

氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖与凋亡的影响

谢俊杰¹, 王庆华², 夏晓华³, 韩玮⁴, 任静¹, 王炳芳²

1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212000; 2. 江苏大学附属昆山医院消化内科, 江苏 昆山 215300;
3. 江苏大学附属昆山医院急诊科, 江苏 昆山 215300; 4. 江苏大学附属昆山医院综合外科, 江苏 昆山 215300

摘要: **目的** 探讨氧化槐果碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能介导的信号通路。**方法** 将人肝癌 SMMC-7721 细胞分为对照组、氧化槐果碱处理组(2、4、8、16、32 mmol/L)。将梯次浓度氧化槐果碱作用于肝癌细胞后培养 48 h; 采用倒置显微镜观察细胞形态变化; 采用 CCK8 法检测不同浓度氧化槐果碱对细胞增殖的影响, 采用流式细胞术检测氧化槐果碱对细胞凋亡的影响, 通过免疫印迹法检测氧化槐果碱对肝癌细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 及转录激活因子(STAT)3、STAT5 表达水平的影响, 分析氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞可能的作用。**结果** 氧化槐果碱呈剂量依赖性抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖, 并且诱导细胞凋亡。并呈剂量依赖性上调促凋亡 Bax 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、STAT3、STAT5 的表达。**结论** 氧化槐果碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞有抑制增殖、诱导凋亡的作用, 可能是通过酪氨酸激酶(JAK)/STAT 信号通路下调 STAT3、STAT5 蛋白激酶表达, 从而上调促凋亡 Bax 基因表达, 下调抗凋亡 Bcl-2 基因表达。

关键词: 氧化槐果碱; 肝癌细胞; 增殖; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白; 酪氨酸激酶/转录激活因子信号通路

中图分类号: R-33 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)06-0826-04

Effects of oxysophocarpine on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

XIE Jun-jie*, WANG Qing-hua, XIA Xiao-hua, HAN Wei, REN Jing, WANG Bing-fang

* School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China

Corresponding author: WANG Bing-fang, E-mail: shbingfang@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of oxysophocarpine on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and its possible signaling pathways. **Methods** Human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells were divided into control group and oxysophocarpine treatment group (2, 4, 8, 16, 32 mmol/L). The effects of different concentrations of oxysophocarpine on cell proliferation were detected by CCK8 method, the effects of oxysophocarpine on cell apoptosis were detected by flow cytometry, and the apoptotic proteins Bax, Bcl-2 were detected by immunoblotting. The effects of signal transduction and transcription activator (STAT) 3 and STAT5 on the expression level were studied. The possible signaling pathway of sophocarpine oxide on SMMC-7721 cells was analyzed.

Results Oxysophocarpine inhibits the proliferation of SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner and induces apoptosis. The expression of apoptotic Bax was up-regulated in a dose-dependent manner, and the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2, STAT3 and STAT5 was down-regulated. **Conclusion** Oxysophocarpine can inhibit proliferation and induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. This may be related to the down-regulation of STAT3 and STAT5 protein kinase expression by tyrosine kinase (JAK) / STAT signaling pathway, thus up-regulation of Bax gene expression and down-regulation of Bcl-2 gene expression.

Key words: Oxysophocarpine; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Bcl-2; Bax; JAK/STAT signaling pathway

Fund program: Kunshan Social Development Science and Technology Project (ks1659)

