

# 3,4,5-三羟基苯甲酸通过线粒体途径诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 的凋亡

赵文静, 牛凤兰

(吉林大学公共卫生学院, 长春 130021)

**摘要** 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)观察3,4,5-三羟基苯甲酸(TBA)对人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用; 通过流式细胞仪检测细胞凋亡、细胞内活性氧(ROS)及线粒体膜电位的变化, 用比色法测定 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白活性, 探讨 TBA 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的分子机制. 研究表明, TBA 对 SMMC-7721 细胞生长具有显著的抑制作用并诱导其凋亡, 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡作用可能通过线粒体信号传导通路实现.

**关键词** 3,4,5-三羟基苯甲酸; 人肝癌 SMMC-7721 细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

**中图分类号** O625.31\*1; R735.7; R363 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)02-0320-04

3,4,5-三羟基苯甲酸(Trihydroxybenzoic acid, TBA)是广泛存在于植物中的多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗诱变及抗肿瘤等作用<sup>[1,2]</sup>. 研究表明, TBA 能选择性地抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[3,4]</sup>, 但其对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖抑制及作用机制未见报道. 为此本实验选取 SMMC-7721 细胞为研究对象, 采用 MTT 比色法、流式细胞术和分光光度法, 通过观察 TBA 对 SMMC-7721 细胞凋亡、细胞内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位和 Caspase-9,3 蛋白活性影响, 初步探讨 TBA 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的分子机制, 为深入研究其在抗肿瘤方面的功效提供一定的理论基础.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂及仪器

改良 MEM 的 Dubecco's (DMEM) 培养基购于 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)和罗丹明 123 (Rh123) 购于 Sigma 公司; 2',7'-二氯荧光素乙二酯(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 购于 Fluka 公司; Trihydroxybenzoic acid(TBA) 购于 Sigma 公司(货号 G7384); Annexin V-FITC/PI 试剂盒和 Caspase-9, 3 蛋白活性检测试剂盒购自南京凯基生物有限公司. MK3 型酶标仪(Labsystem, Finland); CK-40 倒置荧光显微镜(Olympus, Japan); Epics 流式细胞仪(Beckman, USA); 其它化学试剂均为国产分析纯.

### 1.2 实验过程

1.2.1 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 细胞(购于中国科学院上海细胞生物研究所)用 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养. 实验选用对数生长期细胞, 台盼蓝拒染率大于 95%.

1.2.2 人外周血单个核细胞(PBMC)的分离 无菌采集健康供者静脉血, 用肝素抗凝(每毫升全血加 0.1 mL 200 U·mL 肝素钠溶液), 参照文献[5]方法分离外周血单个核细胞, 台盼蓝拒染率大于 95%, 重悬于 10% FBS 的 DMEM 培养基中备用.

1.2.3 TBA 对 SMMC-7721 细胞和人 PBMC 生长的影响 参照文献[6]方法, 用 MTT 法测定 3.125,

收稿日期: 2008-05-05.

基金项目: 吉林省科技厅重点项目(批准号: 20070424)资助.

联系人简介: 牛凤兰, 女, 教授, 主要从事药食同用植物与健康研究. E-mail: jluniu@yahoo.com.cn

6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TBA 在 24, 48, 72 h 对 SMMC-7721 细胞和人 PBMC 的生长抑制作用. 生长抑制率(CI, %) = [(阴性对照组 A 值 - 实验组 A 值)/阴性对照组 A 值]  $\times$  100%.

1.2.4 SMMC-7721 细胞吖啶橙(AO)荧光染色 参照文献[7]方法, 用 AO 染色, 在荧光显微镜下观察不同浓度 TBA 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后细胞形态的变化.

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡 参照文献[8]方法, 采用流式细胞仪测定不同浓度 TBA 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 的凋亡率.

