论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1448-04

香加皮提取物杠柳苷抑制 SMMC-7721 细胞 Stat3 信号通路诱导细胞凋亡的研究

张丽杰[1],鹿 刚[2],张引娟[2],刘刚叁[3],单保恩[2] (河北医科大学:[1]第三医院检验科,石家庄 050051,[2]第四医院科研中心,石家庄 050011;[3]华北制药集团新药研究开发有限责任公司,石家庄 050015)

摘 要:目的 研究香加皮提取物杠柳苷对 Stat3 信号通路的影响,及其诱导细胞凋亡的分子机制。方法 MTT 比色法检测人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖活性,流式细胞术分析肿瘤细胞的周期变化和凋亡,Western blot 检测细胞内 Stat3 蛋白表达,RT-PCR 检测细胞 Mcl-1、Survivin 和 XIAP mRNA 的表达。结果 杠柳苷可明显抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,并使细胞周期停滞在 G_2/M 期。杠柳苷作用后,细胞核内 Stat3 量降低,而细胞质中的量未见明显改变,细胞内 Mcl-1、Survivin 和 XIAP 基因的表达明显降低,并呈时间依赖性。结论 香加皮提取物杠柳苷通过抑制 Stat3 信号转导通路和 Mcl-1、Survivin 和 XIAP mRNA 的表达,进而抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,诱导其凋亡。

关键词:香加皮杠柳苷;信号转导;转录活化因子;Stat3;Western blot;流式细胞术;SMMC-7721 细胞株
中图法分类号:R285.5;R730.23;R735.7 文献标识码:A

Periplocin of cortex periplocae inhibits Stat3 signaling and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

ZHANG Li-jie[1], LU Gang[2], ZHANG Yin-juan[2], LIU Gang-san[3], SHAN Bao-en[2] ([1]Clinical Laboratary, The Third Hospital, Shijiazhuang 050051; [2]Research Center, The Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; [3]New Drug Research and Development Co., Ltd. of North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of periplocin of cortex periplocae (CPP) on Stat3 signaling and its probable molecular mechanism of inducing apoptosis and anti-tumor activity. Methods Cell proliferation was detected by MTT. Cell apoptosis and cell cycle were investigated by flow cytometry. Expression of Stat3 protein in SMMC-7721 cells was analyzed by Western blot. Mcl-1, Survivin and XIAP mRNA expressions were measured by RT-PCR. Results CPP inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells significantly, induced their apoptosis and arrested their cell cycle at G_2/M phase. Decreased expression of Stat3 protein in the cell nucleus was observed after CPP treatment, but no significant changes were found in cytoplasma. Mcl-1, Survivin and XIAP mRNA expression levels were decreased in a time-dependent manner. Conclusion CPP inhibits cell proliferation and induces apoptosis by inhibiting Stat3 signal transduction in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

Key words: periplocin of cortex periplocae; signal transduction; signal transducers and activators of transcription; Stat3; Western blot; flow cytometry; SMMC-7721 cell line

中药香加皮具有强心升压等作用[1],我们以往的实验结果证实,香加皮的提取物具有抗肿瘤作用和增强外周血单个核细胞来源的树突状细胞免疫活性作用[2-5]。

Stat3 是近年来研究异常活跃的信号转导及转录活化因子,在人类多种肿瘤组织和肿瘤细胞株中呈高水平表达,并且伴随多种抗凋亡基因如 Mcl-1、Survivin 等的表达上调。高表达 Stat3 的肿瘤细胞依赖 Stat3 信号通路而存活,当使用抑制剂选择性抑制 Stat3 活性即能够诱导肿瘤细胞的凋亡,因此 Stat3 信号途径作为多种人类肿瘤干预治疗有效的分子标靶而被深入研究[6,7]。

为了研究香加皮抗肿瘤作用机制,我们使用从香加皮中分离、纯化的有效成分杠柳苷[8],探讨其对 Stat3 信号通路的影响,以及抑制细胞增殖、诱导凋亡

基金项目:国家自然科学基金(3037153);河北省自然科学基金(C2004000610)
Supported by the Natural Science Foundation of China (3037153) and the Natural Science Foundation of Heibei Province (C2004000610)
作者简介:张丽杰,女,河北省保定市人,博士,副主任检验师,主要从事肿瘤免疫学方面的研究。电话:(0311) 87027951-3197, E-mail:zljzlj2222@sina.com
通信作者:单保恩,电话:(0311)86033290,E-mail:baoenshan@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-06;修回日期:2008-03-15