氧化槐果碱是一种从豆科槐属植物苦参及豆科槐属植物苦豆子中提取的有效活性成分^[1]。有文献证实,氧化槐果碱对乳腺癌细胞及结肠癌细胞均有抑制增殖作用^[2-3]。有学者发现氧化槐果碱对小鼠炎症性疼痛具有镇痛效果^[4]。目前,氧化槐果碱对于肿瘤细胞的研究主要集中于其促进肿瘤细胞凋亡的作用,但氧化槐果碱对肝癌细胞凋亡机制的研究较少,本试验初步探讨氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞增殖与凋亡的影响及其可能的信号通路介导的凋亡机制。检测氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 及转录激活因子 (STAT) 3、STAT5 基因表达水平,分析氧化槐果碱诱导细胞凋亡可能的信号通路,为药物的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料 肝癌 SMMC-7721 细胞株(本课题保存);DMEM 细胞培养基(Gibco 公司);胎牛血清(Gibco 公司);胰酶含 EDTA(Gibco 公司);磷脂结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物技术);CCK8 检测试剂盒(immunoway 公司);小鼠抗人 Bcl-2 多克隆抗体(immunoway 公司)、小鼠抗人 Bax 多克隆抗体(immunoway 公司);小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(immunoway 公司);小鼠抗人 STAT3 单克隆抗体(北京博奥森);兔抗人 STAT5 多克隆抗体(北京博奥森);HRP 标记小鼠抗兔 IgG(上海碧云天);兔抗小鼠 IgG(上海碧云天);BCA 蛋白测定试剂盒(上海碧云天);RIPA 裂解液(上海碧云天)。氧化槐果碱(白色粉末,纯度 >99%,南京普怡生物),用二甲基亚砷溶解配置成 950 mmol/L 母液。

1.2 仪器和设备 垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(BD 公司);BioTek Synergy HT 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);电转印仪(美国 Bio-Rad 公司);超速离心机(日本 Hitachi 公司);多功能成像系统(德国 Analytik Jena 公司)

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将人肝癌 SMMC-7721 细胞接种于含 10% FBS 的高糖培养基的培养瓶中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 2~3 d 后更换培养液,在显微镜下观察后,取对数生长期的细胞进行后续试验。

1.3.2 显微镜观察氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞的形态学改变 取“1.3.1”细胞接种于 6 孔板中,在培养箱中培养 24 h,显微镜下观察,待培养细胞

铺满 6 孔板 80% 以后,加入氧化槐果碱,分为对照组及药物处理组(2、4、8、16、32 mmol/L),在培养箱中继续培养 48 h 后在显微镜下观察细胞形态变化。

1.3.3 CCK8 法测定氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响 取“1.3.1”中细胞接种于 96 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中贴壁培养 24 h 后分为对照组、氧化槐果碱处理组(2、4、8、16、32 mmol/L),每组设 6 个复孔,培养箱中继续贴壁培养 48 h 后,弃孔内培养液,96 孔板中每孔加入 10 μ l CCK8 和 100 μ l 的 DMEM,继续培养 2 h,在 490 nm 波长处测定各孔光密度(OD)值,按照细胞增殖抑制率公式,抑制率(%) = (1 - 药物处理组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。以氧化槐果碱浓度为横轴,抑制率为纵轴做抑制曲线,并计算出半数抑制浓度(IC₅₀)后,选取合适的氧化槐果碱浓度进行后续试验。

1.3.4 流式细胞仪测定氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 取“1.3.1”中细胞接种于 6 孔板中继续培养 24 h,分为对照组和药物处理组(2、4、8、16 mmol/L),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,不含 EDTA 胰酶消化细胞,用离心机 1 000 rpm,离心 5 min 后,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行:加入 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞,分别加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI,在避光条件下充分振荡后静置 15 min,以流式细胞仪检测各组细胞凋亡的情况。

