

2-甲基-3-羟基蒽醌诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的机制

李娜^{1*}, 崔瑞洁¹, 赵小顺¹, 梁金英²

(¹新乡市中心医院药剂科, 新乡 453000; ²新乡医学院药学院, 新乡 453000)

摘要 为探讨 2-甲基-3-羟基蒽醌抗肿瘤作用及其机制, 本研究采用锥虫蓝法检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞周期变化、细胞凋亡率、线粒体膜电位及细胞内游离钙的变化, Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 caspase-4、caspase-7、caspase-9、Bcl-2、Bax、JNK、细胞色素 C 的表达。结果发现: 2-甲基-3-羟基蒽醌时间依赖性地抑制乳腺癌细胞的生长, 升高细胞内游离钙含量, 降低线粒体膜电位并诱导其凋亡; 药物上调 Bax 并下调 Bcl-2 蛋白的表达; 诱导 caspase-4、caspase-7、caspase-9、calpain 的活化及细胞色素 C 的释放。结果提示 2-甲基-3-羟基蒽醌可能通过 Ca^{2+} /calpain/caspase-4 途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。

关键词 2-甲基-3-羟基蒽醌; 凋亡; caspase; 钙蛋白酶; 细胞内游离钙

中图分类号 R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)04-0365-04

2-Methyl-3-hydroxy-anthraquinone induces Ca^{2+} -mediated apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells

LI Na^{1*}, CUI Rui-jie¹, ZHAO Xiao-shun¹, LIANG Jin-ying²

¹Department of Pharmacy, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000;

²School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

Abstract To evaluate the mechanism of 2-methyl-3-hydroxy-anthraquinone (MHA) inducing apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion assay, cell cycle distribution, apoptosis and mitochondrial membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were measured by FACScan; the protein expression of caspase-4, caspase-7, caspase-9, Bcl-2, Bax, calpain and cytochrome C in the MCF-7 cells was evaluated by Western blots. The results demonstrated that MHA was able to inhibit cell proliferation in a time-dependent manner. It induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ overload, decreased mitochondrial membrane potential and finally induced cancer cell apoptosis. Caspase-4, caspase-7, caspase-9 and calpain protein were activated. Bax expression was upregulated and Bcl-2 expression was downregulated. MHA induced MCF-7 cells apoptosis via Ca^{2+} /calpain/caspase-4 pathway.

Key words 2-methyl-3-hydroxy-anthraquinone; apoptosis; caspase; calpain; $[\text{Ca}^{2+}]_i$

白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd) 属茜草科 (Rubiaceae) 耳草植物, 别名蛇舌草、蛇刺草、羊须草等^[1]。广泛分布于亚热带地区, 在我国主要分布于广东、广西、福建等地。其主要功效是清热解毒、活血消肿、止痛抗菌等, 民间用于治疗肠道疾病、毒蛇咬伤、肿瘤等疾病。近年来因其抗肿瘤作用备受关注, 是临床常用的抗肿瘤药物之一^[2]。至今从白花蛇舌草中已分离得到 30 多种化合物, 其中抗肿瘤活性研究主要集中在黄酮类化合物、甾醇

类化合物、三萜类化合物、多糖等成分^[3]。近年研究表明从白花蛇舌草提取的蒽醌类成分可通过 caspase 3 途径诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡, 是否 caspase 3 是其抗肿瘤作用的唯一机制目前尚不清楚^[4]。本实验选用乳腺癌 MCF-7 细胞 (caspase 3 缺失) 为研究对象, 以期探讨其蒽醌类成分 2-甲基-3-羟基蒽醌 (2-methyl-3-hydroxy-anthraquinone, MHA) 的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

胰蛋白酶、DMEM、胎牛血清(美国 Gibco 公司); MTT、钙离子荧光探针 Fluo-3/AM、罗丹明(Rh123)、碘化丙啶(PI)、2-甲基-3-羟基蒽醌(美国 Sigma 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 一抗如 caspase-7、caspase-9、细胞色素 C、磷酸化-JNK、calpain I 大片段(μ -type)(美国 Cell Signaling Technology 公司); caspase-4(德国 Calbiochem 公司); 羊抗小鼠及兔抗小鼠(美国 Santa Cruz 生物技术公司); MCF-7 乳腺癌细胞(中科院上海细胞生物学研究所)。

1.2 仪器

NAPCO 8000DH 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); Forma Class II A2 二级生物安全柜(美国 Thermo 公司); FACS101 流式细胞仪(美国 BD 公司); DM2500-3HF-FL1 荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 乳腺癌细胞,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养(含 10 μ g/mL 胰岛素),取对数生长期细胞用于实验^[4]。

