

β -榄香烯注射液对人肝癌 HepG-2 细胞微管蛋白 α 的影响

Effects of β -elemene on α -tubulin of Human Hepatocarcinoma HepG-2 Cells

MAO Yu-qiu, LIANG Xin-miao, FU Hai-yan, et al.

毛雨秋¹, 梁鑫淼², 付海雁¹, 密文静¹, 崔晓楠¹

(1. 大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连 116011;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: [目的] 探讨 β -榄香烯注射液对人肝癌 HepG-2 细胞微管蛋白 α (α -tubulin) 的影响。[方法] 采用噻唑蓝还原法 (MTT) 观察 β -榄香烯注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖的影响; 采用流式细胞术检测其对 HepG-2 细胞周期的影响; 采用逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 法检测其对 HepG-2 细胞微管蛋白 α mRNA 表达的影响; 采用蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 分析微管蛋白 α 蛋白水平的表达及聚合和未聚合微管蛋白含量的变化。[结果] β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞增殖具有抑制作用, 其抑制效应具有时间和剂量依赖性; 随着药物浓度 (0.02mg/ml、0.04mg/ml、0.08mg/ml) 的增加将 HepG-2 细胞阻滞于 S 期的比例 (39.23%、44.18%、52.89%) 在逐渐增加; RT-PCR 检测表明, 随着 β -榄香烯注射液浓度的增加, 微管蛋白 α mRNA 表达的条带逐渐减弱; 蛋白免疫印迹显示, 随着 β -榄香烯注射液浓度的增加, 微管蛋白 α 表达的条带在逐渐减弱, 同时细胞内聚合微管蛋白的比例 (28.9%、26.6%、10.5%) 在逐渐降低。[结论] β -榄香烯注射液能够抑制 HepG-2 细胞增殖, 影响微管蛋白 α 的表达, 并抑制 HepG-2 细胞内微管的聚合。

关键词: β -榄香烯; HepG-2 细胞; 微管蛋白 α ; 微管聚合

中图分类号: R73-3; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)02-0145-05

β -榄香烯 (β -elemene) 为我国传统抗肿瘤植物温莪术干燥根茎中制备的活性单体, 是中国知识产权药物。临床报道表明, β -榄香烯对多种肿瘤细胞具有较强的抑制和杀伤效应, 呈现广谱、高效、副作用小的抗肿瘤特点^[1-3], 它还具有免疫保护作用, 与放疗协同作用能缓解癌性疼痛, 升高白细胞数量和抑制血小板聚集等作用, 并且对化疗非敏感肿瘤肝癌疗效显著^[4-6]。基础研究表明, β -榄香烯能够诱导肿瘤细胞凋亡、阻断细胞周期、抑制信号传导通路等, 表现为多靶位抗肿瘤作用^[7-14]。然而, β -榄香烯与微管系统的关系尚不明晰。微管是细胞骨架的重要组成部分, 由 α 和 β 两种微管蛋白异二聚体聚合而成的管状聚合物, 在细胞生长、细胞形态维持、细胞信号转导以及有丝分裂过程中都起着重要作用, 是目前重要的药效靶位之一^[15, 16]。本研究旨在观察 β -榄香烯

注射液对人肝癌 HepG-2 细胞微管蛋白 α 含量和活性的影响, 为进一步阐明 β -榄香烯注射液抗肿瘤的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG-2 从中国科学院上海细胞研究所购买。其他材料包括 β -榄香烯注射液 (大连金港制药有限公司)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (Biosharp 公司)、二甲基亚砷 (Amersco 产品)、RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司)、 α -微管蛋白鼠抗人单克隆抗体 (碧云天生物技术研究)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (北京中山金桥生物有限公司)、PVDF 膜。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG-2 细胞常规复苏后用 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液, 置于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养。取对数生长期的细

收稿日期: 2011-08-23; 修回日期: 2011-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500586)

