

# 丹皮酚对人大肠癌 HT-29 细胞 bcl-2 和 bax 基因表达的影响

计春燕<sup>1</sup>, 汪毅<sup>1</sup>, 谭诗云<sup>2</sup>

关键词: 大肠癌; bcl-2; bax; 丹皮酚

中图分类号: R735.3<sup>+</sup>4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0068-02

## 0 引言

化疗药物的耐药<sup>[1]</sup>及其毒副作用一直是大肠癌治疗的两大难题,因此在植物中寻找有效且副作用小的抗肿瘤药物已成为国内外重要的研究课题。研究表明,丹皮酚(Paeonol, Pae)具有一定的抗肿瘤活性,灌胃给药有抗小鼠肝肿瘤作用<sup>[2]</sup>。我们已报道 Pae 在体外能显著抑制人大肠癌 HT-29 细胞的增殖<sup>[3]</sup>。为进一步探索这种抑制作用的可能机制,我们进行了以下研究,为 Pae 的临床应用提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

常规培养 HT-29 细胞,取对数生长期细胞用于实验。细胞分为实验组和对照组,其中实验组分别加入不同浓度的 Pae 溶液(分别为 15.63 mg/L、62.5 mg/L、250 mg/L),对照组加入等量培养液。

### 1.2 Pae 诱导细胞凋亡的研究

1.2.1 倒置显微镜下观察 常规培养瓶内培养 HT-29 细胞,倒置显微镜下连续性动态观察细胞生长情况。

1.2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡 细胞接种于置有盖玻片的 6 孔培养板中,贴壁后分为实验组和对照组,48h 后取出盖玻片,按 TUNEL 试剂盒说明进行处理。光镜下观测,胞核染色呈棕褐色被判为凋亡细胞,随机选取 5 个高倍镜( $\times 200$ )视野,每个视野计数 200 个细胞,凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 消化收集各实验组及对照组培养 48h 的细胞,离心、漂洗、过滤、固定,加入 RNase 及 PI 染色,上机检测。

### 1.3 凋亡相关基因 bcl-2、bax 的检测

细胞接种及分组同 TUNEL 法,48h 后漂洗、固定,滴加一抗(bcl-2、bax 抗体),以 PBS 代替一抗作为阴性对照,余步骤按 SP 试剂盒操作说明进行。每张玻片在 40  $\times 10$  高倍显微镜下观察,细胞染色呈棕褐色被判为阳性细胞,不染为阴性细胞。凋亡相关基因蛋白 bcl-2、bax 定位于胞浆和胞膜。每个视野下分别计算:表达率(%) = (阳性细胞数/细胞总数)  $\times 100\%$ ,每张涂片观察 5 个视野。

### 1.4 统计学处理

使用 SPSS10.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 Pae 对 HT-29 细胞凋亡的诱导作用

2.1.1 倒置显微镜下观察 对照组细胞生长旺盛,呈高折光率,胞体大。Pae 组细胞增殖减慢,随着药物浓度增大和时间延长,细胞逐渐变小、折光率减弱,部分脱落漂浮于培养瓶中,但细胞膜完整,最后裂解。

2.1.2 TUNEL 法 实验组凋亡细胞的棕褐色染色颗粒定位于细胞核内,染色阳性的细胞出现细胞核碎裂,核质固缩,细胞膜突出形成质膜小泡等凋亡细胞形态学变化(图略)。经 Pae 处理 48h, HT-29 细胞株的凋亡细胞数明显增加,差异均有显著性( $P < 0.01$ ),且 AI 与 Pae 浓度呈正相依赖关系,见表 1。

表 1 各组凋亡指数的比较

Pae(mg/L)	AI(%)
control	3.32 $\pm$ 0.41
15.63	8.16 $\pm$ 2.24 <sup>a</sup>
62.5	15.35 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>
250	23.70 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.01$  vs control

2.1.3 流式细胞仪检测 不同浓度的 Pae 作用于 HT-29 细胞 48h 后,细胞周期分布发生明显改变,表现为 S 期细胞比例上升, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期和 G<sub>2</sub>/M 期细