1.2.6 细胞内活性氧检测 DCFH-DA 是一种自身不产生荧光的化合物, 它能自由地通过细胞膜, 被包内活性氧氧化为 2',7'-二氯荧光素(Dichlorofluorescein, DCF)<sup>[9]</sup>. DCF 能发出很强的荧光, 流式细胞仪检测出的荧光强度间接反映了细胞内活性氧水平, 并呈现出正相关性. 参照文献[10]方法, 采用流式细胞仪测定不同浓度 TBA 作用 SMMC-7721 细胞 2 h 的细胞内活性氧水平.

1.2.7 细胞线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )测定 Rh123 为亲脂性带正电荷的荧光分子探针, 细胞负载 Rh123 后, 主要分布在细胞内带负电荷的线粒体膜区, 荧光强度变化可以反映线粒体内膜电位变化. 参照文献[11]方法, 用流式细胞仪测定不同浓度 TBA 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 的细胞线粒体膜电位.

1.2.8 Caspase-9,3 蛋白活性测定 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒是将 Caspase-3 序列特异性的多肽偶联至发色基团, 当该底物被 Caspase-3 剪切后, 发色基团即游离出来, 通过酶标仪或分光光度计( $\lambda = 405$  或 400 nm)测定其吸光值, 考察 Caspase-3 的活性程度. Caspase-9 分光光度法检测试剂盒是将 Caspase-9 序列特异性的多肽偶联至发色基团, 当该底物被 Caspase-9 剪切后, 发色基团即游离出来, 通过酶标仪或分光光度计( $\lambda = 405$  或 400nm)测定其吸光值, 考察 Caspase-9 的活性程度.

收集对照组和药物处理组的细胞  $1 \times 10^6$  个, 按试剂盒说明书操作, 测定  $A_{405}$  值, 以  $A_{405 \text{ nm}}$  值大小表示 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性.

1.2.9 统计学分析 所有资料均采用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理. 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为显著性检验标准.

## 2 结果与讨论

### 2.1 TBA 对 SMMC-7721 细胞和人 PBMC 生长的抑制作用

对照组 SMMC-7721 细胞生长活跃, 经不同浓度的 TBA 处理 24, 48, 72 h 后, SMMC-7721 细胞生长均不同程度减慢, 并呈明显的时间及浓度依赖性, 不同浓度和不同时间的抑制率有显著性差异( $P < 0.05$ ). TBA 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 35.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 在相同浓度下培养 72 h, TBA 对人 PBMC 几乎无抑制作用, 与 SMMC-7721 细胞比较有显著差异( $P < 0.05$ ).

### 2.2 TBA 体外诱导 SMMC-7721 细胞凋亡

通过荧光显微镜可见, 对照组细胞核呈均染绿色荧光, 表现为正常细胞的染色特征; 6.25 和 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TBA 作用 48 h 后, 细胞染色增强, 荧光更为明亮, 呈均匀一致的圆状或固缩状结构; 25 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TBA 作用 48 h 后, 细胞核固缩为新月状或念珠状, 表现为晚期凋亡细胞核的形状和染色特征

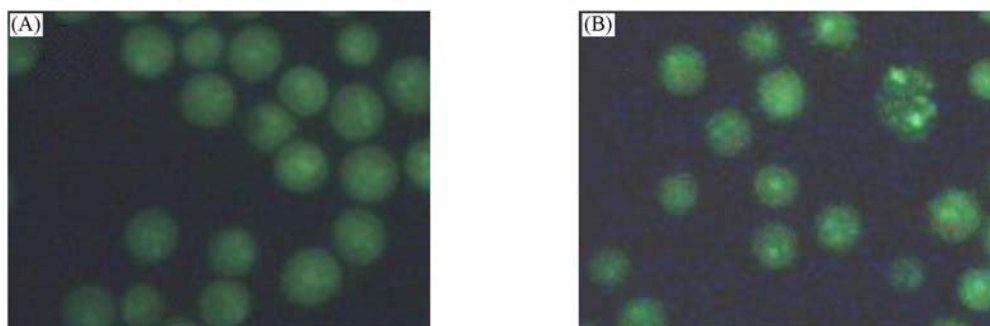


Fig. 1 Apoptotic SMMC-7721 cells observed by acridine orange staining(400  $\times$ )

(A) Control group; (B) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TAB for 48 h.