通讯作者: 崔晓楠, E-mail: cxn23@sina.com

胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,进行细胞计数。

1.3 MTT 法检测肿瘤细胞增殖

取对数生长期的 HepG-2 细胞(0.6×10^4)接种于 96 孔培养板,24h 后加入不同浓度(0.10、0.08、0.06、0.04、0.02、0.01mg/ml)的 β -榄香烯注射液,同时设含 IMDM 全培养基的空白对照组,每个浓度设 4 个副孔,分别培养 24h、48h、72h,每孔加入 5g/L 的 MTT 液 20 μ l,避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 4h,弃培养液,每孔加入 150 μ l DMSO 震荡溶解后于 570nm/630nm 测吸光度(A)值。按公式计算不同浓度的药物对肿瘤细胞生长的抑制率(IR)并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

$IR(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。IC₅₀ 计算方法:用细胞存活率对剂量对数作图并按作图法求出 IC₅₀ 值,实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术分析细胞周期

取对数生长期的 HepG-2 细胞稀释至 2×10^6 种植于培养瓶,24h 后分别加入不同浓度(0.02、0.04、0.08mg/ml)的 β -榄香烯注射液培养 24h,0.25% 胰蛋白酶消化后 1 000r/min 离心 5min,弃上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加 70% 冷乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 固定过夜。PBS 洗 2 次,离心弃上清,加入 2mg/ml RNA 酶 25 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 30min,再加入 1mg/ml PI 染料 25 μ l,4 $^{\circ}$ C 避光静置 30min 后在流式细胞仪上对细胞凋亡和细胞周期进行荧光检测及分析(激发波长 562nm,发射波长 630nm)。本实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 检测微管蛋白 α mRNA 含量

不同浓度(0.02、0.04、0.08mg/ml)的 β -榄香烯注射液作用 HepG-2 细胞 24h 后收集细胞,分别提取细胞总 RNA,定量后逆转录,逆转录产物进行聚合酶链反应(PCR),GAPDH 为内参照。 α -tubulin 的上游引物 5'-ATGGAGCCCTGAATGTTGAC-3',下游引物 5'-CTCAAAGCAAGCATTGGTGA-3',扩增片段 158bp。GAPDH 上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTGCGAGT-3',下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3',扩增片段 226bp。PCR 反应条件:预变性温度 95 $^{\circ}$ C 5min,变性温度 95 $^{\circ}$ C 30s,退火温度 60 $^{\circ}$ C 30s,延伸温度 72 $^{\circ}$ C 30s,共 35 个循环;PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透视仪下观察电泳带,一次性成像仪扫描成像并进行灰度分析。实验重复 3 次。

1.6 Western Blot 检测微管蛋白 α 蛋白含量

不同浓度(0.02、0.04、0.08mg/ml) β -榄香烯注射液作用 HepG-2 细胞 24h,收集细胞常规方法提取总

蛋白,蛋白样品采用 Bradford 法测定总蛋白含量,SDS-PAGE 电泳,分离胶浓度为 8%~12%,每孔上样 50 μ g,电泳完毕后经电转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1h,以 α -微管蛋白鼠抗人单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS/T 洗涤后,用辣根酶标记山羊抗鼠 IgG(1:5 000)室温孵育 1h,最后进行 ECL 试剂反应,X 线胶片曝光 1~5min 后显影,胶片晾干、扫描、照相。实验重复 3 次。

1.7 聚合微管检测

参照文献 [19] 的方法检测聚合微管的比例。0.2% 胰酶消化收集不同浓度(0.02、0.04、0.08mg/ml) β -榄香烯注射液作用 24h 的 HepG-2 细胞,PBS 清洗 2 次,在 1.5ml 离心管中加入 200 μ l 低渗裂解液[1mmol/L MgCl₂, 2mmol/L EGTA, 0.5% NP40, 2mmol/L PMSF, 10 μ l 蛋白酶抑制剂, 20mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)],37 $^{\circ}$ C 避光裂解 10min,14 000r/min 室温离心 10min,分别收集上清和沉淀。上清中即含有可溶性的微管蛋白,沉淀用 100 μ l 低渗缓冲液重悬,此部分的上清中含有原来聚合的微管蛋白。蛋白免疫印迹法分析同前。

