

# 穿心莲内酯通过 Caspase-3/PARP 途径诱导人舌癌 Tb 细胞凋亡作用研究

亓翠玲, 周鑫磊, 叶杰, 杨扬, 章倩倩, 李江超, 王丽京\*

(广东药学院血管生物学研究所, 广州 510006)

**摘要** 研究穿心莲内酯对舌癌细胞(Tb 细胞)凋亡的作用及其机制。用瑞士吉姆萨染色法、Hoechst 33258 荧光染色法、原位 Annexin V/PI 双染和流式细胞术检测穿心莲内酯对 Tb 细胞凋亡的作用; Western blot 检测穿心莲内酯诱导 Tb 细胞凋亡的机制。结果显示:穿心莲内酯处理 Tb 细胞后,与对照组相比,细胞凋亡数明显增加( $P < 0.05$ )。Western blot 实验结果发现,穿心莲内酯处理组与对照组相比,聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶(polyADP-ribose polymerase, PARP)表达明显增强( $P < 0.05$ ),表明穿心莲内酯可能通过活化 PARP 促进 Tb 细胞的凋亡。

**关键词** 穿心莲内酯;细胞凋亡;PARP;Tb 细胞

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)06-0559-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130614

## Andrographolide induces Tb cell apoptosis by activating Caspase-3/PARP

QI Cuiling, ZHOU Xinlei, YE Jie, YANG Yang, ZHANG Qianqian, LI Jiangchao, WANG Lijing\*

Research Institute of Vascular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

**Abstract** Andrographolide (Andro) is one of the major components extracted from *Andrographis paniculata*. As a natural plant medicine, Andro has been used to treat inflammation for thousands of years in Asia and South America. It has been reported to exhibit an important effect on tumor growth, yet its inhibition of Tb cell apoptosis has never been reported. To obtain the effect of Andro on Tb cell apoptosis, Swiss Giemsa staining, Hoechst 33258 dying, *in situ* Annexin V/PI double staining and FCM were used. Furthermore, its mechanisms of action on Tb cell apoptosis by Western blot were detected. It was found that Tb cell apoptosis rate and PARP expression level significantly increased after Andro treatment. Moreover, Andro promoted the Tb cell apoptosis through activating Caspase-3/PARP.

**Key words** andrographolide; apoptosis; PARP; Tb cell

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31271455)

舌癌为口腔癌的常见类型,它发生在口腔内舌部,多以鳞状细胞癌为主,恶性程度较高,生长快,浸润性强,常波及舌肌和发生淋巴道转移,手术治疗损伤大,且易复发<sup>[1]</sup>。本研究选取的人舌鳞状上皮癌细胞系 Tb 为 Tca-8113 接种裸鼠后建立的脑转移亚系,它保持了鳞状上皮癌细胞的特性,具有高增殖性、转移能力强的特点,是研究口腔癌的优良模型。已有文献报道,穿心莲内酯(andrographolide, Andro)对多种肿瘤细胞的生长有抑制作

用,如 MCF-7<sup>[2-3]</sup>、PC-3<sup>[4-5]</sup>等。但是,Andro 是否可以促进 Tb 细胞的凋亡还有待研究。因此,本研究利用此细胞株,研究 Andro 对舌癌 Tb 细胞凋亡的作用及其机制。

## 1 材料

### 1.1 药物、细胞和试剂

人舌鳞状上皮癌细胞系 Tb 细胞为 Tca-8113 脑转移亚系,由第四军医大学口腔医院吴军正教授

惠赠;穿心莲内酯(纯度 99.99%,美国 Sigma 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(中国碧云天生物科技公司);PolyADP-ribosepolymerase 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

## 1.2 仪器

荧光纤维镜(日本 Olympus 公司);超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 Tb 细胞培养

Tb 细胞按照常规方法,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 2.2 细胞爬片吉姆萨染色观察 Andro 对 Tb 细胞凋亡的作用

