

番荔枝内酯单体 Desacetylvaricin 对肝癌细胞株生长和凋亡的影响

陈孝银¹, 周光雄², 赵昌林¹, 夏芳¹, 毛慧君¹, 江振友³, 敖杰男¹

(暨南大学 1. 医学院中医系, 2. 药学院, 3. 医学院微生物学与免疫学教研室, 广东 广州 510632)

摘要: 【目的】探讨 Desacetylvaricin 在体外对肝癌 HepG2.2.15 细胞株生长和凋亡的作用及机制。【方法】处于生长期的人肝癌 HepG2.2.15 细胞分为 3 组: 对照组, Desacetylvaricin 组和顺铂组。用 MTT 法检测各组肿瘤细胞增殖情况, 流式细胞仪检测各组细胞周期、细胞凋亡以及凋亡基因 Fas 的表达情况, 比较 Desacetylvaricin 与顺铂的疗效。【结果】Desacetylvaricin 对肝癌细胞增殖的抑制率高达 62.2%。Desacetylvaricin 抑制肝癌细胞增殖的机制可能为阻滞肝癌 HepG2.2.15 细胞从 G₁ 期进入 S 期, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖, 同时通过促进 Fas 表达, 诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡。其诱导 Fas 表达的效果还优于顺铂。【结论】Desacetylvaricin 可能通过延缓细胞 G₁ 期及诱导细胞凋亡等机制, 对肝癌细胞的增殖有一定的抑制作用。

关键词: Desacetylvaricin; 肝癌; 细胞周期; 细胞凋亡; Fas 基因

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0254-04

Effect of a Monomer Desacetylvaricin of Annonaceous Acetogenin on Growth and Apoptosis of Hepatoma Carcinoma Cell Strain

CHEN Xiao-yin¹, ZHOU Guang-xiong², ZHAO Chang-lin¹, XIA Fang¹, MAO Hui-jun¹,
JIANG Zhen-you³, AO Jie-nan²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College, 2. Pharmaceutical College, 3. Department of Microbiology and Immunology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of desacetylvaricin on the growth and apoptosis of hepatoma carcinoma cell strain and its mechanism in vitro. 【Method】Human hepatoma cells HepG2.2.15 in proliferative phase were divided into three groups: Control group, Desacetylvaricin group, and Cisplatin group. Proliferation of tumor cells in each group was tested by MTT method. Cell cycle, cell apoptosis, and expression of Fas gene of tumor cells in each group was detected by flow cytometer. Inhibitive effect on tumor cells was compared between desacetylvaricin and cisplatin. 【Results】The inhibitive rate on proliferation of hepatoma cells by desacetylvaricin reached up to 62.2%. Parts of the intrinsic mechanism might relate to the blockage of HepG2.2.15 cells to go to S period from G₁ period thus to inhibit tumour cell proliferation, and the induction of HepG2.2.15 apoptosis by promoting expression of Fas gene. Besides, desacetylvaricin showed more notable effect on promoting Fas gene expression compared with cisplatin. 【Conclusion】Desacetylvaricin can inhibit proliferation of hepatoma cells by prolonging G₁ period of cell cycle, and inducing cell apoptosis.

Key words: desacetylvaricin; hepatoma; cell cycle; cell apoptosis; Fas gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):254-257]

肝癌是常见的恶性肿瘤, 早期手术切除是首选的、最有效的治疗方法^[1], 但多数病人发现肝癌

时已属晚期, 失去了手术机会^[2], 因此, 提高肝癌病人的生存率主要依赖早期诊断、早期手术及有效

收稿日期: 2006-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(30400575); 广东省自然科学基金(06025151); 广东省科技计划基金(2005B30101012)

