

半边旗中二萜类化合物 5F 诱导胰腺癌细胞凋亡机制的探讨*

□沈仕兴 (海南省儋州市农垦那大医院普通外科 儋州 527000)

张科郡** 刘群声 谷水基 许海博

(苏州大学第一附属医院中医内科 苏州 215006)

摘要: 目的: 观察研究半边旗中二萜类化合物 5F (11a-羟基-15-氧-16-烯-ent 贝壳杉烷-19 酸)诱导人胰腺癌细胞株 AsPC-1 凋亡的效果及其机制。方法: 用脂质体转染法将 PUMA/siRNA 导入 AsPC-1 细胞, G418 筛选阳性细胞, 获得稳定转染的阳性克隆。将转染载体的 AsPC-1 阳性克隆细胞和未转染载体的 AsPC-1 细胞分别暴露于浓度为 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5F 中作用 72h。RT-PCR 检测不同组细胞经 5F 作用 24h 后的 PUMA 表达; MTT 检测细胞生长抑制, 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡, Hoechst33258 和 PI 双染色染色了解细胞凋亡的变化。结果: 5F 促进 AsPC-1 细胞凋亡, 抑制细胞生长, 并有明显的剂量依赖性, 在细胞凋亡的同时伴有 PUMA 表达的上调; 当 PUMA 表达抑制后, 受 5F 作用的细胞出现 PUMA 表达的降低, 同时伴有细胞凋亡的抑制及细胞的明显增殖。结论: 5F 促进体外 AsPC-1 细胞凋亡, 并抑制其生长, 其诱导凋亡与上调 PUMA 有关。

关键词: 胰腺癌 半边旗 二萜类 PUMA 基因 转染 凋亡

半边旗(*pteris semipinnata* L.), 别名凤凰尾巴草、半凤尾草、半边梳、甘草蕨等, 是凤尾蕨科凤尾蕨属植物, 产于四川及长江以南各省区, 具有疏解风寒、化湿消肿、清热解毒等功效。近来研究发现, 半边旗有效成分有强的抗肿瘤作用^[1-3]。本文通过 5F 诱导胰腺癌细胞凋亡, 观察 5F 对 PUMA 表达及对胰腺癌细胞生长抑制的影响, 探讨半边旗有效成分抗肿瘤作用的可能机制。

一、材料与方法

1. 主要材料

PUMA/siRNA (h) (Santa Cruz), 5F (由广东医学院 张萧博士赠送), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), 噻唑蓝 (MTT, Sigma), 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (FITC) 凋亡检测试剂盒 (美国 Roche 公司), Hoechst 33258, PI (Sigma), PCR 产物回收试剂盒 (北京中山), 细胞总 RNA 提取试剂盒 (Promega), 胰腺癌细胞株 AsPC-1 (中科院上海细胞所), RPMI-1640 培

收稿日期: 2009-04-07

修回日期: 2009-07-27

* 海南省自然科学基金项目(809043): 中药提取物 5F 治疗胰腺癌的研究, 负责人: 张科郡。

** 联系人: 沈仕兴, 主治医师, 主要研究方向: 普外肿瘤的基础与临床研究, Tel: 0898-67493254, E-mail: zjdx2008@126.com; 张科郡, 主任中医师, 博士, 主要研究方向: 中药提取 5F 抗癌方面的研究, Tel: 0512-67892358, E-mail: zjdx2008@126.com。

培养基(Hyclon公司),小牛血清(三利公司),Taq酶、DNA连接酶 Solution I、T4DNA连接酶、蛋白酶K、RNA酶(上海华舜),其他试剂为国产分析纯。

2. 主要方法

(1) 细胞培养。

AsPC-1以含10%的小牛血清和抗生素($100\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的链霉素)的RPMI-1640培养基,在 37°C 、5% CO_2 培养箱条件下常规培养,细胞贴壁生长,0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

(2) siRNA-PUMA 转染。

AsPC-1培养于6孔板中(106个细胞/孔/2mL培养基),培养至细胞融合度达80%时,用无血清培养基清洗后备用。无血清培养基分别稀释siRNA和Lipofectamine™ 2000,室温孵育5min,然后将脂质体与PUMA/siRNA以2(μL):1(μg)的比例混匀后,用无血清DMEM培养基50 μL 稀释,置室温20min,以形成脂质体-寡聚核苷酸复合体。将该复合体溶液分别加入上述已含2mL无血清DMEM培养基的PC-3细胞培养物中(寡聚核苷酸的最终浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mol}/\text{L}$),转染4h后,更换为含15%血清的DMEM培养基,继续培养96h,期间需要更换培养液。

