基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0936-04

雄黄抗人肝癌 BEL-7402 细胞作用

黄姣娥[1],戴支凯[2]

(桂林医学院 1. 护理学院护理学实验教学中心;2. 药学院药理学教研室,桂林 541004)

【摘 要】目的:观察雄黄体外抗人肝癌 BEL-7402 细胞作用和作用机制。方法:采用 MTS 法和细胞克隆实验法观察雄黄对 BEL-7402 细胞增殖的影响,应用 PI/Hoechest33258 双染法和流式细胞仪检测细胞凋亡,荧光分光光度计检测细胞内钙和线粒体膜电位。结果:与阴性对照组比,雄黄能剂量依赖性地抑制 BEL-7402 细胞的生长和克隆形成。雄黄作用后,BEL-7402 细胞出现了凋亡形态学改变如染色质浓缩等;流式细胞仪检测显示,雄黄能剂量依赖性地诱导细胞凋亡,其中,225 μg/ml 雄黄引起 BEL-7402 细胞凋亡的百分率为(28.6±4.6)%。与阴性对照组比,雄黄作用后,BEL-7402 细胞的细胞内钙升高和线粒体膜电位降低。结论:雄黄具有一定的抗肿瘤作用,其作用机制与升高细胞内钙、降低细胞线粒体膜电位并诱导细胞凋亡有关。

【关键词】雄黄;人肝癌细胞系 BEL-7402;抗肿瘤作用

【中国图书分类法分类号】R961 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-14

Anticancer effect of realgar on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402

HUANG Jiao-e[1], DAI Zhi-kai[2]

(1. Nursing Experimental Teaching Center of Nursing College; 2. Department of Pharmacology, Pharmaceutical College, Guilin Medical College)

【Abstract】*Objective*: To investigate anticancer effect of realgar on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402 *in vitro*. *Methods*: MTS assay and colony formation assay were used to elucidate the antiproliferative effect of realgar on BEL-7402 cells. PI/Hoechest33258 double dying and flow cytometer were carried out for cell apoptosis detection. Intercellular calcium concentration and mitochondrial membrane potential were detected using spectrofluorophotometer. *Results*: Realgar inhibited cell growth and colony formation of BEL-7402 cells in a dose-dependent manner when comparing with control group. Morphological changes chromatin condense of cell apoptosis were observed in realgar treated BEL-7402 cells, and a dose-dependent apoptosis was

作者介绍:黄姣娥(1971-),女,讲师,研究方向:中药药理。

通信作者:戴支凯,男,副教授,Email: dzhk110@126.com。

2007,102(1):261-268.

[7] Pan L L, Liu X H, Gong Q H, et al. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism[J]. Amino Acids, 2011, 41(1): 205-215.

[8] Lu J, Zang W J, Yu X J, et al. Effects of postconditioning of adenosine and acetylcholineon the ischemic isolated rat ventricular myocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 549(1-3): 133-139.

[9] Chun Y S, Kim M S, Park J W. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(5): 581-588.

[10] Semenza G L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(19-20): 853-859.

[11] Liu L X, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelia growth factor mRNA by hypoxia inducible factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4)908-914.

[12] Semenza G L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(19-20): 853-859.

[13] Date T, Mochizuki S, Belanger A J, et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(2): C314-C320.

[14] Parisi Q, Biondi-Zoccai G G, Abbate A, et al. Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2005, 99(2): 337-339.

[15] Tipoe G L, Lau T Y, Nanji A A, et al. Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Cbem, 2006, 4(3): 199-218.

[16] Zampino M, Yuzhakova M, Hansen J, et al. Sex-related dimorphic response of HIF-1alpha expression in myocardial ischemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(2): H957-H964.

[17] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5): 949-956.

[18] Musat-Marcu S, Gunter H E, Jugdutt B I, et al. Inhibition of apoptosis after ischemia-reperfusion in rat myocardium by cycloheximide[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(5): 1073-1082.

(责任编辑:关蕴良)

shown by flow cytometer analysis.Apoptotic percentage of BEL-7402 cells treated with 225 μg/ml realgar was(28.6±4.6)% and higher than that in the control.Furthermore,intercellular calcium was increased and mitochondrial membrane potential was decreased in BEL-7402 cells treated by realgar compared with control. *Conclusion*:Realgar has anticancer effect,which might be associated with increasing intercellular calcium,decreasing mitochondrial membrane potential and inducing apoptosis.

