

虎刺醛对人肝癌细胞HepG2生长抑制、细胞迁移抑制及其机制的研究

丁兰* 柳志军 令利军 贾凌云 第五佳丽 彭舒 刘国安

(西北师范大学生命科学院, 兰州 730070)

摘要 采用台盼蓝排染法、划痕法、特异性荧光染色技术检测了虎刺醛对人肝癌细胞HepG2的生长、细胞迁移、微丝骨架和角蛋白纤维网络的影响以及引起的凋亡作用。结果表明, 15~60 $\mu\text{mol/L}$ 的虎刺醛对HepG2细胞有明显的生长抑制作用, 并存在浓度和时间依赖性; 低浓度(15 $\mu\text{mol/L}$)的虎刺醛能够显著抑制HepG2细胞迁移, 30 $\mu\text{mol/L}$ 几乎完全抑制细胞迁移; 25, 27.5, 30, 35 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞24 h后, 其细胞内的应力纤维束、片状伪足、丝状伪足逐渐减少或消失, 这与8 $\mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B的处理结果相似; 而25 $\mu\text{mol/L}$ 和30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白纤维仅有轻微影响; 15~60 $\mu\text{mol/L}$ 的虎刺醛能不同程度诱导HepG2细胞发生凋亡。虎刺醛对HepG2细胞内应力纤维(或微丝)的破坏作用极可能是导致细胞生长抑制、迁移抑制的直接原因, 也是使细胞贴壁性降低或丧失从而导致凋亡发生的直接原因。

关键词 虎刺醛; HepG2; 细胞迁移; 应力纤维; 角蛋白纤维; 细胞凋亡

Study of Damnacanthal on Anti-proliferation, Cell Migration Inhibition and Its Mechanism in Human Hepatoma Cell HepG2

Ding Lan*, Liu Zhijun, Ling Lijun, Jia Lingyun, Diwu Jiali, Peng Shu, Liu Guoan

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract The trypan blue staining, wound healing assay, specific fluorescence staining are used to investigate the effect of proliferation, cell migration, microfilaments cytoskeleton, keratin filaments network and apoptosis induced by damnacanthal on human hepatoma cells HepG2 respectively. The results demonstrated that damnacanthal significantly inhibited cell proliferation of human hepatoma cell HepG2 at concentrations of 15~60 $\mu\text{mol/L}$ in time and dose dependent manners; 15 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthal inhibits cell migration and 30 $\mu\text{mol/L}$ almost inhibits completely; after HepG2 cells were exposed to damnacanthal (25, 27.5, 30, 35 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, stress fibers, lamellipodia and filopodia were absent or decreased gradually with increased concentrations, which is similar to the results caused by 8 $\mu\text{mol/L}$ cytochalasin B in the same condition; however, 25 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthal had only slightly influence on keratin filaments of HepG2; 15~60 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthal induced apoptosis of HepG2 in differently degrees. The destructive effects of damnacanthal on HepG2 cells stress fiber (microfilaments) may be the direct reason of anti-proliferation and cell migration inhibition, maybe the direct reason of cell adherence decreased or lost

收稿日期: 2012-11-02 接受日期: 2012-12-28

国家自然科学基金(批准号: 30960464)和西北师范大学知识与科技创新工程项目(批准号: NWNKJXGC-03-65)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-7970093, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

Received: November 2, 2012 Accepted: December 28, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30960464) and the Foundation of the Innovation Project Council of Northwest Normal University (Grant No.NWNKJXGC-03-65)

*Corresponding author. Tel: +86-931-7970093, E-mail: dinglan@nwnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-28 17:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1722.006.html>

and further lead to HepG2 cells apoptosis as well.

Key words damnacanthal; HepG2; cell migration; stress fiber; keratin filaments; cell apoptosis

细胞骨架是真核生物的主要结构特征之一,是由微丝、微管和中间纤维三种成分构成的复杂网状结构,决定细胞形态并与多种细胞功能有关^[1-3]。微丝,又称肌动蛋白纤维,由真核细胞内含量极为丰富的肌动蛋白组成,具有维持细胞形态特征,参与细胞运动和细胞分裂等功能^[4-6]。微管是细胞内起支撑作用的主要支架,并对细胞内物质运输起轨道和指引方向的作用^[7]。中间纤维按其组织来源和免疫原性可分为6类,其中,角蛋白是上皮细胞中最丰富的中间纤维,可起支撑作用,使细胞具有张力和抗剪切力,并与细胞黏附和迁移有关^[8-9]。

细胞迁移对于细胞和组织的形态发生、免疫防御以及功能修复是必不可少的^[10]。恶性肿瘤细胞可以利用自身固有的迁移能力通过浸入周围的组织或血液,最终完成转移。细胞迁移是由细胞膜下局部肌动蛋白纤维聚合导致细胞膜发生突起,最终引起的多步骤高度互相协调的过程^[11]。细胞膜形成的突起结构根据它们的形态、结构及功能特征分为片状伪足、丝状伪足及伪足。片状伪足是在迁移细胞前缘形成的扁平、片状结构,一般认为片状伪足产生细胞迁移的动力,而丝状伪足呈细小的圆柱形针状结构^[11-12]。研究发现,从菱背响尾蛇毒素中分离得到的解聚素crotatroxin 2可以与细胞表面的整合素结合抑制肿瘤细胞的迁移^[13];日本厚朴木兰(*Magnolia obovata* THUNB)叶中的提取物obovatal能抑制人纤维肉瘤细胞(HT1080)的基质金属蛋白酶表达及其活性,从而抑制肿瘤细胞迁移^[14];而微丝特异性药物,如细胞松弛素类等,则可特异性破坏微丝骨架进而抑制细胞的迁移^[15]。随着癌症治疗策略的改变,分子靶向药物的研究与发现已成为抗肿瘤新药的发展目标。因此,发现细胞迁移抑制性药物以及深入研究它们的作用机理是靶向肿瘤新药研究的重要领域。

