

绞股蓝总皂甙对肝细胞瘤细胞凋亡的诱导作用

□杨明辉* 郭晓兰 袁国华 周京国 魏 锦

(川北医学院附属医院风湿免疫研究所 南充 637000)

摘要:目的:探讨绞股蓝总皂甙(Gp)对人肝细胞瘤细胞(Huh-7)细胞凋亡的影响及作用机制。方法:采用流式细胞术检测 Gp 对人 Huh-7 细胞凋亡的影响,Western blot 分析 Gp 作用 Huh-7 细胞后表达的 Bcl-2, Bcl-XL, Bax 和 Bad 蛋白水平。结果:20mg/ml Gp 作用于细胞 24h 后,64%的 Huh-7 细胞发生凋亡,而人纤维细胞凋亡率为 12%。Western blot 结果显示 Gp 作用后 Huh-7 细胞中 Bcl-2 表达明显降低,而 Bax 表达显著上调。结论:Gp 可诱导人 Huh-7 细胞凋亡,其作用机制是通过下调 Bcl-2 和上调 Bax 的表达而发挥作用。

关键词:绞股蓝总皂甙 细胞凋亡 Bcl-2 Bax

大量的研究表明,发生细胞凋亡需要细胞内自杀机制的活化和表达^[1],Bcl-2 家族是细胞凋亡的调节蛋白,包括促进细胞生存的蛋白如 Bcl-2,Bcl-XL, Bcl-1,A1,Bcl-W,以及诱导细胞死亡的蛋白如 Bax, Bak,Bcl-XS,Bok 等。这些促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白之间的相对平衡影响着细胞对死亡信号的敏感性^[2],在细胞凋亡的级联活化和调节中起着重要的作用^[2,4]。

绞股蓝总皂甙(Gypenosides,Gp)是从绞股蓝中分离的 80 余种皂甙的总称,研究发现 Gp 能抑制和杀伤多种癌细胞,临床上亦发现以绞股蓝为主的中药方剂可预防癌症的转移和复发,并可提高患者自然杀伤细胞的活性而对正常细胞无显著影响,但其作用机理尚不完全清楚。本研究旨在探讨 Gp 对 Huh-7 细胞凋亡的影响及其诱导细胞凋亡的分子途径,为其临床应用提供理论依据。

收稿日期:2005-11-10

修回日期:2006-08-16

* 杨明辉:主管技师,研究方向:自身免疫性疾病,Tel:0817-2262325,E-mail:yhm6782003@yahoo.com.cn。

一、材料与方法

1. 药物

Gp 购自陕西省安康中药厂,批号为:041016,用 DMEM 培养基(含 100mL/L 胎牛血清,1×10⁶U/L 青霉素和 100mg/L 链霉素,pH 值为 7.2)溶解,过滤除渣,制成含 Gp 为 20、10、5、0 mg/mL 的工作液,各工作液 pH 值基本一致,为 7.1~7.2。DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM),由美国 GIBCO 公司提供,批号为:1136551。胎牛血清:美国 GIBCO 公司,批号为:14831。

2. 细胞培养及处理

将 Huh-7 细胞接种于 DMEM 培养基中,于 37℃,5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养。同时处理来源于 3 例外伤病人手术的滑膜成纤维细胞作为对照。将 1×10⁵ 细胞/L 接种于 12 孔板中,每孔加入 DMEM 培养基 2mL,培养 24h 后,去掉培养基,再顺

序加入 0、5、10、20mg/mL 的 Gp 工作液 2mL, 同时作六平行孔, 继续培养 24h 后, 收集细胞, PBS 洗涤, 苔盼蓝染色计数活细胞数量和细胞总数。

3. Western Blot 分析

Gp 作用后的 Huh-7 细胞经预冷 PBS 洗涤 2 次后, 刮下细胞 4℃、800g 离心收集细胞, 加入细胞裂解液, 4℃振摇 30min, 10000g 离心 15min 去除细胞碎片, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。取 20mg 细胞裂解蛋白液作 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉 TBS 缓冲液封闭 2h 后, 分别加入特异性兔抗人 Bcl-2, Bcl-XL, Bax 和 Bad 抗体于 4℃孵育过夜, 再经辣根过氧化物酶结合的羊抗兔 IgG 抗体作用, 利用增强化学发光试剂作用 PVDF 膜, 显色后 Quantity One 定量软件分析获得印迹条带的蛋白含量。

4. 流式细胞分析

采用 annexin V 方法检测细胞凋亡。分别收集经不同浓度 Gp 作用 24h 后的 Huh-7 细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 细胞重悬于结合缓冲液 (10mmol/L HEPES, 140mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, pH7.4) 中, 调整细胞浓度为 1×10⁶/mL, 加入 FITC 结合的 annexin V, 室温放置 10min 后洗涤, 再行 PI 染色。然后以 PI 阴性细胞设门, 流式细胞仪检测 Huh-7 细胞凋亡水平。

