

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.007

· 基础研究 ·

去甲斑蝥素对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

张金梅¹, 吴杰¹, 常城², 朱尤庆² (1. 武汉市中心医院 消化内科, 湖北 武汉 430014; 2. 武汉大学 中南医院 消化内科, 湖北 武汉 430071)

[摘要] 目的: 研究去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡和 survivin 表达的影响。方法: MTT 法检测 NCTD 对 HepG2 细胞增殖的影响, Hoechst 33258 染色、Annexin V/PI 染色、DNA 琼脂糖电泳检测 NCTD 对 HepG2 细胞凋亡的影响, Western blotting 检测 NCTD 对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响。结果: NCTD 可显著抑制 HepG2 细胞的增殖, 呈质量浓度(5、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)依赖性, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD 作用 48 h 时 HepG2 细胞抑制率达(81.27 \pm 3.25)%。NCTD 作用 HepG2 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下可见 HepG2 细胞出现核固缩和核裂解现象; DNA 琼脂糖电泳显示, 基因组 DNA 呈现典型的凋亡梯状图形; 流式细胞术结果显示, 5、10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD 作用后, HepG2 细胞的凋亡率分别为(7.33 \pm 0.25)%、(18.23 \pm 1.19)%、(32.5 \pm 2.30)% 和(48.23 \pm 1.17)%。Western blotting 结果显示, 随着 NCTD 作用剂量的增加, HepG2 细胞中 survivin 蛋白的表达逐渐减少。结论: NCTD 能抑制 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡, 其凋亡的发生与下调 survivin 蛋白的表达有关。

[关键词] 去甲斑蝥素; 肝肿瘤; 凋亡; survivin

[中图分类号] R735.7; R730.54; R730.52 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2011)01-0033-05

Effect of norcantharidin on proliferation and apoptosis of hepatoma HepG2 cells

ZHANG Jin-mei¹, WU Jie¹, CHANG Cheng², ZHU You-qing² (1. Department of Gastroenterology, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, Hubei, China; 2. Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of norcantharidin (NCTD) on the proliferation, apoptosis and survivin expression of human hepatoma HepG2 cells. **Methods:** MTT assay was used to investigate the effect of NCTD on proliferation of HepG2 cells; Hoechst 33258 staining, Annexin V/PI staining, and agarose gel electrophoresis assay were used to examine the effect of NCTD on apoptosis of HepG2 cells. Western blotting analysis was used to examine the effect of NCTD on survivin expression in HepG2 cells. **Results:** Proliferation of HepG2 cells was markedly inhibited by NCTD in a dose-dependent manner (5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), with the inhibitory rate being (81.27 \pm 3.25)% after 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD treatment for 48 h. After HepG2 cells were treated with NCTD for 24 h, fluorescence microscopy revealed that the cell nuclei were condensed and fragmented, and agarose gel electrophoresis of DNA showed a typical DNA ladder map of apoptosis. Flow cytometry results showed that the apoptosis rates of HepG2 cells were (7.33 \pm 0.25)%, (18.23 \pm 1.19)%, (32.5 \pm 2.30)%, and (48.23 \pm 1.17)% after 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD treatments, respectively. Western blotting analysis results demonstrated that the survivin expression in HepG2 cells was significantly down-regulated with the increase of NCTD dosage. **Conclusion:** NCTD can inhibit proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells, which is related to the down-regulation of survivin protein.

[Key words] norcantharidin; liver neoplasmas; apoptosis; survivin

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 33-37]

[基金项目] 湖北省卫生厅科研基金资助项目(No. JX3B22)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Health Bureau of Hubei Province(No. JX3B22)

[作者简介] 张金梅(1979-),女,湖北省随州市人,主治医师,硕士,主要从事消化系统疾病的临床和基础研究工作

[通信作者] 吴杰(WU Jie, corresponding author), E-mail: wujie988@sina.com

[网络出版] 2010-12-01; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20101201.1552.009.html>

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)由斑蝥素的化学结构中去1,2位甲基而得到,在肿瘤尤其是晚期肿瘤的治疗中有着很好的应用前景^[1-5]。NCTD除了干扰微管正常功能、促进微管成束、阻滞细胞有丝分裂外,还可诱导细胞凋亡。因此微管相关蛋白或细胞周期和凋亡相关蛋白的变化都有可能与NCTD的作用有关。Survivin是与细胞周期密切相关的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP),在肿瘤细胞凋亡调控中起重要作用^[6-10]。本研究应用NCTD作用于肝癌HepG2细胞株,观察NCTD对肿瘤细胞凋亡及凋亡相关蛋白survivin表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