肝癌是全球最常见的癌症之一,2008年全球发现748 300例肝癌,其中695 900例死亡,而一半就发生在我国^[16]。萹蓄类化合物广泛存在于茜草科、蓼科和豆科等植物中,对于它们的提取分离、成分分析、药理作用已有大量文献报道,临床上常用的抗肿瘤药物

阿霉素及米托蒽醌的基本母核就是萹蓄结构^[17]。但是,关于萹蓄类化合物的抗肿瘤作用的机理尚不明确。虎刺、短刺虎刺、茜草、三角瓣花是广泛使用的传统抗癌草药,而虎刺醛(1-甲氧基-2-醛基-3-羟基萹蓄)是上述植物中重要的次生代谢产物^[18-20],研究表明,该化合物具有良好的细胞毒活性^[21]、抗癌细胞增殖活性^[22-23]、诱导癌细胞凋亡^[23-24]以及抗肿瘤发生等^[24-25],但有关虎刺醛抑制肿瘤细胞迁移及其相关机理的研究报道还极少^[25]。我们课题组从匙萼木中分离得到了该化合物,并报道了它对4种人肿瘤细胞株的体外细胞毒活性^[21]以及对人早幼粒白血病细胞HL-60的生长抑制、周期阻滞、凋亡诱导及DNA损伤作用^[23]。本研究对该化合物的进一步研究发现,虎刺醛对人肝癌细胞HepG2的迁移具有较强的抑制作用,并对HepG2细胞黏附和迁移相关的功能结构——微丝具有靶向性解聚作用,同时对中等纤维(角蛋白纤维)也有一定的影响,为寻找及求证虎刺醛在细胞内的特异性作用靶点提供了有力的科学依据,同时也为评估该化合物作为肿瘤细胞转移抑制性靶向药物的研究价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

萹蓄化合物虎刺醛由本实验室从云南产匙萼木中分离得到^[22],用助溶剂二甲亚砜(DMSO)溶解后于4 °C保存待用。人肝癌细胞株HepG2引自兰州大学生命科学学院。

1.2 试剂及仪器

RPMI-1640培养基、台盼蓝、吖啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)、细胞松弛素B以及FITC标记的鬼笔环肽购自Sigma公司;胰蛋白酶(Trypsin)购自Amresco公司;Pan-Keratin Mouse mAb购自Cell Signaling Technology公司,Goat anti-mouse IgG-FITC购自Santa Cruz公司;新生小牛血清购自中国杭州四季青生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

美国Costar公司6孔和24孔细胞培养板;美国Forma Scientific公司CO₂细胞培养箱;倒置显微镜(Olympas);荧光显微镜(Leica);索尼数码相机。

1.3 细胞培养

HepG2细胞培养于RPMI-1640培养基中,内含10%灭活新生小牛血清及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,置于37 °C、5.0% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 台盼蓝排染法检测虎刺醛对HepG2细胞的生长抑制作用

采用Letašiová等^[26]的方法,稍作修改。取对数生长期的HepG2细胞,以 5×10^4 /mL的密度接种于24孔板,每孔0.5 mL,置于培养箱中培养24 h后加药。药物终浓度分别为15, 30, 45, 60 μmol/L,对照组加入等体积培养基。从加药开始,每隔12 h置细胞培养板于倒置显微镜下拍照,然后消化、收集细胞加入0.4%的台盼蓝溶液直接进行计数。对照组和实验组均设3个复孔。

1.5 划痕法测试虎刺醛对HepG2细胞迁移的抑制作用

取对数生长期的HepG2的细胞,以 2.5×10^5 /mL的密度接种于24孔板,每孔1 mL,培养24 h后用移液管尖在每孔底部中间划一窄线,培养基轻轻洗几次后加入终浓度为15 μmol/L和30 μmol/L的虎刺醛,对照组加入等体积的完全培养基。药物处理12, 24 h后置细胞培养板于倒置显微镜下观察拍照。

1.6 FITC标记的鬼笔环肽检测虎刺醛对HepG2细胞微丝的影响

取对数生长期的HepG2细胞,在放置有盖玻片的6孔板内每孔接种 3×10^5 细胞,预培养24 h后,实验组加入终浓度为25, 27.5, 30, 35 μmol/L的虎刺醛和8 μmol/L的细胞松弛素B,对照组加入相同体积的培养基。处理24 h后弃掉原培养液,用PBS(pH7.4)洗3次,每次5 min,用4%甲醛室温下固定15 min;弃固定液, PBS(pH7.4)洗3次,每次5 min;加入封闭缓冲液(0.2% Triton X-100, 0.1% BSA的PBS液)封闭30 min;避光加入FITC标记的鬼笔环肽,置于湿盒内37 °C孵育1 h;后用PBS(pH7.4)洗3次,封片,荧光显微镜下(488 nm波长激发光)观察并拍照。

