

鹅脱氧胆酸衍生物 HS-1200 对肝肿瘤细胞株 凋亡及增殖的影响

韩国庆, 刘 慧, 任万华, 秦成勇

(山东省立医院, 山东济南 250021)

[摘要] 目的 探讨鹅脱氧胆酸衍生物 HS-1200 诱导肝肿瘤细胞株凋亡及抑制增殖的作用及机制。方法 分别用 40、60 及 80 μM 的 HS-1200 作用于肝肿瘤细胞株 BEL7402, 于作用后 12、24 及 36 h 采用 MTT 检测细胞活性, 流式细胞术、DNA 梯状条带、荧光显微镜检测细胞凋亡, Western-blot 法检测 bcl-2、bax、细胞色素 C 及 caspase-3 的表达。结果 HS-1200 可有效地抑制 BEL7402 生长, 其作用随药物浓度提高和作用时间延长而增强, 呈一定的剂量、时间依赖性; FCM 结果表明, 随作用浓度和作用时间延长, 凋亡率显著增加, 有显著性差异 ($P < 0.05$); Hoechst33258 染色结果显示细胞呈凋亡形态学改变, 凝胶电泳显示典型的凋亡梯形条带, Western blot 结果显示为 HS-1200 可提升 bax、细胞色素 C 及 caspase-3 的表达, 降低 bcl-2 的蛋白表达水平。结论 HS-1200 对 BEL7402 有显著的抑制增殖及诱导凋亡的作用, 其机理可能为提升 bax、细胞色素 C 及 caspase-3 的表达, 降低 bcl-2 的表达; HS-1200 可能是一种有效的治疗肝癌的化疗药物。

[关键词] 鹅脱氧胆酸衍生物; 肝肿瘤细胞株; 细胞凋亡

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1002-266X(2007)26-0007-03

Effects of inducing apoptosis and inhibiting proliferation on hepatoma cell line by chenodeoxycholic acid derivative HS-1200

HAN Guo-qing, LIU Hui, REN Wan-hua, QIN Cheng-yong

(Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, P. R. China)

Abstract: [Objective] To investigate effects of inducing apoptosis and inhibiting proliferation on hepatoma cell line by chenodeoxycholic acid (CDCA) derivative HS-1200, and to observe mechanisms of the effects. [Methods] The hepatoma cell line BEL7402 was treated with different concentrations (40, 60 and 80 μmol) of CDCA derivative HS-1200 at different time. At 12, 24 and 36 h after treatment, the cell viability of hepatoma cells was examined by MTT assay. Apoptosis of hepatoma cell line BEL7402 was detected by flow cytometry, DNA ladder, and fluorescence microscope. The protein levels of Bcl-2, Bax, cytochrome C and casepase-3 were determined by Western blot analysis. [Results] HS-1200 inhibited the proliferation of BEL7402 cells and its effect was dose- and time-dependent. FCM analysis of the apoptosis rates showed significant differences between the treatment group and control group ($P < 0.05$). Typical DNA laddering was clearly visible in ethidium bromide-stained gels. At the morphological study, cells treated with HS-1200 displayed characteristic nuclear features of apoptosis. Western blot analysis showed that HS-1200 up-regulated the protein levels of bax, cytochrome C and casepase-3 but down-regulated the protein level of bcl-2. [Conclusion] HS-1200 can inhibit proliferation and induce apoptosis of BEL7402 cell line by up-regulating the protein levels of Bax, cytochrome C and casepase-3 but down-regulating the protein level of Bcl-2. Therefore HS-1200 might be a promising chemotherapeutic agent for treating hepatocellular carcinoma.

Key words: chenodeoxycholic acid derivative; hepatoma cell line; apoptosis

鹅脱氧胆酸为一种初级胆汁酸, 可用于治疗胆石症并能控制血液中胆固醇浓度。近来研究表明, 鹅脱氧胆酸衍生物 HS-1199 和 HS-1200 能诱导多种癌细胞凋亡并能抑制其增殖, 如人宫颈癌细胞^[1]、人前列腺癌细胞^[2] 及人骨肉瘤细胞^[3] 等, 以 HS-

1200 作用更强。2006 年 5 月~2007 年 6 月, 我们观察了 HS-1200 对肝肿瘤细胞凋亡和增殖的影响并探讨其机制。

1 材料

人肝肿瘤细胞株 BEL7402 购自中国科学院上海细胞研究所, 兔抗鼠多克隆细胞色素 C 抗体、兔抗

[基金项目] 山东省科技厅基金项目(2005GG3202192)。

鼠多克隆 bax 抗体、兔抗人多克隆 bcl-2 和 caspase-3 抗体为 Santa Cruz 公司产品, Western blot 显色试剂盒为 Cell Sigma 公司产品, 二甲基亚砷 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品。鹅脱氧胆酸衍生物 HS-1200 由山东省医学科学院药物研究所合成室参照文献^[3]合成提供。

2 方法

2.1 细胞培养 将 BEL7402 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 常规培养传代, 至细胞贴壁融合 80% ~ 90% 备用。

