

冬凌草甲素诱导乳腺癌 Bcap37 细胞凋亡的探索

余越美, 严巧灵, 章康健, 岳学田, 周秀梅

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要: 探讨冬凌草甲素(oridonin)对人乳腺癌细胞 Bcap-37 的增殖、凋亡以及引起细胞凋亡机制。以不同浓度的 Ori 处理 Bcap-37 细胞,通过 MTT 法检测细胞生长抑制率;应用流式细胞分析术检测细胞凋亡;Western Blot 检测细胞发生凋亡的机制。结果是 48~96 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ori 可显著抑制 Bcap-37 细胞的增殖($P < 0.05$)。48 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ori 作用 24 h 后,细胞的增值抑制率达到了 40%,而 96 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ori 只需处理 12 h,增值抑制率竟达到了 50%。96 $\mu\text{mol/L}$ Ori 处理 24 h 后,Bcap-37 细胞的凋亡率为 21.6%。Western Blot 检测到了 Fas 的上调,细胞色素 c 的释放和随后 Caspase 9 的激活及其下游信号蛋白 Caspase 3 和它的底物 PARP,ICAD 的剪切。进一步检测到 Survivin 的下调和 GADD34 的上调。基于这些实验结果,推测冬凌草甲素作为一种潜在的抗乳腺癌制剂,诱导乳腺癌细胞 Bcap37 发生凋亡的发生可能与 Survivin 和 GADD34 相关。

关键词: 冬凌草甲素; 细胞凋亡; 乳腺癌; Caspase; survivin; GADD34

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

0 引言

在过去的几十年里,无论是在发展中国家还是在发达国家,女性患乳腺癌的风险均以 1%~2% 的年速度增长。到目前为止,手术是乳腺癌的主要治疗手段,乳腺癌术后的辅助治疗包括:化疗,放疗和放化疗相结合的手段^[1]。由于手术治疗,放化疗和化疗治疗手段对正常组织和肿瘤组织都具有非特异性,从而产生了一些并发症和负面效应,尤其是对器官的损伤。因此对乳腺癌特异性和有效性治疗急需得到改善。

冬凌草(*rabdosia rubescens*)^[2]是一种中草药,在中国已经被应用于临床疾病治疗,化学结构式如图 1 所示。冬凌草甲素是冬凌草的活性成分,有着不同的病理和生理学效应,诸如抗炎,抗菌和抗肿瘤等效应。它已被广泛地应用于治疗食道癌、肺癌、肝癌、结肠癌、胃癌、鼻咽癌、组织细胞肉瘤和白血病的研究^[3]。在中国已将冬凌草甲素应用于肿瘤治疗,它

与化学药物相比较,具有副作用小,减少了并发症的发生和潜在的毒性。这样可有效提高患者的生存期和生活质量。最近,实验和临床研究资料表明冬凌草甲素在各种恶性肿瘤治疗中,已经成为一种有效的抗肿瘤制剂^[4],在治疗肿瘤方面,已经得到了广泛的应用。然而很少有人深入研究它在人类乳腺癌方面的药理作用。并且,冬凌草甲素在治疗乳腺癌方面的机制还没有被完全阐明。

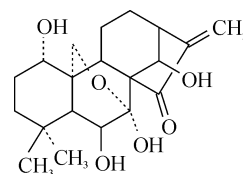


图 1 冬凌草甲素的化学结构式

因此,本文研究冬凌草甲素在乳腺癌 Bcap-37 细胞中的抗癌效果,并且探索在体外的相关机制。实验结果表明了冬凌草甲素能有效地抑制细胞生长,这是通过内源和外源途径共同引起凋亡效应。

并且,冬凌草甲素与凋亡和 survivin 及 GADD34 蛋白表达的改变密切相关。

1 实验材料和方法

1.1 材料

冬凌草甲素购于 sigma 公司,将其溶解在 DMSO 中,储存液浓度为 $1 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$,储藏温度为 -20°C 。在使用之前,要将其溶解在 DMEM 进行稀释。FBS 购于 Biochrom 公司;Hoechst 33342 购买于 Sigma 公司;多克隆抗体 Caspase-3, Caspase-9, ICAD, PARP, survivin 和辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔和羊抗鼠)均购于 Santa Cruz 公司,多克隆抗体 Fas, cytochrome-c 和 β -actin 购买于 epitomics 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人类的乳腺癌细胞 Bcap37 购买于上海中科院。细胞被培养在含有 10%FBS, 4 mM/L 的谷氨酸盐, 青霉素(100 U/mL), 链霉素(100 U/mL)的 DMEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 中。放置在培养条件是 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养。指数期生长期的细胞用于做实验。