5. 统计学分析

采用 Student's 检验, P<0.05 为差异有显著性意义。

二、结果

1. Gp 诱导 Huh-7 细胞凋亡

不同浓度 Gp 作用于 Huh-7 细胞 24h 后, 细胞凋亡率呈剂量依赖性 (如图 1 所示)。Gp 作用后, 人成纤维细胞的凋亡率差异无意义; 而 Huh-7 细胞的凋亡率均较未经 Gp 作用的 Huh-7 细胞高, 当 Gp 浓度达到 10mg/mL 时, 差异有统计学意义 (P<0.05); 当 Gp 浓度达到 20mg/mL 时, 有显著性差异 (P<0.01)。20mg/mL Gp 作用 24h 后, 64% 的 Huh-7 细胞凋亡, 而人成纤维细胞只有 12% 的凋亡率, 如图 2 和图 3 显示。

2. Gp 对 Bcl-2 家族蛋白表达的调节

Western Blot 方法分析 Gp 对 Bcl-2 家族蛋白 (Bcl-2, Bcl-XL, Bax 和 Bad) 表达的影响, 实验结

果显示: Gp 作用 Huh-7 细胞后, Bcl-2 表达随 Gp 的浓度增加而逐渐减少, 相反, Bcl-XL 和 Bax 蛋白随 Gp 的浓度增加表达逐渐上调, Bad 蛋白表达不受 Gp

