

鬼臼毒素衍生物 OAMDP 诱导 HeLa 细胞凋亡

任杰*, 辛文群, 陈新, 胡昆**

(常州大学制药与生命科学学院, 常州 213164)

摘要 鬼臼毒素衍生物 OAMDP 对人宫颈癌 HeLa 细胞显示了细胞增殖抑制活性, 并呈现一定的时间和剂量的依赖性, 对其作用机制进行初步研究。Hoechst 33258 染色荧光显微镜观察发现 OAMDP 能诱导 HeLa 细胞核形态学改变, 部分细胞呈现典型的凋亡形态学特征; Annexin V-FITC/PI 荧光双染流式细胞术检测亦证实 OAMDP 可以诱导 HeLa 细胞发生凋亡; Rhodamine123 染色线粒体膜电位检测发现 OAMDP 会引起 HeLa 细胞线粒体膜电位的下降。Western Blot 分析显示 OAMDP 上调 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 Bax, 下调 Bcl-2 的表达。此外 OAMDP 能使 HeLa 细胞阻滞于 S 期。总之, OAMDP 能够诱导 HeLa 细胞凋亡和 S 期阻滞, 可能成为一种新型的抗肿瘤药物。

关键词 鬼臼毒素; 衍生物; OAMDP; HeLa 细胞; 细胞周期; 凋亡; Bcl-2

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)03-0267-05

Apoptosis induced by podophyllotoxin derivative OAMDP in HeLa cells

REN Jie*, XIN Wenqun, CHEN Xin, HU Kun**

School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China

Abstract A novel podophyllotoxin derivative, 4 β -(1, 3, 4-oxadiazole-2-amino-5-methyl)-4-deoxypodophyllotoxin (OAMDP), showed the antiproliferative effect, for which OAMDP could suppress the proliferation of HeLa cells in a dose-and time-dependent manner. Furthermore, its molecular mechanism in HeLa cells was investigated. In HeLa cells treated by OAMDP, topical morphological changes of apoptotic body formation were observed by Hoechst 33258 staining. Cell apoptosis was also confirmed by Annexin V-FITC/PI double staining assay. Rhodamine 123 label testing revealed that the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of cells was decreased. OAMDP increased apoptotic cell population by induction of bax and reduction of Bcl-2 expression. Moreover, cell cycle analysis showed that OAMDP induced S phase arrest in HeLa cells. Our results indicated that OAMDP, with the ability to cause cell cycle S arrest and apoptosis, has the potential to become a novel antitumor agent.

Key words podophyllotoxin; derivative; OAMDP; HeLa cell; cell cycle; apoptosis; Bcl-2

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21202012) and “Qing-Lan” Project of Jiangsu Province (2012)

恶性肿瘤是危害人类健康最严重的疾病之一^[1]。通过对天然产物进行结构改造是寻找新型抗肿瘤药物的一个重要途径^[2]。研究发现, 鬼臼毒素具有显著的抗肿瘤^[3-4]和抗病毒活性^[5], 但是其水溶性差, 且不良反应较大^[6], 因此寻找低毒、水溶性更好的鬼臼毒素衍生物已成为现在抗肿瘤药物研究的热点。其中将鬼臼毒素结构改造而成的依托泊

苷(etoposide, VP-16)^[7]和替尼泊苷(teniposide, VM-26)的临床效果已被证实, 已作为治疗睾丸癌、淋巴瘤、白血病和小细胞肺癌的重要药物。但是, 鬼臼毒素类衍生物对于抗宫颈癌作用方面的报道较少。因此, 对于本课题组合成了一系列鬼臼毒素衍生物, 研究发现, OAMDP(图1)对 HeLa 细胞具有较好的细胞增殖抑制作用, 本文主要对 OAMDP 的细

* 收稿日期 2013-01-02 通信作者 ** Tel: 0519-86334598 E-mail: hukun@cczu.edu.cn

** Tel: 0519-86334598 E-mail: renjie2006@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21202012); 江苏省“青蓝工程”资助项目(2012)