将消毒过的玻片放入培养板孔内,再接种细胞,让细胞贴壁长在玻片上。将细胞爬片按照标准操作规程进行吉姆萨染色。

### 2.3 Hoechst 33258 染色检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

先将细胞作爬片培养及处理,然后加入 Hoechst 33258 染色 15 min, PBS 冲洗干净,取出盖玻片放于载玻片上,荧光显微镜下观察。

### 2.4 贴壁细胞原位 Annexin V/PI 双染检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

用 PBS 洗涤一次贴壁培养的 Tb 细胞,加入 1 × Annexin V-FITC 结合液 195 μL, 然后加入 Annexin V-FITC 5 μL, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。吸除溶液,加入 1 × Annexin V-FITC 结合液 190 μL 轻轻重悬细胞,加入碘化丙啶染色液 10 μL, 轻轻混匀,冰浴避光放置,荧光显微镜下观察。

### 2.5 流式细胞术检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

本实验采用 Annexin V/PI 双染法<sup>[6]</sup>测定 Andro 作用后 Tb 细胞凋亡情况。把贴壁生长 Tb 细胞用胰酶消化, PBS 洗涤离心后,取 5 ~ 10 万个重悬的细胞,按照“2.4”项下的方法进行 Annexin V/PI 双染后,随即用流式细胞仪检测。

### 2.6 Western blot 检测 Andro 诱导 Tb 细胞凋亡的机制

将培养的 Tb 细胞提取总蛋白并测定浓度后, SDS-PAGE 电泳<sup>[7]</sup>,灌胶:10% 分离胶,4% 浓缩胶。电泳:40 V, 4 ~ 5 h。膜封闭后加入用 PARP 抗体, 4 ℃ 过夜。洗膜,二抗孵育后显影。

## 2.8 统计学

所有数据采用 SPSS 11.0 统计软件包和

Sigmaplot 软件处理,两独立样本比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 形态学观察 Andro 对 Tb 细胞的凋亡作用

100 μmol/L Andro 处理 Tb 细胞 48 h 后,吉姆萨染色,用光学显微镜观察细胞形态,发现 Andro 处理组的细胞染色质浓缩、边缘化,染色质分割成块状,并出现凋亡小体等典型的凋亡形态(图 1, B),而对照组的细胞则未出现凋亡特征(图 1, A)。

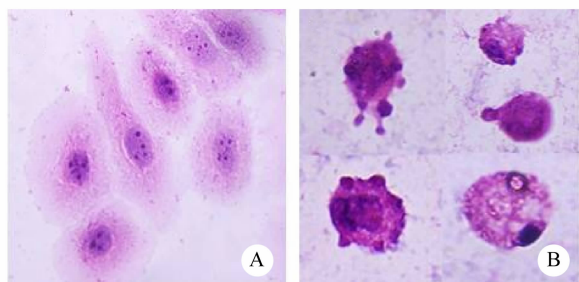


Figure 1 Morphological changes of Tb cell treated with 100 μmol/L andrographolide (Andro) (B) and control (A) (Giemsa, ×100)

### 3.2 Hoechst 33258 荧光染色法检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

分别用 50、100 和 150 μmol/L Andro 处理 Tb 细胞,结果发现:在 50 μmol/L Andro 处理细胞后, Tb 细胞已经开始出现凋亡(图 2, B), 100 μmol/L 和 150 μmol/L Andro 处理 Tb 细胞后,大部分细胞出现了凋亡(图 2, C, D),而 DMSO 组的细胞基本没有出现凋亡(图 2, A)。

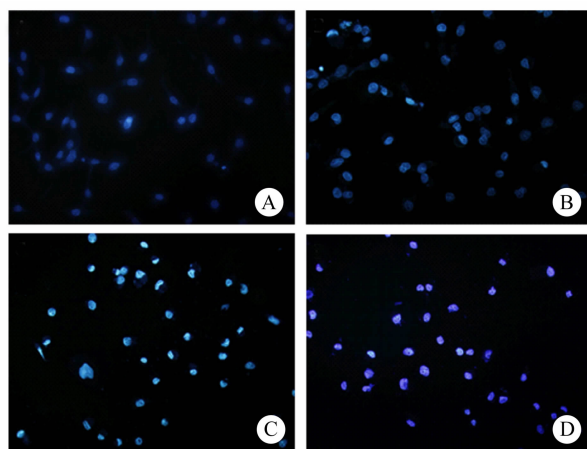


Figure 2 Effect of different concentrations of Andro on Tb cell apoptosis (×10)

A: Control; B: Andro (50 μmol/L); C: Andro (100 μmol/L); D: Andro (150 μmol/L)