1.8 统计学处理

采用 SPSS14.0 统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 β -榄香烯注射液对肿瘤细胞增殖的影响

采用 MTT 方法观察 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞增殖的抑制作用,结果表明,随着药物浓度增加、作用时间延长,药物对 HepG-2 细胞增殖抑制率增加,其 24h、48h、72h 的 IC₅₀ 分别是 0.040mg/ml、0.022mg/ml、0.016mg/ml,表现剂量依赖性和时间依赖性(图 1)。

2.2 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞周期的影响

不同浓度(0.02、0.04、0.08mg/ml) β -榄香烯注射液作用 24h 的 HepG-2 细胞和对照组细胞,流式细胞仪结果显示肿瘤细胞 S 期分布比例分别为 39.23% 和 44.18%,而对照组细胞 S 期比例为 30.14%、52.89%;肿瘤细胞凋亡率分别为 25.30% 和 52.10%,而对照组中细胞凋亡率为 10.70%、79.40%。

见图 2。

2.3 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞微管蛋白 α mRNA 表达的影响

不同浓度(0.02,0.04,0.08mg/ml)的 β -榄香烯注射液作用于 HepG-2 细胞 24h,采用 RT-PCR 分析肿

瘤细胞微管蛋白 α mRNA 水平,结果表明,随着药物浓度的增加,微管蛋白 α mRNA 表达的条带逐渐减弱($P<0.05$),表现浓度依赖性(图 3、4)。

2.4 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞微管蛋白 α 蛋白水平表达的影响

不同浓度(0.02,0.04,0.08mg/ml)的 β -榄香烯注射液作用于 HepG-2 细胞 24h,采用 Western blot 分析 β -榄香烯作用后微管蛋白 α 蛋白水平表达,结果表明,随着药物浓度增加,微管蛋白 α 表达的条带在逐渐减弱($P<0.05$),呈现浓度依赖性(图 5、6)。

2.5 聚合微管免疫印迹分析

图 7 和图 8 显示随着 β -榄香烯注射液浓度的增加,聚合的微管蛋白比例渐下降(由于药物作用后微管蛋白含量下降,药物处理组酌情增加了蛋白上样量),不同药物浓度作用后聚合微管蛋白占总微管蛋白(聚合微管蛋白+可溶性微管蛋白)的比例

依次为 28.9%,26.6%,10.5%,而对照组为 37.8%,各组间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果表明不同浓度的 β -榄香烯抑制细胞内微管蛋白的聚合,并随着作用浓度的增加,其对细胞内微管蛋白聚合的抑制作用呈增加的趋势。

3 讨 论

目前临床缺乏有效的肝癌治疗药物,肝癌化疗药物有效率在 20%以下。靶向药物如索拉非尼和埃罗替尼等在肝癌治疗中尚处于试验阶段,并且目前报道疗效尚不理想。寻找有效、低毒的抗肝癌药物始终是抗肝癌治疗的热点方向。

