论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2246-03

昆明山海棠总生物碱对人结肠癌HCT116细胞增殖和凋亡的影响

黄晓春,刘晋祎,周燕虹,敖 琳,杨录军,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究昆明山海棠总生物碱(total alkaloids of tripterygium hypoglaucum hutch, THHta)对人结肠癌HCT116细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 采用MTT法检测THHta对HCT116细胞增殖的抑制作用;用倒置及荧光显微镜观察THHta作用后HCT116细胞形态的变化;流式细胞术检测THHta对HCT116细胞周期及凋亡的影响,Western bolt检测凋亡相关caspase-3及PARP蛋白表达。**结果** THHta能显著抑制HCT116细胞增殖,抑制率与剂量和时间呈依赖关系。THHta作用HCT116细胞48、72 h的IC_{50}值小于20 μg/ml。THHta(10 μg/ml)能诱导HCT116细胞G_0/G_1期比例增加及细胞凋亡,caspase-3活化及PARP蛋白剪切显著增强。**结论** THHta能显著抑制HCT116细胞增殖,并可诱导HCT116细胞G_0/G_1期阻滞及细胞凋亡。

关键词: 昆明山海棠;生物碱;HCT116细胞;增殖;凋亡
中图法分类号: R285.5;R329.28;R735.35 **文献标识码:** A

Effects of total alkaloids of *Tripterygium hypoglaucum Hutch* on proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line HCT116

HUANG Xiao-chun, LIU Jin-yi, ZHOU Yan-hong, AO Lin, YANG Lu-jun, CAO Jia (Department of Military Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of total alkaloids of *tripterygium hypoglaucum hutch* (THHta) on the proliferation and apoptosis of human colon cancer cell line HCT116. **Methods** The effects of THHta on the proliferation of HCT116 cells were assessed by MTT assay. Morphological changes of HCT116 cells were observed with invert microscopy and fluorescence microscopy. The cell cycle distribution and apoptosis of HCT116 cells were examined by flow cytometry (FCM). The expression of active caspase-3 and cleaved PARP were detected by Western blot assay. **Results** THHta inhibited the proliferation of HCT116 cells in a concentration- and time-dependent manner. The IC_{50} values of THHta which affected HCT116 cells for 48 and 72 h were less than 20 μg/ml. THHta (10 μg/ml) increased the percentage of cells at the G_0/G_1 phase, induced the apoptosis of HCT116 cells, and increased the amount of active caspase-3 and cleaved PARP in HCT116 cells. **Conclusion** THHta inhibits proliferation, causes G_0/G_1 phase arrest and induces apoptosis in cer HCT116 cells *in vitro*.

Key words: tripterygium hypoglaucum hutch; alkaloids; HCT116 cell; proliferation; apoptosis

昆明山海棠总生物碱是从卫茅科雷公藤属植物昆明山海棠[tripterygium hypoglaucum (Level.) Hutch]根茎和根皮中提取的主要有效成分之一。我室前期研究发现THHta体外抗白血病活性,并对其分子机制做了较深入的研究[1]。基于多种肿瘤细胞株的体外抗肿瘤药物筛选实验发现人结肠癌HCT116细胞对THHta敏感[2]。本实验以体外培养的HCT116细胞为研究对象,观察THHta对HCT116细胞的生长、细胞周期和细胞凋亡的影响,为THHta进一步的开发与应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 昆明山海棠总生物碱(辽宁国药三厂中试基地制备),McCoy's 5A液体培养基(美国Introvogen公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)均为美国Sigma公司产品,胎牛血清(杭州四季青

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5026)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5026)
作者简介:黄晓春,男,江苏省淮安市人,博士研究生,主要从事抗肿瘤中药药效学方面的研究。E-mail: huangxc12@gmail.com
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2009-06-15;修回日期:2009-07-01

生物工程研究所),Hoechst 33342 染色液(江苏碧云天生物技术研究所),小鼠抗 Caspase-3、PARP 抗体(美国 Cell Singaling Technology 公司),倒置显微镜(日本,Olympus),Spectra Max M2/M2e 酶标仪(美国 Molecular device 公司),流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),Oddsey 扫描仪(美国 Licor 公司)。

1.1.2　细胞株　　人结肠癌细胞 HCT116 株购自中科院上海细胞研究所,本室留存。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　HCT116 细胞快速复苏后培养于含 10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的 McCoy's 5A 培养液中,在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养,细胞呈单层贴壁生长。传代时用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 溶液消化,每周传代 2 ~ 3 次。台盼蓝拒染法计算活细胞数,取指数生长期的细胞用于实验。