NCTD购自Sigma公司(No. N8784),以RPMI 1640(美国HyClone公司)助溶,终质量浓度为5 mg/ml,0.22 μm 滤器除菌,4℃保存,临用时加培养液稀释至所需浓度。噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst 33258染色试剂盒为南京凯基生物技术发展公司产品,DNA ladder检测试剂盒、碘化丙啶(PI)、蛋白酶K购自碧云天生物技术研究所以,胎牛血清培养基购自美国Gibco公司,抗survivin、β-actin一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗购自R&D公司。

1.2 细胞培养

人肝癌HepG2细胞株由武汉大学中南医院肿瘤实验中心提供。复苏后用含有10%灭活胎牛血清的RPMI 1640培养液(内含青霉素100 U/ml,链霉素100 U/ml)置37℃、5% CO₂加湿细胞培养箱内培养。每2~3 d换液1次,取对数生长期HepG2细胞进行实验。

1.3 MTT法检测NCTD对HepG2细胞增殖的影响

对数生长期HepG2细胞调整细胞密度至 1×10^5 /ml,取96孔板,每孔加入200 μl细胞悬液,培养24 h后弃去培养液,加入不同质量浓度NCTD(5、10、20和40 μg/ml),每浓度3个复孔,分别培养24、36、48 h,弃上清。每孔加入DMSO 150 μl,震荡均匀,测 D_{570} 值,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.4 Hoechst 33258染色检测NCTD对HepG2细胞形态的影响

以20 μg/ml的NCTD处理HepG2细胞,收集并调整细胞至 1×10^6 /ml,PBS洗涤2次。以甲醇和乙

酸混合物(3:1)固定细胞10 min以上,PBS洗涤2次,加入Hoechst 33258于暗室染色30 min,荧光显微镜下观察,照相。

1.5 琼脂糖电泳分析HepG2细胞DNA裂解片段

用胰酶消化收集 1×10^6 细胞,用PBS缓冲液洗涤2次,溶于1 ml细胞提取液中(0.1 mol/L NaCl,0.1 mol/L 蔗糖,0.01 mol/L EDTA,0.1 mol/L Tris-HCl 8.0)混匀,加入65 μl 10% SDS裂解细胞,65℃水浴30 min后加入200 μl 8 mol/L 醋酸钾,冰浴60 min,离心 $12\,000 \times g$,3 min,加入酚/氯仿1 ml,振荡,离心 $12\,000 \times g$ 10 min,取上清,加入0.6倍体积异丙醇,室温离心5 min,70%乙醇洗涤,干燥后加含20 μg/ml RNase的TE 15 μl,37℃消化30 min,加5 μl上样缓冲液。在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察并摄影。

1.6 AnnexinV/PI染色检测NCTD对人肝癌HepG2细胞凋亡的影响

以5、10、20、40 μg/ml NCTD处理肝癌HepG2细胞24 h,分别消化收集各组细胞,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,4℃PBS洗涤2次,弃上清液。加入预冷的结合缓冲液100 μl重悬细胞,置冰浴。加入10 μl AnnexinV-FITC和10 μl PI于细胞悬液中,轻轻混匀;将试管置于室温避光染色15 min。补加400 μl结合缓冲液混悬细胞,流式细胞仪检测凋亡细胞的百分率。

1.7 Western blotting法检测HepG2细胞survivin蛋白的表达

HepG2细胞经不同浓度NCTD作用24 h后,分别加入蛋白裂解缓冲液提取总蛋白,紫外分光光度计法进行蛋白定量,用60 μg/孔上样,10% SDS-PAGE分离,通过电转移法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜后,用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h。加入一抗(1:1 000鼠抗人survivin)4℃孵育过夜,TBST漂洗(10 min × 3次)后,加入二抗(辣根过氧化物酶标记的1:2 000兔抗鼠IgG)室温孵育1 h,TBST充分漂洗(10 min × 3次),化学发光试剂反应5 min,X线片暗室曝光,常规显影、定影。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件,采用方差分析和t检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCTD对HepG2细胞增殖的抑制作用