作者简介: 陈孝银(1970-), 男, 安徽芜湖人, 博士, 副教授, E-mail: tchenxiaoyin@nu.edu.cn

的综合治疗^[3]。然而,包括顺铂在内的化疗药物均尚未被证实可提高肝癌病人的生存率^[4]。番荔枝内酯是从番荔枝科植物中提取的一类化合物,研究显示大多数番荔枝内酯类化合物对体外培养的肿瘤细胞普遍具有强大的细胞毒作用^[5],其中一些单体如 bullatacin 还可逆转肿瘤细胞的多药耐药作用^[6],番荔枝内酯的研究已经成为国内外植物化学和肿瘤药理学研究的新热点。遗憾的是,目前已提纯的番荔枝内酯类化合物单体毒性太大,其体外的抗癌活性难以在体内重复,限制了其体内抗肿瘤作用的研究^[7]。Desacetylurvaricin 是从番荔枝科植物中提取出的一种新型化合物单体,为白色针状晶体,分子式为 $C_{37}H_{66}O_6$ ^[8],其毒性较低。我们前期研究^[9]发现含有 Desacetylurvaricin 的复方中药具有一定的抗乙肝病毒和肝纤维化的作用,并对一些抑癌基因的表达有一定促进作用,但是其是否对乙肝后肝癌及肝癌癌前病变有治疗或预防作用,其是否有抗肿瘤作用,以及作用机制等尚不明确。本研究采用 MTT 法,免疫荧光染色结合流式细胞仪,观察 Desacetylurvaricin 在体外对肝癌细胞株的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 RPMI-1640 培养基,美国 GIBCO 公司。胎牛血清,中国医学科学院血液病研究所(天津)产品。胰蛋白酶,华美公司产品。四噻唑蓝、碘化丙啶(PI)及免疫荧光标记的 Fas 抗体,胰酶抑制酶(RNase),美国 Sigma 公司产品。

1.1.2 器材 倒置显微镜,37 \times AZ 型,上海光学仪器厂。流式细胞仪(FACS)、酶联免疫检测仪,美国 Becton Dickinson 公司生产。相差显微镜,日本 Olymapus 公司产品。台式高速及低速离心机,上海医用分析仪器厂。

1.1.3 药物 顺铂(DDP),齐鲁制药厂生产,批号(91)861-82。Desacetylurvaricin(由暨南大学药学院周光雄博士提纯提供)。

1.1.4 癌株 肝癌 HepG2.2.15 细胞株,购自南方医科大学肝病研究中心。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法

液氮冻存的人肝癌 HepG2.2.15 细胞株经复苏

后培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱中孵育。细胞贴壁生长后取对数生长期的细胞以备试验之用。选择对数生长期细胞,用 0.25%胰酶消化 5-8 min,按每孔 5×10^4 /mL 的密度加于 96 孔培养板中,每孔 200 μ L。分别加入 200 μ g/mL Desacetylurvaricin、20 μ g/mL 顺铂每孔 10 μ L,同时设置每孔加 10 μ L 的培养液作为对照组和不接种细胞的空白孔。置 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱中培养 96 h,每 24 h 加入 MTT10 μ L/孔,孵育 4 h 后弃上清液,加入 DMSO 150 μ L/孔,轻轻振荡 10 min 左右,充分融解结晶物;在酶联免疫检测仪上以 570 nm 波长测定各孔光吸收值(A 值),并计算不同药物对 HepG2.2.15 细胞的生长抑制率^[10]。

1.2.2 流式细胞仪法

对数生长期的细胞,胰酶消化后,以 5×10^4 /mL 的密度传代、接种,贴壁后加入 DMEM 培养基培养 24 h,分别加入 200 μ g/mL Desacetylurvaricin、20 μ g/mL 顺铂每孔 10 μ L,加等体积的培养液作为对照组;继续培养 48 h,胰酶消化成单细胞悬液,冰 PBS 洗涤 2 次,1 000 \times g 离心 5 min,弃上清,缓慢加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的 70%乙醇,4 $^{\circ}$ C 过夜。取细胞悬液,PBS 洗涤,1 000 \times g 离心 5 min 后,弃上清。PI 染液 1.0 mL 染 30 min,混合液过 300 目滤网以除去杂质,488 nm 激发波长测定样品,620 nm 带通滤片检测 PI 荧光。每样本收集多于 10 000 个荧光信号^[11]。在流式细胞仪上作细胞凋亡、细胞周期和细胞 Fas 基因表达分析。计算细胞增殖指数(Proliferation Index,PI):PI=处于 S 期和 G₂ 期的细胞数/处于 G₁ 期、S 期和 G₂ 期的细胞数 \times 100%。