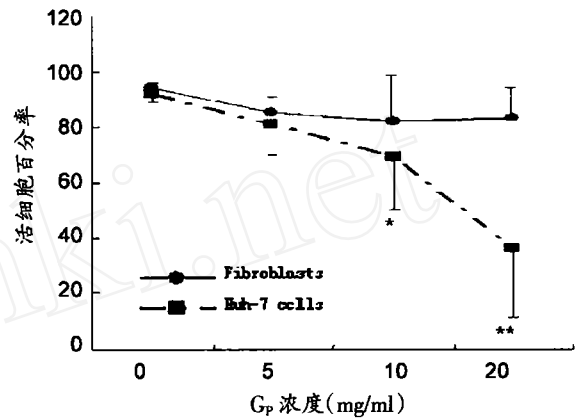


图 1 Huh-7 细胞经不同浓度的 Gp 作用 24 小时活细胞数量

注: 与阴性对照组比较, * P<0.05; ** P<0.01, 下同。

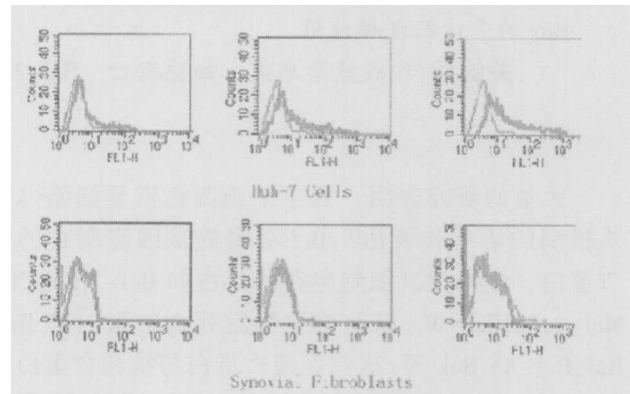


图 2 Gp 诱导 Huh-7 细胞、成纤维细胞凋亡的流式细胞仪检测结果

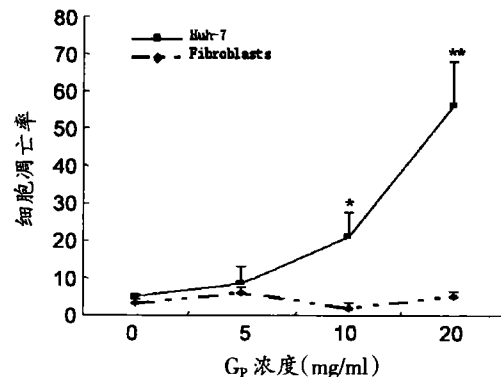


图 3 不同浓度 Gp 作用后 Huh-7 细胞的凋亡率

影响(图4和图5)。

三、讨论

研究表明 Gp 能抑制人肺腺癌细胞、食管癌细胞和肝细胞瘤细胞生长,目前已越来越多地用于治疗恶性肿瘤,但是,其治疗癌症的机制尚不清楚。为了探讨 Gp 诱导细胞凋亡作用的机制,本文检测了 Gp 对肝细胞瘤 Huh-7 细胞生存力的影响。结果显示:Gp 作用后,Huh-7 细胞凋亡率呈剂量依赖性。同时还发现:Huh-7 细胞对于 Gp 引起的细胞凋亡较人滑膜成纤维细胞更为敏感,为排除 Gp 的有毒成分导致细胞坏死的影响,采用 FITC 标记的 annexin V 和 PI 同时染色细胞,以 PI 阴性细胞(活细胞)设门,流式细胞仪检测细胞凋亡水平。结果发现 Gp 作用 Huh-7 24h 后,约有 56% 细胞凋亡,如图 2 和 3 显示。这与 Wang 等报道的结果相似^[5]:他们采用 TUNEL 法检测 Gp 对肝细胞瘤细胞的影响,发现 Gp 作用后 TUNEL 阳性细胞数量增多。

细胞凋亡是一种由细胞启动一系列导致细胞死亡的程序性信号转导途径的过程。在凋亡过程中,半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)蛋白水解级联作用至关重要^[6,7]。现已明确,caspase 可由外部途径(死亡受体)和内部途径(线粒体)启动和活化。在外部途径中,当细胞外“死亡配体”(FasL/Apo1L/CD95L, Trail/Apo2L,Apo3L)与“死亡受体”结合形成复合物后,caspase-8 通过与 Fas 相关死亡区域(FADD)分子/Mort1 作用而活化。在内部途径中,通过线粒体传导细胞死亡信号,导致细胞器的改变而细胞色素 C 的释放。细胞色素 C 能与凋亡蛋白酶活化因子(A-PAF)-1 相互作用,从而激活 caspase-9,诱导细胞凋亡。而 Bcl-2 家族在线粒体依赖的细胞凋亡途径中通过控制细胞器释放促凋亡因子和抑凋亡因子发挥着中心调节功能^[3,8]。Wang 等的研究表明,Gp 对肝细胞瘤细胞的作用剂量不影响 Fas/FasL 的表达^[5],因此我们检测 Bcl-2 家族蛋白表达水平的变化来研究 Gp 对线粒体依赖细胞凋亡途径的影响。实验结果显示:Gp 作用后,Huh-7 细胞中 Bcl-2 家族蛋白受到不同程度的调节,Bcl-2 蛋白明显下调,相反 Bcl-XL 和 Bax 蛋白则显著上调,而 Bad 蛋白不受 Gp 影响。

众所周知,Bcl-2 家族在线粒体依赖的细胞凋亡途径中处于中心调节地位,其作用是抑制或促进细胞凋亡。研究证实,促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的相对平衡影响着细胞对死亡信号的敏感性^[2,4]。大量实验表明,Bcl-2 和 Bcl-XL 的过度表达会阻止线粒体细胞色素 C 的释放,从而抑制 caspase 的级联活化和细胞凋亡^[9-12]。而 Bax 则与 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成二聚体,从而拮抗 Bcl-2 或 Bcl-XL 的作用^[2,4,13,14],Bax 也可作为线粒体膜上的通道蛋白控制膜的通透性,有助于重要蛋白的通过^[15],如细胞色素 C 或其他诱导 caspase 级联活化作用和细胞凋亡的诱导因子等^[16]。我们的实验发现,Gp 作用于 Huh-7 细胞后引起 Bcl-2 表达明显减少和 Bax 蛋白表达的增加,即促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的相对平衡受到破坏从而提高了细胞对死亡信号的敏感性,导致了 Huh-7 细胞凋亡率大大增高。