胞增殖抑制作用机制进行深入的研究。

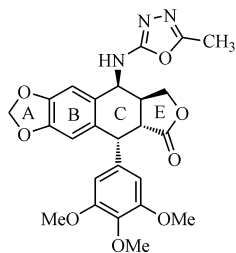


Figure 1 Chemical structure of OAMDP

1 材料

1.1 细胞系

人子宫颈癌 HeLa 细胞株、小鼠成纤维细胞 L929 由上海交通大学提供。

1.2 试剂

RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司); Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 Rhodamine 123 (碧云天生物技术研究); 一抗 Bcl-2、Bax (美国 Santa Cruz 公司); DMSO (美国 Amersco 公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒(北京瑞邦兴业科技有限公司); Hoechst 33258 及 MTT (美国 Sigma 公司)。

1.3 仪器

酶标仪(美国 Thermo 公司); 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 倒置相差荧光显微镜(日本 Nikon 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞活力测定

取对数生长期的 HeLa 细胞和 L929 细胞, 离心后用 RPMI-1640 培养液稀释成每毫升 3×10^4 个细胞, 接种于 96 孔板中。37 °C 培养过夜, 加入不同浓度(0.1, 0.5, 1, 5, 25 $\mu\text{mol/L}$) 样品, 继续培养 72 h, 加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 10 μL , 孵化 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 100 μL , 酶标仪测定吸收度, 即以 570 nm 为检测波长, 630 nm 参考波长, 并用 Bliss 法计算 IC_{50} 。

2.2 流式细胞术检测细胞周期变化

取对数生长期的 HeLa 细胞, 以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 37 °C 培养过夜后加入不同浓度(0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) OAMDP, 药物处理 48 h, 1 500 r/min 离心 3 min, 收集细胞, DAPI 染色

避光 15 min, 用流式细胞仪检测。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 HeLa 细胞, 以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 37 °C 培养过夜后加入不同浓度(0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) OAMDP, 药物处理 48 h, 1 500 r/min 离心 3 min, 收集细胞, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒避光 15 min, 用流式细胞仪检测。

2.4 Hoechst 33258 荧光染色法

取对数生长期 HeLa 细胞, 以每毫升 3×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板内, 每孔内预先放置一块圆形无菌盖玻片, 用不同浓度(0.5, 0.75, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) OAMDP 作用于 HeLa 细胞 48 h 后, 弃上清液, 用 PBS 清洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛 500 μL 固定 15 min, 弃去固定液 PBS 清洗 3 次, 加入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33258 500 μL , 避光 15 min, 取出载有单层培养细胞的盖玻片, 荧光倒置显微镜观察。

2.5 流式细胞术检测线粒体膜电位变化

取对数生长期的 HeLa 细胞, 以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 37 °C 培养过夜后加入不同浓度(0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$) OAMDP 处理 48 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 Rhodamine 123 染色, 37 °C 避光 20 min, 流式细胞仪检测。

2.6 Western blot 检测

不同浓度(0.5, 1 $\mu\text{mol/L}$) OAMDP 作用于 HeLa 细胞后 48 h, 加入适量 Western 及 IP 细胞裂解液提取蛋白, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定样品中总蛋白的含量。上样进行凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 1:500 稀释的一抗 4 °C 孵育过夜, 次日用 TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, 洗膜后 ECL 化学发光, X 片曝光显影。

2.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t -检验, $P < 0.05$ 视为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 视为差异有非常显著意义。

3 结果

3.1 OAMDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用

MTT 结果(表 1) 显示, OAMDP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用要大于鬼臼毒素、VP-16 和 5-Fu,