的抗肿瘤效应，为进一步开发利用香加皮提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料和试剂

香加皮提取物杠柳苷由本课题的合作单位华北制药集团新药研究开发中心分离纯化。人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本实验室保存。RPMI1640 购自 CELLGRO 公司，MTT 试剂和 PI 购自 Sigma 公司，Stat3 抗体（兔抗人多克隆抗体）由本室制备，蛋白分子量标准、细胞质及细胞核蛋白抽提试剂盒购自美国 Pierce 公司，胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司，RT-PCR 所有试剂购自 Promega 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及 MTT 实验　　SMMC-7721 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基，于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养，每 2 ~ 3 天换液 1 次。收集对数生长期的 SMMC-7721 细胞，用完全培养基制成 1×10^5 ml^{-1} 的细胞悬液，加入 96 孔板中，每孔 100 μl，培养 24 h 后，分别加入 10 μl 不同浓度的杠柳苷，终浓度分别为 0.31、0.62、1.25、2.5、5、10 μg/ml。每组设 3 个平行孔，阴性对照组中加入培养基。细胞被培养 24 h 或 48 h 后，继续培养 4 h，弃去培养液，加入 150 μl DMSO，震荡 15 min，酶标仪 492 nm 测定（参考波长 620 nm）每孔吸光度值[D(492)]，计算杠柳苷的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{1 - \text{处理组 } D(492)}{\text{对照组 } D(492)} \times 100\%$$

1.2.2　细胞周期及细胞凋亡检测　　用终浓度为 2.5 μg/ml 杠柳苷处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后，收集未处理组及处理组细胞，生理盐水洗 3 次，再用生理盐水制成 1×10^5 ml^{-1} 细胞悬液，取 0.1 ml，加入 10% 鸡红细胞作为内参标准，以 70% 乙醇固定，用 50 μg/ml PI 染色，流式细胞仪 Beckman Coulter 公司 Epics-XL Ⅱ 分析细胞 DNA 含量。应用 Muticycle AV 软件分析细胞周期和凋亡率。

1.2.3　Western blot 分析　　实验步骤参考文献[9]。细胞质蛋白和核蛋白的提取应用 Pierce 公司的 NE-PER 试剂盒（#78833），按照试剂盒说明书进行操作。提取未处理组和经 2.5 μg/ml 杠柳苷作用 7 h 后的肿瘤细胞质和细胞核蛋白，分别以 30 μl 细胞质、细胞核提取物和上样缓冲液 10 μl 混合，在沸水中变性 7 min，上样，进行 SDS-PAGE，电泳完成后将凝胶中的蛋白区域转移到 PVDF 膜上，经一抗和二抗作用后，用 DAB 显色。

1.2.4　RT-PCR 检测　　分别收集 2.5 μg/ml 杠柳苷不同处理时间（0、7、24、48 h）的 SMMC-7721 细胞，用 Trizol 提取液提取细胞总 RNA，用紫外-可见分光光度仪测定其纯度和含量，在逆转录酶催化下合成 cDNA，以适量 cDNA 为模板，在 Go*Taq* DNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。以 β-actin 为内参照，每批 PCR 均设空白对照（不加模板 RNA 而加三蒸水）。反应体系：RT-PCR 酶混合物 2.0 μl，20 × Buffer（无 Mg^{2+}）1.5 μl，$MgCl_2$（25 mmol/L）2.0 μl，dNTP（2.5 mmol/L）1.2 μl，上、下游引物各 1.0 μl，RNA 模板 2.0 μl（含 2.0 μg RNA），加无菌三蒸水使总体积至 30.0 μl，另铺上液体石蜡 30.0 μl。反应条件：反转录 37 ℃，50 min；预变性 94 ℃，5 min；变性 94 ℃，1 min，退火 52 ℃，45 s，延伸 72 ℃，45 s，循环 30 次；延伸 72 ℃，7 min。Mcl-1、Survivin、XIAP、β-actin 的上下游引物序列见表 1，引物均由上海生工生物工程公司合成。各组分别取 RT-PCR 产物 3.0 μl 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳（含 0.5 mg/L 溴乙锭），80 V 恒压，40 min，应用 FOTODYNE 凝胶成像系统及 Gel-Pro 凝胶分析软件对电泳条带进行成像分析。

表 1　Mcl-1、Survivin、XIAP、β-actin 的上下游引物序列

目的基因	引物	扩增片段长度
Mcl-1	上游 5′-CGGTAATCGGACTCAACCTC-3′ 下游 5′-CCTCCTTCTCCGTAGCCAA-3′	102 bp
Survivin	上游 5′-AGCCCTTTCTCAAGGACCAC-3′ 下游 5′-GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3′	363 bp
XIAP	上游 5′-ACTATGCTCACCTAACCCC-3′ 下游 5′-CCGTGCTTCATAATCTGCC-3′	281 bp
β-actin	上游 5′-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3′ 下游 5′-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3′	316 bp