2.2 MHA 对 MCF-7 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞以每毫升 5×10^5 个细胞接种于培养瓶。培养 12 h 后,加入不同浓度的 MHA。给药后每天定时胰酶消化后用锥虫蓝进行细胞计数,以观察 MHA 对细胞生长的影响^[4]。

2.3 细胞内游离钙测定

收集经 MHA(30 μ mol/L)处理 12,24,48 h 的 MCF-7 细胞,调整细胞数为每毫升 1×10^6 个,分别用 Fluo-3/AM(2 μ mol/L)避光染色 1 h 及 PI(50 μ g/mL)染色 15 min。流式细胞仪检测荧光强度后用 Winlist 4.0 软件分析实验数据^[4]。

2.4 MHA 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

2.4.1 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集经 MHA 作用 12,24,48 h 的 MCF-7 细胞,按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书操作后用流式细胞仪分析细胞凋亡率^[4]。

2.4.2 流式细胞仪检测细胞周期^[7] 收集经 MHA 作用 12,24 及 48 h 的 MCF-7 细胞,4 $^{\circ}$ C 70% 乙醇固

定过夜,PBS 洗 3 次,RNA 酶消化,碘化丙啶染色,流式细胞仪分析 DNA 含量,检测细胞 G0/G1、S、G2/M 期所占的百分率,亚 G1 峰为细胞凋亡峰^[4]。

2.4.3 细胞形态的变化 收集经 MHA 作用 12,24,48 h 的 MCF-7 细胞,用吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)染色液(100 μ g/mL AO 和 EB)1 μ L 加入到细胞悬液 25 μ L 中,荧光显微镜观察细胞形态并摄影^[5]。

2.5 线粒体膜电位检测

收集经 MHA 作用 12,24,48 h 的 MCF-7 细胞,用罗丹明 123(1 μ g/mL)37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,PBS 洗 2 次后应用流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化^[5]。

2.6 Western blot 检测

收集经 MHA 作用 12,24,48 h 的 MCF-7 细胞,PBS 洗 2 次(1 000 r/min,5 min)后,分别应用细胞裂解液或线粒体提取试剂盒裂解细胞或提取线粒体。蛋白定量后分别取蛋白 50 μ g 加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min。8%~12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭后依次加入相应的一抗和二抗,室温孵育 2 h,TBST 缓冲液洗涤 5 次,每次 10 min。加入化学发光试剂后放入暗盒中压片并依次显影、定影及摄像^[5]。

2.7 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和 q 检验,以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 MHA 对 MCF-7 细胞生长的影响

MCF-7 细胞经不同浓度的 MHA 作用后,细胞增殖均受到不同程度地抑制,并呈剂量及时间依赖性,24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 (18.62 ± 2.71) 和 $(42.19 \pm 3.84) \mu$ mol/L(图 1)。

3.2 MHA 对 MCF-7 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

Fluo-3/AM 和 PI 双染法评估 MHA 对细胞内游离钙及细胞死亡的影响。在图 2A 中,右上象限及右下象限表示细胞内游离钙增加的程度,实验结果表明随着 MHA 作用时间的延长细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 逐渐增强。此外,Western blot 结果表明,随着细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 逐渐增多钙蛋白酶(calpain,一类钙依赖性的高度保守的蛋白水解酶)的表达逐渐增加(图 2,B)。

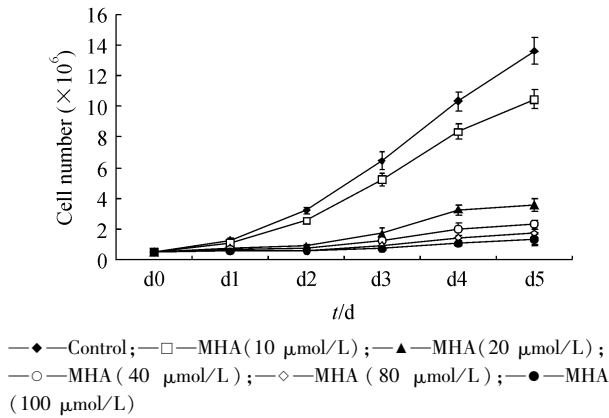


Figure 1 Antiproliferative effect of methylanthraquinone (MHA) on MCF-7 cells by trypan blue dye exclusion assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