1.2.3 统计学处理

所得数据均以表示,SPSS 13.0 统计分析软件包进行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 Desacetylurvaricin 抑制 HepG2.2.15 细胞增殖

Desacetylurvaricin 的细胞生长抑制率为 62.2%,DDP 的抑制率 86%,虽然 Desacetylurvaricin 的抑制率低于 DDP 的抑制率,但是已经明显高于 50%的有效标准(表 1)。

2.2 Desacetylurvaricin 对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

表 1 各组 HepG2.2.15 细胞的吸光值

Table 1 A value of HepG2.2.15 cells in each group (n=9, $\bar{x} \pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	0.635 ± 0.072	0.924 ± 0.069	1.458 ± 0.067	1.723 ± 0.066
DDP	0.592 ± 0.068 ^{1,2)}	0.568 ± 0.070 ^{1,2)}	0.430 ± 0.074 ^{1,2)}	0.242 ± 0.065 ^{1,2)}
Desacetylvaricin	0.621 ± 0.071 ¹⁾	0.858 ± 0.058 ¹⁾	0.876 ± 0.055 ¹⁾	0.651 ± 0.055 ¹⁾
F	4.32	5.27	4.65	5.89
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

1) vs control group, P < 0.01; 2) vs Desacetylvaricin group, P < 0.01

与对照组相比, Desacetylvaricin 和顺铂均可增加处于 G₁ 期细胞数并减少 S 期细胞数, 延长肿

瘤细胞的 G₁ 期并阻碍其向 S 期转化。两者效果相比, 没有显著差异(图 1, 表 2)。

表 2 Desacetylvaricin 对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

Table 2 Effect of desacetylvaricin on cell cycle of HepG2.2.15 (n=9, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	G ₀ / G ₁	G ₁	S	G ₂ / M
Control	75.6 ± 2.3	6.1 ± 0.2	17.6 ± 1.4	6.7 ± 0.7
DDP	74.8 ± 1.9	12.6 ± 0.15 ¹⁾	12.2 ± 1.3 ¹⁾	3.1 ± 0.4 ¹⁾
Desacetylvaricin	74.8 ± 2.2	12.4 ± 0.16 ¹⁾	11.9 ± 1.2 ¹⁾	3.3 ± 0.6 ¹⁾
F	17.86	5.63	5.29	4.38
P	> 0.05	< 0.01	< 0.01	> 0.01

1) vs control group, P < 0.05

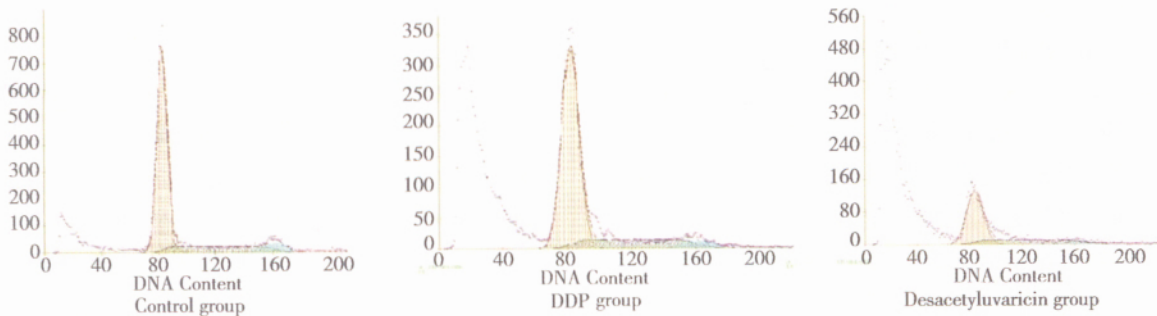


图 1 Desacetylvaricin 对 HepG2.2.15 细胞周期的影响

Fig.1 Effect of Desacetylvaricin on cell cycle of HepG2.2.15

2.3 Desacetylvaricin 诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

与对照组相比, Desacetylvaricin 和顺铂均可显著增加肝癌细胞的凋亡率, 两者效果相比, 没有显著差异(图 2, 表 3)。

表 3 Desacetylvaricin 诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

Table 3 Apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by desacetylvaricin

