

· 硕博专栏论著 ·

# 毛萼乙素诱导肝细胞癌细胞凋亡的实验研究

白海燕<sup>1,2</sup>, 谢丹<sup>2</sup>, 廖奕佳<sup>2</sup>, 买世娟<sup>2</sup>, 阳桂香<sup>1</sup>, 普建新<sup>3</sup>, 李朝晖<sup>1</sup>

(1.中山大学中山医学院法医系, 广东 广州 510080; 2.中山大学肿瘤防治华南国家重点实验室, 广东 广州 510060; 3.中国科学院昆明植物所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:**目的 研究毛萼乙素抑制肝癌肿瘤细胞增殖的机制。方法 利用 MTT 实验检测毛萼乙素对肝癌肿瘤细胞株增殖的影响, 采用 Hoechst 染色法检测毛萼乙素是否能引起人肝癌细胞株 HepG2 的凋亡, 采用 Western-blotting 检测凋亡相关蛋白 Bax 和 PARP 的表达水平, 免疫荧光技术检测 Bax 的表达水平。结果 毛萼乙素可以明显抑制肝癌细胞的生长, Hoechst 染色实验发现毛萼乙素可以诱导肝癌细胞的凋亡, Western-blotting 实验检测到实验组 Bax 高表达, 凋亡蛋白 PARP 的剪切带与对照组相比也明显增强。免疫荧光实验也显示, 实验组 Bax 高表达。结论 毛萼乙素可通过升高促凋亡蛋白 Bax 的表达, 促进肝癌细胞株 HepG2 的凋亡, 从而抑制其增殖。

**关键词:**毛萼乙素; 肝癌; 细胞凋亡; Bax; PARP

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3619(2013)05-0535-03

## Eriocalyxin B induces apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cells

BAI Hai-yan<sup>1,2</sup>, XIE Dan<sup>2</sup>, LIAO Yi-ji<sup>2</sup>, MAI Shi-juan<sup>2</sup>, YANG Gui-xiang<sup>1</sup>, PU Jian-xin<sup>3</sup>, LI Zhao-hui<sup>1</sup>

(1. Faculty of Forensic Medicine, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangdong, Guangzhou 510080;

2. State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangdong, Guangzhou

510060; 3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Yunnan, Kunming, 650201, China)

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of the growth inhibitory effect of Eriocalyxin B (EriB) on HCC.

**Methods** The growth inhibitory effect of EriB on HCC cells was measured by MTT assay. The effect of EriB on cell apoptosis was investigated by Hoechst staining. Apoptosis proteins were detected by Western-blotting and immunofluorescent staining.

**Results** EriB had significant growth inhibitory effect on HCC cells in a dose-dependent manner. Hoechst staining indicated that EriB could induce cell apoptosis in hepatocellular carcinoma. And after treatment by EriB, the apoptosis protein Bax, cleaved-PARP was increased in the experimental group. Immunofluorescent staining also confirmed the expression level of Bax in EriB treatment group was higher than that in the control group.

**Conclusion** EriB may inhibit HCC growth by elevating the expression of Bax and promoting the HepG2 cells apoptosis.

**Key words:** Eriocalyxin B; hepatocellular carcinoma; cell apoptosis; Bax; PARP

肝癌是全球第五大常见癌症, 占有所有癌症的 5.6%, 全球 50% 以上的肝癌发生在我国, 慢性乙肝、丙型肝炎病毒是其最主要的病因(约 80%), 其次是酒精、药物、摄食含有黄曲毒素的食物等<sup>[1]</sup>。因此, 开发具有抗肝癌肿瘤活性的新药成为当今科研工作者的使命。二萜类化合物的抗肿瘤活性一直以来备受天然药物研究者的关注, 其中以紫杉醇及其衍生物对耐药的乳腺癌和卵巢癌的疗效为典

型代表。毛萼乙素是从毛萼香茶菜属分离鉴定出来的, 具有对映~贝壳杉型结构的一种二萜类化合物, 研究表明, 该化合物在体外可抑制多种肿瘤细胞株的增殖<sup>[2-5]</sup>。本研究主要探讨毛萼乙素抑制肝癌肿瘤细胞 HepG2 增殖的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 毛萼乙素来自中国科学院昆明植物所; MTT (噻唑蓝)、RPMI-1640、DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Hoechst33342 购自美国 Invitroge 公司; 抗体 Bax、PARP、 $\alpha$ -tubulin 均购自美国 Cell Signaling 公司; 肝癌细胞株 PLC-8024、BEL-7402、HepG2 均来