1.7 间接免疫荧光法检测虎刺醛对HepG2细胞角蛋白纤维的影响

将对数生长期的HepG2细胞,每孔 3×10^5 细胞接种在放置有盖玻片的6孔板内培养24 h后,实验组加入终浓度为25 μmol/L和30 μmol/L的虎刺醛,对照组加入相同体积的培养液。处理24 h后弃掉原培养液,

PBS(pH8.0)洗3次,每次5 min,用预冷的甲醇在-20 °C固定10 min后吸掉固定液, PBS(pH8.0)洗3次,每次5 min;之后室温下封闭60 min(封闭缓冲液: 5%山羊血清, 0.3% Triton X-100的PBS液);吸出封闭液加一抗置于4 °C冰箱孵育过夜; PBS(pH8.0)洗3次后避光加二抗孵育2 h;最后PBS(pH8.0)洗3次,封片,在荧光显微镜下(488 nm波长激发光)观察并拍照。

1.8 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)荧光双染法检测虎刺醛诱导HepG2细胞凋亡

AO/EB双染法是一种鉴别细胞坏死和凋亡的简便方法。吖啶橙(AO)能透过细胞膜完整的细胞,嵌入DNA显绿色荧光;溴化乙锭(EB)仅能透过细胞膜受损的细胞,与DNA结合显红色荧光。根据细胞呈现的不同颜色的荧光及细胞核的形态可区分未凋亡细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞及坏死细胞。

取对数生长期的HepG2细胞,以每孔 3×10^5 接种于6孔板,培养24 h后分别加入终浓度为15, 30, 45, 60 μmol/L的虎刺醛,对照组加入等体积培养基。继续培养至规定时间后,按下列3类不同的收集方式收集细胞:(1)用PBS轻轻吹打已回缩变圆的弱贴壁细胞,离心收集;(2)铺展良好的贴壁细胞,经胰酶消化后离心收集;(3)收集所有细胞,包括:铺展良好的贴壁细胞、形态回缩变圆的弱贴壁细胞及已脱壁细胞。离心机转速为500 r/min, PBS(pH7.4)洗3次,每次5 min,取95 μL细胞悬液(1×10^6 /mL)与5 μL AO/EB染液(1:1, 100 μg/mL)混匀,立即涂片,荧光显微镜下(488 nm波长激发光)观察并且统计至少300个细胞。实验独立重复3次。

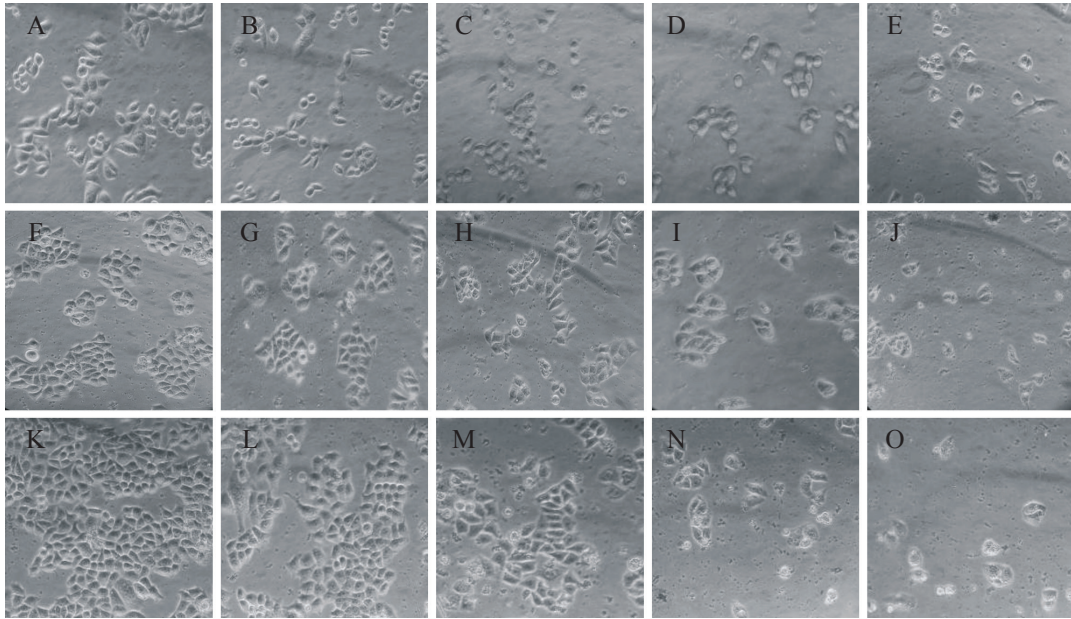
1.9 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示,显著性差异分析用SPSS 11.5软件进行。* $P < 0.05$ 为差异具有显著性,** $P < 0.01$ 为极显著。

2 结果

2.1 虎刺醛对HepG2细胞生长的抑制作用

15, 30, 45, 60 μmol/L的虎刺醛分别处理HepG2细胞24~72 h后于倒置显微镜下观察细胞数量和形态变化(图1)。由图1可以观察到,随着虎刺醛浓度的升高和处理时间的延长,细胞数量明显减少,细胞形态也发生显著变化。对照组细胞为多边形,随着培养时间的延长细胞数量增多;15 μmol/L和30 μmol/L虎刺醛处理细胞24 h、48 h和72 h后,细胞仍然处于



A-E: 空白对照组及15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞24 h; F-J: 空白对照组及15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞48 h; K-O: 空白对照组及15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞72 h。

A-E: HepG2 cells were exposed to control and damnacanthal (15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h; F-J: HepG2 cells were exposed to control and damnacanthal (15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h; K-O: HepG2 cells were exposed to control and damnacanthal (15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h.