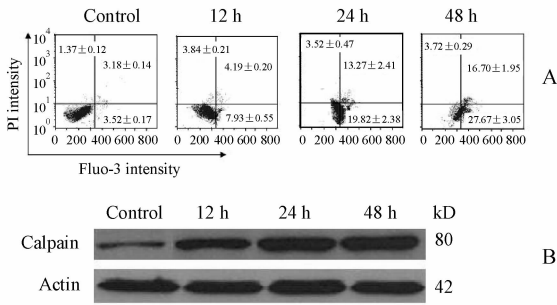


Figure 2 MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) induces intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increase and calpain activation in MCF-7 cells
A: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is detected using Fluo-3/AM and PI double staining. The percentages of top right quadrants and bottom right quadrants presented the effective increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$). B: The protein expression of calpain in MCF-7 cells treated with MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) by Western blot analysis. Actin protein is blotted as control

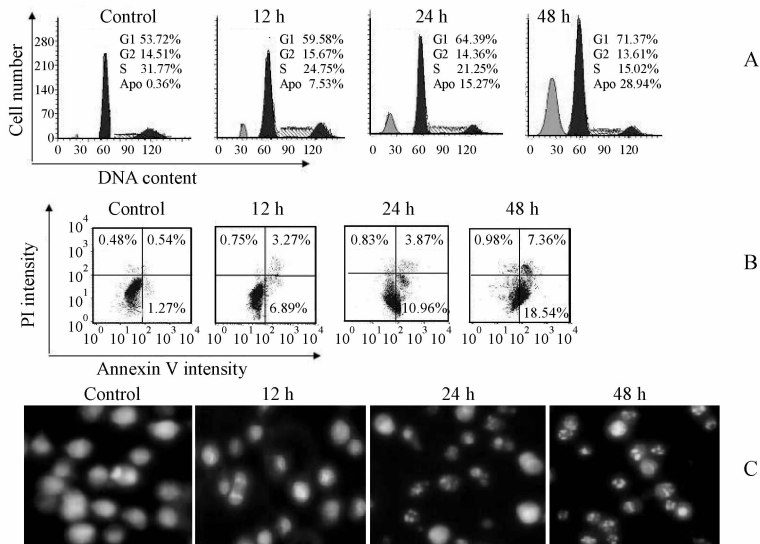


Figure 3 MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) induces MCF-7 cells apoptosis and cell cycle arrest
A: Cell cycle is detected using PI staining; B: Cell apoptosis is detected using Annexin V-FITC and PI double staining. Bottom right quadrants represent early-apoptosis cells and top right quadrants represent late-apoptosis cells; C: Cell apoptosis was observed by fluorescence microscopy using AO/EB staining ($\times 200$)

3.3 MHA 对 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响

流式细胞仪检测表明,随着 MHA 作用时间的延长,MCF-7 细胞的 G0/G1 期比例明显增多同时伴有凋亡率 (Sub-G1 峰) 逐渐升高 (图 3, A)。应用凋亡特异性 Annexin V-FITC 检测试剂盒测试同样表明,MHA 时间依赖性地诱导 MCF-7 细胞凋亡 (图 3, B); AO/EB 染色同样表明经 MHA 处理后,MCF-7 细胞出现明显的凋亡特征,如凋亡小体 (图 3, C)。

3.4 MHA 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位、细胞色素 C 影响

MCF-7 细胞经 MHA 作用后线粒体膜电位随作用时间的延长逐渐降低 (图 4, A), 同时细胞浆中细胞色素 C 含量升高, 而线粒体中的含量减少 (图 4, B)。

3.5 MHA 对凋亡相关蛋白的影响

Western blotting 结果同样表明,与对照组相比,MHA 作用 MCF-7 细胞后,caspase-4、caspase-7、caspase-9 的蛋白表达均呈时间依赖性地增加,提示 MHA 诱导了这些蛋白的活化 (图 5)。此外,MHA 可诱导 JNK 的磷酸化,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达及上调促凋亡蛋白 Bax 蛋白的表达 (图 5)。

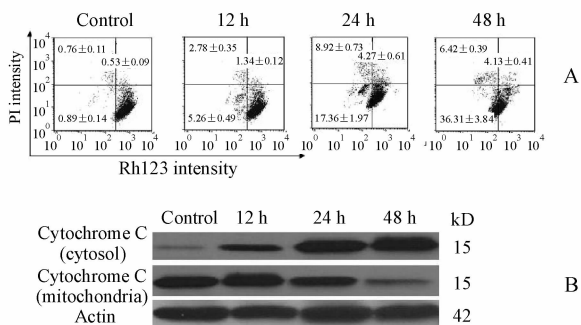


Figure 4 MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) induces MMP MCF-7 cells decrease and cytochrome C release