且对正常 L929 细胞的毒性要远远小于鬼臼毒素、VP-16 和 5-Fu。如图 2 所示,以不同浓度 OAMDP 处理 HeLa 细胞 24,48,72 h 后,细胞增殖抑制呈明显的时间、剂量依赖性,其中 72 h 的 IC_{50} 达到了 $2.68 \mu\text{mol/L}$ 。

Table 1 Cytotoxic effects of OAMDP, podophyllotoxin, VP-16 and 5-Fu on HeLa and L929 cells

Cell	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$			
	OAMDP	Podophyllotoxin	VP-16	5-Fu
HeLa	2.68	7.58	96.26	15.99
L929	19.62	1.37	1.00	1.38

3.2 OAMDP 对 HeLa 细胞周期的影响

不同浓度 OAMDP 作用于 HeLa 细胞 48 h 后,对细胞周期分布的影响如图 3 所示。Sub G_1 和 S 期细胞比例逐渐增加,而 G_0/G_1 期细胞比例逐渐减少,表明发生了细胞凋亡或者细胞坏死且在 S 期发生阻滞,并呈现一定的剂量依赖性。

3.3 OAMDP 对 HeLa 细胞凋亡的影响

HeLa 细胞经 0.5,1,2 $\mu\text{mol/L}$ OAMDP 处理 48 h 后,随着给药浓度的增加,凋亡细胞逐渐增加,呈现浓度依赖性(图 4),表明 OAMDP 可以诱导 HeLa 细胞发生凋亡。

3.4 OAMDP 对 HeLa 细胞细胞核染色质的形态学影响

经 0.5,0.75,1,2 $\mu\text{mol/L}$ OAMDP 处理 HeLa

细胞 48 h 后,如图 5 所示,在荧光倒置显微镜下观察发现对照组细胞的细胞核染色均匀,细胞核边缘轮廓清晰,但是给药组的细胞核边缘不再是光滑清晰的,染色质逐渐皱缩,边缘化,随着给药浓度增加,细胞核皱缩越严重,染色质不均一或边集,呈致密荧光,表明了 OAMDP 诱导了细胞凋亡并发生细胞核染色质形态学的变化。

3.5 OAMDP 对 HeLa 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响

早期凋亡伴随着线粒体膜电位的变化,研究发现经 0.5,1,2 $\mu\text{mol/L}$ OAMDP 处理 HeLa 细胞 48 h 后,用流式细胞仪检测,如图 6 所示,随着给药浓度的增加,线粒体膜电位下降并呈现一定的剂量依赖性。

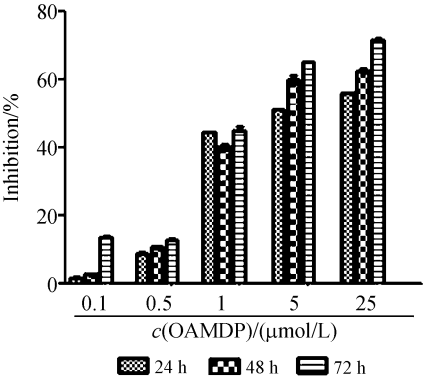


Figure 2 OAMDP induced cytotoxicity in HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

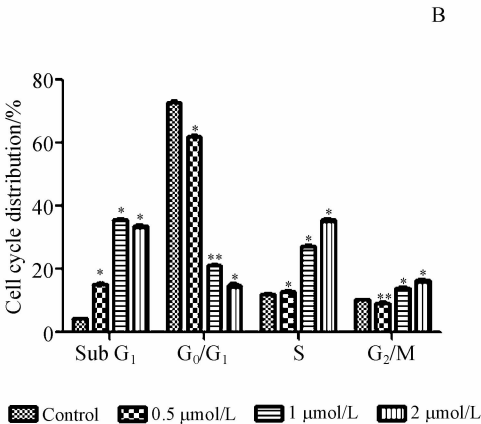
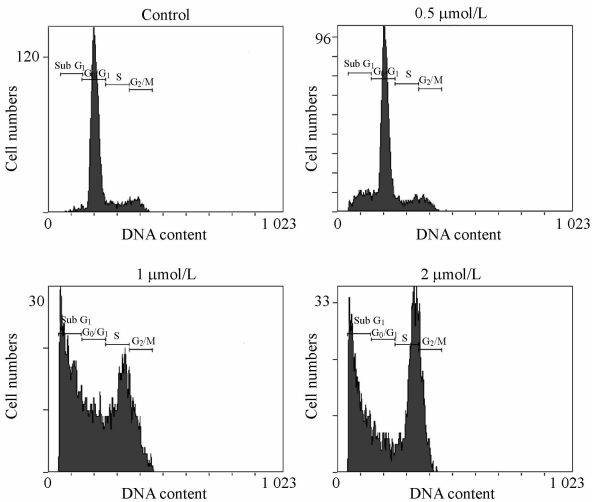