图1 倒置显微镜观察虎刺醛对HepG2细胞形态的影响

Fig.1 Effects of damnacanthal on HepG2 cells morphology were observed under inverted microscope

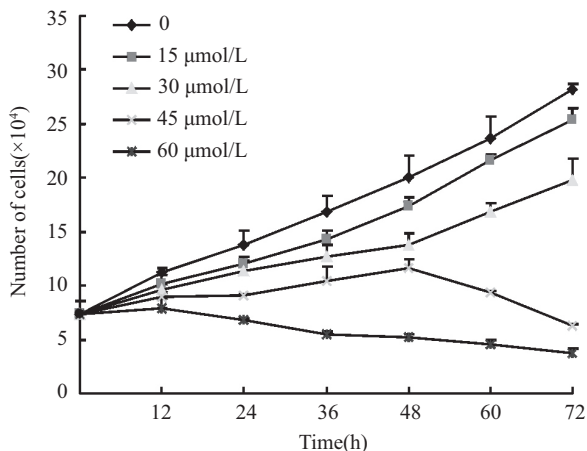


图2 虎刺醛对HepG2细胞生长的抑制作用

Fig.2 Effects of damnacanthal on HepG2 cell growth

增殖状态, 细胞形态基本无变化; 45 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛使细胞的贴壁性明显降低, 60 $\mu\text{mol/L}$ 处理48 h和72 h后大部分细胞变圆, 几乎失去贴壁性。

进一步采用台盼蓝排染法检测了虎刺醛对HepG2细胞72 h内的生长抑制作用(图2)。45~60 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛对HepG2细胞有较强烈的细胞毒活性, 细胞增殖在处理12 h后几乎受到完全抑制, 60 $\mu\text{mol/L}$ 处理组有部分细胞死亡, 致死率分别在6.78%~49.72%。虎刺醛对细胞生长的抑制作用与药物处理时间及浓度

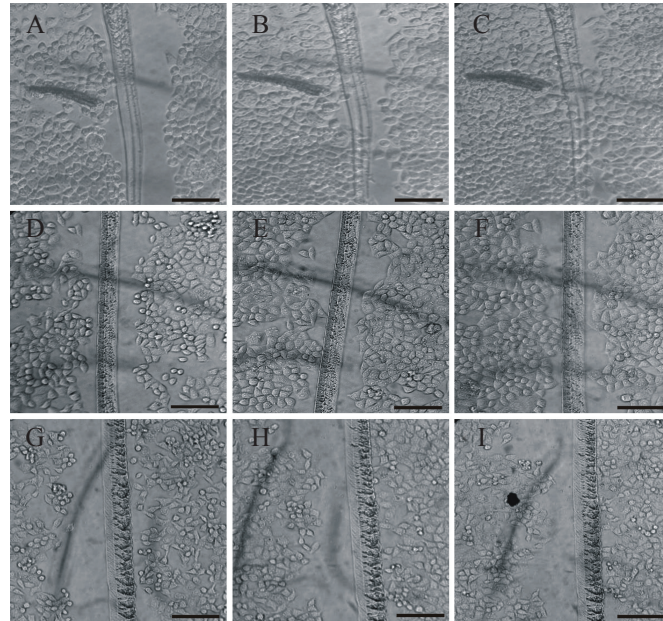
呈正相关。

2.2 虎刺醛对HepG2细胞迁移的抑制作用

HepG2细胞贴壁生长24 h后, 用移液管尖部在其培养板底部中间划一窄线, 加入药物继续培养12 h和24 h后观察细胞的迁移情况。如图3所示, 对照组细胞在培养12 h后逐渐向划痕迁移, 24 h后大部分细胞已迁移至划痕处, 并越过划痕形成两界融合。15 $\mu\text{mol/L}$ 和30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛处理HepG2细胞12 h和24 h后均显示了较强的迁移抑制作用。

2.3 虎刺醛对HepG2细胞微丝的影响

为了进一步了解虎刺醛抑制HepG2细胞生长和迁移的机制, 我们采用荧光分子标记实验观察与细胞贴附性和运动性密切相关的微丝结构(主要是应力纤维)的变化情况, 同时利用抑制微丝组装的特异性药物细胞松弛素B作为阳性对照。鬼笔环肽可特异性与微丝结合, 其分子上的标记物FITC经488 nm波长光激发后发出绿色荧光, 在荧光显微镜下可清晰分辨间期细胞中的束状微丝, 如应力纤维等。虎刺醛处理HepG2细胞24 h后, 经FITC标记的鬼笔环肽染色后其细胞内微丝的变化(图4)。从图4可以看出, 在对照组细胞中应力纤维(红色箭头所示)清晰可见, 沿细胞纵轴平行排列, 片状伪足及丝状伪足丰

