。取出 PVDF 膜 TBST 缓冲溶液洗 4 次, 每次 5 min。加入二抗 (山羊抗兔, 稀释比例 1:20 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, TBST 缓冲溶液洗 4 次, 每次 5 min。ECL 化学发光法检测条带, 用 GAPDH 作为内参。

2.8 细胞周期实验

细胞培养、分组及加药处理同“2.6”项, 药物作用 48 h, 吸弃培养基, 用预冷的 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次。加入预冷的 70% 乙醇固定液, 每孔 1 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 弃去乙醇, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次。加入 RNase 溶液 (终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$) 500 μL , 室温避光孵育 30 min, 排除 RNA 干扰。加入 PI 溶液 (终质量浓度为 1.25 mg/mL) 25 μL , 室温避光孵育 10 min, 用流式细胞仪检测。

2.9 数据统计

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 检验方法为 t 检验 (小于 3 组数据) 和单因素方差分析 (3 组数据及以上)。

3 结果

3.1 TasD1-6 对 3 种肝癌细胞株增殖的影响

3.1.1 MTT 实验结果 MTT 实验结果表明不同浓度的 TasD1-6 对 3 种肝癌细胞均有抑制作用 (图 2), TasD1-6 作用于 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (11.3 ± 1.6)、(17.2 ± 3.8)、(26.2 ± 1.7) $\mu\text{mol/L}$, 可见 TasD1-6 对 Hep3B 细胞的抑制作用最强, 故后续实验均以 Hep3B 细胞为考察对象。

3.1.2 实时细胞分析实验结果 TasD1-6 作用于 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 细胞 72 h 的 IC_{50} 分别为 (13.2 ± 2.6)、(19.9 ± 4.7)、(22.4 ± 5.4) $\mu\text{mol/L}$, 图 3 表明 TasD1-6 对 Hep3B 细胞具有较好的抑制作用, 此结果与 MTT 结果一致, 确定 Hep3B 为敏感细胞株。

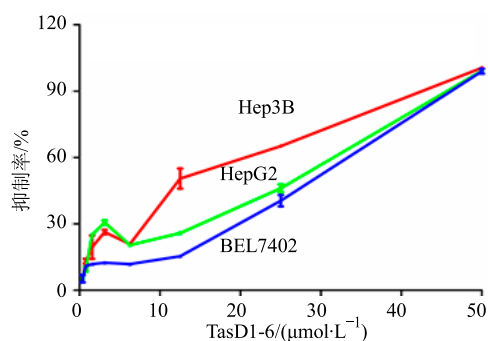


图 2 TasD1-6 对 Hep3B、HepG2 和 BEL7402 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of TasD1-6 on proliferation of Hep3B, HepG2, and BEL7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