(图1). AnnexinV-FITC/PI 双染检测法是目前检测细胞凋亡和区分坏死细胞特异性的较好方法. 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TBA 作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 其凋亡率分别为  $(3.25 \pm 1.02)\%$ ,  $(10.25 \pm 2.32)\%$ ,  $(14.58 \pm 3.57)\%$  和  $(16.21 \pm 4.68)\%$ . 与对照组比较, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

凋亡是细胞的程序化死亡. 凋亡异常(相对减弱)是肿瘤形成和发展的一个重要原因, 通过各种途径和方式诱导、增强肿瘤细胞的凋亡是抑制、杀伤肿瘤细胞的重要方面. 实验研究结果表明, TBA 体外可以通过诱导 SMMC-7721 细胞凋亡抑制其增殖, 同时随 TBA 浓度的逐渐增加, SMMC-7721 细胞凋亡率逐渐升高, 呈现出一定的量效关系.

### 2.3 三羟基苯甲酸对 SMMC-7721 细胞内活性氧、线粒体膜电位和 Caspase-9,3 蛋白活性的影响

TBA 作用于 SMMC-7721 细胞 2 h 后, 与对照组  $(2.45 \pm 0.98)\%$  比较, 6.25, 12.5 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组细胞内活性氧增加到  $(8.34 \pm 2.45)\%$ ,  $(10.98 \pm 3.87)\%$  和  $(21.5 \pm 4.68)\%$ . 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组细胞内活性氧增加到  $(47.38 \pm 3.52)\%$ , 随 TBA 浓度的逐渐增加, SMMC-7721 细胞内 ROS 含量也随之逐渐升高 ( $P < 0.05$ ). 与对照组比较, TBA 作用 48 h 后 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位降低, 峰值明显左移. 对照组和 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TBA 组低荧光强度细胞分别为  $(2.51 \pm 0.38)\%$ ,  $(11.86 \pm 0.97)\%$ ,  $(22.88 \pm 2.98)\%$ ,  $(32.24 \pm 3.54)\%$ ,  $(35.05 \pm 4.56)\%$ , 药物处理组与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图2).

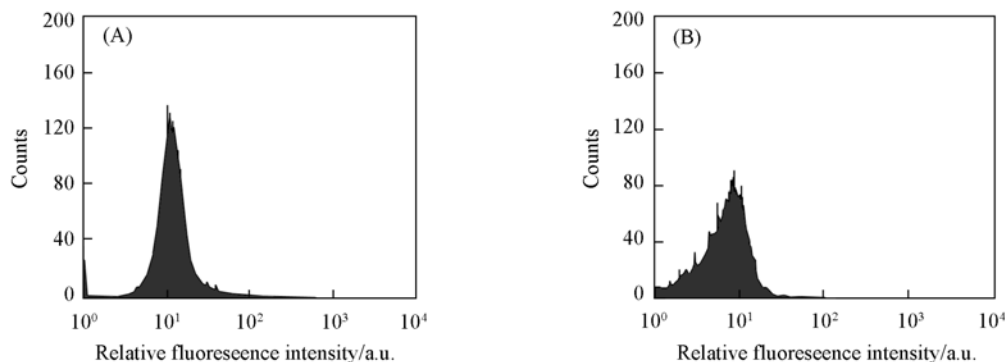


Fig. 2 Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential

(A) Control group; (B) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TAB for 48 h.

在正常情况下, SMMC-7721 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活性水平较低,  $A_{405\text{ nm}}$  值分别为 0.132 和 0.112. 在三羟基苯甲酸二聚体作用下, Caspase-3 和 Caspase-9 活性增加, 经 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TBA 作用 48 h,  $A_{405\text{ nm}}$  值分别升至 0.134, 0.324, 0.458, 0.523 和 0.167, 0.254, 0.398, 0.487, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TAB 引起 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化程度最高.