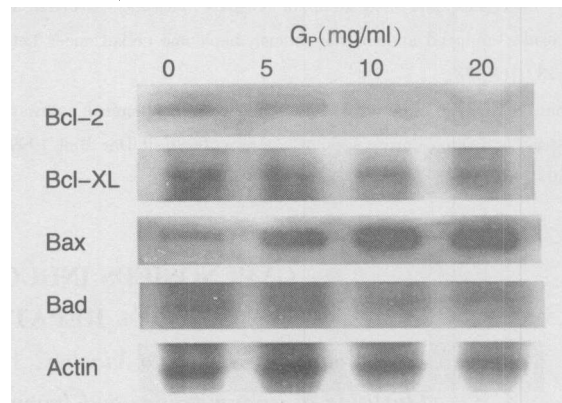


图4 Western blot 检测 Bcl-2, Bcl-XL, Bax 和 Bad 的表达

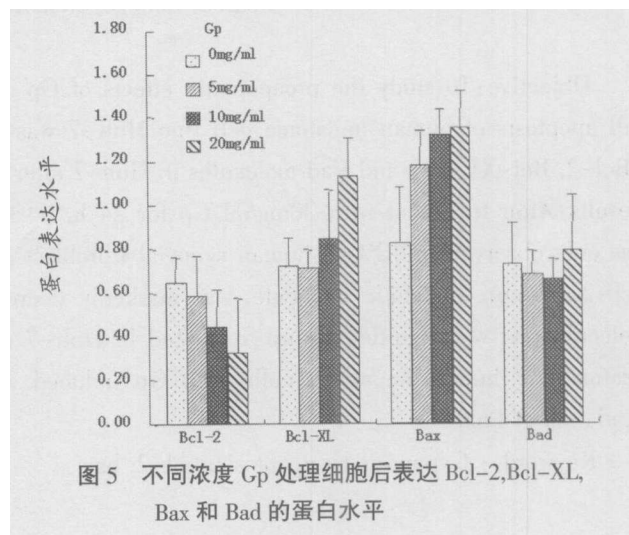


图5 不同浓度 Gp 处理细胞后表达 Bcl-2, Bcl-XL, Bax 和 Bad 的蛋白水平

因此,本实验结果证实:Gp 诱导人肝细胞瘤细胞凋亡的分子机制是通过上调促凋亡蛋白 Bax 表达和下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,导致线粒体膜的通透性改变而释放细胞色素 C 或其他诱导凋亡因子,从而引起 caspase 的级联活化和诱导细胞凋亡。

参考文献

- Roy S,icholson DW.Cross-Talk in Cell Death Signaling.J Exp Med 2000, 92:21~26.
- Burlacu A.Regulation of apoptosis by Bel-2 family proteins.J Cell Mol Med 2003,7:249~257.
- Martin DA,Elkon KB.Mechanisms of apoptosis.Rheum Dis Clin North Am 2004,30:441~454.
- Cory S,Adams JM.The Bcl2 family:regulators of the cellular life-or-death switch.Nat.Rev.Cancer 2002, :647~656.
- Wang QF,Chen JC,Hsieh SJ,Cheng CC,Hsu SL.Regulation of Bcl-2 family molecules and activation of caspase cascade involved in gypenosides-induced apoptosis in human hepatoma cells.Cancer Lett. 2002;183:169~78.
- Budihardjo I,Oliver H,Lutter M,Luo X,Wang X.Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol 1999, 15:269~290.
- Hipfner DR,Cohen SM.Connecting proliferation and apoptosis in development and disease.Nat Rev Mol Cell Biol 2004,5:805~15.
- Sun EW,Shi YF,et.al,Apoptosis:the quiet death scilences the immunessystem.Pharma Thera,2002,92,135~145.
- Heiser D,Labi V,Erlacher M, illunger A.The Bel-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease.Exp Gerontol 2004,39:1125~1135.
- Gross A, cDonnell JM,Korsmeyer SJBcl-2family members and the mitochondria in apoptosis.Genes Dev 1999,13:1899~1911.
- Bouillet P,Strasser A.BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death.J Cell Sci 2002,115:1567~1574.
- Thomenius MJ,Wang NS,Reineks EZ,Wang Z,Distelhorst CW.Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins.J Biol Chem 2003,278:6243~6250.
- Cheng EH,Levine B,Boise LH,Thompson CB,Hardwick JM.Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. Nature 1996,379:554~556.
- Don AS,Hogg PJ.Mitochondria as cancer drug targets.Trends Mol Med 2004,10:372~378.
- Wood DE,Newcomb EW.Cleavage of Bax enhances its cell death function.Exp Cell Res.2000,256:375~382.
- Orrenius S,Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death:the calcium-apoptosis link.Nat Rev Mol Cell Biol 2003,4:552~565.

GYPENOSIEDS INDUCE APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOMA CELLS

Yang Minghui, Guo Xiaolan, Yuan GuoHua, Zhou Jingguo, Jin Wei
(Institute of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China)

Objective:To study the proapoptotic effects of Gp on human hepatoma cells. **Methods:**The effects of Gp on the cell apoptosis of human hepatoma cell line Huh-7 was assessed by flow cytometrial analysis, and the expression of Bcl-2, Bcl-XL, Bax and Bad molecules in Huh-7 after treated by Gp was detected by using Western blot analysis. **Results:**After treatment with 20mg/ml Gp for 24 h, 64% of Huh-7 cell were undergoing apoptosis, while cell death was only observed in 12% of human synovial fibroblast cells treated by Gp. Western blot analysis demonstrated that, Bcl-2, an anti-apoptotic molecule, was markedly decreased in Huh-7 cells treated by Gp. Whereas, proapoptotic molecule Bax was significantly up-regulated in Huh-7 cells after Gp treatment. **Conclusion:**Our results suggest that treatment of human hepatoma cells with Gp induced apoptosis through the down-regulation of Bcl-2, and up-regulation of Bax.

Keywords: Gypenosieds; apoptosis; bcl-2; bax

(责任编辑:付建华, 责任编辑:李澎湃, 责任译审:凌仰之)