Figure 3 Effect of OAMDP on cell cycle of HeLa cells treated for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$). DNA content of 10 000 events was analyzed by flow cytometry. The profiles showed the cell cycle (A) and the proportions (%) in each phase (B) of HeLa cells treated with OAMDP

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

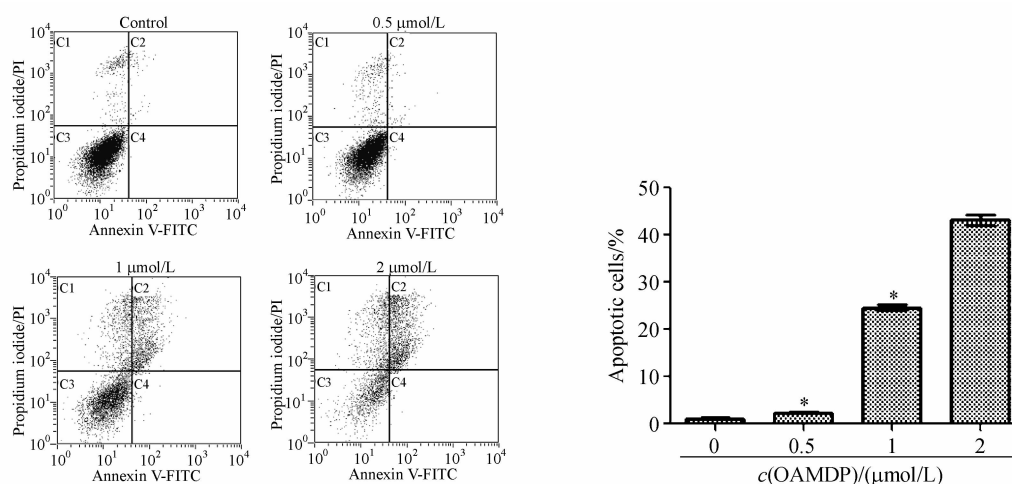


Figure 4 Effects of OAMDP on cell apoptosis of HeLa cells measured by Annexin-V/PI double-staining assay after treatment with compound OAMDP (0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$ vs control group

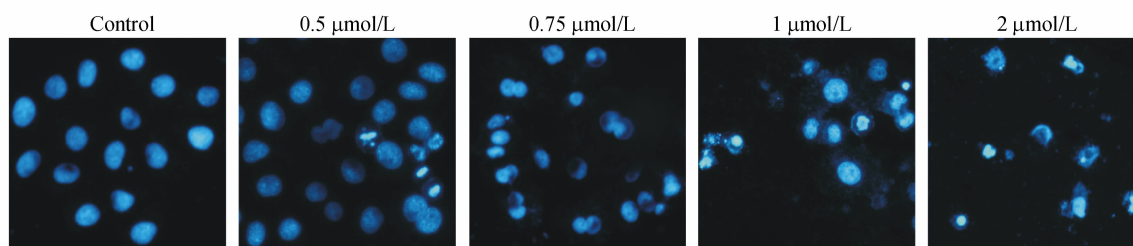


Figure 5 Effect of compound OAMDP on morphological changes of HeLa cells. HeLa cells were incubated with various concentrations of OAMDP (0.5, 0.75, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h and stained by Hoechst 33258 for morphology observation