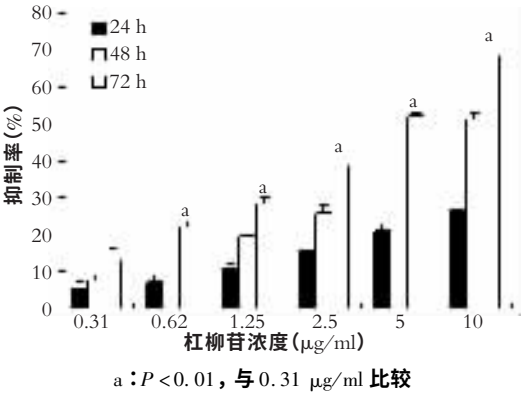
1.3　统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　杠柳苷对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

采用不同浓度的杠柳苷处理 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h，可明显抑制细胞的增殖（$P < 0.01$），并呈剂量依赖关系，作用时间越长抑制率越高，见图 1。



a：$P < 0.01$，与 0.31 μg/ml 比较

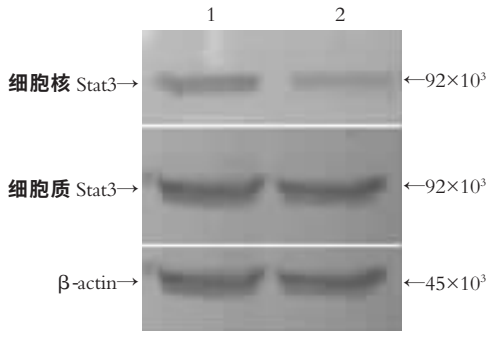
图 1　杠柳苷对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用（$n = 3$）

2.2　杠柳苷对 SMMC-7721 细胞周期和细胞凋亡的影响

用终浓度为 2.5 μg/ml 的杠柳苷处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后，G_0/G_1 期细胞为 76.8%，与未处理组（39.3%）相比，明显增加（$P < 0.05$），并发生明显的凋亡现象，凋亡率达 23.5%。说明杠柳苷处理后，肿瘤细胞被阻滞在 G_0/G_1 期，且诱导 SMMC-7721 细胞凋亡。

2.3　杠柳苷对 SMMC-7721 细胞 Stat3 蛋白表达的影响

用 2.5 μg/ml 杠柳苷作用 48 h 后，细胞核内 Stat3 蛋白的含量明显降低（$P < 0.05$），细胞质中该蛋白含量未见明显改变（$P > 0.05$），见图 2。

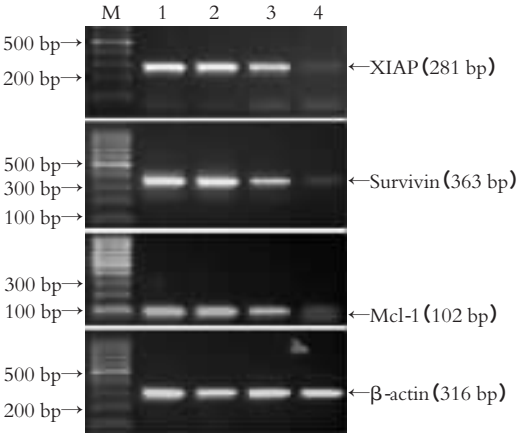


1：2.5 μg/ml 杠柳苷处理48 h后；2：未处理组

图2 Western blot检测杠柳苷处理前后SMMC-7721细胞质和细胞核中Stat3蛋白的表达变化

2.4 杠柳苷对SMMC-7721细胞Mcl-1、Survivin和XIAP mRNA表达的影响

结果显示杠柳苷对Mcl-1、XIAP和Survivin mRNA的表达均有明显抑制作用（$P<0.01$），并呈时间依赖性。作用12 h后，细胞内的抗凋亡基因开始减少，作用24 h后SMMC-7721细胞内的3种抗凋亡基因表达变得很微弱。该现象与杠柳苷诱导SMMC-7721凋亡的结果相一致，见图3。