1.3.5 免疫印迹法检测 Bax、Bcl-2、STAT3、STAT5 蛋白的表达 取“1.3.1”中细胞接种于 6 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,分为对照组及氧化槐果碱处理组(2、4、8、16 mmol/L)继续培养 48 h,弃培养液,PBS 润洗细胞两次,加入细胞裂解液 100 μ l,在冰上反应 15 min 后收集细胞,在 4 °C、13 000 rpm 离心 30 min。取上清,用 BCA 法进行蛋白定量后,保存于 -20 °C。对照组与药物处理组分别取含有 20 μ g 蛋白的提取液,以 10% SDS-PAGE 胶进行电泳分离蛋白,将 SDS-PAGE 胶上的蛋白电转至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加 β -肌动蛋白(β -actin)和 Bcl-2、Bax、STAT3、STAT5 一抗(1:1 000)在 4 °C 条件下摇床孵育过夜,取出膜后经 TBST 润洗 3 次后分别加入 HRP 标记的相应二抗(1:1 000),37 °C 孵育 1 h,经 TBST 润洗 3 次加入增强性化学发光试剂盒(ECL)检测特异性目标蛋白条带,采用多功能成像系统记录条带曝光结果。以 β -actin 作为内参对照,用 Quantity One 软件分析目的蛋白表达量,Bcl-2、Bax、STAT3、STAT5 的相对蛋白表达量作为目的蛋白灰度值与对应 β -actin 灰度值之比。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件和 Graphpad 6.0 软件进行数据处理。所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Tamhanes T2 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞的形态学影响

通过倒置显微镜观察结果显示, 细胞处理 48 h 后, 与对照组比较, 随着氧化槐果碱浓度不断上升(2、4、8 mmol/L), SMMC-7721 细胞增殖受到抑制, 有部分细胞发生皱缩和凋亡。在 16 mmol/L 浓度时, SMMC-7721 细胞较对照组分布密度明显减少, 有大量细胞发生皱缩, 部分细胞发生凋亡。在 32 mmol/L 浓度时, SMMC-7721 细胞增殖受到抑制, 绝大多数细胞发生皱缩, 大部分细胞发生凋亡。见图 1。

2.2 氧化槐果碱抑制 SMMC-7721 细胞增殖 CCK8

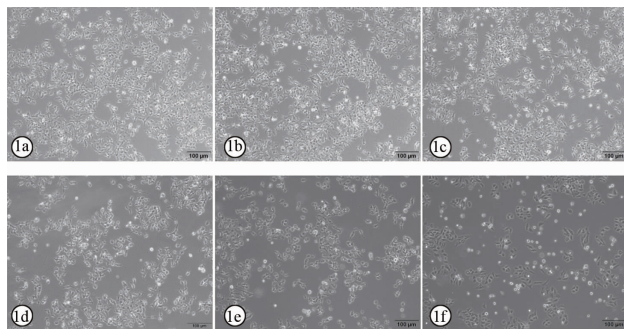
法结果显示, 细胞经五种浓度处理 48 h 后与对照组相比, 氧化槐果碱明显抑制 SMMC-7721 细胞的增殖, 且随着浓度的升高, 细胞增殖抑制率递增(图 2)。其 IC_{50} 为 5.294, 为了减少氧化槐果碱的细胞毒副作用, 后续试验氧化槐果碱的最高浓度采用 16 mmol/L 处理 48 h。

2.3 氧化槐果碱促进 SMMC-7721 细胞的凋亡 流式细胞术检测发现, 氧化槐果碱药物处理组(2、4、8、16 mmol/L)作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 16 mmol/L 浓度下细胞凋亡率明显高于其余 4 组($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2、Bax、STAT3、STAT5 蛋白表达的影响 免疫印迹法结果显示, 随着氧化槐果碱浓度升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量逐渐减少, 而促进凋亡的 Bax 表达量逐渐增加($P < 0.05$)。氧化槐果碱药物处理组的 STAT-3、STAT-5 的表达量较对照组明显下降($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

肝细胞癌是我国常见的死亡率极高的恶性肿瘤。对于肝细胞癌的治疗, 目前方法有限, 主要以手术切除为主, 放化疗为辅。但患者发现疾病时, 往往已经是癌症晚期, 预后极差。因此, 临床需要寻求一种有效的治疗方法。苦参碱类生物碱具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、除湿利尿等多种药理作用^[5]。近年来, 对苦参碱类抗肿瘤的研究逐渐深入, 以苦参碱为代表的生物碱具有阻滞细胞周期、抑制细胞增殖、促进细胞凋