1.2.2 细胞活性分析

用不同浓度的冬凌草甲素处理完细胞后,通过 MTT 来检测细胞活力。按 8×10^3 个/孔密度植入 96 孔板中, 24 h 之后,用 0、12、24、36、48、96 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的冬凌草甲素且同一浓度按照 12、24、48、72 h 不同时间点来处理细胞,其中每个处理均设 6 个复孔。加 20 μL MTT(5.0 mg/mL)到每一个孔里面,继续培养 4 h 后,小心吸干净孔内培液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 A570 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔、对照孔,将测得的 OD 值代入公式进而计算细胞生存率。细胞生存率 = $(A_{\text{药物处理孔}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$ 。每个实验至少做 3 次重复。

1.2.3 冬凌草甲素对 Bcap-37 集落形成的影响

按 250 个细胞/mL 密度种植于 12 孔板中。用不同浓度的冬凌草甲素(3~36 $\mu\text{M/L}$)来处理细胞,以不加冬凌草甲素的作为对照。14 d 以后,在室温,用 0.1%结晶紫染细胞 13 min,然后用蒸馏水洗干净,拍照。为了检测细胞是否具有耐药性,把细胞用冬凌草甲素处理 3 d 之后,完全洗掉冬凌草甲素,继续孵育 11 d。这个实验重复做 3 次。

1.2.4 观察形态变化

通过 Hoechst 33342 染细胞来研究细胞凋亡。把 Bcap37 细胞种植在 12 孔板中,用不同浓度的冬凌草甲素(0~96 $\mu\text{M/L}$)来处理细胞。24 h 以后,用 PBS 洗细胞一遍,加固定液,固定 20 min,最后用 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst 33342 染色 15 min。之后,用 PBS 洗 Bcap-37 细胞,在倒置荧光显微镜镜下观察 Bcap-37 细胞的形态变化。

1.2.5 细胞流式分析

种植密度为 3×10^5 细胞/孔于 6 孔板中,孵育在 37°C , 5% CO_2 培养箱中。24 h 之后,用待测浓度的冬凌草甲素处理细胞。药物处理 20 h 以后,用胰酶消化并收集细胞。按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒,将细胞重悬在 binding 缓冲液中,然后,用荧光标记的 FITC 相耦联的 annexin V 和 PI 染色。之后,通过流式细胞分选仪检测凋亡细胞。

1.2.6 Western blot 分析

将 5×10^5 的 Bcap37 细胞铺于 6 孔板中,培养 24 h,然后用指定浓度的冬凌草甲素处理细胞,以不加冬凌草甲素的孔作为对照,处理 24 h,贴壁和悬浮的细胞一齐用裂解液(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10 mM/L 丙三醇和 1.55%的二硫苏糖醇)裂解并收集细胞。蛋白浓度通过 BCA 蛋白分析试剂盒(Thermo scientific, Rockford, U. S. A)测定。上样量相同的蛋白通过 12%的分离胶分离,转移到 NC 膜上。膜用 5%的脱脂奶粉封闭,然后用一抗和适当稀释好的荧光二抗孵育膜。通过红外扫描系统检测进行免疫检测。抗体包括:抗人细胞色素 C 的兔单克隆抗体,抗人 Fas 的兔单抗,抗人 ICAD 的兔单抗,抗人 PARP 的兔单抗,抗人 Caspase 3 的兔单抗,抗人 Caspase 9 的兔单抗,抗人 GADD34 的兔单抗,抗人 β -actin 的鼠单抗。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞增殖的影响

2.1.1 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞的毒性

为了检测冬凌草甲素对 Bcap37 细胞的毒性,把细胞用每种不同浓度的冬凌草甲素(0~96 $\mu\text{mol/L}$)处理不同的时间(12~72 h)。通过 MTT 分析 Bcap37 细胞的活性。结果表明,随着浓度和时间的递增,冬凌草甲素对细胞产生的毒性效应越来越明显。如图 2 所示,用冬凌草甲素(48 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h 后,细胞的死亡率达到了 40%左右,然而用 12 $\mu\text{mol/L}$ 处理,细胞死亡率仅仅达到了 12%。在