细胞微管系统对细胞形态维持、细胞信号传导、细胞生长分化都具有重要意义。微管由 α 和 β 微管蛋白组装成长管状异二聚体结构,依赖于微管蛋白二聚体不

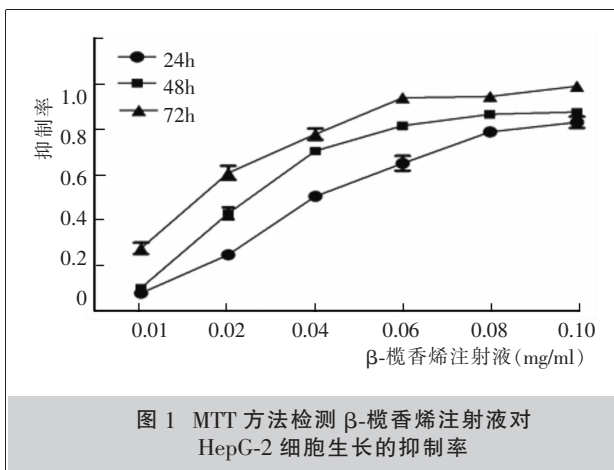


图 1 MTT 方法检测 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞生长的抑制率

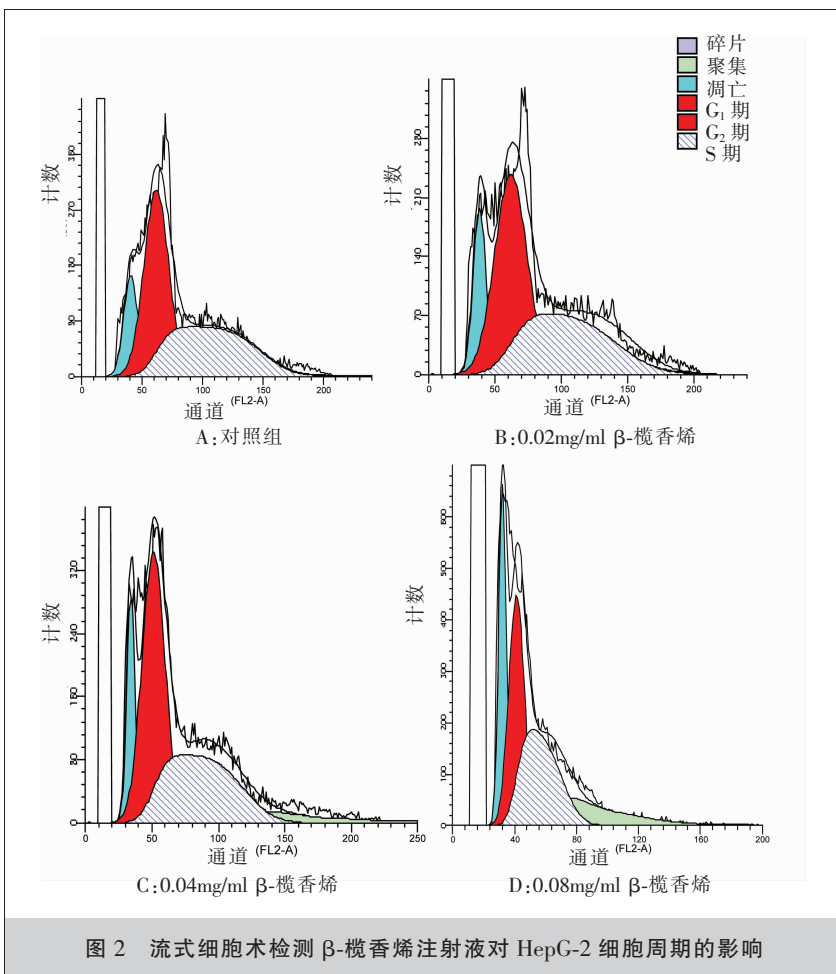