Group	Apoptosis cells	Total cells	Apoptosis rate(%)
Control	1693 ± 87	12 000	14.1 ± 0.72
DDP	6344 ± 103 ¹⁾	12 000	52.9 ± 0.86 ¹⁾
Desacetylvaricin	6586 ± 12 ¹⁾	12 000	54.3 ± 0.93 ¹⁾
F	4.58	4.58	
P	< 0.01	< 0.01	

1) vs control group, P < 0.01

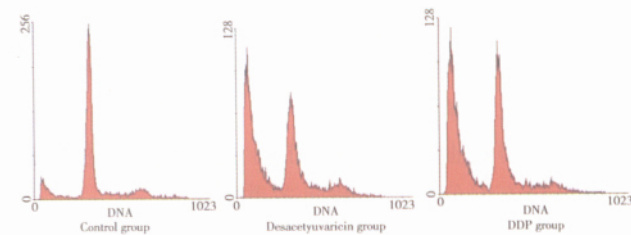


图 2 Desacetylvaricin 诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡

Fig.2 Apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by desacetylvaricin

2.4 Desacetylvaricin 诱导 HepG2.2.15 细胞 Fas 表达

如表 4 所示, Desacetylvaricin 组较对照组及顺铂组的 Fas 阳性细胞数为多, 表明 Desacetylvaricin 可能通过激活 Fas 基因诱导肿瘤细胞凋亡(图 3)。

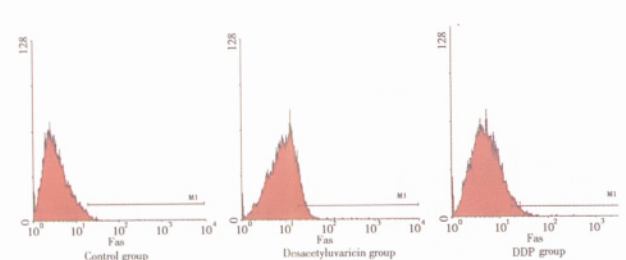


图 3 Desacetylvaricin 诱导 HepG2.2.15 细胞 Fas 表达

Fig.3 Expression of Fas in HepG2.2.15 cells induced by Desacetylvaricin

表4 Desacetylurvaricin 诱导HepG2.2.15细胞Fas表达
Table 4 Expression of Fas in HepG2.2.15 cells induced by Desacetylurvaricin

Group	Apoptosis cells	Total cells	Apoptosis rate(%)
Control	142 ±22	12 000	1.4 ±0.18
DDP	370 ±33 ¹⁾²⁾	12 000	3.7 ±0.28 ¹⁾²⁾
Desacetylurvaricin	611 ±41 ¹⁾	12 000	6.1 ±0.34 ¹⁾
F	5.59		5.59
P	< 0.01		< 0.01

1) vs control group, P< 0.01; 2) vs Desacetylurvaricin group, P< 0.01

3 讨论

番荔枝内酯类化合物对肿瘤细胞具有较强的细胞毒作用,对其抗肿瘤研究是目前国际上植物药研究的热点之一。中草药中有很多属于番荔枝科植物,开展番荔枝内酯的肿瘤药理学研究对中医药抗肿瘤研究有一定的普遍意义。然而目前提纯的大多数番荔枝内酯单体细胞毒性作用太强,阻碍了其体内试验的进行。为寻找新的低毒且具有良好抗肿瘤作用的番荔枝内酯单体,我们前期研究发现含有Desacetylurvaricin的中药复方,其有一定的抗乙型肝炎病毒和肝纤维化的作用,并对一些抑癌基因的表达有一定促进作用^[9],但其是否对乙肝后肝癌及肝癌前病变有治疗或预防作用,其是否有抗肿瘤作用等尚不明确。本研究我们以HepG2.2.15细胞株作为研究对象,从肿瘤发生的两大重要环节——逃逸凋亡和无限增殖入手,探讨了Desacetylurvaricin在体外对肝癌细胞株生长及凋亡的影响。