2.2 细胞增殖抑制试验 (MTT 试验) 将对数生长期 BEL7402 细胞配成 3.0×10^4 个/ml 单细胞悬液, 每孔 200 μ l, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h。吸去培养液, 实验组每孔加入 HS-1200, 终浓度分别为 40、60、80 μ M, 对照组不加药物。每个浓度设 3 个复孔, 分别培养 12、24、36 h 后, 每孔加入 MTT (5 mg/ml, 用 0.01% 的 PBS 配制), 置 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h, 弃去孔内液体, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 100 μ l/孔, 避光室温下振荡 20 min, 在酶标仪 (Bio Rad 产品) 上测定各孔吸光度 (A), 测定波长为 570 nm。细胞生长抑制率 = $(1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

2.3 细胞凋亡试验 各组处于对数生长期的细胞经不同药物浓度处理 24 h 后, 0.25% 的胰酶消化收集, 冷 PBS 洗涤, 悬浮成单细胞悬液, 细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 分别取 100 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l 膜联蛋白 v-异硫氰酸荧光素 (Annexin V - FITC)、10 μ l (5 mg/L) 碘化丙啶 (PI), 室温避光反应 30 min, 加入反应缓冲液 400 μ l, 流式细胞术对凋亡细胞进行定量检测。

2.4 细胞 DNA 检测 将观察组 (HS-1200 40、60、80 μ M 处理 24 h) 和对照组 (不加 HS-1200 对照组) 5×10^5 个细胞, 分别移入 1.5 ml EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 20 μ l 细胞裂解液, 充分混匀后, 再加 10 μ l RNA 酶 A, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 h, 加蛋白酶 K 20 μ l (10 mg/ml), 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。取 20 μ l DNA 样品加入 2% 琼脂糖凝胶中, 35 V 电泳 4 h, 凝胶电泳扫描仪照相。

2.5 凋亡细胞形态学观察 ① 荧光 Hoechst33258 染色, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 调整细胞数为 4×10^5 个/ml, 离心弃上清液, 细胞悬浮于 100 μ l DMEM 培养基后, 加入 20 μ l 的 0.5 mg/ml Hoechst33258 储存液, 室温放置 10 min, 荧光显微镜观

察凋亡细胞形态学变化。② 不同浓度药物处理细胞后, 收集细胞, 加入蛋白裂解液吹打混匀, 按照试剂盒 (美国 Active Motif 公司) 说明抽提蛋白质, 采用蛋白测定试剂盒 (美国 Pierce 公司) 测定蛋白浓度, 取 100 μ g 蛋白行 12.5% 的聚丙烯酰胺电泳, 将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温阻断 2 h, 分别加入一抗 (1:1 000) 孵育过夜; 滤膜经缓冲液清洗 3 次后再与二抗室温下孵育 1 h。缓冲液清洗 3 次后, 应用增强的化学发光法显影, 暗室曝光于 X 线片, 显影定影。

2.6 统计学方法 采用 SPSS12.0 软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间和组内采用 *t* 检验和方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制试验 见表 1。

表 1 不同浓度 HS-1200 作用对 BEL7402 细胞的生长抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	36 h
HS-1200 40 μ M 组	18.75 \pm 1.25**	27.05 \pm 1.07**	36.76 \pm 1.52**
HS-1200 60 μ M 组	29.51 \pm 1.21*	38.45 \pm 1.28*	50.29 \pm 1.81*
HS-1200 80 μ M 组	46.5 \pm 1.26** ^Δ	54.41 \pm 1.03** ^Δ	67.2 \pm 1.09** ^Δ
对照组	2.58 \pm 0.46	2.64 \pm 0.51	2.82 \pm 0.72

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 HS-1200 60 μ M 组比较, ** $P < 0.05$, ^Δ $P < 0.01$

3.2 HS-1200 对 BEL7402 凋亡的影响 FCM 检测结果表明, BEL7402 细胞经 HS-1200 40、60、80 μ M 3 个浓度作用 24 h 的凋亡率分别为 (11.42 \pm 0.54)%、(21.36 \pm 0.28)%、(42.25 \pm 0.52)% , 对照组的凋亡率为 (1.09 \pm 0.05)%。BEL7402 细胞经 60 μ M HS-1200 分别作用 24 h、36 h、48 h 的凋亡率分别为 (21.36 \pm 0.28)%、(29.82 \pm 0.31)%、(37.15 \pm 0.45)% , 随作用浓度和作用时间的延长, 凋亡率显著增加。实验组与对照组之间及不同浓度组之间, 有显著性差异 ($P < 0.05$); 各时间组与对照组之间及不同时间组之间也有显著性差异 ($P < 0.05$)。说明 HS-1200 作用 BEL7402 细胞后, 可明显诱导细胞凋亡。

3.3 细胞 DNA BEL7402 细胞琼脂糖凝胶电泳呈现典型的凋亡梯形带, 而对照组仅显示基因组 DNA (见图 1)。Hoechst 33258 荧光染色显示对照组细胞发出微弱的绿色荧光, 细胞核无明显的形态学改变, 各实验组均发现有细胞核浓缩聚集, 核碎裂, 有凋亡小体形成并发出较强的绿色荧光。