ROS 生成的增加可导致细胞损伤. 研究表明, ROS 可直接引起蛋白质的变性失活, 造成脂质过氧化, 对线粒体直接造成伤害, 导致线粒体 PT 孔道的开放, 使线粒体膜电位下降<sup>[12]</sup>. 本实验结果表明, 在 TBA 作用下, SMMC-7721 细胞内的活性氧增加, 线粒体膜电位下降, Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白活性增加, 提示 TBA 可能通过增加细胞内 ROS, 诱导线粒体膜电位降低, 激活 Caspase-9, 3 的线粒体凋亡途径, 启动和介导了 SMMC-7721 细胞的凋亡过程.

### 参 考 文 献

- [1] Abe I., Umehara K., Morita R., *et al.*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [J], 2001, **16**(1): 122—125
- [2] Isuzugawa K., Ogihara Y., Inoue M.. *Biol. Pharm. Bull.* [J], 2001, **24**(3): 249—253
- [3] Yang H. L., Chang W. H., Chia Y. C., *et al.*. *Food Chem. Toxicol.* [J], 2006, **44**(12): 1978—1988
- [4] NIU Feng-Lan(牛凤兰), YIN Jian-Yuan(尹建元), DONG Wei-Yan(董威严), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2005, **26**(5): 852—855
- [5] TIAN Xin(田新), FU Ren-Yi(符仁义), DENG Li(邓力), *et al.*. *Chinese J. Reparative and Reconstructive Surgery(中国修复重建外科杂志)*[J], 2007, **21**(1): 81—86

- [ 6 ] HUANG He-Ning(黄河宁), LI An-Zhang(李安章), WENG Lu-Na(翁露娜), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(6): 1072—1076
- [ 7 ] Zhang K. Z., Xu J. H., Huang X. W., *et al.*. Acta Pharmacol Sin. [J], 2007, **28**(1): 105—110
- [ 8 ] Davison K., Cote S., Mader S., *et al.*. Leukemia[J], 2003, **17**(5): 931—940
- [ 9 ] Armstrong J. S., Steinauer K. K., Hornung B., *et al.*. Cell Death Differ. [J], 2002, **9**(3): 252—263
- [ 10 ] JIANG Ying-Juan(江颖娟), ZENG Yao-Ying(曾耀英), WANG Tong(王通), *et al.*. Chinese Journal of Pathophysiology(中国病理生理杂志)[J], 2006, **22**(5): 846—850
- [ 11 ] ZHANG Shen(张申), JIANG Xing-Lin(江兴林), WEI Tao-Tao(卫涛涛), *et al.*. Chin. Pharm. J. (中国药学杂志)[J], 2006, **41**(5): 750—753
- [ 12 ] PENG Shu-Ping(彭淑平), FANG Wei-Yi(方唯意), JIANG Ri-Cheng(蒋日成), *et al.*. Chin. Bull. Pharmacology(中国药理学通报)[J], 2003, **19**(6): 678—682

## Trihydroxybenzoic Acid on Induction of the Apoptosis of Human Hepatocarcinoma SMMC-7721 Cells by Mitochondrial-dependent Pathway

ZHAO Wen-Jing, NIU Feng-Lan\*

(School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** Trihydroxybenzoic acid show the anti-tumor potency from many previous investigations, but the research for the inhibitory effect and mechanism on SMMC-7721 cells has not been regarded so far. MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation effect of trihydroxybenzoic acid on SMMC-7721 cells and human PBMC. ROS production, apoptotic cells and the mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. The activities of Caspase-3, 9 were measured by colorimetric method. The results show that trihydroxybenzoic acid significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells in dose and time-dependent pathways. Compared with control group, trihydroxybenzoic acid caused the increase of ROS levels and a concomitant dissipation of the mitochondrial membrane potential, activities caspase-9 and caspase-3, triggering apoptosis of SMMC-7721 cells. Mitochondrial-dependent pathways could involved in trihydroxybenzoic acid induced SMMC-7721 cells apoptosis.

**Keywords** Trihydroxybenzoic acid; Human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

(Ed. : H, J, Z)