收稿日期:2005-11-29;修回日期:2006-03-27

作者单位:1. 430015 武汉,湖北省新华医院消化科;2. 武汉大学人民医院消化内科

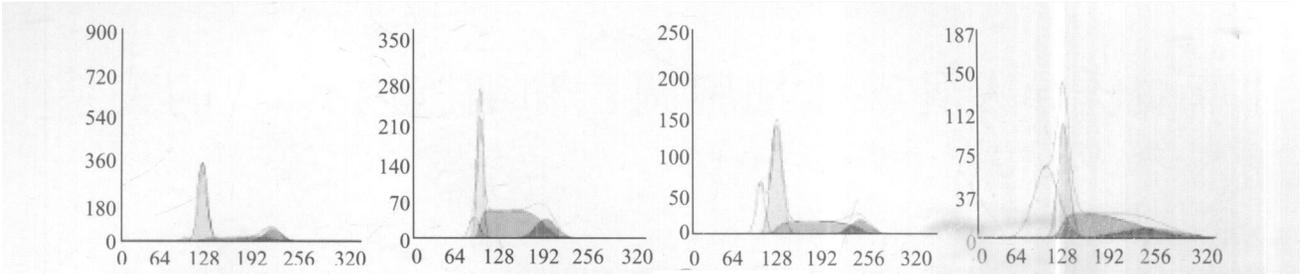


图 1a 对照组(0mg/L Pae) 图 1b 15.63mg/L Pae 组 图 1c 62.5mg/L Pae 组 图 1d 250mg/L Pae 组

图 1 流式细胞仪检测结果

胞比例下降,见表 2,并出现明显的凋亡峰,见图 1a ~ 1d。两组结果相比差异均有显著性( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Pae 对凋亡相关基因 bcl-2、bax 表达的影响 见表 3。

表 2 Pae 对 HT-29 细胞周期的影响

Pae (mg/L)	Apoptosis rate (%)	cell cycle (%)		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
control	2.3	61.3	20.3	18.4
15.63	7.6 <sup>b</sup>	28.1 <sup>b</sup>	55.8 <sup>b</sup>	16.1 <sup>a</sup>
62.5	16.2 <sup>b</sup>	50.7 <sup>b</sup>	35.8 <sup>b</sup>	13.5 <sup>b</sup>
250	34.5 <sup>b</sup>	38.0 <sup>b</sup>	45.6 <sup>b</sup>	16.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs control

表 3 Pae 对 HT-29 细胞 bcl-2、bax 基因表达的影响

Pae(mg/L)	bcl-2	bax
control	95.6 ±4.03	93.2 ±5.76
15.63	89.2 ±9.21 <sup>a</sup>	94.1 ±6.07
62.5	80.4 ±7.89 <sup>b</sup>	92.9 ±7.05
250	73.1 ±6.52 <sup>b</sup>	94.3 ±7.23

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs control

2.2.1 bcl-2 蛋白表达 对照组的 bcl-2 蛋白表达水平最高,胞浆染色细胞数最多并且呈深棕色,Pae 组细胞 bcl-2 表达均有下降,染色阳性细胞减少,染色明显变浅,且与药物浓度呈反比关系,各组结果与对照组相比均具有显著性差异( $P < 0.01$ ) (图略)。

2.2.2 bax 蛋白表达 阳性细胞胞浆、胞膜染成深棕色。Pae 组染色阳性细胞数及染色程度与对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ) (图略)。

### 3 讨论

细胞增殖过盛和凋亡抑制被认为是肿瘤发生、发展的关键<sup>[4]</sup>。众多研究业已表明,细胞凋亡的减少与大肠癌的发生、发展相关。多种化疗药物均可引起肿瘤细胞凋亡<sup>[5]</sup>。通过诱导凋亡治疗肿瘤是目前的一个热点<sup>[6]</sup>。本实验中 Pae 作用于大肠癌 HT-29 细胞,通过光镜可观察到典型的凋亡细胞形态学改变。TUNEL 法发现经 Pae 处理后大肠癌细胞的凋亡指数显著提高,且与 Pae 呈剂量依赖关系。流式细胞仪发现 Pae 作用后出现了明显的凋亡峰,