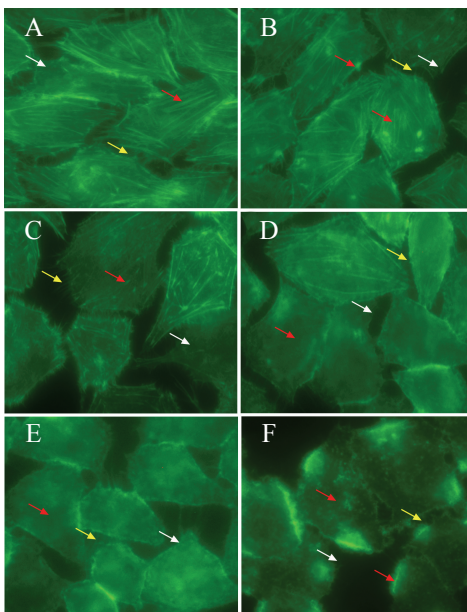


A-C: 空白对照组0, 12, 24 h细胞迁移; D-F: 15 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞0, 12, 24 h细胞迁移; G-I: 30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛作用HepG2细胞0, 12, 24 h细胞迁移。标尺=3 μm 。

A-C: migration of HepG2 cells in control group for 0, 12, 24 h; D-F: effects of 15 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol on migration of HepG2 cells for 0, 12, 24 h; G-I: effects of 30 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol on migration of HepG2 cells for 0, 12, 24 h. Bar=3 μm .

图3 虎刺醛对HepG2细胞细胞迁移的影响。

Fig.3 Effects of damnacanthol on migration of HepG2 cells



A: 空白对照; B: 25 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛; C: 27.5 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛; E: 35 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛; F: 8 $\mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B。

A: control; B: 25 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol; C: 27.5 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol; E: 35 $\mu\text{mol/L}$ damnacanthol; F: 8 $\mu\text{mol/L}$ cytochalasin B.

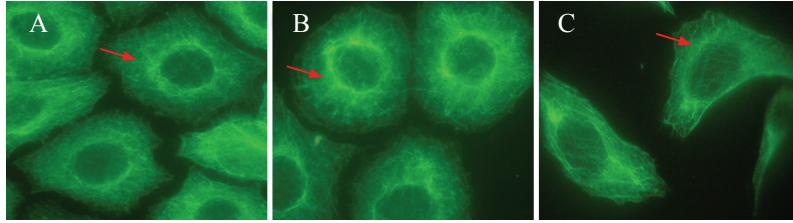
图4 虎刺醛和细胞松弛素B作用HepG2细胞24 h后细胞内微丝的变化(1 000 \times)

Fig.4 Effects of damnacanthol and cytochalasin B on microfilaments of HepG2 cells for 24 h(1 000 \times)

富, 并相互接触形成细胞间连接(图4中白色和黄色箭头所示); 25 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞, 片状伪足、丝状伪足仍然可见, 与对照组相比无明显变化, 但质膜下方和细胞内部局部出现“亮斑”, 与对照相比应力纤维束减少且分布不均; 27.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理后细胞间隙增大, 丝状伪足形成的细胞间连接显著减少, 同时, 细胞内应力纤维也进一步减少, 已极少见贯穿细胞两极的应力纤维束, 仅有不连续的点状应力纤维分布; 30, 35 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞应力纤维基本消失, 片状伪足和丝状伪足也明显减少。同样处理条件下, 8 $\mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B处理后, 细胞内应力纤维束、丝状伪足、片状伪足几乎完全消失, 质膜下方也出现局部“亮斑”。

2.4 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白纤维的影响

采用间接免疫荧光的方法, 观察了25, 30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白纤维的作用(图5)。对照组细胞角蛋白纤维在胞质中呈致密的网状, 均匀分布; 25 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛处理后(图5B), 胞质中的角蛋白纤维与对照组相比其致密度有所下降, 开始分布不均, 并且围绕核周出现了荧光较亮的“环状”区域(红色箭头所示); 30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛处理后(图5C), 胞质中角蛋白纤维网状结构密度继续降低, 但整个网状



A: 空白对照; B-C: 25, 30 μmol/L 虎刺醛作用HepG2细胞24 h后角蛋白的变化。
A: control; B-C: effects of 25, 30 μmol/L damnacanthal on keratin of HepG2 cells for 24 h.