### 3.3 Annexin V/PI 原位荧光双染法检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面,目前早期识别仍有困难。这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内转移到细胞膜外,使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂,正常主要存在于细胞膜的內面,在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 是一种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的磷脂结合蛋白,最初发现是一种具有很强的抗凝血特性的血管蛋白,Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性。对 PS 有高度的亲和性。因此,该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所特有的,也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的,而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。

碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但对凋亡中晚期的细胞和死细胞,PI 能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用,就可以将处于不同凋亡时期的细胞区分开来(图 3)。分别用  $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ (图 3, A)、 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ (图 3, B)、 $150\text{ }\mu\text{mol/L}$ (图 3, C)的穿心莲内酯及 DMSO 处理 Tb 细胞,Annexin V/PI 染色后,发现  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  和  $150\text{ }\mu\text{mol/L}$  的穿心莲内酯明显促进了 Tb 细胞的凋亡,而  $50\text{ }\mu\text{mol/L}$  的穿心莲内酯及对照组凋亡的细胞数则很少。

### 3.4 Annexin V/PI 双染法流式细胞仪检测 Andro 对 Tb 细胞凋亡影响

流式细胞仪检测发现: $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  Andro 作用于 Tb 细胞 24 h 后, $60.8\%$  Tb 细胞发生凋亡,而对照组细胞的凋亡率为  $0.8\%$ 。

### 3.5 Andro 诱导 Tb 细胞凋亡的机制

Andro 作用 Tb 细胞 48 h 后,通过 Western blot 实验可以观察到,Cleaved PARP 表达明显高于对照组(图 4),说明 Andro 通过 PARP 的活化促进了 Tb 细胞的凋亡。

## 4 讨 论

本研究用多种方法证实了 Andro 对 Tb 细胞的

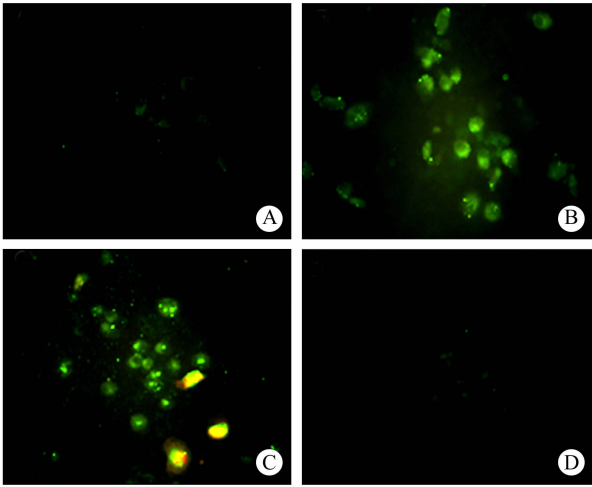


Figure 3 Effect of Andro on Tb cell apoptosis in a dose-dependent manner ( $\times 40$ )

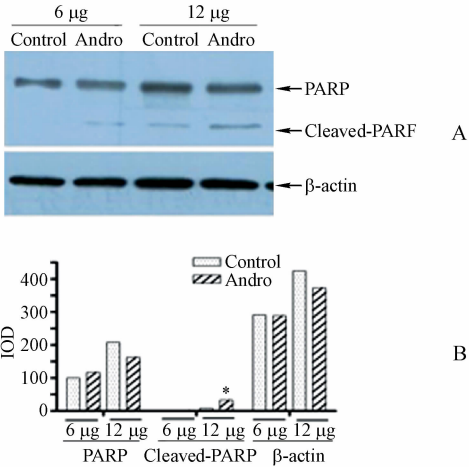


Figure 4 Cleaved PARP expression levels treated with  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  Andro for 48 hours. \*  $P < 0.05$

凋亡作用。形态学观察结果显示: Andro 作用 Tb 细胞 48 h 后,做细胞爬片并 HE 染色,观察到细胞皱缩,染色质浓集,凋亡小体等现象。Kim 等<sup>[4]</sup>的研究结果显示,PC-3 细胞中 Andro 作用 8 h 后,可明显观察到细胞凋亡的形态学特征,Andro 作用 4 h 后即可在电镜下观察到凋亡小体。Hoechst-33258 荧光染色法及 Annexin V/PI 荧光双染法研究结果均表明 Andro 可诱导 Tb 细胞的凋亡,但是 Andro 诱导 Tb 细胞的凋亡水平还需要通过流式细胞仪做定量的分析。因此,以 Annexin V/PI 双染法用流式细胞仪测 Andro 作用 24 h 后的 Tb 细胞的凋亡率,结果表明 Andro 在  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  时诱导 Tb 细胞的凋亡率可达到  $60.8\%$ 。该结果进一步说明 Andro 对舌癌 Tb 细胞有良好的诱导凋亡作用。

