

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-ribosepolymerase, 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 dyeing, *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^[1]。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

用, 如 MCF-7^[2-3]、PC-3^[4-5] 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

惠贈；穿心蓮內酯（純度99.99%，美國Sigma公司）；Annexin V-FITC細胞凋亡檢測試劑盒（中國碧雲天生物技術公司）；PolyADP-ribosepolymerase抗體（美國Santa Cruz公司）。

1.2 仪器

熒光顯微鏡（日本Olympus公司）；超聲波清潔機（寧波新芝生物技術有限公司）。

2 方 法

2.1 Tb細胞培養

Tb細胞按照常規方法，在37℃、5%CO₂培養箱中培養。

2.2 細胞爬片吉姆薩染色觀察Andro對Tb細胞凋亡的作用

將消毒過的玻片放入培養板孔內，再接種細胞，讓細胞貼壁長在玻片上。將細胞爬片按照標準操作規程進行吉姆薩染色。

2.3 Hoechst 33258染色檢測Andro對Tb細胞凋亡影響

先將細胞作爬片培養及處理，然後加入Hoechst 33258染色15 min，PBS沖洗乾淨，取出蓋玻片放於載玻片上，熒光顯微鏡鏡下觀察。

2.4 貼壁細胞原位Annexin V/PI雙染檢測Andro對Tb細胞凋亡影響

用PBS洗滌一次貼壁培養的Tb細胞，加入1×Annexin V-FITC結合液195 μL，然後加入Annexin V-FITC 5 μL，輕輕混勻。室溫避光孵育10 min。吸除溶液，加入1×Annexin V-FITC結合液190 μL輕輕重懸細胞，加入碘化丙啶染色液10 μL，輕輕混勻，冰浴避光放置，熒光顯微鏡下觀察。

2.5 流式細胞術檢測Andro對Tb細胞凋亡影響

本實驗採用Annexin V/PI雙染法^[6]測定Andro作用後Tb細胞凋亡情況。把貼壁生長Tb細胞用胰酶消化，PBS洗滌離心後，取5~10萬個重懸的細胞，按照“2.4”項下的方法進行Annexin V/PI雙染後，隨即用流式細胞儀檢測。

2.6 Western blot檢測Andro誘導Tb細胞凋亡的機制

將培養的Tb細胞提取總蛋白並測定濃度後，SDS-PAGE電泳^[7]，灌膠：10%分離膠，4%濃縮膠。電泳：40 V，4~5 h。膜封閉後加入用PARP抗體，4℃過夜。洗膜，二抗孵育後顯影。

2.8 統計學

所有數據採用SPSS 11.0統計軟件包和

Sigmaplot軟件處理，兩獨立樣本比較採用t檢驗，以P<0.05為差異有統計學意義。

3 結 果

3.1 形態學觀察Andro對Tb細胞的凋亡作用

100 μmol/L Andro處理Tb細胞48 h後，吉姆薩染色，用光學顯微鏡觀察細胞形態，發現Andro處理組的細胞染色質濃縮、邊緣化，染色質分割成塊狀，並出現凋亡小體等典型的凋亡形態（圖1，B），而對照組的細胞則未出現凋亡特徵（圖1，A）。

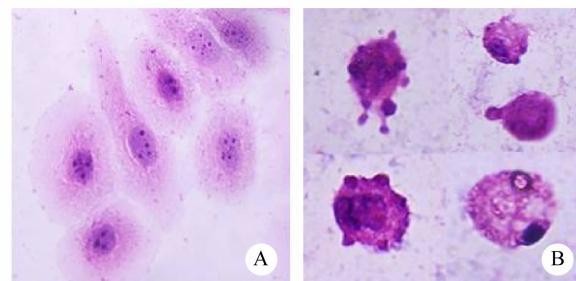


Figure 1 Morphological changes of Tb cell treated with 100 μmol/L andrographolide (Andro) (B) and control (A) (Giemsa, $\times 100$)