由不同质量浓度NCTD作用HepG2细胞24、36

及 48 h 后的细胞增殖曲线(图 1)可见,随着 NCTD 质量浓度升高,HepG2 细胞增殖抑制程度逐渐加剧。当 40 $\mu\text{g/ml}$ NCTD 作用 HepG2 细胞 48 h 后,HepG2 细胞增殖抑制率达到(81.27 \pm 3.25)% ($P < 0.01$)。

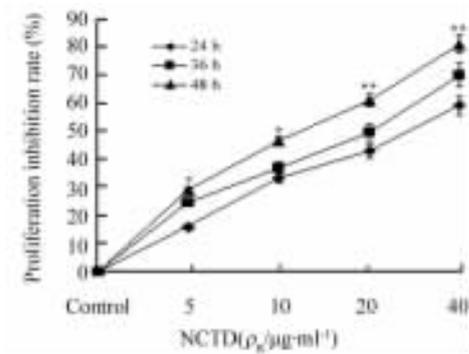


图 1 不同质量浓度 NCTD 抑制 HepG2 细胞的增殖

Fig.1 Different mass concentrations of NCTD inhibited proliferation of HepG2 cells

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

2.2 NCTD 诱导 HepG2 细胞凋亡

NCTD 处理 HepG2 细胞 24 h 后,Hoechst 33258 染色显示,部分 HepG2 细胞体积变小、出现核固缩和核裂解等细胞凋亡的形态特征,而对照组 HepG2 细胞凋亡形态不明显(图 2)。

DNA 裂解片段电泳显示,HepG2 细胞经 NCTD 作用 24 h 后,可见典型的“阶梯状”DNA 条带,大小约呈 200 bp 整倍数递增,DNA 裂解片段条带密度随 NCTD 剂量增大而增高(图 3)。由此可见,NCTD 可诱导 HepG2 细胞凋亡。

不同浓度 NCTD 作用 HepG2 细胞 24 h 后,收集各组细胞,AnnexinV/PI 染色检测细胞凋亡率。结果如图 4 所示,5、10、20 和 40 $\mu\text{g/ml}$ NCTD 作用后,肝癌细胞的凋亡率分别为(7.33 \pm 0.25)%、(18.23 \pm 1.19)%、(32.5 \pm 2.30)% 和(48.23 \pm 1.17)% ,呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

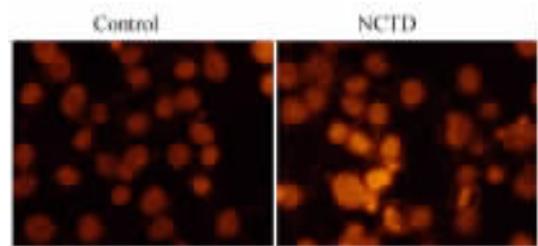


图 2 NCTD 诱导 HepG2 细胞凋亡(×400)

Fig.2 NCTD induced apoptosis of HepG2 cells(×400)