Bcap37 细胞中,用适当低浓度范围内的冬凌草甲素处理细胞,随着时间的递增,对细胞有明显的抑制性。但是当细胞用冬凌草甲素($96 \mu\text{mol/L}$)处理 12 h,大约有 50% 的细胞死亡,然而在 24 h 到 72 h 以后,观察到细胞毒性变化不是很明显。

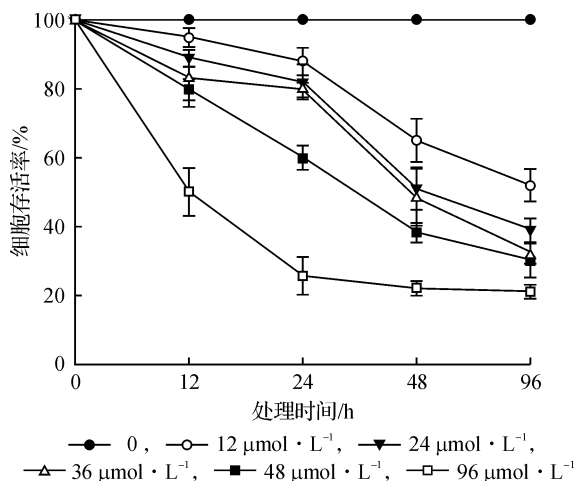


图 2 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞增殖的影响

注:通过 MTT 分析细胞存活,数据出现以平均值±标准差($P < 0.05$)

2.1.2 冬凌草甲素影响 Bcap-37 细胞克隆形成效应

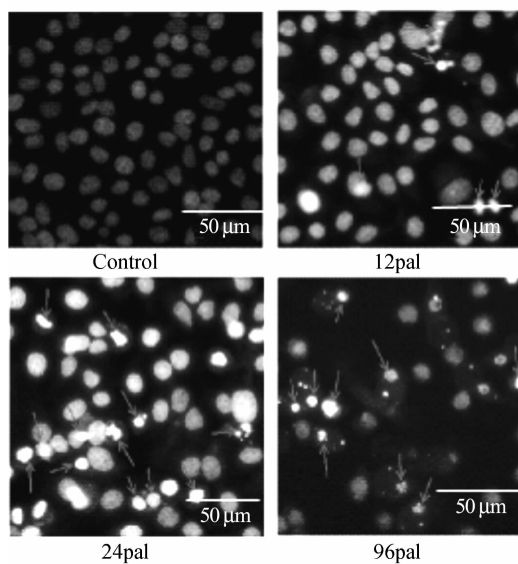
实验检测了细胞增值和形成病灶的能力,集落形成间接地预测了细胞增值死亡的能力。通过铺一定数目的 Bcap-37 细胞到 6 孔板中,每孔加入不同

浓度的冬凌草甲素($3 \sim 36 \mu\text{M/L}$),以不加冬凌草甲素的孔作为对照。实验结果说明随着冬凌草甲素浓度的递增,Bcap-37 集落形成率极大地减少,在冬凌草甲素浓度 $\geq 6 \mu\text{M/L}$ 时,最为明显。通过用冬凌草甲素处理细胞 3 d 之后除去它与连续用其处理 14 d 的这两种方式相比较,产生了同样的实验结果,表明了冬凌草甲素的效应一旦产生将不可逆转。