M：标准；1：0 h；2：7 h；3：12 h；4：24 h

图3 RT-PCR方法检测杠柳苷处理不同时间时SMMC-7721细胞XIAP、Mcl-1、Survivin mRNA的表达

3 讨论

本实验室前期的研究工作已经证实，香加皮水提物和醇提物在体内外能很好的抑制多种肿瘤细胞生长，并能够诱导肿瘤细胞凋亡[2,3,5]，说明香加皮不但有强心升压作用，还有显著的抗肿瘤作用。研究证实，香加皮发挥抗肿瘤作用的重要活性成分之一是杠柳苷[8]。为进一步明确杠柳苷抗肿瘤的分子机制，本研究将杠柳苷作用于高表达Stat3的人肝癌细胞株SMMC-7721[10,11]，以探讨杠柳苷是否通过抑制Stat3信号通路来发挥其抑制细胞增殖、诱导凋亡的抗肿瘤效应。

本研究结果显示，小剂量2.5 μg/ml的杠柳苷就能抑制肿瘤细胞的增殖，最大凋亡率达23.5%，并能够诱导SMMC-7721细胞凋亡，使细胞周期停滞在G_0/G_1期。

通常情况下，肿瘤细胞高表达各种抗凋亡分子（如Survivin、Mcl-1、XIAP等），这是肿瘤细胞过度增殖、恶化和转移的基础。X-染色体相关凋亡抑制蛋白（X-chromosome linked inhibitor of apoptosis，XIAP）是一种能直接抑制Caspases级联反应而阻止凋亡反应发生的蛋白因子[12]。XIAP表达增高是肿瘤发生的重要始动和促进因素[13]。Survivin是耶鲁大学的Ambrosini等在1997年发现的一种新型凋亡抑制因子[14]，在正常成人组织（除胸腺、生殖腺外）不表达，而广泛高表达于乳腺癌、胃癌、皮肤癌等各种肿瘤组织[15,16]，具有抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂的双重功能，是联系细胞周期和细胞凋亡界面的重要因子。髓细胞白血病蛋白-1（myeoid cell leukema-1 protein，Mcl-1）是一种抗凋亡蛋白，是B细胞淋巴瘤基因-2（B-cell Lymphoma-2，bcl-2）家族成员之一。1993年，Kozopas等[17]在分化的骨髓细胞中发现了Mcl-1。Mcl-1在多种组织及恶性肿瘤细胞中均有表达，包括白血病细胞、骨髓瘤细胞以及结肠癌肝转移灶细胞。

本实验结果显示，2.5 μg/ml杠柳苷能以时间依赖性抑制SMMC-7721细胞Survivin、Mcl-1、XIAP mRNA的表达，提示杠柳苷诱导SMMC-7721细胞凋亡与抑制这些基因表达密切相关。

Stat3能直接调控细胞内许多抗凋亡基因的表达，其中Mcl-1和Survivin蛋白等是Stat3的靶基因。有研究证实，活化的Stat3信号通路可促使乳腺癌细胞中Survivin基因表达，保证了癌细胞的增殖活性[6,7]。我们在实验中发现2.5 μg/ml杠柳苷作用10 h后，可明显抑制SMMC-7721细胞核中Stat3的表达。Stat3常通过酪氨酸位点磷酸化形成二聚体后，才能进入细胞核内，调控相关基因的表达。杠柳苷处理后，SMMC-7721细胞核内Stat3含量的减少，说明杠柳苷在Stat3信号通路的某个环节上发挥了抑制作用，结果导致其向核内的转移减少，并进一步导致其下游靶基因的表达减少，该现象与杠柳苷处理后，Stat3的下游靶基因Survivin、Mcl-1、XIAP表达减少的结果相一致。提示杠柳苷诱导SMMC-7721细胞凋亡可能与其抑制了Stat3信号通路有关。

有研究提出，Stat3信号通路被认为是癌症治疗中很有研究价值的干扰作用靶点[6,7]。本研究表明，杠柳苷能够抑制SMMC-7721细胞中Stat3信号通路，介导细胞凋亡，提示该物质可能为Stat3信号抑制剂和抗肿瘤新药，具有良好的开发前景。关于杠柳苷抑制