3.2 Hoechst 33258熒光染色法檢測Andro對Tb細胞凋亡影響

分別用50、100和150 μmol/L Andro處理Tb細胞，結果發現：在50 μmol/L Andro處理細胞後，Tb細胞已經開始出現凋亡（圖2，B），100 μmol/L和150 μmol/L Andro處理Tb細胞後，大部分細胞出現了凋亡（圖2，C，D），而DMSO組的細胞基本沒有出現凋亡（圖2，A）。

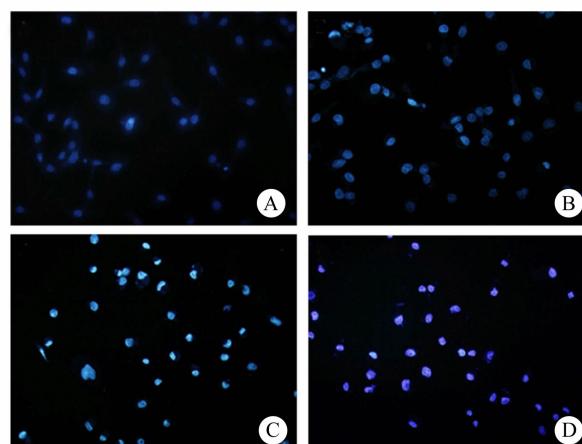


Figure 2 Effect of different concentrations of Andro on Tb cell apoptosis ($\times 10$)

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内面,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 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 $\mu\text{mol/L}$ (图3,A)、100 $\mu\text{mol/L}$ (图3,B)、150 $\mu\text{mol/L}$ (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和150 $\mu\text{mol/L}$ 的穿心莲内酯明显促进了Tb细胞的凋亡,而50 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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

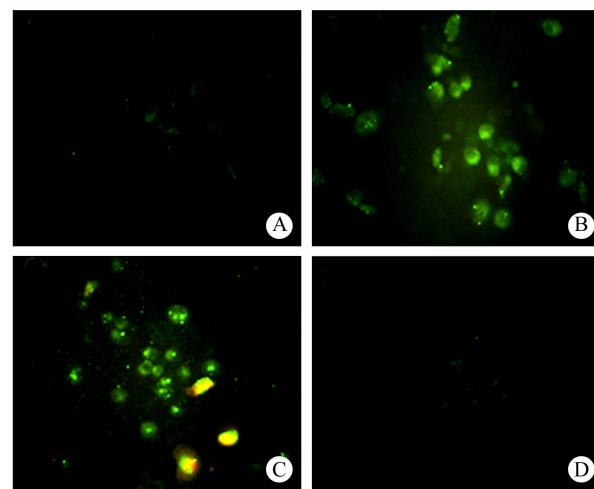


Figure 3 Effect of Andro on Tb cell apoptosis in a dose-dependent manner ($\times 40$)

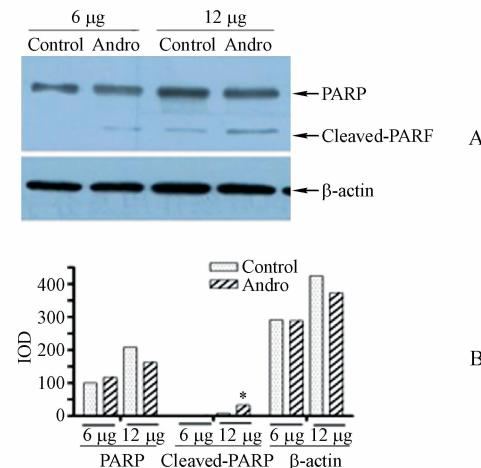


Figure 4 Cleaved PARP expression levels treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Andro for 48 hours. * $P < 0.05$

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^[4]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 $\mu\text{mol/L}$ 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^[4]，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^[8]。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 Asp²¹⁶-Gly²¹⁷ 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 Ca²⁺/Mg²⁺ 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^[9]。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):1415-1420.
- [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):1397-1401.
- [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