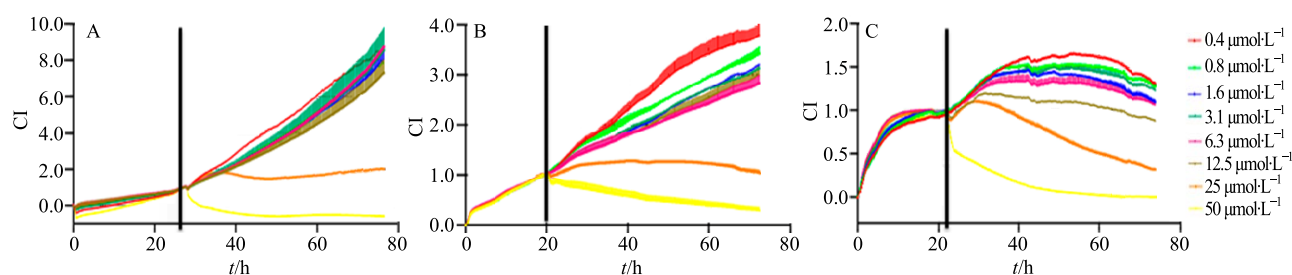


图 3 Hep3B (A)、HepG2 (B) 和 BEL7402 (C) 细胞增殖曲线

Fig. 3 Proliferation of Hep3B (A), HepG2 (B), and BEL7402 (C) cells by RTCA

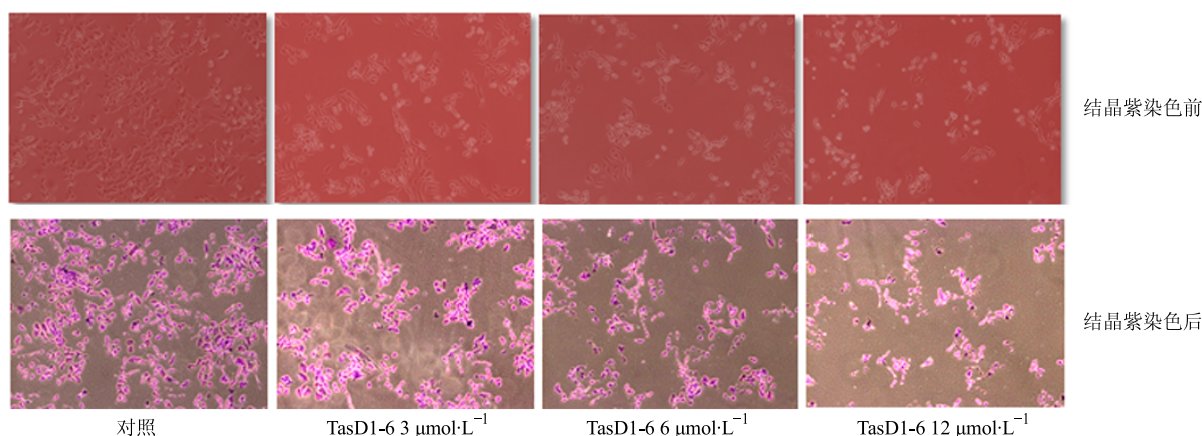


图 4 TasD1-6 对 Hep3B 细胞形态的影响

Fig. 4 Effect of TasD1-6 on cytomorphology of Hep3B cells

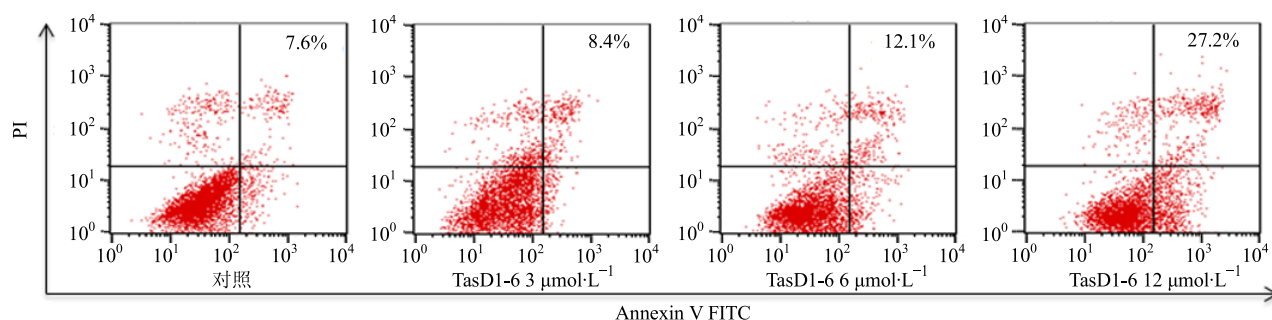


图 5 TasD1-6 对 Hep3B 细胞凋亡的影响 (流式细胞仪)

Fig. 5 Effect of TasD1-6 on apoptosis of Hep3B cells (flow cytometry)

3.2 形态学观察结果

通过显微镜直接观察和结晶紫染色后观察给药 48 h Hep3B 细胞形态变化, 见图 4。可看出随着给药浓度增大, 细胞数目明显减少, 且边缘皱缩, 细胞形态发生明显变化。

3.3 细胞凋亡检测结果

由流式细胞仪检测结果 (图 5) 可看出, 随着 TasD1-6 给药浓度增加, 细胞凋亡率明显升高, Hoechst 33258 染色实验结果 (图 6) 也表明 TasD1-6 高浓度组的细胞凋亡数明显增加。