Stat3 信号通路的作用位点及其体内抑瘤机制正在研究中。

参考文献：

[1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2005 年版一部[S]. 北京：化学工业版社，2005，181.
[2] 张 静，单保恩，刘刚叁，等. 香加皮提取物抗肿瘤活性的研究[J]. 癌变·畸变·突变，2006，18(2)：108－111.
[3] 张 静，单保恩，张 超，等. 香加皮羽扇豆烷乙酸酯(CPLA)对树突状细胞分化成熟的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2006，22(1)：26－28，32.
[4] 张 静，单保恩，刘刚叁，等. 香加皮乙酸乙酯提取物诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的研究[J]. 肿瘤，2006，26(5)：418－421，439.
[5] 单保恩，李俊新，张 静. 香加皮水提取物诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制[J]. 中草药，2005，36(8)：1184－1188.
[6] Buettner R，Mora L B，Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res，2002，8(4)：945－954.
[7] Nam S，Buettner R，Turkson J，*et al*. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2005，102(17)：5998－6003.
[8] 陈书红，杨峻山，任风芝，等. 香加皮的抗肿瘤活性成分研究(I)[J]. 中草药，2006，37(4)：519－520.
[9] 奥斯伯 F M，金斯顿 R E，赛德曼 J G. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军，舒跃龙，译. 北京：科学出版社，2005：379－416.
[10] 张丽杰，单保恩，鹿 刚，等. STAT3 在人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞内的表达[J]. 临床检验杂志，2007，25(5)：371－372.
[11] 董荣春，周荣华，吕发度，等. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察[J]. 第二军医大学学报，1980，1(1)：5－9.
[12] Deveraux Q L，Reed J C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev，1999，13(3)：239－252.
[13] Tamm I，Kornblau S M，Segall H，*et al*. Expression and prognostic significance of IAP－family genes in human cancers and myeloid leukemias[J]. Clin Cancer Res，2000，6(5)：1796－1803.
[14] Ambrosini G，Adida C，Altieri D C. A novel anti－apoptosis gene，survivin，expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med，1997，3(8)：917－921.
[15] Lo－Muzio L，Staibano S，Pannone G，*et al*. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma[J]. Exp Mol Pathol，2001，70(3)：249－254.
[16] Okada E，Murai Y，Matsui K，*et al*. Survivin expression in tumor cell nuclei is predicative of a favorable prognosis in gastric cancer patients[J]. Cancer Lett，2001，163(1)：109－116.
[17] Kozopas K M，YangT，Buchan H L，*et al*. MCL1，a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation，has sequence similarity to BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1993，90(8)：3516－3520.

（编辑 邓强庭）

文章编号：1000-5404(2008)15-1451-01

个案与短篇

视频脑电图监测并暗示诱发试验对假性癫痫的诊断价值

宋晓涛[1]，谢红武[2] （娄底市中心医院：[1]脑电图室，[2]精神科，湖南 娄底 417000）

假性癫痫(pseudoseizure，PS)是指一组临床症状类似于癫痫发作的疾病，常易被误诊。PS 的发生是由于生理或心理功能障碍所致，可由情绪刺激或暗示诱发[1]。视频脑电图(VEEG)可长程同步监测患者的临床发作和脑电变化情况。现将我院 2005 年 5 月至 2007 年 11 月经 VEEG 监测并暗示诱发试验诊断的 25 例 PS 患者进行分析，报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

25 例 PS 患者，男性 9 例，女性 16 例，年龄 10～52(28.9±9.7)岁，病程 0.5～20(7.1±4.8)年，发作频率 3 次/年至 10 次/d，检查前 6 个月平均发作 3.2 次；考虑癫痫药物对结果的影响，检查前 1 d 停服抗癫痫药物；患者发病前均有明显精神刺激或创伤史。25 例中有 17 例在外院误诊为癫痫，予以抗癫痫治疗，8 例未确诊。

1.2 方法

由医师向患者及家属交代检查的无危害性，并要求家属在场判断诱发发作与既往发作是否相同，取得其同意后进行 VEEG 监测。采用日本光电 1518K 型录像脑电图仪，按国际 10-20 系统安装电极。首先详细询问患者既往发病的过程，然后给予静脉注射生理盐水，同时依据患者既往发作的情况进行言语暗示诱发，出现临床发作后终止诱发。对阳性者行第 2 次静脉注射生理盐水，同时进行心理暗示治疗以终止发作，并暗示患者的病已治愈。整个过程均在 VEEG 监测下进行，注意记录患者临床发作情况及痫样放电情况，并让患者回忆发作时的情景。

1.3 诊断标准

PS 诊断通过 VEEG 监测、CT 或 MRI 检查，结合详细的病史及神经系统体格检查确认。PS 诊断标准[1]：①VEEG 监测到临床发作，但无痫样放电。②VEEG 监测到临床发作，伴有不同步间隙期痫样放电，但无发作期痫样放电。符合第 1 条标准诊断为 PS，符合第 2 条标准和既往有癫痫发作则诊断为 PS 合并癫痫，既往无癫痫史则诊断为 PS 合并亚临床发作。

（下转 1455 页）

作者简介：宋晓涛，女，湖南省娄底市人，主管技师，主要从事脑电图方面的研究，电话：13907389383，E-mail：songxiaotao8888@163.com

收稿日期：2008-04-01；修回日期：2008-05-26