MTT检测各组肝癌HepG2.2.15细胞增殖情况显示,Desacetylurvaricin对HepG2.2.15细胞的增殖具有明显抑制作用,其抑制效应强于顺铂。为进一步阐明Desacetylurvaricin抑制HepG2.2.15细胞增殖的机制,我们从细胞周期角度进行深入研究。在细胞周期的进程中,从G₁期向S期转变时存在一个被称为限制点(restriction point, R point)的调控点,G₁期细胞通过此点可进入S期,否则细胞周期的进程将发生滞留。肿瘤细胞的细胞周期中R点消失,其生长、分裂失去控制,因此阻止肿瘤细胞进入S期是抑制肿瘤细胞增殖的一个重要措施^[12, 13]。流式细胞仪检测细胞周期结果显示Desacetylurvaricin可减少S期细胞数并增加G₁期细胞数,表明Desacetylurvaricin延迟了肿瘤细胞G₁期并阻碍其向S期转化,具有G₀/G₁期阻滞作用,从

而抑制了肿瘤细胞增殖。其效果与顺铂相比,没有显著差异。

肿瘤发生机制的研究表明除细胞过度增殖这一途径外,凋亡不足、细胞死亡不足是肿瘤发病的另一途径。肿瘤细胞逃逸凋亡,将导致病变组织内肿瘤细胞存活延长,使肿瘤细胞群体内存活与死亡的平衡被破坏,存活大于死亡,肿瘤细胞数目的净增长加大,因此诱导肿瘤细胞凋亡是肿瘤治疗的又一重要手段^[14, 15]。流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示Desacetylurvaricin可增加肿瘤细胞的凋亡率,显示出Desacetylurvaricin良好的诱导凋亡作用。其效果与顺铂相比,没有显著差异。凋亡的分子机理十分复杂,许多基因的变化参与此过程,为进一步探讨Desacetylurvaricin诱导凋亡的机制,我们选取了经典促凋亡基因Fas^[16],研究Desacetylurvaricin对Fas表达的影响。免疫荧光染色结合流式细胞仪检测Fas阳性细胞结果显示,Desacetylurvaricin组较空白对照组及顺铂组的Fas阳性细胞数增多,表明Desacetylurvaricin可能通过激活Fas基因诱导肿瘤细胞凋亡,重新恢复肿瘤细胞群体内存活与死亡的平衡。

本研究结果显示Desacetylurvaricin可阻滞肝癌HepG2.2.15细胞的有丝分裂,从而抑制了肿瘤细胞的增殖,同时通过促进Fas表达,诱导HepG2.2.15细胞凋亡。其诱导Fas表达的效果优于顺铂。

参考文献:

- [1] SASAKI Y, YAMADA T, TANAKA H, et al. Risk of recurrence in a long-term follow-up after surgery in 417 patients with hepatitis B- or hepatitis C-related hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg*, 2006, 244 (5): 771- 780.
- [2] CHERQUI D. Surgery for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease [J]. *Br J Surg*, 2006, 93(10):1179- 1181.
- [3] ZHANG Q, CHEN G, PENG L, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21):6523- 6531.
- [4] JIANG B K, CHUNG W J, PARK K S, et al. The efficacy of hepatic arterial infusion therapy for advanced hepatocellular carcinoma according to extrahepatic collateral feeding vessels [J]. *Korean J Hepatol*, 2005, 11 (4): 359- 370.