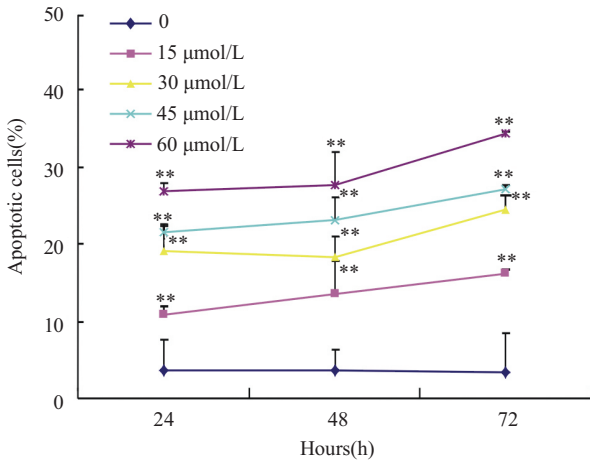
图5 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白的作用(1 000×)

Fig.5 Effects of damnacanthal on keratin of HepG2 cells(1 000×)

构架没有显著变化, 核周末出现荧光较亮的“环状”区域, 另一个较为明显的变化是细胞铺展形态收缩。

2.5 虎刺醛诱导HepG2细胞凋亡的作用

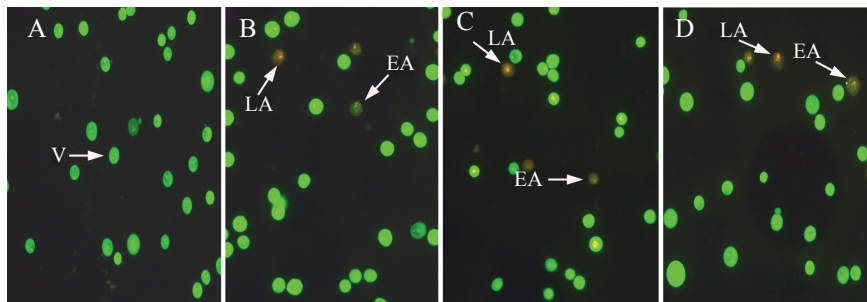
细胞经AO/EB双染后在荧光显微镜下, 可观察



实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示, ** $P < 0.01$ 。
Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent, ** $P < 0.01$.

图6 AO/EB荧光双染法检测虎刺醛诱导HepG2细胞凋亡
Fig.6 The apoptosis of HepG2 cells after damnacanthal treated was evaluated by the AO/EB double staining

到4种形态的细胞: 未凋亡细胞, 核染色质呈均匀绿色荧光; 早期凋亡细胞, 核染色质着绿色荧光, 但其形态呈固缩状或圆珠状; 晚期凋亡细胞, 核染色质着橘红色荧光, 形态呈固缩状或圆珠状; 坏死细胞, 核染色质呈红色荧光, 形态正常。依据上述形态标准对各组细胞凋亡率进行统计。15, 30, 45, 60 μmol/L 虎刺醛处理HepG2细胞24, 48, 72 h后, 收集细胞(包括铺展贴壁细胞、形态回缩的弱贴壁细胞或已脱壁细胞)进行AO/EB双染检测, 其结果显示, 与对照组(3.80%、3.80%、3.76%)相比, 处理组细胞的凋亡率达到极显著水平($P < 0.01$, 图6), 并且具有浓度和时间依赖性。同时, 我们还观察到, 随着药物浓度增大和处理时间的延长, 形态回缩的细胞比例升高, 细胞贴壁性逐渐减弱。收集这些回缩变圆细胞并进行AO/EB双染检测, 发现其具有较高的凋亡率。但铺展良好的细胞经胰酶消化后进行双染检测, 发现极少有凋亡产生(图7)。上述结果一方面表明HepG2细胞凋亡可能与其失去贴壁性相关, 另一方面也说明虎刺醛处理HepG2细胞后引起铺展细胞内微丝的解聚并非是由细胞凋亡引起的, 即虎刺醛对微丝的解聚极



A: 空白对照; B: 25 μmol/L 虎刺醛; C: 30 μmol/L 虎刺醛; D: 35 μmol/L 虎刺醛。图中箭头所示分别为活细胞(V)、早期凋亡细胞(EA)、晚期凋亡细胞(LA)。
A: control; B: 25 μmol/L damnacanthal; C: 30 μmol/L damnacanthal; D: 35 μmol/L damnacanthal. Viable cells (V), early apoptotic cells (EA) and late apoptotic cells (LA) indicated by arrows in pictures respectively.

图7 AO/EB荧光双染法检测虎刺醛作用HepG2细胞24 h后铺展细胞的凋亡情况

Fig.7 The apoptosis of spread HepG2 cells after damnacanthal treated 24 h was evaluated by the AO/EB double staining

可能具有特异性。

3 讨论

药物对肿瘤细胞的细胞毒活性通常与其抑制肿瘤细胞的生长有关^[27]。我们课题组从匙萼木中分离得到多种蒽醌化合物, 研究表明, 它们对HepG2、SGC-7901、Glc-82和HL-60人肿瘤细胞株具有较强的体外细胞毒活性, 在3种贴壁细胞中, 虎刺醛对HepG2的细胞毒活性最强^[21], 具有进一步研究的价值。在本实验中, 我们首先使用台盼蓝排染法, 检测了不同浓度的虎刺醛对HepG2细胞的生长抑制作用, 结果表明, 较低浓度的虎刺醛(15 $\mu\text{mol/L}$ 和30 $\mu\text{mol/L}$)对HepG2细胞已有较强的生长抑制作用; 细胞迁移实验进一步证实, 该浓度条件下的虎刺醛对细胞的迁移性也同样显示了显著的抑制作用; 尽管30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛没能完全抑制细胞增殖, 但30 $\mu\text{mol/L}$ 几乎完全抑制了细胞的迁移。随着药物浓度升高和培养时间延长HepG2细胞的贴壁性逐渐减弱, 细胞慢慢回缩变圆(图2), 该现象与Desjardins等^[28]描述的贴壁细胞发生凋亡时的形态变化相一致。我们采用AO/EB双染法检测了铺展性良好的HepG2细胞和回缩变圆HepG2细胞的凋亡情况, 进一步证明了贴壁性减弱的细胞逐渐进入凋亡, 另外, 检测中还发现死亡的细胞中极少发现有坏死细胞(数据未显示), 绝大多数为凋亡细胞。

