

棉酚在肝癌细胞中作用机制的研究

黄青红, 姚 超, 胡徐庞, 王 刚, 杨耿兵, 刘 立, 钱 程, 魏旭斌

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 棉酚是棉花中倍半萜(十五碳)的法尼基焦磷酸环化后合成的次生代谢产物。近来有研究显示棉酚具有抗肿瘤效果。本研究通过 MTT、Hoechst 染色、Western blot 等生化技术开展棉酚对肝癌细胞系 Bel-7404 的增殖抑制及促凋亡作用研究。MTT 实验结果表明 5mmol 棉酚即对肝癌细胞增殖具有强烈抑制作用, Hoechst 染色表明 5mmol/L 棉酚即可对肝癌细胞具有促凋亡作用, Western blot 结果表明棉酚能下调 *Bcl-2* 基因的表达。棉酚对肝癌细胞系 Bel-7404 具有很好的抑制增殖和促凋亡的效果。

关键词: 棉酚; 肝癌; 凋亡; *Bcl-2*

中图分类号: R73-362

文献标识码: A

0 引 言

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率长期位居各类恶性肿瘤前列。在我国每年死于该病的人数逾 10 万,尤其在长江入海口的华东地区如江苏、上海、浙江等地。目前对肝癌的治疗主要采用手术切除,该方法对早期患者的治疗起到较好的效果,但对中晚期肝癌患者疗效不明显,因此寻找更有效的治疗手段和方法就显得尤为重要。

棉酚,俗名棉籽醇,大量存在于废弃的棉籽中,可用作男性避孕药。近来越来越多研究显示棉酚对多种细胞系都具有杀伤和促进凋亡的效果^[1]。As-sikis^[2]发现棉酚对前列腺癌具有治疗效果, Meng L Y 等^[3]发现棉酚可以通过抑制 *Bcl-2* 蛋白而促进 HL-60 细胞凋亡,王瑾等^[4]发现棉酚能促进结肠癌细胞的凋亡。棉酚对肝癌细胞是否也具有杀伤和促凋亡的效果目前还未见相关报道。本实验拟通过棉酚对体外培养的人肝癌细胞系 Bel-7404 的增殖抑制作用以及对细胞凋亡的影响来研究该药对肝癌细胞的作用机制,以期为深入探讨棉酚作为治疗肝癌

药物的研发奠定基础。

棉酚的分子式见图 1。

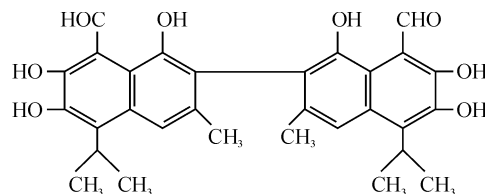


图 1 棉酚的分子结构示意图

1 材料和方法

1.1 实验材料

棉酚购自上海融禾生物医药技术有限公司;人肝细胞系 Bel-7404 购自与上海生命科学院细胞生物研究所;DMEM、胎牛血清、胰酶及相关培养试剂购自 Gibco 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司;用于 Western blot 实验的抗体购自 Santa Cruz 公司。其他设备 Hera cell 150 二氧化碳培养箱, IX71-22/PH 荧光倒置显微镜, 9201F 型扫描仪分别购自 Thermo, Olympus 和 LICOR。

1.2 方 法

1.2.1 肝癌细胞系 Bel-7404 细胞的培养

人肝癌细胞系 Bel-7404 培养于 10% 胎牛血清的 DMEM(双抗)中,在 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中孵育,待细胞汇合度达到 70%~80% 进行消化传代。实验所用细胞为生长对数期长势良好的细胞。