基金项目: 国家自然科学基金(81225018 和 81172340)

作者简介: 白海燕(1987-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事法医学病理学研究

通讯作者: 李朝晖(1957-), 男, 博士, 副教授, 主要从事法医学病理及颅脑损伤研究, E-mail: zhaohuil118@yahoo.com.cn

自中山大学肿瘤防治中心。

1.1.2 仪器 超净工作台购自苏州集团苏州安泰空气技术有限公司;二氧化碳培养箱购自美国 FORMA 公司;酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;倒置荧光显微镜购自德国 Zeiss 公司;激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株 BEL-7402 常规培养于 5%胎牛血清、1640 培养基中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内全湿条件下培养。人肝癌细胞株 HepG2、PLC-8024 常规培养于 5%胎牛血清、DMEM 培养基中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内全湿条件下培养。

1.2.2 MTT 实验 MTT 法检测毛萆乙素对 BEL-7402、HepG2、PLC-8024 细胞的体外细胞毒性。将处于对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 5×10<sup>4</sup>/ml,待细胞处于对数生长期后分别加入不同浓度 (2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μmol/L) 的毛萆乙素(毛萆乙素先溶于 DMSO,再用培养液稀释至所需浓度),空白对照组只加培养液。孵育 24 h 后每孔加入 20 μl MTT,4 h 后吸去药物,每孔加入 150 μl 的 DMSO 溶解,并在酶标仪下于 570 nm 处检测细胞活性,按以下公式计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率=(1-实验孔吸光值/空白对照孔吸光值)×100%。

1.2.3 Hoechst 染色实验 将 5×10<sup>4</sup>/ml HepG2 铺到 6 孔板中,待细胞贴壁后,加入毛萆乙素(0、10.0 μmol/L)作用 24 h 后,PBS 清洗一遍,每孔加入 2 ml 4%的多聚甲醛固定 30 min,然后加入 20 μg/ml 的 Hoechst33342 染液,室温避光染色 15 min,最后用荧光显微镜观察细胞核形态变化。

1.2.4 采用 Western-blotting 和免疫荧光法检测相关凋亡蛋白表达 将处于对数生长期的 HepG2 细胞用胰酶消化后,用含 5%胎牛血清的培养基配成细胞悬液,充分混匀,以 5×10<sup>4</sup> 个/孔密度接种于 6 孔细胞培养板中,经不同浓度的毛萆乙素作用 24 h 后,收集实验组和对照组所有细胞的全细胞蛋白。蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并电转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后加入一抗。4℃过夜后加入二抗,室温孵育 2 h,暗室曝光;并将 α-Tubulin 蛋白表达量作为内参。毛萆乙素(0、10.0 μmol/L)作用于 HepG2 细胞 24 h 后,细胞经 4%多聚甲醛固定和 0.5% TritonX-100 穿孔后,用 1%羊血清于 37℃温箱封闭 30 min 后加入一抗(Bax),37℃孵育 1.5 h 后加入荧光二抗,37℃避光孵育 1.5 h 后,加入配好的 DAPI 染液,避光室温放置 10 min,用含抗淬灭剂的封片液封片后,于激光共聚焦显微

镜下观察结果。

2 结果

2.1 毛萆乙素明显抑制多株肝癌肿瘤细胞生长 MTT 实验显示,毛萆乙素可以明显抑制肝癌肿瘤细胞 HepG2、BEL-7402、PLC-8024 的生长,毛萆乙素作用 24 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 9.13、13.4、15.7 μmol/L (图 1)。