【Key words】realgar;human hepatocarcinoma cell line BEL-7402;anticancer

祖国中医认为雄黄辛温有毒，归心、肝、胃经，具有解毒杀虫、燥湿祛痰、化瘀消积等功效，已用于治疗痈肿疔疮、蛇虫咬伤、虫积腹痛、惊痫和疟疾等疾病。现代医学研究表明，雄黄具有抗肿瘤作用[1]。雄黄抗肿瘤作用的临床应用和作用机理的研究多集中在血液系统肿瘤，有关雄黄对实体肿瘤研究的报道较少。本研究探讨了雄黄对人肝癌细胞 BEL-7402 细胞的影响，并初步探讨了其作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 BEL-7402 由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供；RPMI-1640 培养基干粉为 Gibco 产品；胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司；雄黄由贵阳中药厂提供；5-氟尿嘧啶(Fluorouracil,FU)购自上海旭东海普药业有限责任公司；(MTS)为 Promega (Madson,WI,USA)产品；胰蛋白酶、Fura 2/AM、Hoechest33258、罗丹明 123(Rhodamine 123,R123)和碘化丙啶(Propidium iodide,PI)均为 Sigma 产品；Annexin V/FITC 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。550型酶标仪：BioTek Instruments,Inc.USA；DM4000b 型荧光显微镜：Leica Microsystems Ltd.,Germany；荧光分光光度计：Cary Eclipse,Australia。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 BEL-7402 细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中，37℃，5%CO_2 培养箱中培养。细胞于指数生长期时，胰蛋白酶消化，进行传代培养。

1.2.2 MTS 检测 将 5×10^4 个/ml 的对数生长期细胞接种于 96 孔板，100 μl/孔。次日分为阴性对照组(Control,RPMI-1640)、阳性对照组(FU,100 μmol/L,RPMI-1640 配制)和 5 个试药组(分别为 225、75、22.5、7.5 μg/ml 和 2.25 μg/ml,RPMI-1640 配制)，加药，每组设 4 个平行孔。于结束培养(48 h 和 72 h)前 4 h，加入 MTS。结束培养后，于酶标仪 490 nm 检测各孔的吸光度值(Absorbance value,A value)。计算生长抑制百分率。

1.2.3 细胞克隆实验 应用细胞克隆实验检测雄黄对 BEL-7402 细胞的长期毒性作用。取指数生长期细胞，接种于 6 孔板，每孔 150 个细胞。次日分组(同 MTS 检测)加药，药物作用 24 h 后，去上清，PBS 洗 2 遍，换成无药物的完全培养基，于 5% CO_2、37℃培养箱中继续培养 10 d。培养结束后，弃上清，瑞氏吉姆萨(溶于 70%乙醇)染色，倒置显微镜下计数细胞集落数(每个集落的细胞数大于 50 个细胞)。计算其它各给药组的克隆百分率，克隆百分率(%)=给药组的克隆数/阴性对照组的克隆数×100%。

1.2.4 荧光显微镜观察 将细胞接种于 24 孔板，次日分组(阴性对照组、225、22.5 μg/ml 和 2.25 μg/ml 的雄黄组)加药。药物作用 24 h 后，去上清，加入 PBS 配制的荧光染液(终浓度为 20 μg/ml PI 和 10 μg/ml Hoechest33258)，荧光倒置显微镜下观察。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 2×10^8 个/L 的细胞种于 12 孔培养板，每孔 2 ml。次日，分为阴性对照组、225、22.5 μg/ml 和 2.25 μg/ml 的雄黄组并加药。每组设 3 个平行孔。按 Annexin V/FITC 试剂盒说明，流式细胞仪分析 10^4 个细胞。

1.2.6 细胞内钙($[Ca^{2+}]_i$)检测 Fura 2/AM 是一种钙离子敏感的荧光染料。Fura 2/AM 负载细胞后，用荧光分光光度计以激发波长分别为 340 nm 和 380 nm、发射波长为 510 nm 测定其荧光强度比率(F_{340}/F_{380})，该荧光强度比率能反映$[Ca^{2+}]_i$的变化，已成为判断$[Ca^{2+}]_i$变化的指标[2]。取对数生长期细胞，用缓冲液(含 150 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl、5 mmol/L glucose、1 mmol/L $MgCl_2$、2.2 mmol/L $CaCl_2$ 和 10 mmol/L HEPES,pH 7.4)洗 2 遍，用含 0.2%牛血清白蛋白的上述缓冲液重悬细胞，加入终浓度为 5 μmol/L 的 fura 2/AM,37°C 避光孵育 30 min。用上述缓冲液洗 3 遍，以去除细胞外残留的 Fura 2/AM。用含 0.2%牛血清白蛋白的上述缓冲液重悬细胞，调整为 5×10^5 个/ml,37°C 避光孵育 20 min。荧光分光光度计测定 F_{340}/F_{380} 比率。实验结果以给药前的平均比率进行标准化，用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