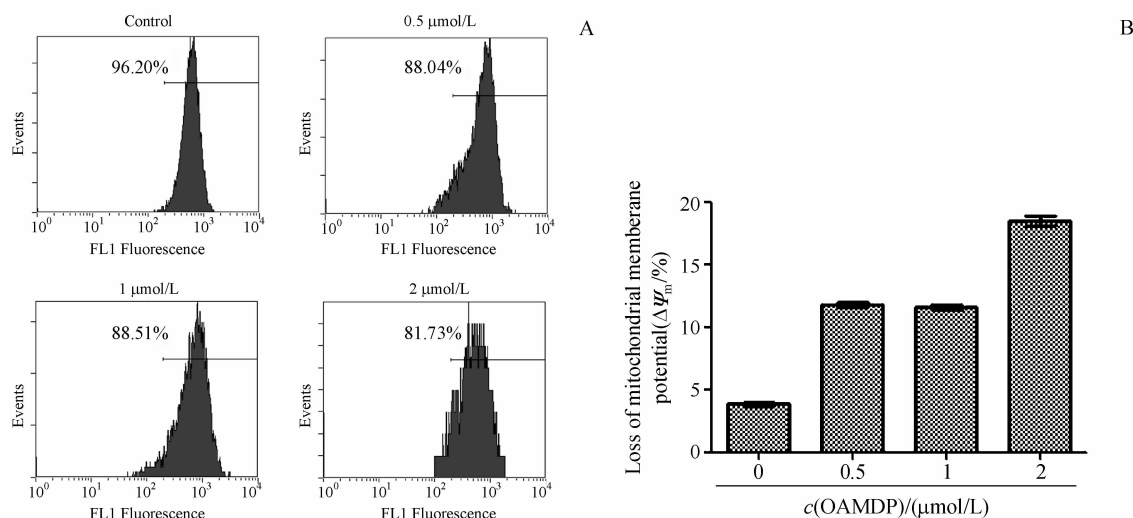


Figure 6 Effect of OAMDP on mitochondrial membrane potential of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Cells treated with OAMDP (0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h were incubated with Rhodamine 123 and measured by flow cytometry; B: Percentage loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in the control and OAMDP treated cells

3.6 凋亡相关蛋白的表达

采用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 的表达。研究发现 Bcl-2 可抑制多种细胞

凋亡,在多种恶性肿瘤中均有表达,甚至高度表达^[8-9],如图 7-A, C 所示,给药组与对照组相比 Bcl-2 蛋白表达逐渐减少。而 Bax 作为 Bcl-2 家族

的一种前凋亡蛋白,能促进细胞凋亡^[9]。如图 7-A,C 所示,Bax 蛋白表达逐渐增加,呈现剂量依赖性,且 Bax/Bcl-2 比例增加(图 7-B)。

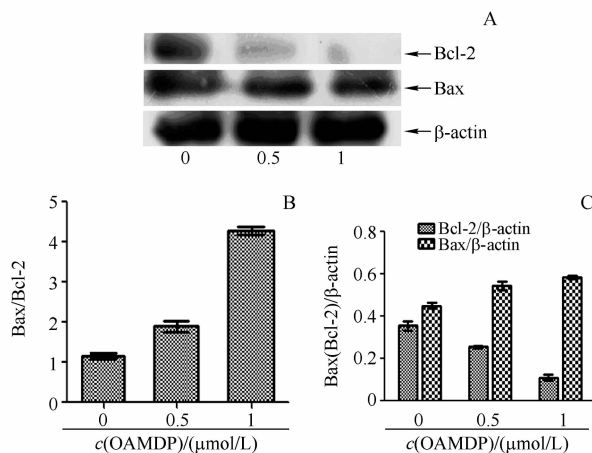


Figure 7 Effects of OAMDP on apoptosis-related proteins of HeLa cells

(A) HeLa cells were treated with OAMDP (0.5 and 1 μmol/L) for 48 h; (B) Ratio of Bax/Bcl-2 protein expressions using densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$); (C) Ratio of Bcl-2 (Bax)/β-actin protein expressions using densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