迁移和侵袭是恶性肿瘤发展的关键, 也是临床治疗的难题, 控制肿瘤的迁移和侵袭是抗肿瘤药物研究的一个重要方向^[29]。培养的动物细胞的爬行(或迁移)由3个核心步骤组成: 首先, 由肌动蛋白聚合(微丝组装)引起的细胞前缘扩展; 其次, 由应力纤维介导的黏着斑形成; 最后, 由微丝解组装引起胞质溶胶前行和细胞尾部收缩^[30]。在上述运动过程中会有大量的由肌动蛋白丝组成的重要运动结构——伪足形成^[15]。应力纤维与细胞的贴壁、铺展及收缩密切相关^[31-32]。Kato等^[33]分离出应力纤维后细胞形态特征并未发生变化, 进一步说明了应力纤维在细胞收缩中的重要作用。为了进一步了解虎刺醛抑制HepG2细胞迁移的机制, 本实验中我们利用特异性荧光染色技术检测了虎刺醛对HepG2细胞微丝骨架的影响, 并同时设计另一组实验检测用于微丝检测的细胞是否具有凋亡现象。检测结果表明, 25, 27.5, 30, 35 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛对HepG2细胞的应力纤维、片

状伪足、丝状伪足均有显著影响, 其中, 30 $\mu\text{mol/L}$ 和35 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞的应力纤维消失、片状伪足和丝状伪足明显减少(图4), 这与阳性对照组(8 $\mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B)处理HepG2细胞后的现象极为相似, 即应力纤维、丝状伪足和片状伪足几乎完全消失; 此外, 细胞松弛素B处理细胞的质膜下方出现了局部“亮斑”, 这种现象在25 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛处理细胞中也观察到, 因此我们推测虎刺醛对HepG2细胞微丝的影响与细胞松弛素的作用相似; 同时, 凋亡检测实验表明用于微丝实验的铺展性良好的HepG2细胞极少有凋亡发生。由此证明, 上述实验中虎刺醛对微丝的破坏作用不是由凋亡而产生, 而是通过破坏HepG2细胞微丝结构使细胞贴壁性减弱, 影响了伪足和黏着斑的形成, 从而抑制细胞生长和迁移。间接免疫荧光法检测25, 30 $\mu\text{mol/L}$ 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白的作用发现, 虎刺醛对HepG2细胞角蛋白纤维有轻微影响, 尤其是对纤细的纤维有一定的破坏作用, 但这与对微丝的影响相比要小得多。当然, 由于细胞骨架的各种组分之间相互连接形成了复杂的网络体系^[34], 在我们的实验中, 是否是由于微丝骨架的损坏而导致了纤细型角蛋白纤维网络破损还有待进一步的研究。

综上, 本实验的研究结果显示, 虎刺醛对人肝癌细胞HepG2有较强的生长抑制和迁移抑制作用, 并首次发现该化合物对微丝骨架, 尤其对应力纤维具有显著的破坏作用, 其是否与细胞松弛素B一样具有特异性以及其具体作用机制还需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Windoffer R, Woll S, Strnad P, Leube RE. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 2004; 15(5): 2436-48.
- 2 Parry DA, Steinert PM. Intermediate filaments: Molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* 1999; 32(2): 99-187.
- 3 夏伟, 周建伟. 细胞骨架与细胞凋亡及细胞内信息通路的关系. *细胞生物学杂志*(Xia Wei, Zhou Jianwei. Relationship between the cytoskeleton and cell apoptosis and intracellular pathway. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2001; 23(4): 205-9.
- 4 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学*. 北京: 高等教育出版社(Zhai Zhonghe, Wang Xizhong, Ding Mingxiao. *Cell Biology*. Beijing: Higher Education Press) 2000, 318-43.
- 5 Heng YW, Koh CG. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(10): 1622-33.
- 6 徐国恒. 细胞骨架—肌动蛋白纤维. *生物学通报*(Xu Guoheng. Cytoskeleton-actin filaments. *Bulletin of Biology*) 2005; 40(2): 43.