1.2.7 线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential,$\Delta\psi m$)测定 R123 是一种具有膜通透性的阳离子荧光染料，可扩散进入细胞质，聚集于带负电位的线粒体，结合基质蛋白后其荧光即淬灭。线粒体膜去极化时，R123 释放进入细胞浆，R123 荧光恢复。因此，R123 荧光强度能反映线粒体膜去极化程度[3]。取对数生长期细胞，D-Hanks 液洗 2 遍，用 D-Hanks 液重悬细胞，加入终浓度为 500 nmol/L 的 R123、37°C 避光负载 30 min。R123 负载的细胞用 D-Hanks 洗 3 遍，再用 D-Hanks 液重悬细胞，调整为 4×10^5 个/ml。荧光分光光度计测定荧光强度，设定激发波长 488 nm，发射波长 535 nm。荧光强度稳定后，加入雄黄。实验结果以给药前的平均荧光强度进行标准化。

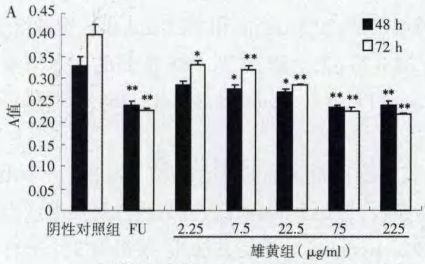
1.3 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。

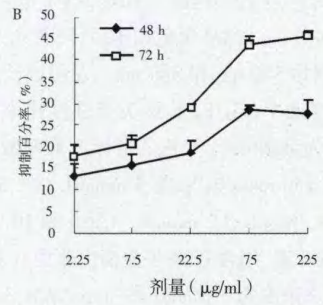
2 结　果

2.1 雄黄对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖的影响

MTS 检测显示(图 1A、1B)，10^{-4} mol/L FU 作用 BEL-7402 细胞 48 h 和 72 h 的抑制百分率分别为(27.6±3.6)%和(43.2±1.1)%；随雄黄剂量的增加和药物作用时间的延长，雄黄对 BEL-7402 细胞体外增殖的抑制作用逐渐增强。细胞克隆实验显示(图 1C)，随雄黄剂量的增加，BEL-7402 细胞克隆数逐渐减少。



A. 与阴性对照组比，*，P<0.05，**，P<0.01



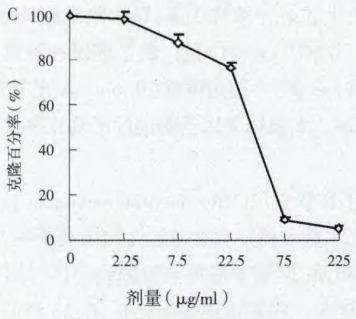


图 1　雄黄对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖(A、B)和克隆(C)的影响

2.2 雄黄对 BEL-7402 细胞凋亡的影响

经 PI 和 Hoechest33258 双荧光染色，荧光显微镜观察显示(图 2，200×)，正常细胞染色质呈均一的蓝染；早期凋亡细胞核染色质聚集，呈亮蓝色；晚期凋亡细胞核碎裂，蓝染，或核裂解后呈红染。阴性对照组凋亡细胞极少，与阴性对照组比，雄黄作用后的凋亡细胞和死亡细胞明显增多。流式细胞仪检测显示(图 2)，阴性对照组的凋亡细胞百分率为(2.6±1.4)%，2.25、22.5 μg/ml 和 225 μg/ml 的雄黄作用后的凋亡细胞百分率分别为(9.4±2.8)%、(19.4±4.2)%和(28.6±4.6)%，均高于阴性对照组(P<0.01)。