(3) RT-PCR 检测 PUMA mRNA 表达。

将转染PUMA/siRNA的AsPC-1和对照组细胞接种于96孔平底培养板,每孔细胞数均为 3×10^3 个,每孔分别加入 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的5F,继续孵育48h。收集约 5×10^6 个细胞,PBS洗2次,0.25%胰蛋白酶消化,离心,弃去上清。取细胞团块,TRIzol一步法提取培养细胞总RNA,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,光密度 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 评估RNA纯度, OD_{260} 值评价RNA质量,按照逆转录试剂盒说明合成cDNA,2%琼脂糖凝胶电泳、紫外灯下观察电泳结果并拍照。PUMA反应体系为50 μL ,其中dNTP 0.6 μL 、Taq DNA多聚酶1 μL 、PCR Buffer 3 μL 、Premier 1 μL ,肌动蛋白的正义反义链各1 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5min,95 $^{\circ}\text{C}$ 45s→50 $^{\circ}\text{C}$ 退火60s→72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45s,35循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 10min。PUMA引物F 5'-TGT AGA GGA GAC AGG AAT CCA CGG-3';R 5'-AGG CAC CTA ATT GGG CTC CAT CTC-3', β -actin引物:(F)5'-GTGCGTGA-CA1TraAGGAG-3'(R)5'-CTAAGTCATAGTCCGCCT-3'。

(4) MTT 实验。

转染PUMA/siRNA 96h后,经胰酶消化、台盼蓝染色后在血球计数板上计数,确保活细胞在97%以上。调整细胞为每孔8000个($100\mu\text{L}/\text{孔}$),加到96孔培养板中,分别加 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的5F孵育24h,每个浓度设3个平行孔;同时设置空白对照组和调零孔。然后各加MTT 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4h后吸去上清,加入100 μL 二甲亚砜,振荡15min,在570nm处用酶标仪测定各孔吸光值,计算细胞增殖抑制率。细胞抑制率=(1-实验组A值/细胞对照组A值) $\times 100\%$ 。

(5) 细胞凋亡检测。

收集各组细胞,2000rpm,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5min后,冷PBS重悬,离心,弃上清再次重悬离心,加膜联蛋白V-FITC溶液5 μL 、碘化丙啶溶液2.5 μL 到100细胞悬浮液中,混匀后避光反应10min,加150 μL 样品稀释液到样品中,混匀后上机检测。

(6) Hoechst33258 和 PI 染色。

Hoechst 33342可以穿透细胞膜,染色后凋亡细胞荧光会比正常细胞明显增强;PI不能穿透细胞膜,对于具有完整细胞膜的正常细胞或凋亡细胞不能染色,而对于坏死细胞,其细胞膜的完整性丧失,PI可以染色坏死细胞。上述两种染料双染后,使用荧光显微镜观察,正常细胞为弱红色荧光+弱蓝色荧光,凋亡细胞为弱红色荧光+强蓝色荧光,坏死细胞为强红色荧光+强蓝色荧光。3组细胞接种于6孔板中,24h取出玻片,用1 $\times$ PBS洗1次,分别加入细胞染色缓冲液、5 μL Hoechst染色液。加入5 μL PI染色液,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min,PBS洗涤1次,避光干燥后在荧光显微镜下检测红色和蓝色荧光。

(7) 统计学处理。

采用SPSS10.0软件进行 χ^2 分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结 果

1. 5 F 对细胞生长的影响

对照组细胞生长抑制率为 $0.00\pm 0.48\%$,细胞在 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的5F作用24h,抑制率分别为 $(14.53\pm 1.39)\%$ 、 $(30.96\pm 1.4)\%$ 、 $(53.7\pm 2.65)\%$,有显著性差异($P<0.05$),说明5F能抑制细胞生长。细胞转染PUMA/siRNA并在梯度浓度的5F作用24h后,抑制率分别为 $(0.00\pm 0.56)\%$ 、 $(0.00\pm 0.84)\%$ 、 $(1.03\pm 0.24)\%$,无统计学意

义($P>0.05$),说明 PUMA 表达抑制后抑制 5F 引起的细胞生长。

2. 5F 对细胞凋亡的影响

AsPC-1 细胞自然凋亡率为 $(2.79\pm0.44)\%$,在 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 5F 作用下作用 24h 后其凋亡率达 $(16.16\pm2.63)\%$ 、 $(33.56\pm2.48)\%$ 、 $(47.0\pm3.97)\%$,有统计学意义($P<0.05$),说明 5F 能抑制细胞凋亡。细胞转染 PUMA/siRNA 后,在梯度浓度 5F 作用 24h 后其凋亡率分别为 $(2.83\pm0.43)\%$ 、 $(3.17\pm0.51)\%$ 、 $(3.68\pm0.55)\%$,无显著性差异($P>0.05$),说明 PUMA 表达抑制后抑制 5F 引起细胞凋亡。