细胞周期分布也发生了明显变化,表明 Pae 对 HT-29 细胞周期分布的影响主要是阻滞细胞周期中 S 期向 G<sub>2</sub>/M 期的转变过程,减少有丝分裂,并引起细胞凋亡。证实 Pae 作用于 HT-29 细胞的作用机制与诱导该细胞株凋亡及影响其细胞周期分布有关。

细胞凋亡是多基因调控的程序化过程。通过研究其分子调控机制,将对有计划地诱导肿瘤细胞凋亡产生重要的指导作用<sup>[7]</sup>。与细胞凋亡相关的基因大致有 bcl-2 家族、p53、Fas、c-myc、k-ras 等,其中 bcl-2 是凋亡调控的中心环节。体外实验表明,去除了生长因子后,正常细胞便逐渐转向凋亡;而当 bcl-2 过度表达时,这一凋亡现象便被抑制<sup>[8]</sup>。由此可见,bcl-2 可通过抑制凋亡延长细胞寿命,产生细胞过度增殖和堆积,在肿瘤发生中起启动作用。bax 基因是近年来新发现的一种凋亡促进基因,属 bcl-2 同一家族<sup>[9]</sup>。bax 基因的作用与 bcl-2 相反,其单体以及 bax/bax 形式的同源二聚体均有促凋亡作用。bax 又可与 bcl-2 形成异源二聚体,抑制后者的功能促进凋亡。近期研究表明,bcl-2 家族中促凋亡和抗凋亡蛋白之间的平衡在调节促凋亡因子 c-myc 从线粒体的释放起着重要的作用<sup>[10]</sup>。bcl-2/bax 两蛋白之间的比例是细胞凋亡发生与否的关键因素<sup>[11]</sup>。本实验发现,Pae 能明显下调大肠癌 HT-29 细胞 bcl-2 基因的表达,而 bax 在 Pae 作用后与对照组相比表达率无明显差异,故可认为经 Pae 作用后是通过 bcl-2/bax 比例的下降,从而诱导大肠癌细胞的凋亡。

综上所述,本实验研究发现中药丹皮酚在一定的浓度范围内能显著下调人大肠癌 HT-29 细胞 bcl-2/bax 的比例,因此,丹皮酚的抑瘤机制之一可能是通过作用于 bcl-2 和 bax 基因来诱导肿瘤细胞的凋亡。

#### 参考文献:

[1] Litvak DA, Bilcbik AF, Cabot MC. Modulators of Ceramide Metabolism Sensitize Colorectal Cancer Cells to Chemotherapy: A Novel Treatment Strategy [J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(1):140-148.

(下转第 71 页)

到的凋亡率,与检测反映早期凋亡特征的细胞膜外翻的磷脂酰丝氨酸的 Annexin V 流式细胞仪法、以及高灵敏度检测中、晚期凋亡的特征即凋亡细胞 DNA 断裂的 TUNEL 法所得的结果有明显的一致性。结果显示,三种方法测定的在同等甘草酸浓度作用下的凋亡率基本相等,这可能反映甘草酸诱导凋亡细胞发生 DNA 断裂的速率很快。另外,甘草酸诱导 MCF-7 细胞凋亡的凋亡率,只略低于相应甘草酸浓度作用的细胞增殖抑制率,可见甘草酸诱导凋亡的作用在抑制 MCF-7 细胞增殖中起重要作用。目前,多数文献<sup>[3,4]</sup>报道细胞内  $Ca^{2+}$  水平升高与诱发细胞凋亡密切相关,而 Kluck 等<sup>[5]</sup>和 Bansal 等<sup>[6]</sup>用 EGTA 等  $Ca^{2+}$  络合剂处理 NS-1 鼠骨髓瘤细胞和 CEM-C7 人 T 淋巴细胞,发现  $[Ca^{2+}]_i$  下降伴随细胞凋亡发生,他们认为  $[Ca^{2+}]_i$  下降抑制 DNA 和蛋白质合成,影响许多  $Ca^{2+}$  依赖性的蛋白质活性、细胞活动和基因表达等。本研究结果显示甘草酸诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡组的细胞内  $Ca^{2+}$  水平明显低于对照组,这一结果与 Kluck 等<sup>[5]</sup>和 Bansal 等<sup>[6]</sup>报道相符,我们推测甘草酸诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡可能与细胞内  $Ca^{2+}$  水平降低有关。但是通过细胞内  $Ca^{2+}$  螯合剂 BAPTA-AM 络合细胞内游离  $Ca^{2+}$  而减弱 18-甘草次酸对 MCF-7 细胞凋亡