注: 1a: 0 mmol/L; 1b: 2 mmol/L; 1c: 4 mmol/L; 1d: 8 mmol/L; 1e: 16 mmol/L; 1f: 32 mmol/L。

图 1 不同氧化槐果碱浓度处理 48 h 对 SMMC-7721 细胞形态学的影响($\times 100$)

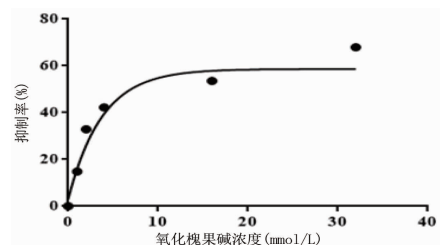
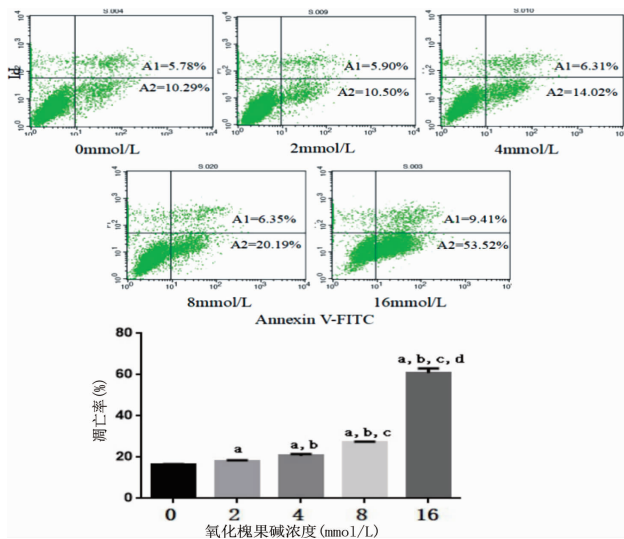


图 2 氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞增殖的影响



注: 3a: 流式细胞检测结果, 第一、二、三、四象限分别为晚期凋亡细胞、死亡细胞、正常细胞和早期凋亡细胞。3b: 氧化槐果碱不同浓度下 SMMC-7721 细胞凋亡率比较, 与 0 mmol/L 比, $^a P < 0.05$; 与 2 mmol/L 比, $^b P < 0.05$; 与 4 mmol/L 比, $^c P < 0.05$; 与 8 mmol/L 比, $^d P < 0.05$ 。

图 3 氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

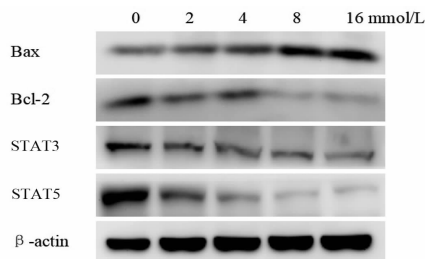


图 4 氧化槐果碱对 SMMC-7721 细胞 Bcl-2、Bax、STAT3、STAT5 蛋白表达的影响

亡等作用^[6]。本研究结果显示,不同浓度的氧化槐果碱对细胞均有一定抑制增殖、促进凋亡的作用。随着氧化槐果碱浓度的增高,细胞的增殖抑制率越高,凋亡率也越高。氧化槐果碱可能通过上调促凋亡基因 Bax 表达,下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达来抑制细胞增殖、促进细胞凋亡。