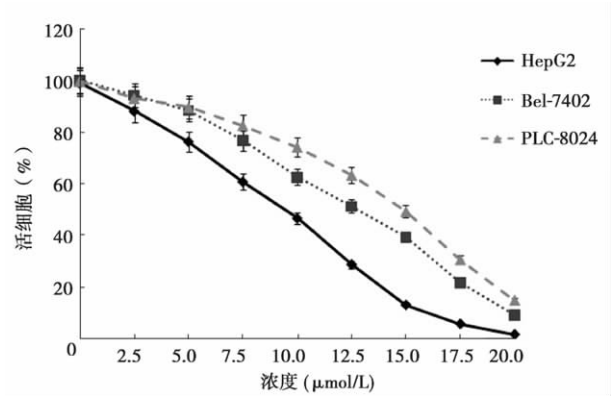


图 1 毛萆乙素对肝癌肿瘤细胞活性的影响

Fig.1 Effect of EriB on the viability of HCC cells

2.2 毛萆乙素诱导肝癌细胞凋亡 毛萆乙素作用 24 h 后,Hoechst 染色发现 HepG2 的细胞核发生固缩,并伴有凋亡小体的出现,以上现象证明毛萆乙素能诱导肝癌细胞凋亡(图 2)。

2.3 毛萆乙素作用 HepG2 细胞后凋亡蛋白的变化 Western-blotting 实验检测到,经不同浓度的毛萆乙素作用 24 h 后,HepG2 细胞中凋亡相关蛋白 Bax 和 cleaved-PARP 的表达量明显高于对照组。Bax 蛋白的免疫荧光染色实验也证实实验组 Bax 出现高表达(图 3)。

图 2~图 3 见封二。

3 讨论

肝癌是我国癌症中的第二号杀手,临床用于肝癌治疗的药物不但治疗效果不理想,而且还有严重的副作用。因此,寻找新型有效的抗肝癌药物非常必要。据统计,从 1981 年到 2010 年的近 30 年开发并用于临床的抗肿瘤药物中有约 79% 的药物是来源于天然药物或是与其相关的衍生物<sup>[6]</sup>。二萜类化合物是一种十分重要的天然产物,广泛存在于自然界,资源十分丰富,具有多种生物活性,作为潜在的抗肿瘤活性物质来源具有较高的研究价值<sup>[7-12]</sup>。毛萆乙素是从毛萆香茶菜属分离鉴定出来且具有对映-贝壳杉型结构的一种二萜类化合物,本研究

发现毛萼乙素可以显著抑制肝癌细胞增殖并诱导肝癌细胞凋亡。

细胞凋亡的发生往往伴随着胞内一系列相关蛋白表达的变化, Bcl-2 家族在细胞凋亡调控中有重要作用, 是目前细胞凋亡研究的热点之一。Bcl-2 家族分为抑制凋亡和促进凋亡蛋白两大类。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。在多数肿瘤中, Bcl-2 表达水平升高, 而 Bax 表达下降。上调 Bcl-2 或下调 Bax 能抑制多种因素诱导的多种肿瘤细胞凋亡。反之, 下调 Bcl-2 或上调 Bax 则促进多种肿瘤细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>。根据文献报道, Bax 的上调可以促进 Cytochrome C 的释放, Cytochrome C 的释放又可以激活 Caspase 通路, 导致 PARP 水解成 cleaved-PARP, 最终引起细胞的凋亡<sup>[16-18]</sup>。Western-blot 实验发现, 经毛萼乙素处理后 HepG2 细胞中 Bax 蛋白和 cleaved-PARP 表达上调, 免疫荧光实验再次证明促凋亡蛋白 Bax 在实验组高表达。因此推断, 毛萼乙素可通过上调 Bax 而激活下游一系列凋亡通路, 进而使 PARP 水解, 最终导致肝癌细胞凋亡。

综上所述, 本研究发现毛萼乙素可以显著抑制肝癌肿瘤细胞的增殖并诱导其发生凋亡。结合以前的文献报道, 毛萼乙素显示了良好的抗肿瘤活性, 具备开发为新型抗肿瘤药物的潜质, 但毛萼乙素的临床应用还有待于更多的实验研究。