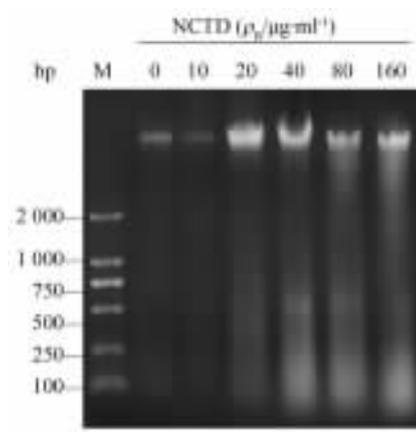


图 3 DNA 电泳分析 NCTD 诱导 HepG2 细胞凋亡

Fig.3 NCTD induced apoptosis of HepG2 cells as detected by DNA electrophoresis

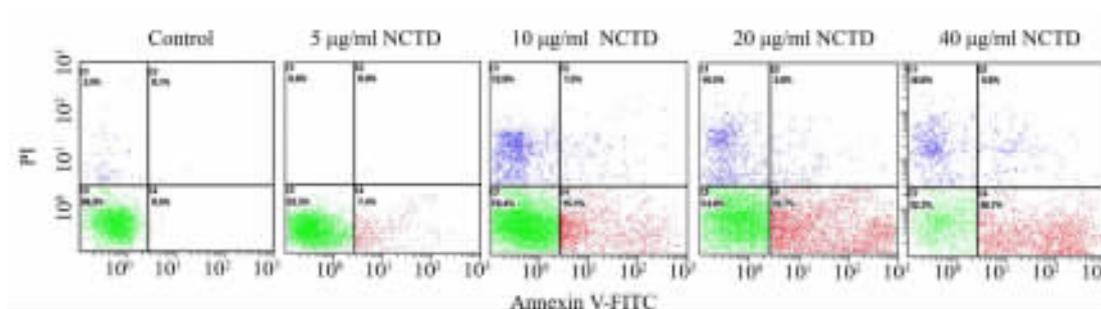


图 4 AnnexinV/PI 染色检测 NCTD 诱导 HepG2 细胞凋亡

Fig.4 Annenxin V/PI staining in detection of HepG2 cell apoptosis induced by NCTD

2.3 NCTD 抑制 HepG2 细胞 survivin 蛋白的表达
实验结果(图 5)显示,NCTD 作用 HepG2 细胞

24 h 后,随着 NCTD 质量浓度的增加,HepG2 细胞中 survivin 蛋白的表达逐渐减少($P < 0.05$)。

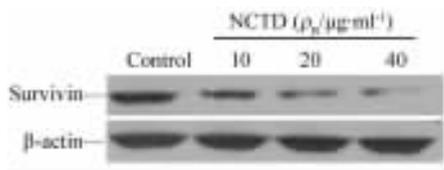


图5 NCTD 下调 HepG2 细胞中 survivin 蛋白的表达

Fig. 5 NCTD down-regulated survivin protein expression in HepG2 cells

3 讨论

原发性肝癌作为一种发病率很高的消化道肿瘤,治疗效果一直不理想^[11]。近年来顺铂等新化疗药物的应用虽大大提高了肿瘤细胞对药物的敏感性,但临床治疗效果仍然不甚满意^[12]。中草药作为我国传统药物,以其药物温和、毒性作用小的特点,受到临床的广泛关注。越来越多的研究证实,中药提取物在抗肿瘤方面有着不容忽视的作用。

据《本经》记载,斑蝥性味辛、寒,有大毒,归肝、肾、胃、大肠、小肠经,具有攻毒蚀疮、逐瘀散结的功效。其提取物 NCTD 不仅具有显著的抗癌作用,且毒性作用较小,同时具有上调白细胞、保护肝细胞、调节免疫功能等作用。临床上主要用于乳腺癌、食管癌及胃癌等的治疗。

本实验发现,NCTD 对肝癌 HepG2 细胞的增殖有抑制作用,各质量浓度组和各时间段的抑制率间比较均有统计学意义,呈明显的剂量-时间依赖性。目前认为,肝癌的发病与细胞凋亡失衡直接相关。核酸内切酶的活化是细胞凋亡的主要生物学标志,活化的核酸内切酶可将 DNA 降解,产生 180~200 bp 的寡核苷酸片段,在琼脂糖电泳中呈现典型的梯状条带。本研究中,随 NCTD 作用时间的延长,HepG2 细胞凋亡的 DNA 裂解条带密度明显增高。同时荧光显微镜下发现,NCTD 处理 HepG2 细胞 24 h 后,部分细胞体积明显变小、出现核固缩和核裂解现象^[13-14]。以上都结果表明,NCTD 可诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡。

细胞凋亡早期,在凋亡细胞出现典型 DNA 特征以前,细胞膜成分就已经发生了改变,位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜的内侧翻转至细胞膜外侧,暴露于细胞外环境中。AnnexinV 是一种能与磷脂酶结合的蛋白,可与暴露在细胞膜外的 PS 基团高亲和结合。因此,与荧光染料 FITC 相结合的 AnnexinV(AnnexinV-FITC)可作为特异的荧光探针在流式细胞术中标记凋亡细胞。AnnexinV-

FITC 与 PI 双染可进一步将早期凋亡细胞从活细胞、晚期凋亡细胞以及坏死细胞中区分出来^[15-17]。本研究结果发现,随着 NCTD 浓度的增加,HepG2 细胞凋亡率随之增加,呈明显的质量浓度依赖性。