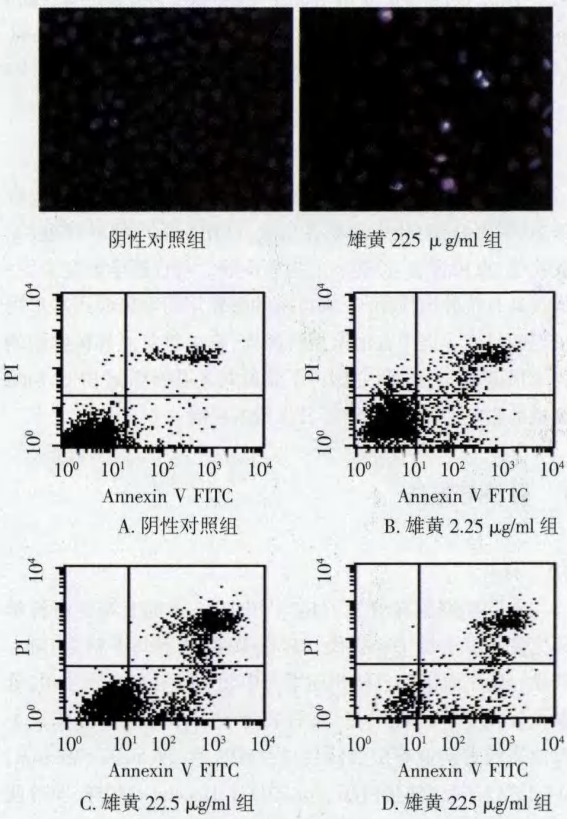
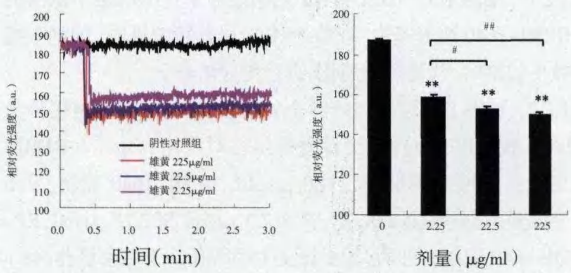


图 2　雄黄对 BEL-7402 细胞凋亡的影响

2.3 Δψm 的测定

R123 荧光强度检测显示(图 3)，BEL-7402 细胞经 R123 负载后的为(186.4±1.2) a.u.。随雄黄剂量的增加，R123 荧光强度逐渐减弱。

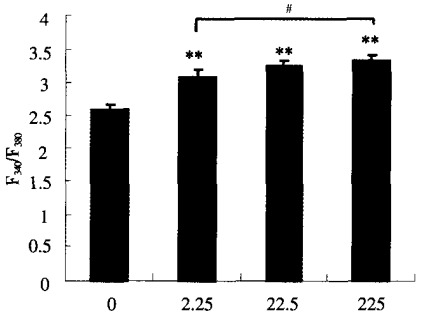


与阴性对照组比，**，P<0.01，不同剂量组间比较，#，P<0.05，##，P<0.01

图 3　雄黄对 BEL-7402 细胞△Ψm 的影响

2.4 $[Ca^{2+}]_i$ 测定

荧光分光光度计检测结果(图 4)显示，BEL-7402 细胞 Fura 2/AM 负载后的 F_{340}/F_{380} 比率为 2.58±0.09，2.25、22.5 μg/ml 和 225 μg/ml 的雄黄作用后的 F_{340}/F_{380} 比率分别为 3.07±0.12、3.24±0.07 和 3.34±0.07，均高于阴性对照组(P<0.01)。



与阴性对照组比，**，$P<0.01$，不同剂量组间比较，#，$P<0.05$

图 4 雄黄对 BEL-7402 细胞$[Ca^{2+}]_i$的影响

3 讨 论

雄黄的主要成分为 As_4S_4，具有抑制白血病细胞生长、诱导细胞分化和促进肿瘤细胞凋亡的作用[4,5]，对临床白血病的疗效明显[6-8]，因而受到很多研究者的关注。大多报道主要集中于雄黄对白血病治疗的研究，而对实体瘤的研究报道较少。以往研究显示，雄黄具有抑制荷瘤小鼠[9]和大鼠[10]肿瘤生长的作用，并能诱导肿瘤细胞凋亡[9,11]。本研究结果显示，雄黄能剂量依赖性地抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的体外增殖和克隆生长，并能诱导 BEL-7402 细胞凋亡。其中，225 μg/ml 的雄黄作用后的凋亡细胞百分率达(28.6±4.6)%，高于阴性对照组的(2.6±1.4)%($P<0.01$)。提示，雄黄具有一定的抗肿瘤作用，诱导细胞凋亡是其抗肿瘤的作用机制之一。