1.2.2 MTT 法检测棉酚对 Bel-7404 细胞增殖的抑制作用

取生长良好的对数期细胞按每孔 1×10^4 个细胞 200 μ L 接种于 96 孔板培养。实验组加入不同浓度的棉酚,每次处理 5 个复孔,另设不加药物的对照组以及不加细胞的空白组。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,适时换液,待细胞覆盖率达到 75% 时加入药物棉酚。加药后分别于 24、48、72、96 h 换液,再分别每孔加入 MTT(5mg/mL)置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内继续培养 4 h 后,弃废液每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO)。水平摇床震荡使细胞内黄色结晶充分溶解,用灭联免疫仪器检测,按下式计算棉酚对肿瘤细胞的增殖抑制作用,

$$\text{细胞增殖抑制率} = (\text{加药组} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组} - \text{空白组 OD 值}) \quad (1)$$

1.2.3 Hoechst 染色法观察 Bel-7404 细胞凋亡

取对数期细胞,按每孔 5×10^5 个于 6 孔板中,培养至 24 h 后覆盖率达到 75% 时按加入棉酚至终浓度为 5 mmol/L,继续培养 48 h 后加入 Hoechst33342(1 μ g/ml),放置在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 0.5 h。取出后 PBS 洗涤 2 次立即放置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot 法检测 Bel-7404 细胞内 Bcl-2 表达

取对数期细胞按每孔 5×10^4 细胞数于 24 孔板中。37℃、5% 培养箱培养过夜。分别加入不同浓度的棉酚,36 h 后弃细胞液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 100 μ L 裂解液,将细胞裂解物进行 BCA 定量后使用。每孔 20 μ L SDS-PAGE 电泳,结束后湿转法转移到 PVDF 膜上。BSA 孵育封闭 2 h,加入一抗,水平摇晃过夜,TBST 洗涤 3 次,加入含荧光标记的二抗孵育 2 h,TBST 洗涤后进行检测。

1.3 统计学处理

所有定量试验重复进行 3 次。数据以平均数士标准差表示,结果采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著。

2 结 果

2.1 MTT 法检测棉酚对 Bel-7404 细胞增殖抑制作用

采用 MTT 法检测棉酚对肝癌细胞系 Bel-7404 的作用。图 2 结果显示:棉酚对 Bel-7404 具有显著的增殖抑制作用,并且与剂量和时间成正比,即棉酚对 Bel-7404 的增殖抑制作用是随着药物浓度的增加和作用时间的增长而增强。发现在 48 h 内棉酚对 Bel-7404 细胞的半数致死量为 15 mmol/L,说明肝癌细胞对棉酚敏感,只需要微量棉酚就可以抑制肝癌细胞的增殖。

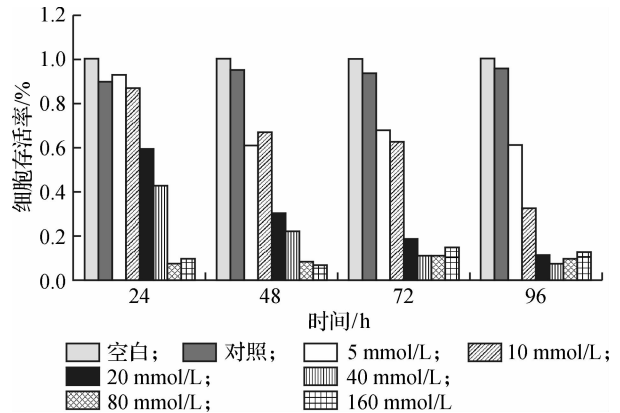


图 2 MTT 法检测棉酚对 Bel-7404 细胞增殖抑制作用

2.2 光学显微镜观察不同药物浓度下 Bel-7404 细胞形态变化

利用普通倒置显微镜观察不同药物浓度处理 Bel-7404 细胞后的形态学变化。实验组分别用 5、10、20、40、80 mmol/L 终浓度的棉酚处理,对照组不加棉酚(如图 3)。棉酚处理后 24 h 的细胞形态变化:对照组细胞形态饱满,长势健康;5 mmol/L 棉酚处理的仅细胞边界开始清晰;10 mmol/L 棉酚处理的细胞出现细胞皱缩,细胞之间开始相互分离;20 mmol/L 棉酚处理的细胞则大部分皱缩成圆形;40 mmol/L 以及 80 mmol/L 棉酚处理的细胞基本上都皱缩成圆形,大小均一。棉酚对细胞的作用效果随剂量的增加而变得显著,且在较小范围内起了很明显的作用。同样棉酚的作用效果与时间成线性关系。而用 15 mmol/L 棉酚处理 24 h 则细胞开始大量皱缩,48 h 后细胞基本成圆球状,且细胞间边界清晰,相互分离。