细胞凋亡是一种依赖于信号的主动死亡过程,近年来,研究发现许多抗肿瘤药都是通过诱导细胞凋亡来发挥抗肿瘤作用,其中线粒体途径已成为一个重要的细胞凋亡信号路径。线粒体凋亡通路中的 Bcl-2 家族成员发挥了重要的调节功能。通常 Bcl-2 基因在凋亡细胞中表达受到抑制,并能够促进细胞的生存^[10],而 Bax 作为一种促凋亡基因,破坏并且重新定位线粒体表面的抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达。Bcl-2 能够与 Bax 形成异二聚体,亦可形成同源二聚体,当 Bax 表达高度表达时促进癌细胞凋亡^[11]。

本研究是以本实验室合成的新型鬼臼毒素衍生物 OAMDP 为受试化合物,以 HeLa 细胞为样本,从体外分析 OAMDP 对 HeLa 细胞生长的影响和其是否诱导 HeLa 细胞凋亡,并探讨其抗肿瘤作用机制。实验结果发现 OAMDP 对于 HeLa 细胞的生长具有明显的抑制作用,并使细胞阻滞在 S 期。同时

OAMDP 也诱导 HeLa 细胞发生凋亡并能够改变凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达,且有可能通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] Huang WT, Liu J, Liu JF, *et al.* Synthesis and biological evaluation of conjugates of deoxypodophyllotoxin and 5-Fu as inducer of caspase-3 and -7 [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, **49**: 48–54.
- [2] Xu H, Lv M, Tian X. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003–2007 [J]. *Curr Med Chem*, 2009, **16**(3): 327–349.
- [3] Kamal A, Kumar BA, Suresh P, *et al.* An efficient one-pot synthesis of benzothiazolo-4β-anilino-podophyllotoxin congeners: DNA topoisomerase-II inhibition and anticancer activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21**(1): 350–353.
- [4] Zhao Y, Wang C, Wu Z, *et al.* Synthesis and antitumor activity of novel aroylthiourea derivatives of podophyllotoxin [J]. *Invest New Drugs*, 2012, **30**(1): 17–24.
- [5] Gordaliza M, Garcia PA, del Corral JM, *et al.* Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives [J]. *Toxicol*, 2004, **44**(4): 441–459.
- [6] Miao RD, Han Y, An LZ, *et al.* Seleno-podophyllotoxin derivatives induce hepatoma SMMC-7721 cell apoptosis through Bax pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2008, **32**(2): 217–223.
- [7] Yousefzad M, Sharifi M, Behmanesh M, *et al.* Podophyllotoxin: current approaches to its biotechnological production and future challenges [J]. *Eng Life Sci*, 2010, **10**(4): 281–292.
- [8] Rong YP, Barr P, Yee VC, *et al.* Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2009, **1793**(6): 971–978.
- [9] Renault TT, Teijido O, Antonsson B, *et al.* Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x_L: keep your friends close but your enemies closer [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2013, **45**(1): 64–67.
- [10] Jin S, Dai CL. Attenuation of reperfusion-induced hepatocyte apoptosis is associated with reversed Bcl-2/Bax ratio in hemihepatic artery-preserved portal occlusion [J]. *J Surg Res*, 2012, **174**(2): 298–304.
- [11] Chetsawang J, Suwanjang W, Pirompul N, *et al.* Calpastatin reduces methamphetamine-induced induction in c-Jun phosphorylation, Bax and cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Neurosci Lett*, 2012, **506**(1): 7–11.