1.2.2　总生物碱的制备[3]　　昆明山海棠去皮根粉碎过 10 目筛后用 10 倍量 60% 乙醇超声提取、浓缩,浓盐酸酸化后用氯仿萃取保留水相。加 Na_2CO_3 碱化,氯仿再次萃取,保留有机相。旋转蒸发溶剂后得黄褐色固体,-20 ℃保存。取少量加 DMSO 溶解,分装后 -20 ℃保存备用。

1.2.3　MTT 实验[4]　　处于对数生长期且活细胞百分率 > 95%(0.4% 台盼蓝染色计数)的细胞按 2×10^4/ml 接种于 96 孔板中(90 μl/孔)。细胞贴壁生长 24 h 后更换新鲜培养基,THHta 处理组每孔加入 10 μl 含 THHta 培养基(终浓度为 5、10、25、50、100 μg/ml),每个浓度设 3 个复孔。对照组加入含等体积 DMSO 的培养基(DMSO 体积比 1‰)。继续培养 72 h 后,加 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,孵育 4 h 后弃上清,加 150 μl/孔三联液(SDS 10 g,异丁醇 5 ml,10 mol/L HCl 0.1 ml 用双蒸水溶解配成 100 ml 溶液),混匀后 37 ℃放置过夜以溶解甲臜。全自动酶标仪中振荡 9 s 后测定每孔吸光度(OD 值),测定波长为 570 nm,校正波长为 630 nm。IC_{50} 值用 Logit 法计算。

肿瘤抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 治疗组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%

1.2.4　Hochest 33342 染色　　HCT116 细胞 THHta 作用到实验设定时间后,于 96 孔板每孔加入 100 μl Hoechst 33342 染色液。细胞于培养箱中再培养 20 ~ 30 min。弃染色液,用磷酸盐缓冲液小心洗涤细胞 1 ~ 2 次后于荧光显微镜下用紫外光激发荧光进行观察。

1.2.5　流式细胞仪检测　　取对数生长期的 HCT116 细胞,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 溶液消化后,以每孔 4×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板培养,24 h 后吸除原培养液,用血清饥饿法同步化 HCT116 细胞(0.1% FBS)24 h 后加入含 THHta(0、10 μg/ml)的 McCoy's 5A 培养液,对照组含等体积 DMSO,继续培养 12、24、36 h。用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 溶液消化 HCT116 成单细胞悬液,300 × *g* 4 ℃离心 5 min 后弃上清,冷 PBS 洗涤细胞 2 次收集细胞,轻轻蜗旋振荡条件缓慢加入 4 ℃预冷的 75% 乙醇,4 ℃固定过夜。染色前用 PBS 洗涤,300 × *g* 离心 5 min,去除固定液后用 RNaseA(终浓度 20 μg/ml)消化,37 ℃水浴 30 min,再加入 PI 染色液(终浓度 50 μg/ml)1 ml,混匀,4 ℃避光染色 30 min,用 FACS Calibur 流式细胞仪测定 PI 荧光强度,计算凋亡细胞百分率及细胞周期参数。

1.2.6　Western blot 检测　　HCT116 细胞 THHta 处置后提取细胞总蛋白,Lowrry 法测定蛋白浓度,变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。半干转印法将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加一抗溶液 4 ℃振荡孵育过夜。专用的荧光标记二抗室温孵育 0.5 h。利用 Oddsey 扫描仪扫描条带并分析结果。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件将不同时相的实验组的细胞生长抑制率与其相应阴性对照组进行方差分析;THHta 诱导 HCT116 细胞的凋亡率比较采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　THHta 对 HCT116 细胞形态学的影响

THHta(10 μg/ml)作用 HCT116 细胞 48 h 后,在倒置显微镜下可见悬浮细胞增多,细胞胞体缩小、变圆、皱缩,细胞折光性减弱,细胞内出现颗粒样物质,培养液中有可见细胞碎片,与对照组比较细胞形态差异明显。Hoechst 33342 染色可见 THHta 致 HCT116 细胞核染色增强,呈致密的颗粒状或团块状荧光增强,提示发生核皱缩,染色质致密化,核破裂。见图 1。