目前，有关雄黄抗实体瘤作用的机制尚未明了。钙离子(Ca^{2+})是细胞内的一种信号分子，在细胞多种生物学功能中发挥着重要作用，$[Ca^{2+}]_i$的升高是细胞凋亡的关键信号之一[12]。$[Ca^{2+}]_i$升高，CaMK(Calmodulin-dependent kinase)Ⅱ通过自磷酸化或活性氧氧化而激活，至少可通过 3 种通路诱导细胞凋亡[13]：①激活 JNK，诱导 Fas；②线粒体摄取 Ca^{2+}，线粒体外膜通透性增加，$\Delta\psi m$ 下降，凋亡基因的释放；③激活 STAT1，通过转录或非转录机制促进凋亡。另有报道[14]，应激刺激能引起的内质网释放 Ca^{2+}，线粒体摄取 Ca^{2+}，触发线粒体功能障碍，并激活 CaMK Ⅱ，从而诱导凋亡。本研究结果显示，雄黄作用后，BEL-7402 细胞 $[Ca^{2+}]_i$升高，线粒体膜电位下降。提示，雄黄的抗肿瘤作用可能是通过砷诱导 Ca^{2+}依赖的凋亡通路和线粒体依赖的凋亡通路[15,16]，进而诱导细胞凋亡有关。

综上所述，雄黄具有抗人肝癌细胞系 BEL-7402 的作用，并能诱导细胞凋亡，其作用机制可能与钙依赖性通路和线粒体依赖的凋亡通路有关。

参 考 文 献

[1] 张春敏，孟双荣，齐元富.雄黄抗肿瘤作用机制研究进展[J].山东中医杂志，2010，29(8)：579-581.

[2] Ni X，Sullivan G J，Martin-Caraballo M.Developmental characteristics of AMPA receptors in chick lumbar motoneurons[J].Dev Neurobiol，2007，67(11)：1419-1432.

[3] Ward M W，Rego A C，Frenguelli B G，et al.Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells[J].J Neurosci，2000，20(19)：7208-7219.

[4] 滕智平，张 萍，主鸿鹄，等.四硫化四砷诱导急性早幼粒细胞凋亡的机制[J].北京大学学报(医学版)，2006，38(3)：236-238.

[5] Qi J，He P，Chen W，et al.Comparative.proteome study of apoptosis induced by As_4S_4 in retinoid acid resistant human acute promyelocytic leukemia NB4-R1 cells[J].Leuk Res，2010，34(11)：1506-1516.

[6] Chou W C，Dang C V.Acute promyelocytic leukemia：recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies[J].Curr Opin Hematol，2005，12(1)：1-6.

[7] Lu D P，Qiu J Y，Jiang B，et al.Tetra-arsenic tetra-sulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia：a pilot report[J].Blood，2002，99(9)：3136-3143.

[8] Douer D.New advances in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J].Int J Hematol，2002，76(s2)：179-187.

[9] 刘京生，吕占军，董兰风，等.雄黄诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究[J].河北中医，2000，22(11)：874-876.

[10] 庞 琦，王汉斌，葛明旭，等.雄黄治疗胶质瘤的初步试验研究[J].山东大学学报(医学版)，2006，44(4)：376-379.

[11] 王汉斌，庞 琦，富 壮，等.雄黄体外诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的特点及分析[J].山东大学学报(医学版)，2009，48(1)：21-25.

[12] Olofsson M H，Havelka A M，Brnjic S，et al.Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology role of calmodulin kinase Ⅱ[J].BMC Chem Biol，2008，8：2.

[13] Timmins J M，Ozcan L，Seimon TA，et al.Calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J].J.Clin.Invest，2009，119(10)：2925-2941.

[14] Lim W S，Timmins J M，Seimon T A，et al.STAT1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo[J].Circulation，2008，117(7)：940-951.

[15] Florea A M，Yamoah E N，Dopp E.Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction[J].Environ Health Perspect，2005，113(6)：659-664.

[16] Shen Z Y，Shen W Y，Chen M H，et al.Mitochondria，calcium and nitric oxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As_2O_3[J].Int J Mol Med，2002，9(4)：385-390.

（责任编辑：关蕴良）