3. Hoechst33258 和 PI 双染色检测细胞凋亡

荧光显微镜下,AsPC-1 细胞在 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 5F 作用 24h 后,细胞主要为蓝色容光,说明细胞的凋亡现象明显。细胞转染 PUMA/siRNA 后,受梯度浓度 5F 作用的细胞主要表现为弱红色荧光和弱蓝色荧光,两种荧光在强度和比例上无明显差别,说明细胞凋亡不明显(图 1)。

4. 细胞内 PUMA mRNA 表达的变化

细胞在 $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $37.5\mu\text{mol/L}$ 、 $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 5F 作用 24h 后,PUMA mRNA 表达相对灰度值逐渐增高,分别为 $(29.4\pm5.7)\%$ 、 $(54.6\pm7.9)\%$ 、 $(82.4\pm9.2)\%$,有显著性差异($P<0.05$),细胞转染 PUMA/siRNA 后,在梯度浓度 5F 作用下 PUMA 表达不明显,说明 5F 促进细胞表达 PUMA mRNA(见图 2)。

四、讨论

最近发现 PUMA 是 P53 靶基因,是凋亡通路的关键基因。多个实验证实转染外源性 P53 是由射线照射、DNA 损伤药物、缺氧和 NO 等条件下引起的。内源性 P53 表达上调

引发的促细胞凋亡作用是通过上调 PUMA 表达介导的,PUMA 发挥作用是通过线粒体途径,PUMA 的缺失或突变均可导致凋亡率降低^[4-6]。P53 突变或 P53-/- 的细胞在受到损伤后没有发现 PUMA 上调,也不发生细胞凋亡,而在 P53 突变或 P53- 的细胞中转入野生型 P53 会恢复对 PUMA 的上调作用并促进细胞凋亡^[7]。

从半边旗中分离提取的 5F 有很强的肿瘤细胞杀伤作用^[8]。目前,发现的 5F 抗肿瘤机理主要有如下 3 点: MAPK 的异常激活和表达^[9];上调 Bax 和下调 bcl-2 基因表达^[10];下调 NF- κ B, VEGF, Smad3 表达^[11]。本研究探讨了 5F 是否通过 PUMA 途径促进胰腺癌细胞凋亡的,结果发现,5F 诱导胰腺癌细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长,其效果与药物剂量相关;在细胞生长抑制的同时,胰腺癌细胞的 PUMA 信号传导通路被活化,PUMA 表达干扰后可以阻断该通路对 5F 诱导胰腺癌细胞凋亡和生长抑制作用。由此推断 PUMA 的激活可能在 5F 诱导的凋亡中起到重要作用。

参考文献

- 1 张晓,崔燎,田中信寿,等.半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究.中国

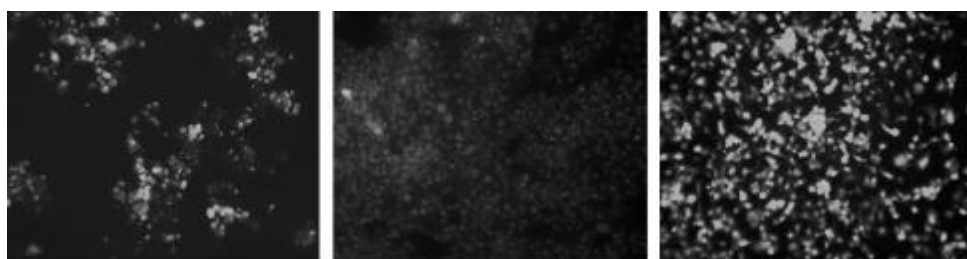


图 1 Hoechst33342 和 PI 双染检测凋亡($\times 100$)