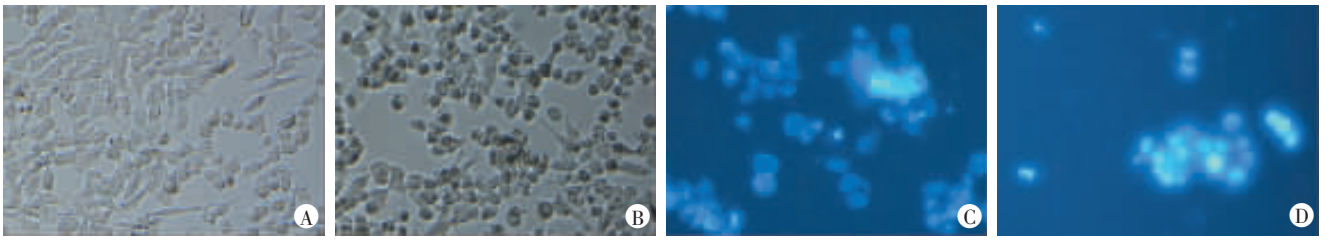
2.2　THHta 体外对 HCT116 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测 THHta 作用 HCT116 细胞不同时间的生长抑制效应见表 1。结果显示 THHta 对 HCT116 细胞有显著的生长抑制作用,其抑制作用与 THHta 剂量和时间呈依赖关系。THHta 对 HCT116 细胞增殖抑制率随药物浓度升高和作用时间延长而增加,实验组与对照组间有显著性差异($P < 0.05$)。THHta 作用 HCT116 细胞 48 h 和 72 h,IC_{50} 分别为(19.11 ± 6.34)μg/ml 和(3.59 ± 0.86)μg/ml。

表 1　MTT 法检测不同浓度 THHta 对 HCT116 细胞增殖的抑制作用

时间	5 μg/ml	10 μg/ml	25 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml
24 h	87.8 ± 1.9[a]	78.1 ± 0.7[a]	68.7 ± 0.3[a]	64.5 ± 2.8[a]	65.2 ± 1.4[a]
48 h	77.1 ± 7.2[a]	52.0 ± 5.0[a]	34.4 ± 2.5[a]	36.1 ± 1.7[a]	34.6 ± 2.4[a]
72 h	47.7 ± 2.6[a]	39.2 ± 2.9[a]	18.6 ± 1.2[a]	16.8 ± 1.7[a]	16.7 ± 0.2[a]

对照组为 100%;a:$P < 0.05$,与对照组比较



A:对照组电镜观察(×200);B:THHta 处理组电镜观察(×200);C:对照组 Hoechst 33342 染色(×400);D:THHta 处理组 Hoechst 33342 染色(×400)

图 1　THHta(10 μg/ml)作用 HCT116 细胞 48 h 形态学变化

2.3 THHta 对 HCT116 细胞周期及凋亡的影响

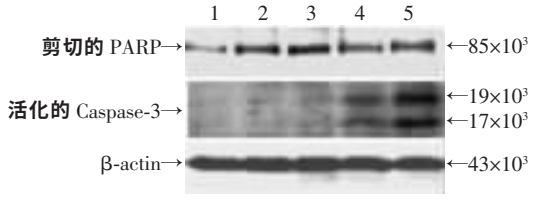
THHta(10 μg/ml)处理 HCT116 细胞 12、24、36 h,收集细胞固定后经 PI 染色,用流式细胞仪检测细胞 DNA 含量,分析 THHta 对 HCT116 细胞周期和凋亡的影响,结果见表 2。与对照组比较,10 μg/ml THHta 导致 HCT116 细胞中 G_0/G_1 期细胞比例增加,作用 12 h 时最明显,随着 THHta 作用时间的延长,G_0/G_1 期细胞比例逐渐减少但仍然高于对照组;G_2/M 期细胞比例降低。THHta(10 μg/ml)作用 HCT116 细胞能诱导其发生凋亡,凋亡率与时间呈依赖关系,36 h 达到峰值(20.43 ± 1.94)%,与对照组凋亡率(4.99 ± 1.41)% 比较差异显著($P < 0.05$)。

表 2 THHta(10 μg/ml)对 HCT116 细胞周期及凋亡的影响

THHta	细胞比例			
	G_0/G_1	S	G_2/M	sub G_1
对照组	73.62	12.75	13.63	4.99
12 h	85.42	8.44	6.14	5.75
24 h	81.37	13.07	5.57	10.42
36 h	82.35	11.89	5.76	20.43

2.4 THHta 对 HCT116 细胞 PARP 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

流式细胞检测显示 THHta 能诱导 HCT116 细胞凋亡,Western blot 检测结果显示 10 μg/ml THHta 处置 HCT116 细胞 36 h,活化的 Caspase-3 蛋白及 PARP 蛋白的剪切片段(85×10^3)量显著增加(图 2),证实 THHta 能诱导 HCT116 细胞凋亡。