2.3 Hoechst 染色法观察 Bel-7404 细胞凋亡效果

凋亡实验见图 5,用 5 mmol/L 棉酚对肝癌细胞系 Bel-7404 处理,用 hoechst33342 染色后可以直观

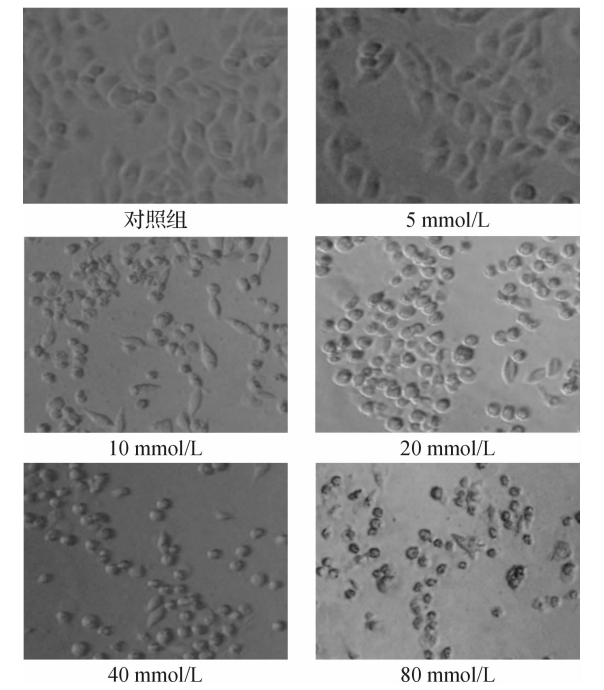


图 3 光镜下观察同一时间不同浓度棉酚对 Bel-7404 细胞的杀伤作用

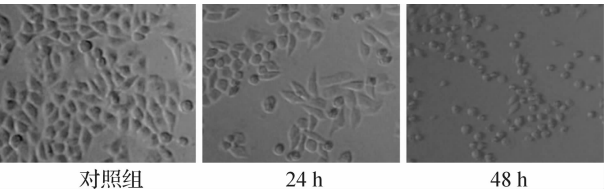


图 4 光镜下同一浓度不同时间下棉酚对 Bel-7404 细胞的杀伤作用

地观察到对照组细胞长势饱满,凋亡细胞很少。而用棉酚处理的试验组在 24 h 内出现少量的凋亡细胞,36 h 后则出现大量的凋亡细胞,表现为细胞皱缩,染色质异化固缩,颜色加深,出现凋亡小体。此外,实验对比还发现该凋亡作用与时间成正比关系。

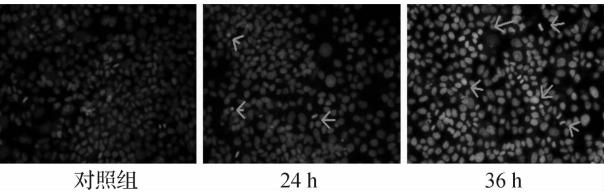


图 5 Hoechst 染色法观察棉酚的促凋亡作用

2.4 Western blot 分析棉酚对 Bel-7404 细胞杀伤的分子机制

实验组分别用 5、10、20 mmol/L 的棉酚处理,对照组不加棉酚。36 h 后收集细胞,用 western blot 法观察细胞内 *Bcl-2* 基因的表达情况。图 6 显示,随着棉酚浓度的提高,对 *Bcl-2* 基因表达的抑制越强。