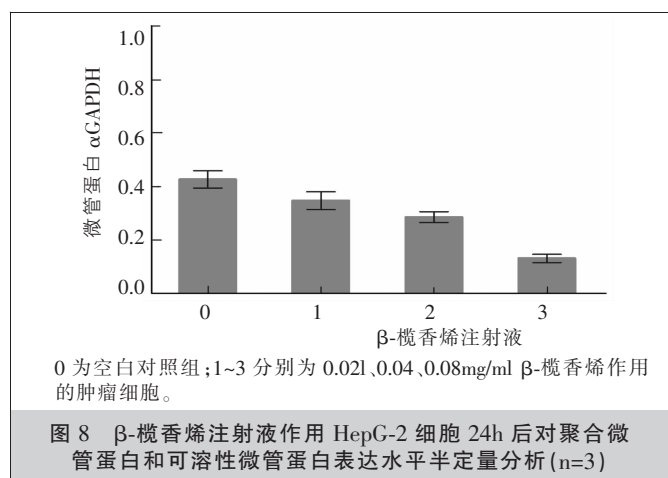
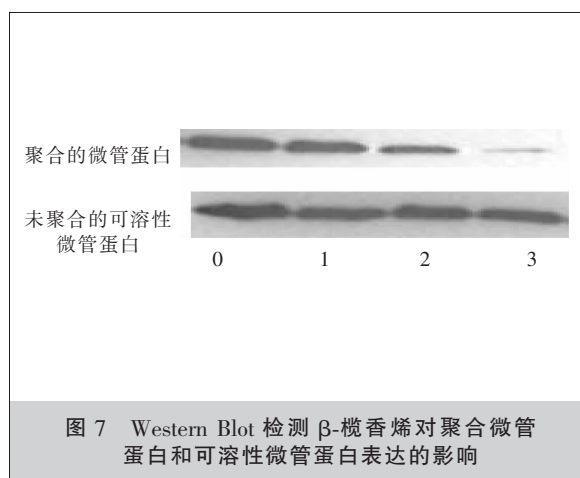
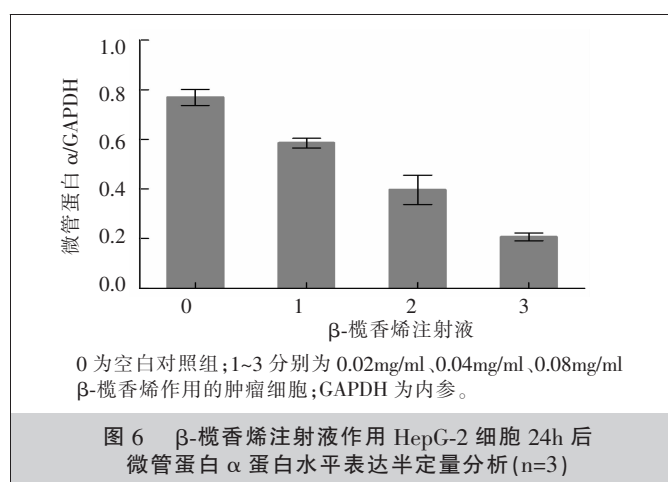
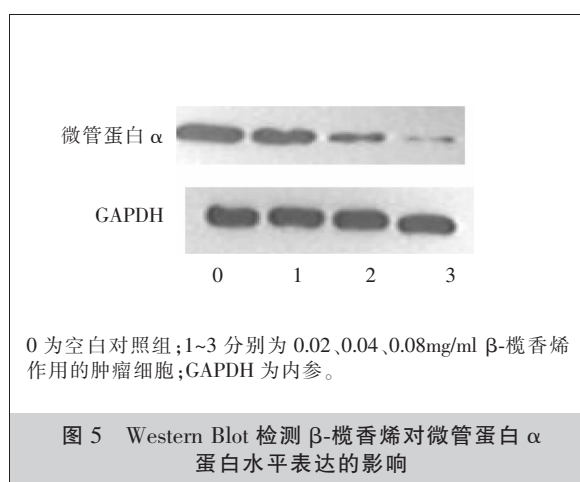
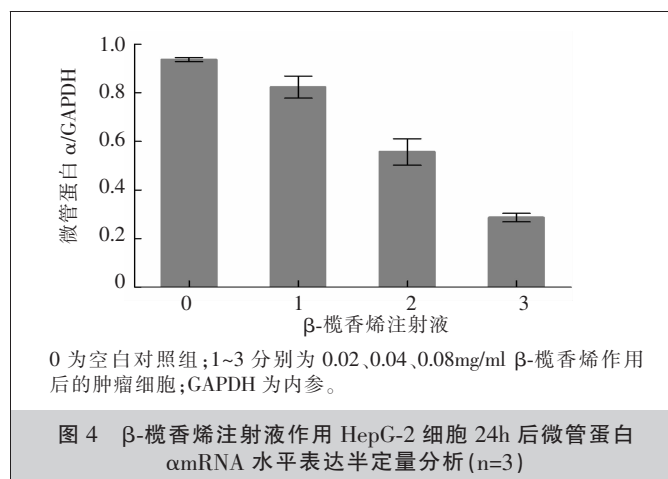
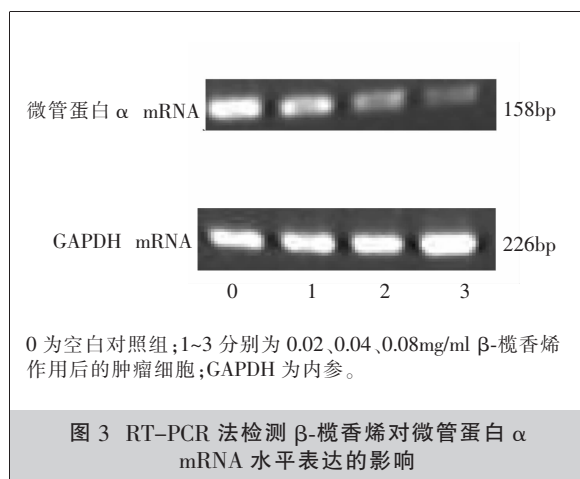