#### 参考文献

- [1] 刘允怡, 赖俊雄. 肝癌治疗新进展 [J]. 临床外科杂志, 2007, 15 (1): 2-7.
- [2] Zhang YW, Jiang XX, Chen QS, et al. Eriocalyxin B induces apoptosis in lymphoma cells through multiple cellular signaling pathways [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(3): 191-201.
- [3] Lu Y, Chen B, Song JH, et al. Eriocalyxin B ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(6): 2258-2263.
- [4] Li L, Yue GG, Lau CB, et al. Eriocalyxin B induces apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic adenocarcinoma cells through caspase- and p53-dependent pathways [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2012, 262(1): 80-90.
- [5] Wang Z, Yuan Q, Sun JH, et al. A validated HPLC method for the determination of eriocalyxin B in plasma and its application to pharmacokinetic studies [J]. *Arzneimittel Forsch*, 2012, 62(12): 666-669.
- [6] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 311-335.
- [7] Xu HZ, Huang Y, Wu YL, et al. Pharicin A, a novel natural ent-kaurene diterpenoid, induces mitotic arrest and mitotic catastrophe of cancer cells by interfering with BubR1 function [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(14): 2897-2907.
- [8] Gu ZM, Wu YL, Zhou MY, et al. Pharicin B stabilizes retinoic acid receptor-alpha and presents synergistic differentiation induction with ATRA in myeloid leukemic cells [J]. *Blood*, 2010, 116(24): 5289-5297.
- [9] Zou J, Du X, Pang G, et al. Ternifolide A, a new diterpenoid possessing a rare macrolide motif from *Isodon ternifolius* [J]. *Org Lett*, 2012, 14(12): 3210-3213.
- [10] Sun HD, Huang SX, Han QB. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23(5): 673-698.
- [11] Wang L, Zhao WL, Yan JS, et al. Eriocalyxin B induces apoptosis of t(8;21) leukemia cells through NF-kappaB and MAPK signaling pathways and triggers degradation of AML1-ETO oncoprotein in a caspase-3-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(2): 306-317.
- [12] Wang S, Zhong Z, Wan J, et al. Oridonin induces apoptosis, inhibits migration and invasion on highly-metastatic human breast cancer cells [J]. *Am J Chinese Med*, 2013, 41(1): 177-196.
- [13] Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(2). doi: pii: a008722.
- [14] Liu WY, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 780719.
- [15] Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, Cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(2): 50-57.
- [16] Schellenberg B, Wang P, Keeble JA, et al. Bax Exists in a Dynamic Equilibrium between the Cytosol and Mitochondria to Control Apoptotic Priming [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 959-971.
- [17] Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4997-5002.
- [18] Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, et al. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis [J]. *Cell*, 2013, 152(3): 519-531.