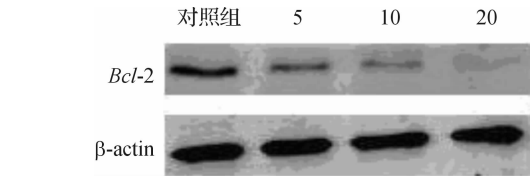


图 6 Western blot 观察 Bel-7404 细胞 *Bcl-2* 基因表达情况

3 讨论

细胞的正常增殖分化与凋亡是保持机体稳定的前提,肿瘤的发生可以被看做细胞的异常分化和过度增殖。因此抑制肿瘤细胞的增殖与促凋亡是治疗肿瘤的有效方法。*Bcl-2* 蛋白家族被认为是凋亡的关键并首先被发现是原癌基因的产物而被分离出来^[6],其成员包括抗凋亡分子,如 *Bcl-2*、*Bcl-Xl*、*Mcl-1* 以及促凋亡分子 *Bax*、*Bak*、*Bid*、*Bad*、*Noxa*、and *Puma*^[7-8]。棉酚可以通过增加 *Puma* 和 *Noxa* 的表达而抑制 *Bcl-xl* 基因,,从而细胞通路的失活,引起细胞的凋亡^[9]。

本实验通过棉酚对肝癌细胞系 Bel-7404 的不同剂量、时间处理发现,低浓度的棉酚就可以对肝癌细胞系 Bel-7404 产生比较明显的抑制和杀伤作用,并且随着棉酚药物浓度的增加,该细胞的生存率显著下降,并在短时间内产生明显的效果。Hoechst 染色结果也表明同样的现象。免疫印记实验(western blot)则表明棉酚可以抑制 *Bcl-2* 通路,从而促进细胞的凋亡。因此棉酚有可能是一个有效的抗肝癌药物,具有较好的潜在研发价值。

参考文献:

[1] Keller P A, Birch C, Leach S P, et al. Novel pharmacophore-based methods reveal gossypol as a reversetranscriptase inhibitor[J]. Mol Graph, 2003, 36(21): 365-366.

[2] Assikis V, Simons J W. Novel therapeutic strategies for androgen-independent prostate cancer[J]. Semin Oncol, 2004(31): 26-32.

[3] Meng Y, Li Y. Gossypol and its combination with imatin induce apoptosis in human chronic myeloid leukemic cells[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(11) : 2204-2212.

[4] 王 瑾,王向红,周淑雅,等. 棉籽酚诱导结肠癌细胞系凋亡的作用[J]. 中国癌症杂志, 2000, 10 (4): 319-322.

[5] Shidaifat F, Canatan H, KulP S K, et al. Telomerase inhibitors in anticancer therapy: gossypol as a potential telomerase inhibitor[J]. Anticancer Res, 1997, 17(2A):

1003-1009.

[6] Reed J C. *Bcl-2* family proteins: strategies for overcoming chemo-resistance in cancer[J]. *Adv Pharmacol*, 1997, 41: 31-32.

[7] Reed J C, Jurgensmeier J M, Matsuyama S. *Bcl-2* family proteins and mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366: 27-37.

[8] Korsmeyer S J. *Bcl-2* gene family and the regulation of programmed cell death [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 1693-1700.

[9] Meng Yang, Tang Wen-hua, Dai Liu-yao, et al. Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human-prostate cancer via Bel-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 192-202.

Study on the Mechanism of Activity on Hepatocarcinoma by Gossypol

HUANG Qing-hong, YAO Chao, HU Xu-pang, WANG Gang, YANG Geng-bing, LIU Li, QIAN Cheng, WEI Xu-bin
(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Gossypol is generated from sesquiterpene in cottons after thefarnesyl-pyrophosphoric is cyclized. For the past years there were evidences showing that the gossypol has the capacity of anti-tumor. The experiment studies the capacity of suppressing proliferation and promoting apoptosis in of gossypol in hepatoma cell line Bel-7404 via MTT Hoechst and West-blotting. The MTT shows that the gossypol has the activity of suppressing proliferation, the Hoechst shows that it promotes apoptosis in Bel-7404 and the Western-blot shows that it can reduce the expression of *Bcl-2*. The experiment offer the reference for the forward research and clinical application.

Key words: gossypol; hepatocarcinoma; apoptosis; *Bcl-2*

(责任编辑: 许惠儿)