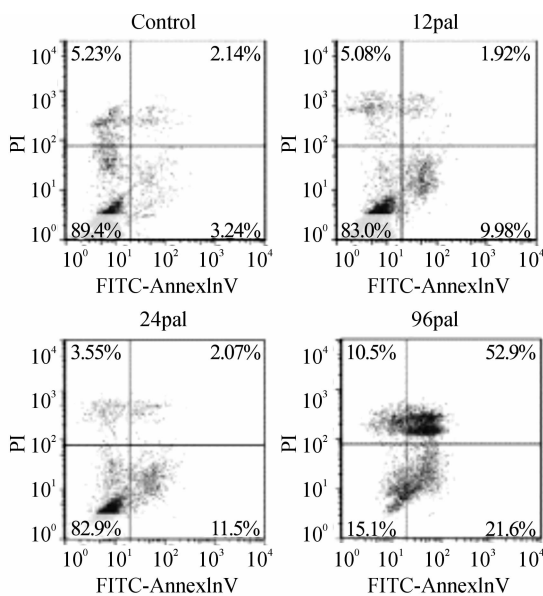
2.2 冬凌草甲素对 Bcap37 细胞凋亡的影响

2.2.1 在 Bcap37 中的凋亡分析

为了确定冬凌草甲素引起 Bcap37 细胞的死亡是否是通过凋亡途径,通过 Hoechst 33 342 染色来检测处理后的肿瘤细胞形态变化,如图 3(A)所示:当 Bcap37 用不同浓度的冬凌草甲素处理 24 h 后,发现细胞质和细胞核形态有极大的不同,最为明显的是染色质的浓缩和细胞核的片段化,这些都说明了凋亡的发生。当用冬凌草甲素处理细胞时,随着浓度的递增,可以观察发生凋亡细胞的数目也在逐渐增加。并且通过流式分析凋亡细胞。如图 3(B)所示,当细胞发生早期凋亡时 annexin V 把细胞染为阳性,而 PI 染为阴性(右侧象限下方),比对照组早期凋亡细胞多。对照组用 annexin V 染为阳性细胞比率为 3.24%,而冬凌草甲素处理的早期凋亡细胞为 9.98%~21.6%。随着冬凌草甲素浓度的增加,凋亡细胞的数目在上升。



(A) 冬凌草甲素引起了 Bcap-37 细胞形态的变化。箭头指示了凋亡细胞。(放大倍数 200 \times)



(B) 通过流式检测凋亡

图 3 在 Bcap37 中的凋亡分析

2.2.2 冬凌草甲素通过内源和外源两条途径引起 Bcap37 细胞凋亡与 Survivin 和 GADD34 表达的改变

为了研究 Caspase 一类蛋白是否参与了凋亡途径,做了 Western blot 分析。冬凌草甲素促进了细胞色素 c 的释放,进而激活 Caspase-9 和 Caspase-3,笔者发现了 20-kD 亚单位的 Caspase-3 剪切体形式,如图 4(A)所示,此时可以很明显地观察到 Caspase-3 的剪切底物 ICAD 和 PARP。剪切诱导了 DNA 的片段化,引起了酶的失活,因此阻止了 DNA 周期性的无效修复。同时 Fas 蛋白的表达水平出现了急速上升。

为了检测别的凋亡相关蛋白是否也参与了冬凌草甲素引起 Bcap37 细胞的凋亡,通过 Western blot 分析发现,用冬凌草甲素处理细胞 24 h 后,观察 Survivin 和 GADD34 的表达情况。如图 4(B)所示,随着浓度的递增,GADD34 的表达量急剧上升然而 Survivin 的表达量下调了。

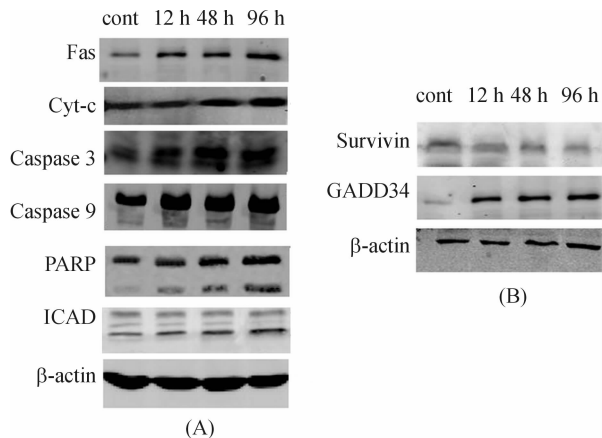


图4 Western blot 分析

注:分析了通过不同浓度的冬凌草甲素处理过的 Bcap37 细胞,凋亡蛋白在细胞中的表达情况。第一列:对照;第 2~4 列分别为:12、24 和 48 μM 的冬凌草甲素。

3 讨论

凋亡过程具有广泛的生物学意义,它在细胞的发育、分化、增殖之间起一种动态平衡,并且在免疫系统的调控以及除去缺陷和有害细胞等方面具有重要的作用^[4-5]。凋亡调控一旦破坏,就很有可能导致癌症的发生。人们认为凋亡检测是一种评估许多抗肿瘤药物临床效价的重要且基本的检测手段。在很大程度上,Caspases(Caspases 2,8,9)被认为是凋亡的发起者,而 Caspases(Caspases 2,6,7)^[5-6]被认为是凋亡的执行者。Caspases 的发起者被招募,从而激活信号复合物。要么引发细胞表面死亡受体