3.4 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达结果

图 7 结果表明, TasD1-6 可上调 p53 和促凋亡

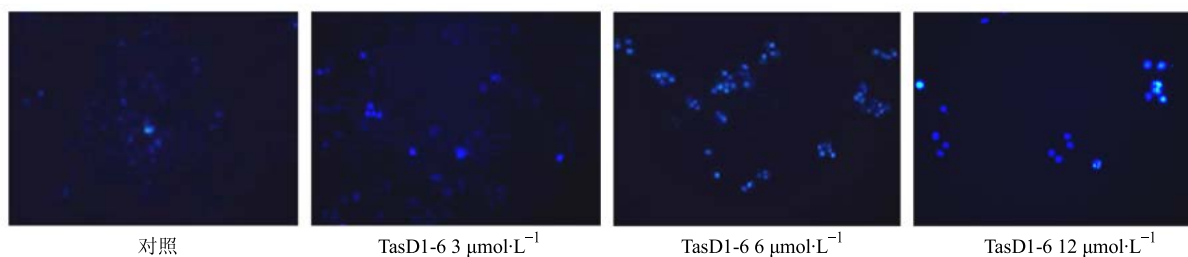


图 6 TasD1-6 对 Hep3B 细胞凋亡的影响 (Hoechst 染色)

Fig. 6 Effect of TasD1-6 on apoptosis of Hep3B cells (Hoechst staining)

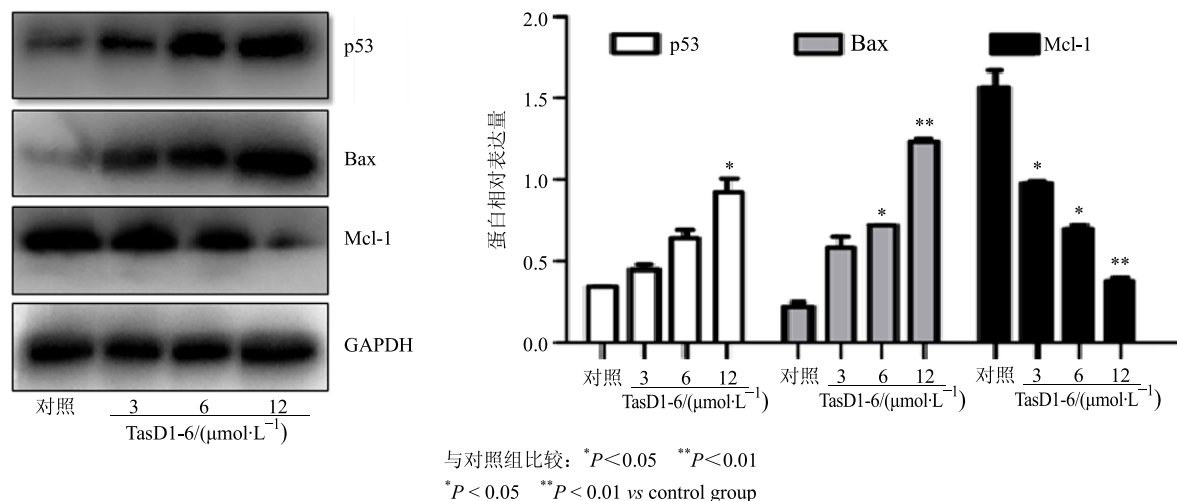


图 7 TasD1-6 对 Hep3B 细胞 p53、Bax 和 Mcl-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of TasD1-6 on protein expression of p53, Bax, and Mcl-1 in Hep3B cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

蛋白 Bax 表达, 下调抑凋亡蛋白 Mcl-1 表达。

3.5 细胞周期检测结果

流式细胞仪检测细胞周期结果见图 8, 随着给药浓度的增加, G_1 期细胞所占比例增加, 对照组及 TasD1-6 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_1 期细胞比例依次为 38.4%、40.3%、41.9%、53.8%, 表明 TasD1-6 可将 Hep3B 细胞阻滞于 G_1 期。