图 2 流式细胞术检测 β -榄香烯注射液对 HepG-2 细胞周期的影响



断地聚合与解聚而处于一种装配与去装配的动态平衡中,是近年抗肿瘤药物的重要靶向目标之一^[17]。临床应用广泛的一线抗肿瘤药物紫杉醇^[2]、多西紫杉醇、长春新碱^[3]等都是通过促进微管聚合或解聚来实现杀伤肿瘤细胞。临床观察表明 β -榄香烯对肝癌

的疗效突出,并且能够提高患者生存质量,改善免疫状态,与常规肝癌治疗具有协同作用。基础研究表明, β -榄香烯能够诱导肝癌细胞凋亡,影响 HSP 家族基因表达^[18],抑制肿瘤细胞迁移、侵袭,然而有关 β -榄香烯与微管系统关系罕见报道。我们观察了 β -

榄香烯对肝癌增殖及微管系统的影响,结果显示 β -榄香烯注射液能够抑制 HepG-2 细胞增殖、诱导凋亡,且呈时间与浓度依赖性;可将肿瘤细胞阻滞于 S 期,影响微管蛋白 α 表达,同时下调聚合微管蛋白比例。

传统以微管为靶点的抗肿瘤药物,如紫杉醇、长春新碱、秋水仙碱为 G₂/M 期阻滞药物,通过诱导肿瘤细胞有丝分裂阻滞,实现凋亡,而近年来发现的一些能有效地抑制微管装配的化合物,如环状乙基酯系列衍生物、天然产物 Artelastin、 β -谷甾醇等则是 S 期阻滞药物^[19-22],与我们的实验结果一致。他们将这些化合物实现 S 期阻滞的机制解释为药物影响与微管结合的线粒体进而影响 ATP/ADP 的转换和能量供应,因此引起 S 期延长。然而 β -榄香烯通过何种机制引起肿瘤细胞 S 期阻滞有待进一步研究。

综上,研究表明 β -榄香烯可抑制 HepG-2 细胞增殖,阻滞肿瘤细胞于 S 期,影响微管蛋白 α 表达及聚合可能为药效机制之一。 β -榄香烯注射液是一个有价值的抗肝癌药物。

参考文献:

- [1] Yang FQ, Li SP, Chen Y, et al. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of Curcuma rhizomes by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005,39(3-4):552-558.
- [2] Zhou X, Li ZW, Liang GY, et al. Analysis of volatile components of Curcuma sichuanensis X. X. Chen by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007,43(2): 440-444.
- [3] Zhang HY, Hu CX, Liu CP, et al. Screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines using cell extract and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007,43(1): 151-157.
- [4] 陈乃杰,金源,刘燕珠,等.榄香烯为主治疗原发性肝癌 43 例临床观察[J].福建医药杂志,1996,18(5):19-80.
- [5] 陈华,孙宇,崔晓楠.华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞 DNA 拓扑异构酶 I 的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2010,20(3):197-201.
- [6] 易成,吴万垠,叶剑飞. 榄香烯肝动脉灌注治疗原发性肝癌[J].中药药理与临床, 1998,14(2):44-45.
- [7] Kavallaris M, Tait AS, Walsh BJ, et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells [J]. Cancer Res, 2001,61(15):5803-5809.
- [8] Li X, Wang G, Zhao J, et al. Antiproliferative effect of β -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G₂-M phase[J]. Cell Mol Life Sci, 2005,62(7-8): 894-904.
- [9] Wang G, Li X, Huang F, et al. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death [J]. Cell Mol Life Sci, 2005,62(7-8): 881-893.
- [10] Tao L, Zhou L, Zheng LY, et al. Elemene displays anticancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006,58(1): 24-34.
- [11] Chen ZH, Song YX, Che JJ, et al. Validation of a sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous determination of β -elemene and β -elemenal in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009,877(4): 408-414.
- [12] Peng XX, Zhao YL, Liang XY, et al. Assessing the quality of RCTs on the effect of β -elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors [J]. Contemp Clin Trials, 2006,27(1): 70-82.
- [13] Sun YH, Liu GF, Zhang YQ, et al. Synthesis and in vitro anti-proliferative activity of β -elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase [J]. Bioorg Med Chem, 2009,17(3): 1118-1124.
- [14] Xu LY, Tao SJ, Wang XM, et al. The synthesis and anti-proliferative effects of β -elemene derivatives with mTOR inhibition activity [J]. Bioorg Med Chem, 2006,14(15): 5351-5356.
- [15] Górka M, Daniewski WM, Gajkowska B, et al. Autophagy is the dominant type of programmed cell death in breast cancer MCF-7 cells exposed to AGS 115 and EFDAC, new sesquiterpene analogs of paclitaxel [J]. Anti cancer Drugs, 2005,16(7):777-787.
- [16] Nicholson B, Lloyd GK, Miller BR, et al. NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent [J]. Anti-cancer Drugs, 2006, 17 (1) :25-31.
- [17] 刘义,吴科锋,李延平. 川陈皮素体外对微管蛋白聚合的影响[J].中国中药杂志, 2008,33(18):2113-2115.
- [18] 高志红,郭连英,沈杰.榄香烯或热休克对人肝癌细胞 HepG2 HSP70 膜表达及多种 HSP 基因表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(11): 790-794.
- [19] 王莉,杨永杰,陈松华,等. β -谷甾醇对子宫颈癌细胞微管系统的影响 [J]. 中华医学杂志,2006,86 (39):2771-2775.
- [20] Davis A, Jiang JD, Middleton KM, et al. Novel suicide ligands of tubulin arrest cancer cells in S-phase[J]. Neoplasia, 1999,1(6):498-507.
- [21] Jiang JD, Denner L, Ling YH, et al. Double blockade of cell cycle at G1-S transition and M phase by 3-iodoacetamido benzoyl ethyl ester, a new type of tubulin ligand [J]. Cancer Res, 2002,62(21):6080-6088.
- [22] Pedro M, Ferreira MM, Cidade H, et al. Artelastin is a cytotoxic prenylated flavone that disturbs microtubules and interferes with DNA replication in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Life Sci, 2005,77(3):293-311.