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员之一,在肿瘤组织中几乎都高表达,与肿瘤细胞凋亡密切相关。Survivin 能够抑制 Fas、Bax、抗肿瘤药物等多种因素诱导的细胞凋亡,在调节细胞有丝分裂、细胞增殖等方面起着重要作用。在很多恶性肿瘤中 survivin 可以作为判断预后的标志之一,高表达 survivin 的肿瘤患者常预后不良,而且肿瘤细胞易发生耐药^[18-21]。研究 survivin 并设计针对 survivin 的药物有可能对于肿瘤防治具有重要意义。本实验用 Western blotting 方法分析 NCTD 对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响,结果显示,NCTD 组抗凋亡蛋白 survivin 表达下降,表明 NCTD 诱导肝癌细胞凋亡与抑制 survivin 蛋白表达有关。

综上所述,本实验证明 NCTD 对人肝癌 HepG2 细胞有较强的增殖抑制及诱导凋亡能力,为该药的临床应用提供了实验依据,NCTD 在肝癌的治疗方面是一种有应用前景的抗肿瘤药物。

[参考文献]

- [1] Peng C, Liu X, Liu E, et al. Norcantharidin induces HT-29 colon cancer cell apoptosis through the alpha V beta VI-extracellular signal-related kinase signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2302-2308.
- [2] Yang H, Guo W, Xu B, et al. Anticancer activity and mechanisms of norcantharidin-Nd3 II on hepatoma [J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(10): 1133-1137.
- [3] Liao HF, Su SL, Chen YJ, et al. Norcantharidin preferentially induces apoptosis in human leukemic Jurkat cells without affecting viability of normal blood mononuclear cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1678-1687.
- [4] Huang Y, Liu Q, Liu K, et al. Suppression of growth of highly-metastatic human breast cancer cells by norcantharidin and its mechanisms of action [J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(3): 209.
- [5] Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, et al. Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro* [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 72-80.
- [6] Chen YC, Chang SC, Wu MH, et al. Norcantharidin reduced cyclins and cytokines production in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Life Sci*, 2009, 84(7/8): 218-226.
- [7] Muchmore SW, Chen J, Jakob C, et al. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor of apoptosis protein survivin [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 173-182.
- [8] Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(17): 2708-2710.

- [9] Ryan BM, O' Donovan N, Duffy MJ. Survivin: A new target for anti-cancer therapy [J]. *Cancer Treat*, 2009, 35(7): 553-562.
- [10] Liu XY, Yao LL, Chen YJ, et al. Survivin is involved in the anti-apoptotic effect of edaravone in PC12 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327(1/2): 21-28.
- [11] Moriai R, Tsuji N, Moriai M, et al. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 117(2): 261-271.
- [12] 韩丹,叶胜龙,刘彬彬,等. Survivin 在原发性肝细胞癌中的表达及其与侵袭、转移的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(12): 1502-1504.
- [13] Bai Y, Li Q, Yang J, et al. p75(NTR) activation of NF-kappaB is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells [J]. *Neurosci Res*, 2008, 62(1): 9-14.
- [14] Qian YF, Wang H, Yao WB, et al. Aqueous extract of the Chinese medicine, Danggui-Shaoyao-San, inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome-c release and inactivating of caspase cascade [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(2): 304-311.
- [15] Wang L, Li Z, Wang C, et al. E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 481(1): 116-122.
- [16] Gao C, Jiang Y, Tan C, et al. Synthesis and potent antileukemic activities of 10-benzyl-9(10H)-acridinones [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(18): 8670-8675.
- [17] Wang LM, Li QY, Zu YG, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 176(2/3): 165-172.
- [18] 曹军,孙权,刘志苏. 维生素 E 联合顺铂抑制肝癌细胞 BEL-7402 体外增殖作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(11): 1456-1458.
- [19] Bremer E, van Dam G, Kroesen BJ, et al. Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: Current progress and prospects [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(8): 382-393.
- [20] Rosato A, Pivetta M, Parenti A, et al. Survivin in esophageal cancer: An accurate prognostic marker for squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7): 1717-1722.
- [21] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(2): 360-372.
- [收稿日期] 2010-09-02 [修回日期] 2010-12-17
[本文编辑] 王莹

· 编者 · 作者 · 读者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至全国带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。
4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给作者以下处理:书面警告、通知作者所在单位、在本领域相关期刊间通报、2年内本刊不刊登有其署名的稿件、相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿等。

(本刊编辑部)