4 讨论

在抗肿瘤药物的筛选中, 一般以 MTT 等传统的方法来测定细胞的存活与生长情况。本实验中采

取 MTT 和实时细胞分析技术 2 种方法来评价 TasD1-6 的体外抗肿瘤活性, 避免了传统的终点检测法只能在人为设定的时间点进行检测的缺点。同时由于实时细胞分析技术具有实时在线, 无标记检测等优点^[6], 更加准确地反映了 TasD1-6 对不同肿瘤细胞株的生长抑制作用。结果表明, TasD1-6 对 Hep3B 细胞最为敏感, MTT 检测其 IC_{50} 值为 $(11.3 \pm 1.6) \mu\text{mol/L}$, 确定后续实验药物浓度为 3、6、12 $\mu\text{mol/L}$ 。

细胞周期和凋亡对肿瘤的发生和发展进程至关重要, 细胞周期是细胞生命运行的核心, 是一个有

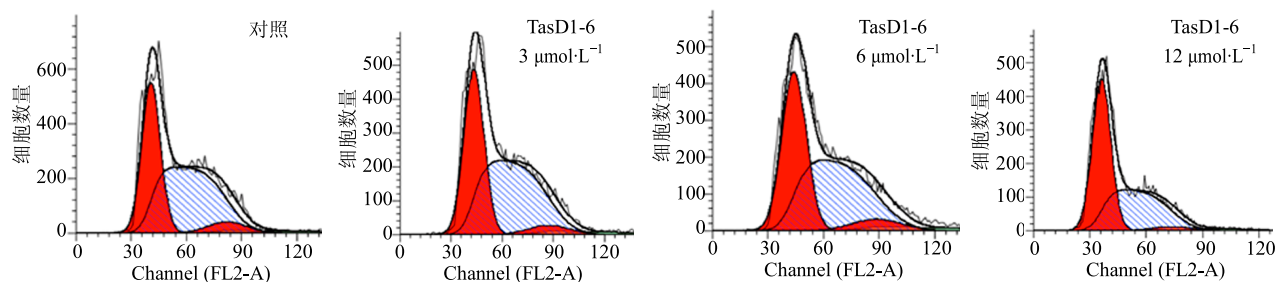


图 8 TasD1-6 对 Hep3B 细胞周期的影响

Fig. 8 Effect of TasD1-6 on cell cycle distribution of Hep3B cells

序精密的细胞内外信号相互作用的过程。细胞凋亡过程受一系列基因控制,其中 Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡相关基因中研究得最多的一类蛋白^[7], Bax 与 Mcl-1 均属于 Bcl-2 蛋白家族成员。抑癌基因 p53 对防止细胞增生和保持 DNA 受损基因组的完整性有重要作用^[8]。研究表明, p53 可以通过提高 Bax/Bcl-2 来完成促进细胞凋亡的作用^[9]。因此 TasD1-6 可能通过上调 p53 和促凋亡蛋白 Bax, 下调抑凋亡蛋白 Mcl-1, 诱导 Hep3B 细胞凋亡, 同时流式细胞术检测结果表明 TasD1-6 可将 Hep3B 细胞阻滞于 G₁ 期, 从而抑制细胞增殖。

本研究通过一系列实验证明了塔斯品碱衍生物 TasD1-6 具有良好的体外抗肿瘤活性, 并对其作用机制进行了初步研究, 为开发更具特异性和有效性的抗肝癌药物, 预防肝癌术后转移奠定实验基础。

参考文献

- [1] 吕桂帅, 陈 磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景 [J]. 生命科学, 2015, 27(3): 237-247.
- [2] 张绍梅, 张 娜. 肝癌治疗药物的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(2): 93-98.
- [3] 陈飞宇, 甘加宽, 任钧国, 等. 靶向肿瘤干细胞天然药物的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(8): 667-672.
- [4] 高 琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成份 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 14-16.
- [5] 张彦民, 王 楠, 代秉玲, 等. 塔斯品碱衍生物对人肝癌 SMMC7721 细胞生长的抑制作用研究 [J]. 中药材, 2011, 34(7): 1094-1097.
- [6] Roshan M M, Young A, Reinheimer K, *et al.* Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA) [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2): 379-386.
- [7] 施 勤, 刘继明, 张学光. 细胞凋亡的线粒体调控与 BCL-2 基因家族 [J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(1): 60-61.
- [8] Reubold T F, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(7): 1420-1425.
- [9] 周 桔, 罗荣保, 汤长发, 等. Bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(10): 1950-1952.