(TNF,FasL,TARIL^[7])相耦联配体的外源凋亡途径,要么引发来自于细胞内部信号(内源凋亡途径:内质网压力和 DNA 损伤)引起的凋亡途径^[8]。随后,通过来自于细胞内外的凋亡刺激物来激活 Caspases 的级联反应。最后促进了凋亡底物,诸如 pro-caspases,ICAD^[2],PARP 的剪切,来执行凋亡。

高表达量的 IAP 蛋白抑制各种转化和人类肿瘤细胞的凋亡^[9]。Survivin 是抗凋亡蛋白 IAP 家族成员的一员,它在调节细胞凋亡和分化中起着重要的作用^[10]。Survivin 在人类大多数的肿瘤(肺癌,乳腺癌,结肠癌,胃癌)中过表达,但是在正常的细胞和组织中表达量却很低。研究报道认为,Survivin 让细胞逃避凋亡是通过前体形式的 Caspase-3 和 Caspase-7 过表达来实现的,并且抑制了这些酶原成为活化形式的 Caspases。人们认为 Survivin 是一种有效的抗癌靶点。

同时 GADD34(MyD116)被认为是一种生长抑制 DNA 损伤诱导表达基因^[11]。此后,人们发现随着 GADD34 的过表达与各种信号引起的凋亡有关^[12],蛋白水平上 GADD34 的过表达导致了凋亡^[10-13]。它是原癌基因 c-myc 的重要靶点。Myc 在乳腺癌中被广泛地提到,具有潜在的抑制 GADD34 表达的功能。在很多细胞系中,据报道 TNF,神经酰胺的类似物 C-2^[14],二甲基鞘氨醇,抗 Fas 的抗体和电离辐射射线等因子导致了细胞内部神经酰胺水平的升高,从而引起了 GADD34 转录水平的提高。在这项研究中,我们发现随着冬凌草甲素浓度的递增,引起 GADD34 表达量的上调。结果表明 GADD34 的激活可能有助于凋亡的发生。

在最近几年里,人们普遍接受用中草药来抑制癌症的形成和复发,这是一种经济的选择。冬凌草甲素从唇形科香茶菜属植物冬凌草中提纯出来,它是一种非常有效的中草药。最近报道,冬凌草甲素在治疗大多数的恶性肿瘤(前列腺癌,非小细胞肺癌)上,是一种非常有效的抗肿瘤药物,具有某种现实意义^[15]。对于乳腺癌的治疗来说,自 2008 以来,在世界范围内冬凌草甲素得到了应用。由于冬凌草甲素治疗乳腺癌的报道比较少见,尤其是在原发性的乳腺癌上。Bcap-37 细胞是一种重要的来源于中国妇女的原发性乳腺癌细胞系,它对于研究中国妇女乳腺癌非常重要。在我们的研究中,表明了冬凌草甲素极大地抑制了 Bcap-37 细胞的生长,并且在体外,随着时间和浓度的不同,引起了细胞不同程度的凋亡。同时 Western blot 表明:冬凌草甲素通过

降解 Caspase-3 的底物 (ICAD 和 PARP) 来激活 Caspase-3, 与不同时间具有相关性。冬凌草甲素也促进了细胞色素 c 从线粒体内膜间隙释放到细胞质, 并且上调了 Fas。随着凋亡的发生, 观察到 Survivin 的表达下调了, 而 GADD34 的表达上调了。因此可以推论: 冬凌草甲素通过线粒体内源途径和死亡受体诱导的外源途径共同起作用, 来引起细胞凋亡, 从而抑制细胞生长。并且, 冬凌草甲素引起的凋亡与 Survivin 的下调和 GADD34 的上调有关。这些结果表明: 冬凌草甲素是一种有效的治疗乳腺癌的制剂。

总之, 结果表明, 在体外冬凌草甲素通过线粒体途径和死亡受体途径, 激活 Caspase-3, 下调 Survivin, 上调 GADD34 和 Fas 的表达从而引起细胞的凋亡。从而进一步证明冬凌草甲素具有潜在的有效的抗乳腺癌的作用。

参考文献:

- [1] Habel L A, Capra A M, Achacoso N S, et al. Mammographic density and risk of second breast cancer after ductal carcinoma in situ[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(10): 2488-2495.
- [2] Zhang C L, Wu L J, Tashiro S, et al. Oridonin induces apoptosis of HeLa cells via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(5): 691-698.
- [3] Jin S, Shen J N, Wang J, et al. Oridonin induced apoptosis through Akt and MAPKs signaling pathways in human osteosarcoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(2): 261-268.
- [4] Gao F, Tang Q, Yang P, et al. Apoptosis inducing and differentiation enhancement effect of oridonin on the all-trans-retinoic acid-sensitive and-resistant acute promyelocytic leukemia cells[J]. *Int J Lab Hematol*, 2010, 32(1): 114-122.
- [5] Cui Q, Tashiro S, Onodera S, et al. Augmentation of oridonin-induced apoptosis observed with reduced autophagy[J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101(3): 230-239.
- [6] Hu H Z, Yang Y B, Xu X D, et al. Oridonin induces apoptosis via PI3K/Akt pathway in cervical carcinoma HeLa cell line[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1819-1826.
- [7] Huang J, Wu L, Tashiro S, et al. A comparison of the signal pathways between the TNF alpha-and oridonin-induced murine L929 fibrosarcoma cell death[J]. *Acta Med Okayama*, 2005, 59(6): 261-270.
- [8] Cui Q, Yu J H, Wu J N, et al. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(7): 1057-1066.
- [9] Si R, Tao L, Zhang H F, et al. Survivin: a novel player in insulin cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(1): 16-24.
- [10] McKenzie J A, Liu T, Goodson A G, et al. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and $\alpha 5$ integrin upregulation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7927-7937.
- [11] Adler H T, Chinery R, Wu D Y, et al. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 7050-7060.
- [12] Haneda M, Xiao H, Hasegawa T, et al. Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate[J]. *Gene*, 2004, 336(1): 139-146.
- [13] Minami K, Inoue H, Terashita T, et al. GADD34 induces p21 expression and cellular senescence[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(6): 1481-1485.
- [14] Cheung C H, Sun X, Kanwar J R, et al. A cell-permeable dominant-negative survivin protein induces apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TNF-alpha therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2010, 10: 36.
- [15] Zhang Y C, Zhou L, Ng K Y, et al. Sesquiterpene lactones from *Ixeris sonchifolia* Hance and their cytotoxicities on A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(4): 294-298.

Exploration on Induction of Breast Cancer Bcap37 Apoptosis by Oridonin

YU Yue-mei, YAN Qiao-ling, ZHANG Kang-jian, YUE Xue-tian, ZHOU Xiu-mei

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This paper discusses the role of oridonin in the proliferation and apoptosis of breast cancer cell Bcap-37 and the mechanism causing apoptosis; treats Bcap-37 cell with Ori of different concentrations; detects cell growth inhibition rate with MTT method; detects apoptosis by using flow cytometry and the mechanism of apoptosis with Western blot. The result is that 48~96 $\mu\text{mol/L}$ Ori can significantly inhibit the proliferation of Bcap-37 cell ($P < 0.05$). After 24 h of operation of 48 $\mu\text{mol/L}$ Ori, the proliferation inhibition rate reaches 40%, while 96 $\mu\text{mol/L}$ Ori only needs 12 h treatment and the proliferation inhibition rate reaches 50%. After 24-hour treatment of 96 $\mu\text{mol/L}$ Ori, the apoptosis rate of Bcap-37 cell is 21.6%. Western blot detects up-regulation of Fas, release of cytochrome c, activation of Caspase 9 and shear of its downstream signaling protein Caspase3 and its substrates PARP and ICAD. It further detects the down-regulation of Survivin and up-regulation of GADD34. Based on these experimental results, it is inferred that the induction of apoptosis of breast cancer cell Bcap37 by oridonin as a potential anti-breast cancer preparation might be related to Survivin and GADD34.

Key words: oridonin; apoptosis; breast cancer; Caspase; survivin; GADD34

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 371 页)

Automatic Classification of Leukocytes in Blood Based on Multi-evidence

ZHUANG Yang-kai, ZHOU Ping

(School of Information Science and Technology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This paper puts forward a classification algorithm based on shape feature study for leukocytes classification method. This algorithm first extracts invariant moment feature and morphological feature based on Euclidean distance transform from nucleus; then, features extracted can realize the classification of mononuclear cell, lymphocyte and basophilic granulocyte; gray-level co-occurrence matrix is extracted as texture feature and the classification of residual leukocyte categories is realized through support vector machine. The experimental result shows that this method has a very good classification accuracy rate and short processing time.

Key words: leukocytes classification; Euclidean distance transform; invariant moment; morphological features; texture features; support vector machine

(责任编辑: 陈和榜)