收稿日期: 2013-03-13

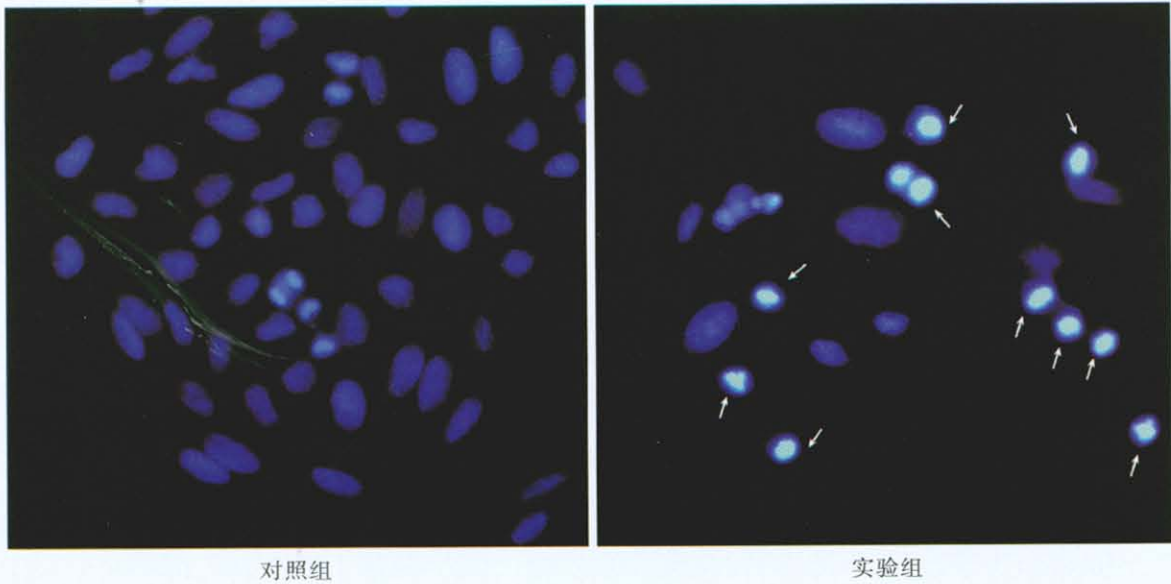


图 2 Hoechst 染色  
Fig.2 Hoechst staining

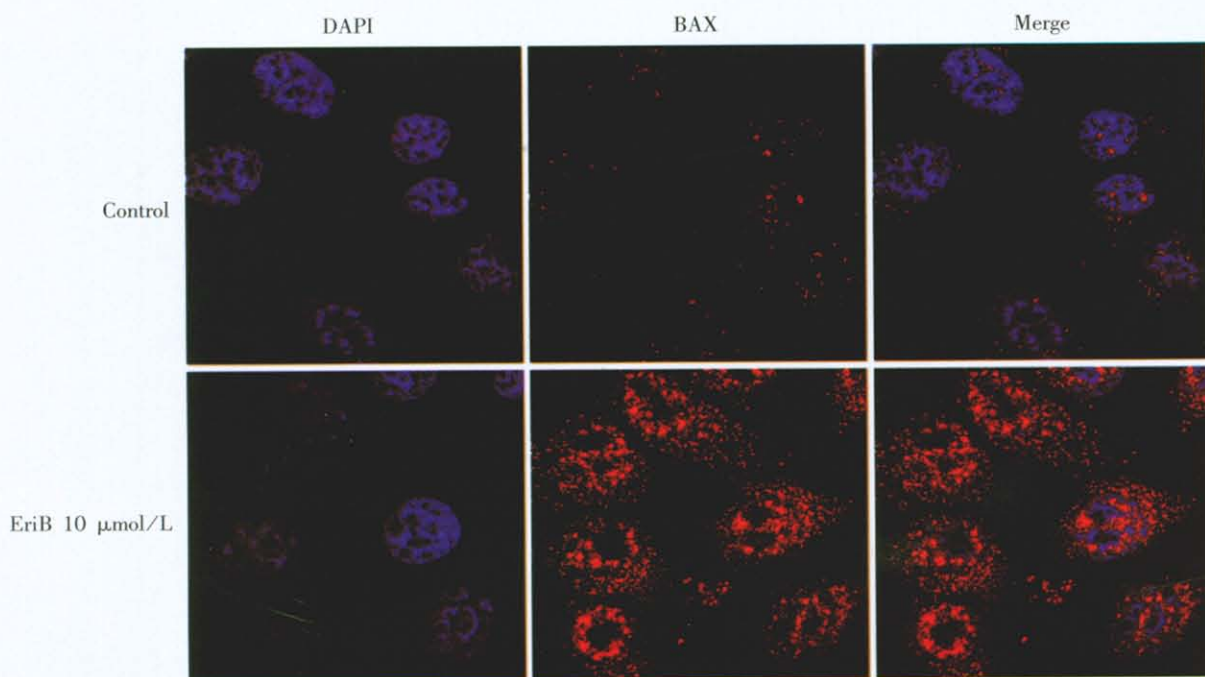
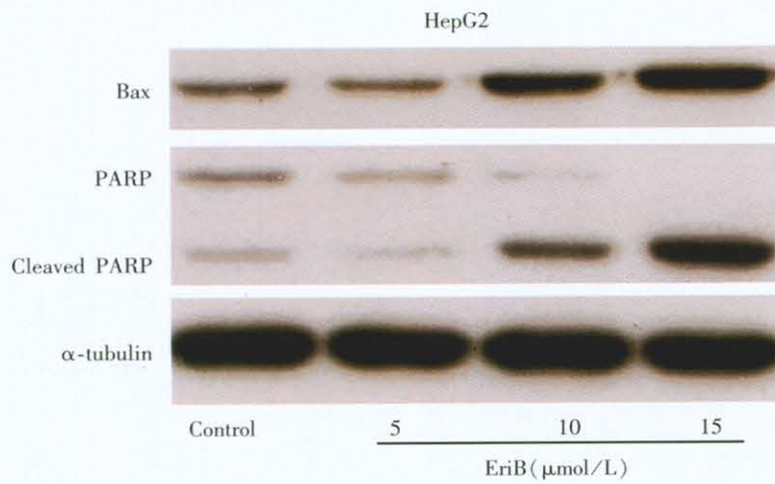


图 3 检测相关凋亡蛋白的表达

Fig.3 Test the expression of apoptosis-associated protein