的诱导作用,这表明甘草酸诱导 MCF-7 凋亡并不全依赖于细胞内  $Ca^{2+}$  水平下调,可能还与其他诱导癌细胞凋亡的信息传递途径有关,具体甘草酸诱导肿瘤细胞凋亡的机制尚有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Malagoli M, Castelli M, Baggio A, et al. Effect of glycyrrhizin and its diastereoisomers on the growth of human tumor cells: Preliminary finding [J]. *Phytother Res*, 1998, 12 (1): S95-S97.
- [2] 黄炜,黄济群,张东方,等. 全反式维甲酸、18-甘草次酸和甘草酸诱导人肝癌细胞分化和凋亡的研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2003, 13 (3): 148-150.
- [3] Gryniewicz G, Poene M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260 (3): 3440-3450.
- [4] Mattana A, Tozzi MG, Costa M, et al. By releasing ADP, *Acanthamoeba castellanii* causes an increase in the cytosolic free calcium concentration and apoptosis in wish cells [J]. *Infect Immun*, 2001, 69 (6): 4134-4140.
- [5] Kluck RM, McDougall CA, Harmon BV, et al. Calcium chelators induce apoptosis—evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1223 (2): 247-254.
- [6] Bansal N, Houle AG, Melnykovich G. Dexamethasone-induced killing of neoplastic cells of lymphoid derivation: lack of early calcium involvement [J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143 (1): 105-109.

[编辑:刘红武]

(上接第 69 页)

- [2] 孙国平,沈玉先,张玲玲,等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19 (2): 160-162.
- [3] 计春燕,谭诗云,刘长青. 丹皮酚抑制人大肠癌细胞增殖及其与化疗药物的协同作用[J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32 (9): 513-515.
- [4] Tin Oo Khor, Yunus A Gul, Hairuzah Ithnin, et al. Positive correlation between overexpression of phospho-BAD with phosphorylated Akt at serine 473 but not threonine 308 in colorectal carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2004, 210 (1): 139-150.
- [5] Coter TG, Glynn JM, Echeverri F, et al. The induction of Apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phase of the cell cycle[J]. *Anticancer Res*, 1992, 12 (1): 773.
- [6] Dong J T, Luo X M. Effects of arsetic on DNA damage and repair in human fatllung fibroblasts[J]. *Mutation Res*, 1994, 321 (1): 111.
- [7] Qi-Long LU, Richard P, Leslie W, et al. Bcl-2 expression in ar-

dult and embryonic non-haematopoietic tissues[J]. *J Pathol*, 1993, 200 (1): 360.

- [8] Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, et al. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurous by the bcl-2 proto-oncogene[J]. *Science*, 1992, 258 (1): 302-304.
- [9] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: aibiters of cell suivival[J]. *Science*, 1998, 281 (1): 1322-1326.
- [10] J B Tuynman, M P Peppelenbosch, D J Richel. COX-2 inhibition as a tool to treat and prevent colorectal cancer[J]. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*[J]. 2004, 52 (1): 81-101.
- [11] Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391 (1): 496-499.

[编辑:刘红武]