早在 1994 年,JAK/STAT 信号通路就被发现^[7]。细胞因子及细胞外信号通过与细胞膜上受体特异性结合使细胞受体构象发生改变。JAK 向膜受体移动后发生磷酸化修饰而被激活,吸引 STAT 结合到受体上,使 STAT 发生磷酸化,形成同源或异源二聚体。二聚体转位到细胞核的调控序列,调控基因表达^[8]。随着分子生物学的迅速发展,JAK/STAT 信号通路与肿瘤的关系成为研究的热点。有研究发现,恶性黑色素瘤通过抑制 STAT1 表达,从而下调干扰素反应因子(IRF)表达,进而抑制主要组织相容性复合体-II(MHC-II)在细胞表面表达肿瘤相关抗原提呈 CD4⁺ 辅助 T 细胞,逃避免疫监护,促进肿瘤转移^[9]。血液系统肿瘤异常激活 STAT3 信号通路从而促进肿瘤发展。急性早幼粒细胞白血病细胞系 HT93A 必须激活 JAK/STAT 信号通路诱导分化^[10]。有研究表明,肝癌细胞中过度表达 B7-同源物 3(B7-H3)通过 JAK2/STAT3/Slug 通道,调节上皮细胞向间充质细胞转化,促进肝癌细胞的浸润和转移^[11]。本研究结果显示,随着氧化槐果碱浓度增高,STAT3、STAT5 蛋白的表达量明显减少,说明氧化槐果碱可能是通过下调 JAK/STAT 信号通路中 STAT3、STAT5 的表达,诱导肝癌细胞凋亡。

本课题组通过前期实验发现,槐果碱有抑制肝癌 SMMC-7721 细胞生长及侵袭的能力,但是笔者通过进一步实验发现,槐果碱的药物选择性较差,对肝细胞 L-O₂ 也有较大损伤的毒副作用^[12-13]。改变槐果碱的分子结构可能会增强其抗肿瘤的作用或者减少对肝细胞的损害。因此,本试验研究了与槐果碱结构相似的氧化槐果碱对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖与凋亡的影响,证实氧化槐果碱同样具有抑制肝癌细胞增殖、促进其凋亡的作用。

综上所述,本研究初步证实了氧化槐果碱能够上调 Bax 表达、下调 STAT3、STAT5、Bcl-2 表达,从而达到抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡的作用。这可能

是通过 JAK/STAT 信号通路下调 STAT3、STAT5 蛋白激酶表达,致磷酸化 STAT3、STAT5 减少,从而上调促凋亡 Bax 基因表达,下调抗凋亡 Bcl-2 基因表达。JAK/STAT 信号通路是否影响 Bax 和 Bcl-2 表达,肝癌细胞的凋亡是否仅通过 JAK/STAT 信号通路进行调控,需要抑制 JAK/STAT 信号通路后进行后续实验进一步验证。

参考文献

- [1] 廖春燕,梁健,杨燕,等. 苦豆子的药理及应用概述[J]. 中国民族民间医药,2009,18(5):6-8.
- [2] 资源,赵文键,程庆,等. 氧化槐果碱对人乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(2):174-177.
- [3] 张绪慧,梁磊,蔡长青,等. 氧化槐果碱对人结肠腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 广东医学,2015,36(5):660-664.
- [4] 吴璟,杨文,郑婕,等. 氧化槐果碱对小鼠炎症性疼痛的镇痛作用研究[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(1):54-58.
- [5] Liu Y, Xu Y, Ji WD, et al. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: literature review[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6):5111-5119.
- [6] 钱利强,沈根海,刘岩. 苦参碱类生物碱及其衍生物抗肝癌作用研究进展[J]. 实用肿瘤杂志,2015,30(1):97-100.
- [7] Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins[J]. Science, 1994, 264(5164):1415-1421.
- [8] 程初勇,黄照河. JAK/STAT 信号通道与相关疾病的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2016,30(5):448-451.
- [9] Osborn JL, Greer SF. Metastatic melanoma cells evade immune detection by silencing STAT1[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2):4343-4361.
- [10] Uchino Y, Iriyama N, Hata Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor potentiates all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cell line HT93A[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15:30.
- [11] Kang FB, Wang L, Jia HC, et al. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15:45.
- [12] 王庆华,韩玮,陈达飞,等. 槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 和肝细胞 L-O₂ 生长的影响[J]. 中医药导报,2018,24(17):31-35,49.
- [13] 王庆华,韩玮,陈达飞,等. 槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 生长与侵袭的影响及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志,2019,39(1):67-71.

收稿日期:2018-11-28 修回日期:2018-12-18 编辑:王海琴