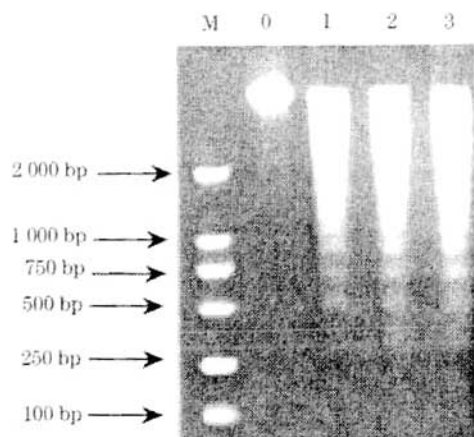


图 1 BEL7402 经不同浓度 HS-1200 处理 24 h 后 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

注: M 为 DNA 标志物; 0~3 分别为对照组及 HS-1200 浓度 40、60、80 μM 组

3.4 细胞 bax、细胞色素 C 及 caspase-3 表达情况见表 2。

表 2 不同浓度 HS-1200 作用 24 h 后 BEL7402 的 western blot 结果(相对值, $\bar{x} \pm s$)

组别	bax	细胞色素 C	Caspase-3
HS-1200 40 μM 组	8.55 ± 1.20*	7.43 ± 1.22*	8.26 ± 1.02*
HS-1200 60 μM 组	8.69 ± 1.21*	7.45 ± 1.26*	8.29 ± 1.04*
HS-1200 80 μM 组	8.74 ± 1.26*	7.47 ± 1.29*	8.32 ± 1.09*
对照组	2.08 ± 0.46	2.04 ± 0.51	2.02 ± 0.49

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

4 讨论

近来国外研究表明, HS-1200 在体外实验中能诱导多种肿瘤细胞凋亡。本实验研究结果证实其对 BEL7402 有明显的抑制作用, 其抑制率具有明显的药物浓度依赖性和时间依赖性, 即可有效抑制肝肿瘤细胞活性。出现典型的细胞凋亡形态学改变及梯形电泳图谱, 表明 HS-1200 可引起 BEL7402 凋亡。

越来越多证据表明线粒体参与细胞凋亡, 而线粒体膜通透性转换在凋亡调节中起了重要作用^[4]。线粒体膜通透性可为 bcl-2 家族中相关成员所调节, 抗凋亡蛋白如 bcl-2 和 bcl-xL, 具有恢复跨膜电位和调节线粒体膜通透性转换孔功能的作用, 可使线粒

体膜通透性降低, 阻止凋亡启动因子如细胞色素 C 释放, 具有很强的抗细胞凋亡作用; 而促凋亡蛋白如 bax 或 bak, 则与抗凋亡蛋白作用相反, 具有很强的促细胞凋亡作用^[5]。bax 与 bcl-2 的比值的升高较单纯 bax 升高, 对于药物诱导的凋亡来说更为重要^[6]。许多研究表明细胞色素 c 从线粒体释放是诱导细胞凋亡的重要一步^[7]。细胞色素 C 释放到胞质后可引发 caspase 活化级联, 导致细胞凋亡。本结果显示, BEL7402 经 HS-1200 处理后 bax、细胞色素 C 及 caspase-3 蛋白表达水平升高, 而 bcl-2 蛋白水平表达下降, 因而 bax 与 bcl-2 的比值明显升高, 导致细胞色素 C 升高, 引发 caspase-3 活性升高, 导致细胞凋亡。

综上所述, HS-1200 能够显著抑制肝肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡, 其机制可能为提升 bax 与 bcl-2 的比值, 促使细胞色素 C 释放, 引发 caspase 活化级联, 引起细胞凋亡。本研究结果为鹅脱氧胆酸衍生物用于肝癌化疗提供了理论基础。

【参考文献】

- [1] Eunok Im, Sang-Ho Choi, Hongsuk S, et al. Synthetic bile acid derivatives induce apoptosis through a c-Jun N-terminal kinase and NF-Kb-dependent process in human cervical carcinoma cells[J]. Cancer letters, 2005, 229(1): 49-57.
- [2] Yung HC, Eun OI, Hongsuk S, et al. Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid in human prostate cancer cells[J]. Cancer Letters, 2003, 199(2): 157-167.
- [3] Kim GC, Her YS, Park JH, et al. Synthetic bile acid derivative HS-1200-induced apoptosis of human osteosarcoma cells[J]. The Korean J. Anat, 2004, 37(5): 449-457.
- [4] Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [5] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptosis cell death[J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1-3): 19-23.
- [6] Salomons GS, Brady HJ, Verwijs-Janssen M, et al. The Bax:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. Int [J] Cancer, 1997, 71(6): 959-965.
- [7] Reed JC. Cytochrome c: can live with it-can live without it[J]. Cell, 1997, 91(5): 559-562.

(收稿日期: 2007-07-12)

热烈庆祝《山东医药》创刊五十周年!