1. 对照组;2. 药物;3. siRNA-PUMA + 药物。

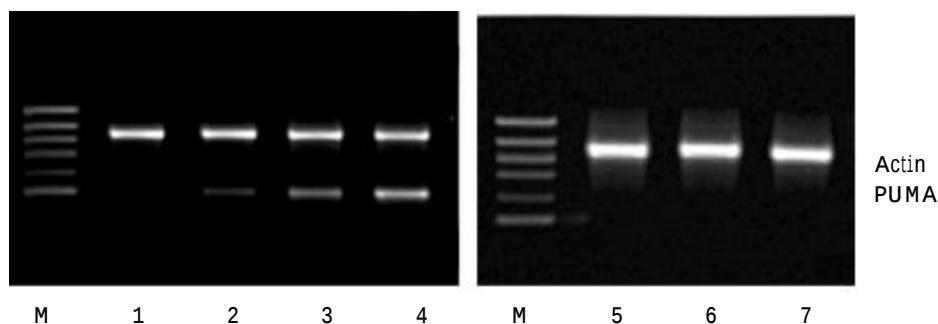


图 2 PUMA mRNA 表达的检测

M: Marker 100bp 1. 对照细胞;2. $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;3. $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;4. $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;5. PUMA/siRNA+ $8.875\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;6. PUMA/siRNA+ $37.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;7. PUMA/siRNA+ $142\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

- 药杂志, 1997, 32(1):37-38.
- 2 崔燎, 张晓, 梁念慈, 等. 一种新二萜类化合物的体外抗肿瘤研究. 中国药理学通报, 1998, 14(1):50-52.
 - 3 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 半边旗提取物 5F 对高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 侵袭转移的影响. 中国药理学通报, 2005, 21(5):540-544.
 - 4 J. Han, C. Flemington, A.B. Houghton Z. Expression of bbc3, a proapoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. Proc. Natl. Acad. Sci., 2001, 98:11318-11323.
 - 5 Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee. Puma is an essential mediator of p53-dependent and independent apoptotic pathways. Cancer Cell, 2003, 4: 321-328.
 - 6 Villunger, A., Michalak, E. M., et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. Science, 2003, 302:1036-1038.
 - 7 Hemann MT, Zilfou JT, Zhao Z. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (25):9333-9338.
 - 8 张晓, 田中信寿. 半边旗中二萜类化合物的植化及抗肿瘤活性初步研究. 中国药理学杂志, 1999, 34(8):512-514.
 - 9 王京滨, 梁念慈. 半边旗中二萜类化合物 5F 对 K562 细胞 MAPK 活性、表达的影响. 中国药理学通报, 2002, 18(3):294-297.
 - 10 王京滨, 莫丽儿. 半边旗有效成分 5F 对 K562 细胞癌基因 bcl-2, bax 表达的影响. 中国药理学通报, 2000, 17(3):56-56.
 - 11 何太平, 陈杰, 莫丽儿. 半边旗二萜类化合物 5F 对人高转移卵巢癌细胞系 HO-8910PM NF- κ B (P65)、Smad3 蛋白和 NF- κ B (P65)、ETS-1 mRNA 表达的影响. 中草药, 2005, 36(4):545-548.

**The Mechanism of Apoptosis of Human Pancreatic Cancer PC-3 Cell Line Induced by
Diterpenoid Compound 5F Isolated from Pteris Semipinnata L**
Shen Shixin¹, Zhang Kejun², Liu Qunsheng², Gu Shuiji², Xu Haibo²

(1. Department of general surgery, Nada Hospital of Hainan State Farms, Danzhou 527000, China;

2. Internal Medicine Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract: This study aimed to reveal the effects of diterpenoid compound 5F (ent-11a-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid) isolated from *Pteris Semipinnata* L. on apoptosis of pancreatic cancer cell line PC-3, and its working mechanism. PUMA/siRNA was transfected into AsPC-1 cells by Lipofectamine 2000 methods. Stably transfected colony was chosen through the G418. AsPC-1 cells treated with 10 μ L 5F at serial concentrations of 8.875, 37.5, 142 μ mol $\cdot$ L⁻¹. The MTT assay was used to observe the inhibitory actions of 5F on AsPC-1 cells. The apoptotic rate of the cells was detected by flow cytometry. The apoptosis was assessed by Hoechst 33258 and PI dye staining. The expression of PUMA mRNA was detected by RT-PCR. Cell growth, as well as apoptosis, was observed in the AsPC-1 control cells dealt with 5F. 5F inhibited the proliferation of AsPC-1 cells in a concentration-dependent manner. The apoptosis induced by 5F was accompanied by the up-regulation of PUMA. In PUMAAS cells treated with 5F, the apoptosis rate decreased greatly and the proliferation rate increased compared those in the AsPC-1 control cells. The expression of PUMA was decreased greatly compared with the control cells treated with 5F. The results showed 5F depresses the proliferation of AsPC-1 cells in vitro, mainly through the induction of apoptosis, which makes it a potential agent for pancreatic cancer therapy. The mechanism is probably related to its effect on the regulation of PUMA a expression

Keywords: Pancreatic cancer; *Pteris sereipinnata* L.; Diterpenoid; Apoptosis; PUMA

(责任编辑: 崔建华 李沙沙, 责任译审: 张立巍)