研究报道在 PC-3 细胞中 Andro 可能是通过诱导 Caspase-3 和 Caspase-8 活化引起细胞凋亡的<sup>[4]</sup>,但是在 Hep3B 细胞中, Andro 诱导凋亡是通过 JNK 及 ERK1/2 信号途径激活相关信号的,但是对 Caspase-3 并没有诱导其活化的作用<sup>[8]</sup>。Caspase-3 最主要的底物是多聚 ADP-核糖聚合酶 PARP,该酶与 DNA 修复、基因完整性保护有关。在细胞凋亡启动时,116 kD 的 PARP 在 Asp<sup>216</sup>-Gly<sup>217</sup> 之间被 Caspase-3 剪切成 31 kD 和 85 kD 两个片段,使 PARP 中与 DNA 结合的两个锌指结构与羧基端的催化区域分离,不能发挥正常功能。结果使受 PARP 负调控影响的 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 依赖性核酸内切酶的活性增高,裂解核小体间的 DNA,引起细胞凋亡<sup>[9]</sup>。因为 PARP 是 Caspase-3 的最重要的底物,所以在 Tb 细胞中通过 Western blot 实验直接对 PARP 的表达量进行考察,发现 Andro 作用后的 Tb 细胞中被剪切的 PARP 的量显著增加,进一步说明 Andro 可诱导 Tb 细胞发生凋亡。

参 考 文 献

[1] Kirsch C. Oral cavity cancer[J]. *Top Magn Reson Imaging*, 2007, **18**(4):269-280.

[2] Jada SR,Subur GS,Matthews C,*et al.* Semisynthesis and *in vitro* anticancer activities of andrographolide analogues[J]. *Phytochemistry*,2007, **68**(6):904-912.

[3] Satyanarayana C,Deevi DS,Rajagopalan R,*et al.* DRF 3188 a novel semi-synthetic analog of andrographolide;cellular response to MCF 7 breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*,2004, **4**:26.

[4] Kim TG, Hwi KK, Hung CS. Morphological and biochemical changes of andrographolide-induced cell death in human prostatic adenocarcinoma PC-3 cells [J]. *In vivo*, 2005, **19**(3):551-557.

[5] Zhao F,He EQ,Wang L,*et al.* Anti-tumor activities of andrographolide, a diterpene from *Andrographis paniculata*, by inducing apoptosis and inhibiting VEGF level[J]. *J Asian Nat Prod Res* (亚洲天然产物),2008, **10**(5):473-479.

[6] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA,*et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis[J]. *Blood*,1994, **84**(5):1 415-1 420.

[7] Hall RA. Studying protein-protein interactions via blot overlay or far Western blot[J]. *Methods Mol Biol*,2004, **261**:167-174.

[8] Ji L,Liu T,Liu J,*et al.* Andrographolide inhibits human hepatoma-derived Hep3B cell growth through the activation of c-Jun N-terminal kinase[J]. *Planta Med*,2007, **73**(13):1 397-1 401.

[9] Kraus WL,Lis JT. PARP goes transcription[J]. *Cell*,2003, **113**(6):677-683.

· 行业动态 ·

2013 年全球制药企业市值 15 强

排名	企业名称	2013 年市值/亿美元	市值变化/%
1	强生	2 484	31.4
2	辉瑞	2 037	21.2
3	诺华	1 734	29.5
4	罗氏	1 665	15.0
5	赛诺菲	1 484	50.9
6	默克	1 419	19.6
7	葛兰素史克	1 125	7.3
8	拜耳	875	52.6
9	百时美施贵宝	677	18.7
10	艾伯维/雅培	646	-
11	礼来	646	39.7
12	阿斯利康	625	10.2
13	武田	401	38.0
14	安斯泰来	239	48.8
15	第一三共株式会社	129	20.3