1:空白对照;2:THHta 1.25 μg/ml;3:THHta 2.5 μg/ml;4:THHta 5 μg/ml;5:THHta 10 μg/ml

图 2 不同剂量 THHta 作用 HCT116 细胞 36 h PARP 和 Caspase-3 蛋白表达变化

3 讨论

我国恶性肿瘤发病率和死亡率排序中结直肠癌位居第 3 ~ 5 位,同时结直肠癌发病率在我国呈增加趋势。全身化疗是早中期结直肠癌术后辅助治疗和晚期结直肠癌姑息治疗的主要手段。结直肠癌对化疗的敏感性不一,化疗耐药是导致结直肠癌治疗失败的重要原因。寻找和开发新的抗结肠癌药物是进一步提高结肠癌防治水平的基础。

昆明山海棠是我国传统中药,为卫矛科雷公藤属植物,分布在我国西南地区,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮等自身免疫性疾病。昆明山海棠的主要成份有生物碱、色素类和萜类,其中生物碱在临床上的疗效好且毒副作用较小。我们在前期的实验中发现 THHta 体外对白血病细胞、结肠癌细胞、乳腺癌细胞及肺癌细胞等具有增殖抑制作用,其中 THHta 对结肠癌细胞 HCT116、HT-29 及 SW480 的增殖抑制作用均强于肺腺癌 A549 细胞[2]。THHta 能够诱导 Jurkat、A549 等肿瘤细胞凋亡及细胞周期阻滞[1-3]。恶性肿瘤细胞具有细胞周期调控缺失及凋亡障碍的特性导致其过度增殖。诱导肿瘤细胞凋亡及调控肿瘤细胞周期是抗肿瘤药物开发的重要指标[5]。为探讨 THHta 抗实体瘤活性研究开发的价值,我们选择结肠癌 HCT116 细胞研究 THHta 对其体外增殖、细胞周期及凋亡的影响。

MTT 比色法显示 THHta 作用 HCT116 细胞 24、48、72 h 后可显著抑制其增殖,且呈时间及剂量依赖关系,48、72 h 对 HCT116 细胞 IC_{50} 值小于 20 μg/ml。在体外抗肿瘤筛选试验中,NCI 判断植物粗提物细胞毒性活性的标准是 IC_{50} 小于 30 μg/ml[6],低于该值即认为该粗提物有进一步研究的价值。国内样品筛选结果的判断标准为目标受试物对肿瘤细胞的 IC_{50} 小于 20 μg/ml,在 100 μg/ml 剂量时对肿瘤细胞的生长抑制率达 80%。结合上述标准,THHta 具有进一步研究开发的价值。形态学观察发现 THHta 在 10 μg/ml 能明显抑制 HCT116 细胞增殖,光镜观察结合 Hoechst 33342 核染色提示 HCT116 细胞发生凋亡。流式细胞术检测结果显示,随着 10 μg/ml THHta 作用时间延长,HCT116 细胞凋亡比例增加,与时间呈依赖关系;36 h 细胞凋亡率与对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。分析细胞周期分布变化与细胞凋亡率变化的时相点,分析 10 μg/ml THHta 可能首先引起 HCT116 细胞周期 G_0/G_1 阻滞继而诱导其发生细胞凋亡。Caspase-3 蛋白的活化及 PARP 蛋白的剪切进一步证实 THHta 能诱导 HCT116 细胞凋亡。

综上所述,昆明山海棠总生物碱(THHta)体外能够抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖,10 μg/ml THHta 能诱导 HCT116 细胞周期 G_0/G_1 阻滞及细胞凋亡。THHta 抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖的有效成分及分子机制具有深入研究开发的价值。

参考文献:

[1] 曹 佳, Nusse M. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株发生细胞凋亡[J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1169 - 1173.

[2] 黄晓春, 周燕虹, 杨录军, 等. 昆明山海棠总生物碱体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(4): 442 - 445.

[3] 刘乐斌, 刘胜学, 胡孝贞, 等. 昆明山海棠总生物碱诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡与细胞周期改变[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 18 - 20.

[4] 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法[J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(10): 455 - 457.

[5] Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(3): 178 - 194.

[6] Cragg G M, Newman D J, Yang S S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience [J]. J Nat Prod, 2006, 69(3): 488 - 498.

(编辑 汪勤俭)