A: Mitochondrial membrane potential (MMP) is detected using PI and Rh123 double staining. The percentage of bottom left quadrant and top left quadrant represent MMP decrease ($\bar{x} \pm s, n = 3$). B: The protein expression of cytochrome C in MCF-7 cells treated with MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) by Western blot analysis. Actin protein is blotted as control

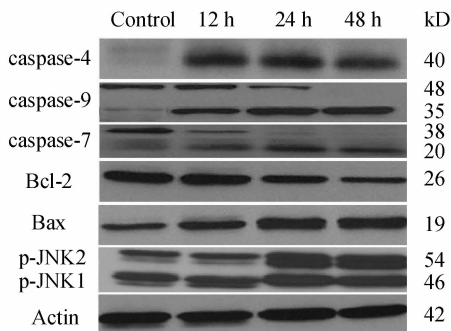


Figure 5 Expression of apoptosis-related proteins in MCF-7 cells treated with MHA (30 $\mu\text{mol/L}$) for 12, 24 or 48 h by Western blot analysis. Equal amounts (50 $\mu\text{g/lane}$) of cellular protein are fractionated on 8%-12% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes as described in Materials and Methods. Actin protein is blotted as a control

4 讨论

白花蛇舌草已被广泛应用于临床,对消化、呼吸、血液等系统的恶性肿瘤治疗取得了较好的疗效。实验结果表明:MHA可诱导MCF-7细胞凋亡并使细胞周期阻滞于G0/G1期但无坏死出现(因Annexin V-FITC染色阳性而PI染色阴性),提示MHA抗肿瘤作用归因于细胞凋亡,这与从大黄中提取的蒽醌类成分抗肿瘤作用相似^[6]。

蒽醌类药物可通过 Ca^{2+} 介导的内质网途径诱导肿瘤细胞凋亡。MHA可时间依赖性地诱导MCF-7细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,同时 Ca^{2+} 依赖性calpain表达明显增加。此外,MHA明显导致线粒体膜电位下降及细胞色素C释放,这进一步证明了钙超载往往导致线粒体损伤,而线粒体膜电位下降

及细胞色素C释放是线粒体损伤的标志性特征^[7]。caspase-4往往与内质网应激密切相关^[8],实验结果也表明MHA可引起caspase-4、caspase-7、caspase-9活化,因MCF-7细胞不表达caspase-3,caspase-7可能替代了caspase-3的功能^[9]。此外,MHA诱导JNK磷酸化及调控Bcl-2家族蛋白的表达,从而调控线粒体凋亡途径^[10]。这些结果说明MHA通过 Ca^{2+} /calpain/caspase-4途径诱导MCF-7细胞发生凋亡,为白花蛇舌草抗肿瘤作用的研究提供了理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] 芦柏震(Lu BZ),周俐斐(Zhou LF),侯桂兰(Hou GL),等.白花蛇舌草抗肿瘤作用研究进展[J].医药导报(*Her Med*),2009,28(3):344-346.
- [2] 邓红艳(Deng HY),高宝安(Gao BA),陈世雄(Chen SX).白花蛇舌草抗肿瘤的实验研究进展[J].现代中西医结合杂志(*Mod J Integr Tradit Chin West Med*),2009,18(6):1947-1949.
- [3] 方岩雄(Fang YX),张永成(Zhang YC),陈敏敏(Chen MM),等.抗肿瘤药物白花蛇舌草及其活性成分[J].中成药(*Chin Tradit Pat Med*),2004,26(7):577-579.
- [4] Shi Y, Wang CH, Gong XG. Apoptosis-inducing effects of two anthraquinones from *Hedyotis diffusa* WILLD [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008,31(6):1075-1078.
- [5] Chiang PC, Chien CL, Pan SL, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis by a marine prostanoid in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2005,43(4):679-686.
- [6] Hsia TC, Yang JS, Chen GW, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} on rhein-induced apoptosis in A-549 human lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2009,29(1):309-318.
- [7] Garcia M, Bondada V, Geddes JW. Mitochondrial localization of μ -calpain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,338(2):1241-1247.
- [8] Pelletier N, Casamayor-Pallejà M, De Luca K, et al. The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway [J]. *J Immunol*, 2006,176(3):1340-1347.
- [9] Delaney CE, Hopkins SP, Addison CL. Supplementation with L-carnitine does not reduce the efficacy of epirubicin treatment in breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2007,252(2):195-207.
- [10] Lin ML, Chen SS, Lu YC, et al. Rhein induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} -dependent mitochondrial death pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2007,27(5A):3313-3322.