- 7 徐国恒. 细胞骨架—微管. 生物学通报(Xu Guoheng. Cytoskeleton-microtubule. Bulletin of Biology) 2005; 40(5): 21-2.
- 8 Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 345-82.
- 9 Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011; 194(5): 669-78.
- 10 Fried P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1/2): 129-35.
- 11 Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(5): 642-52.
- 12 Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84(3): 359-69.
- 13 Galán JA, Sánchez EE, Rodríguez-Acosta A, Soto JG, Bashir S, McLane MA, *et al.* Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of *Crotalus atrox*. *Toxicon* 2008; 51(7): 1186-96.
- 14 Lee SK, Chun HK, Yang JY, Han DC, Son KH, Kwon BM. Inhibitory effect of obovatal on the migration and invasion of HT 1080 cells via the inhibition of MMP-2. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(12): 4085-90.
- 15 苗龙. 细胞运动、细胞迁移与细胞骨架研究进展. 生物物理学报(Miao Long. Recent progresses on the cellular motility, cell migration and cytoskeleton. *Acta Biophysica Sinica*) 2007; 23(4): 281-9.
- 16 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 17 金雪梅, 金光洙. 天然蒽醌抗肿瘤作用机制研究进展. 延边大学医学学报(Jin Xuemei, Jin Guangzhu. Recent progresses on natural anthraquinone anti-tumor mechanism. *Journal of Medical Science Yanbian University*) 2006; 29(3): 221-3.
- 18 俞秀媛, 陈重明, 张洒庆. 中国茜草科抗癌植物资源. 中药材(Yu Xiuyuan, Chen Zhongming, Zhang Saqing. Resources of anti-tumor *Rubiaceae* plant in China. *Journal of Chinese Medicinal*) 1988; 11(5): 18-21.
- 19 潘启超, 利国威, 刘宗潮, 赵振彬, 谢冰芬. 短刺虎刺(岩石羊)抗癌研究初步报告. 中山医学院学报(Pan Qichao, Li Guowei, Liu Zongchao, Zhao Zhenbin, Xie Bingfen. Preliminary report the anti-tumor research of *Damnacanthus giganteus* (Mak.) Nakai. *Acta Academia Medicine Zhongshan*) 1980; 1(1): 59-63.
- 20 屠殿君, 庞祖焕, 闭宁基. 黄根(*Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum)化学成分的研究. 药学学报(Tu Dianjun, Pang Zuhuan, Bi Ningji. Studies on constituents of *Prismatomeris tetrandra* (Roxb) K Schum. *Acta Pharmaceutica Sinica*) 1981; 16(8): 631-4.
- 21 周启银, 汪涛, 丁兰, 张琼, 侯茜, 王丽. 匙萼木中六种蒽醌化合物构效关系的研究. 西北师范大学学报(自然科学版)(Zhou Qiyin, Wang Tao, Ding Lan, Zhang Qiong, Hou Qian, Wang Li. Structure-activity relationships of six anthraquinones from *Xanthophytum atropvensis* Pierre. *Journal of Northwest Normal University, Natural Science*) 2008; 44(5): 74-7.
- 22 Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S, Phatchana R. Biological activity of anthraquinones and triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(3): 284-8.
- 23 丁兰, 董刚, 周启银, 郭艳, 刘国安. 虎刺醛对人早幼粒白血病细胞HL-60的生长抑制, 周期阻滞, 凋亡诱导及DNA损伤作用. 西北师范大学学报(自然科学版)(Ding Lan, Dong Gang, Zhou Qiyin, Guo Yan, Liu Guoan. The effect of damnacanthol on anti-proliferation, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cell. *Journal of Northwest Normal University, Natural Science*) 2012; 48(1): 84-90.
- 24 Lin FL, Hsu JL, Chou CH, Wu WJ, Chang CI, Liu HJ. Activation of p38 MAPK by damnacanthol mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- α and p53 pathways. *Eur J Pharmacol* 2011; 650(1): 120-9.
- 25 Nualsanit T, Rojanapanthu P, Gritsanapan W, Lee SH, Lawson D, Baek SJ. Damnacanthol, a noni component, exhibits antitumor activity in human colorectal cancer cells. *J Nutr Biochem* 2012; 23(8): 915-23.
- 26 Letašiová S, Jantová S, Čipák L, Múčková M. Berberine-antiproliferative activity *in vitro* and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer Lett* 2006; 239(2): 254-62.
- 27 Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Inhibition of G₁/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(11): 1715-26.
- 28 Desjardins LM, MacManus JP. An adherent cell model to study different stages of apoptosis. *Exp Cell Res* 1995; 216(2): 380-7.
- 29 曹惠慧, 张冬梅, 刘俊珊, 侯春英, 栗原博, 叶文才. 沙蟾毒精抑制肝癌HepG2细胞黏附、迁移和侵袭的作用. 中国药理学通报(Cao Huihui, Zhang Dongmei, Liu Junshan, Hou Chunying, Li Yuanbo, Ye Wencai. Inhibitory effect of Arenobufagin on the adhesion, invasion and migration of human hepatoma carcinoma cells. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2011; 27(1): 19-23.
- 30 王金发. 细胞生物学. 北京: 科学出版社(Wang Jinfa. *Cell Biology*. Beijing: Science Press) 2006, 452-3.
- 31 Kreis TE, Birchmeier W. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 1980; 22(2 Pt 2): 555-61.
- 32 Pelton PD, Sherman LS, Rizvi TA, Marchionni MA, Wood P, Friedman RA, *et al.* Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* 1998; 17(17): 2195-209.
- 33 Katoh K, Kano Y, Masuda M, Onishi H, Fujiwara K. Isolation and contraction of the stress fiber. *Mol Biol Cell* 1998; 9(7): 1919-38.
- 34 Green KJ, Talian JC, Goldman RD. Relationship between intermediate filaments and microfilaments in cultured fibroblasts: Evidence for common foci during cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 1986; 6(4): 406-18.