(下转第267页 to page 267)

荧光逐渐减弱; 皮肤干细胞能逐渐排出 Hoechst 33342, 标记的细胞荧光随标记时间延长而逐渐减弱。但是, 在本实验进行的 10 d 内, 皮肤干细胞的 Hoechst 虽有衰减, 仍保持了胞核的蓝色荧光。

本研究通过把带有 Hoechst 33342 标记的恒河猴皮肤干细胞在体外横向诱导分化为结膜上皮细胞, 为组织工程结膜提供了新型的种子细胞, 并为严重结膜损伤眼表疾病的治疗展示了曙光。

参考文献:

- [1] 龙崇德, 葛 坚, 高前应, 等. 胚胎干细胞联合羊膜移植治疗早期严重眼化学伤的实验研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(2): 188- 192.
 - [2] 黄丹平, 郑建梁, 高前应, 等. 兔结膜基质诱导人骨髓间质干细胞分化的初步研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(1): 24- 28.
 - [3] 刘建康, 孙 宏. 表皮细胞的体外培养. 见: 薛庆善, 主编. 体外培养原理技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 409- 421.
 - [4] TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V, et al. Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin [J]. Science, 2004, 303(5656): 359- 363.
 - [5] JONES P H, HARPER S, WATT F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis [J]. Cell, 1995, 80(1): 83- 93.
 - [6] LYLE S, CS M, LIU Y, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells [J]. J Cell Sci, 1998, 111(Pt 21): 3179- 3188.
 - [7] WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. Nature, 1997, 385(6619): 810- 813.
 - [8] 黄 冰, 王智崇, 葛 坚, 等. 利用皮肤干细胞的横向分化重建角膜上皮的初步研究 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(10): 838- 842.
 - [9] KURPAKUS M A, MANIACI M T, ESCO M. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium [J]. Curr Eye Res, 1994, 13 (11): 805- 14.
 - [10] 孙 勇, 侍 坚, 富赛里, 等. 胚胎神经干细胞移植及胶质细胞源性神经营养因子对大鼠脊髓损伤的修复作用 [J]. 生理学报, 2003, 55(3): 349- 354.
 - [11] 张仁礼, 李海标. 胚胎干细胞源表皮样干细胞分化潜能的初步研究 [J]. 解剖学报, 2004, 35(1): 65- 68.
- (编辑 徐 杰)
-
- (上接第 257 页 from page 257)
- [5] YUAN S S, CHANG H L, CHEN H W, et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and Caspase- 3-related pathway [J]. Life Sci, 2003, 72(25): 2853- 2861.
 - [6] 李艳芳, 符立梧. 番荔枝内酯抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 245- 247.
 - [7] 钟 利, 楼丽广, 胥 彬. 番荔枝科植物抗癌活性成分研究的新结果[J]. 肿瘤, 2003, 23(2): 162- 163.
 - [8] 李朝明, 孙汉董, 郑惠兰, 等. 滇产圆滑番荔枝中的番荔枝内酯[J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 221- 224.
 - [9] CHEN X Y, TONG G D, XIA F. Antiviral effect of Chinese medicine jiaweinisan on hepatitis B virus transgenic mice [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14): 2280- 2283.
 - [10] LI Y, RAFFO A J, DREW L, et al. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine- 143[J]. Cancer Res, 2003, 63(7): 1527- 1533.
 - [11] SCHMIDT M, HOURFAR M K, NICOL S B, et al. A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions [J]. Transfusion, 2006, 46(8): 1367- 1373.
 - [12] LI J, CHEN X, DONG X, et al. Specific COX- 2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21 (12): 1814- 1820.
 - [13] SCHINDBECH C, KAMPIK T, JANNI W, et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(6): R1174- 1185.
 - [14] HILL S C, YOUDE S J, MAN S, et al. Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis [J]. J Immunol, 2005, 174(1): 41- 50.
 - [15] YAN P, BENHATTAR J, SEELENTAG W, et al. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 121(5): 391- 397.
 - [16] ERB P, JI J, WEMLI M, et al. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation [J]. Immunol Lett, 2005, 100(1): 68- 72.
- (编辑 徐 杰)