

澳洲茄碱诱导胆管癌 QBC939 细胞凋亡及作用机制

严展鹏^{1,2}, 王晓松³, 徐婷婷^{1,2}, 安振涛^{1,2}, 张秀华³, 朱方石^{1,2*}

¹南京中医药大学附属中西医结合医院; ²江苏省中医药研究院; ³南京医科大学第二附属医院, 南京 210028

摘要: 研究澳洲茄碱对人胆管癌上皮细胞系 QBC939 凋亡的诱导与作用机制。采用 MTT 法检测不同浓度澳洲茄碱对 QBC939 细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测澳洲茄碱对 QBC939 细胞的凋亡诱导情况; Western blot 检测澳洲茄碱对 QBC939 细胞中凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、caspase3、caspase7、PARP、cleaved PARP)的表达影响。结果发现澳洲茄碱以浓度依赖方式能够抑制 QBC939 细胞的增殖; 澳洲茄碱能够显著诱导 QBC939 细胞的凋亡; 澳洲茄碱可以上调 Bax、caspase3、caspase7 和 cleaved PARP 蛋白表达, 下调 Bcl-2 和 PARP 蛋白表达。表明澳洲茄碱能够通过改变凋亡相关蛋白表达, 诱导胆管癌 QBC939 细胞的凋亡, 这对于研发和治疗胆管癌相关药物具有一定的潜在价值。

关键词: 澳洲茄碱; 胆管癌; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.004

Apoptosis-inducing Effects of Solasonine on Human Cholangiocarcinoma Epithelial QBC939 Cells and Its Mechanism

YAN Zhan-peng^{1,2}, WANG Xiao-song³, XU Ting-ting^{1,2}, AN Zhen-tao^{1,2}, ZHANG Xiu-hua³, ZHU Fang-shi^{1,2*}

¹*Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of*

Chinese Medicine; ²*Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine;*

³*Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210028, China*

Abstract: This study focused on investigating the effect of solasonine on human cholangiocarcinoma epithelial QBC939 cells via inducing apoptosis and related mechanisms. MTT assay was used to detect the inhibition effect of solasonine on QBC939 cell proliferation, flow cytometry was applied to detect QBC939 cells apoptosis induced by solasonine, Western blot was used to detect the expression changes of apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, caspase3, caspase7, XIAP, PARP, cleaved PARP) induced by solasonine in QBC939 cells. The results showed that solasonine can inhibit the proliferation of QBC939 cells in a dose-dependent manner significantly, solasonine can induce apoptosis of QBC939 cells obviously, and solasonine can increase protein expression level of Bax, caspase3, caspase7 and cleaved PARP and decrease the protein expression level of Bcl-2, XIAP and PARP. Those results suggested that solasonine can induce apoptosis of cholangiocarcinoma QBC939 cells significantly by changing the expression of apoptosis-related protein, which had the potential to be the drug candidate for the treatment of human cholangiocarcinoma in future.

Key words: solasonine; cholangiocarcinoma; apoptosis

胆管癌是一种消化道恶性肿瘤, 放化疗不敏感和术后生存率比较低是目前治疗胆管癌的重要困难之处, 所以需求确切有效的治疗方法具有重要的临床价值^[1]。澳洲茄碱是一种来源于药用植物龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 的糖苷生物碱, 具有抗肿瘤的作用, 有望成为一种有效的抗肿瘤药物^[2]。然而澳

洲茄碱在胆管癌中的研究还没有涉及, 本文在体外研究了澳洲茄碱对人胆管癌上皮细胞 QBC939 增殖和凋亡的影响, 旨在为澳洲茄碱的抗肿瘤作用的临床应用提供新的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌上皮细胞株 QBC939 为南京医科大学第二附属医院惠赠; 澳洲茄碱 (纯度 ≥ 94.89%, 纯化方式: HPLC) 购自成都曼思特生物科技有限公司;

收稿日期: 2017-01-23 接受日期: 2017-02-27

基金项目: 江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划 (2014965); 南京市医学科技发展计划 (YKK14176)

* 通讯作者 Tel: 86-25-52362761; E-mail: zhufangshi@126.com

RPMI 1640 培养基、FBS(胎牛血清)、双抗和胰酶均购自美国 Gibco 公司;MTT(噻唑蓝)购自碧云天生物技术公司;DMSO(二甲基亚砷)购自美国 Sigma 公司;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;Bax、Bcl-2、caspase3、caspase7、XIAP、PARP 和 cleaved PARP 兔抗人抗体均购自美国 CST 公司;羊抗兔二抗购自美国 KPL 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

QBC939 细胞用含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基培养,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 的细胞培养箱中培养,细胞长满培养皿底部后,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,传代后选用对数生长期的细胞进行细胞实验研究。

1.2.2 细胞活力检测

将对数生长期的 QBC939 细胞接种在 96 孔的培养板中,每孔 10^4 个细胞,置于细胞培养箱中,待细胞完全贴壁后,完全弃去培养基,加入不同浓度的含澳洲茄碱(0、10、20、30、40、50、60、70 μM)的培养基,每组设 3 个重复孔,培养 24 h 后每孔加入 10 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,弃去上清,加入 100 μL 的 DMSO,室温震荡 15 min,全波长酶标仪(瑞士 Tecan 公司)检测培养板在 570 nm 和

630 nm 处的吸光值,利用检测波长 570 nm 处的数据计算各组的细胞活力。

1.2.3 流式细胞术检测凋亡

将处于对数期生长的 QBC939 细胞铺在 6 孔板中,每孔 3×10^5 个细胞,放置在细胞培养箱中培养,待细胞完全贴壁后弃去培养基,加入含有不同浓度澳洲茄碱(0、10、20、30、40、50 μM)的培养基,作用 24 h 后,弃去上清液,PBS 洗 2 遍,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,收集细胞,加入 100 μL 的 Binding buffer 重悬细胞,加入 5 μL 的 AnnexinV 和 5 μL 的 PI 染料后充分混匀,室温避光孵育 15 min,加入 400 μL 的 Binding buffer,流式细胞仪(美国 Millipore 公司)检测分析。

1.2.4 蛋白杂交

将处于对数期生长的 QBC939 细胞铺在 6 孔板中,每孔 3×10^5 个细胞,放置在细胞培养箱中培养,待细胞完全贴壁后弃去培养基,加入含有不同浓度澳洲茄碱(0、10、20、30、40、50 μM)的培养基,作用 24 h 后,弃去上清液,预冷的 PBS 洗 2 遍,每孔加入 100 μL 含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 PIPA 裂解液,在冰上作用 5 min,收集细胞,12000 $\times g$ 离心 10 min 后吸取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各组样本蛋白浓度,调整蛋白浓度一致后与等体积 sample buffer 混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

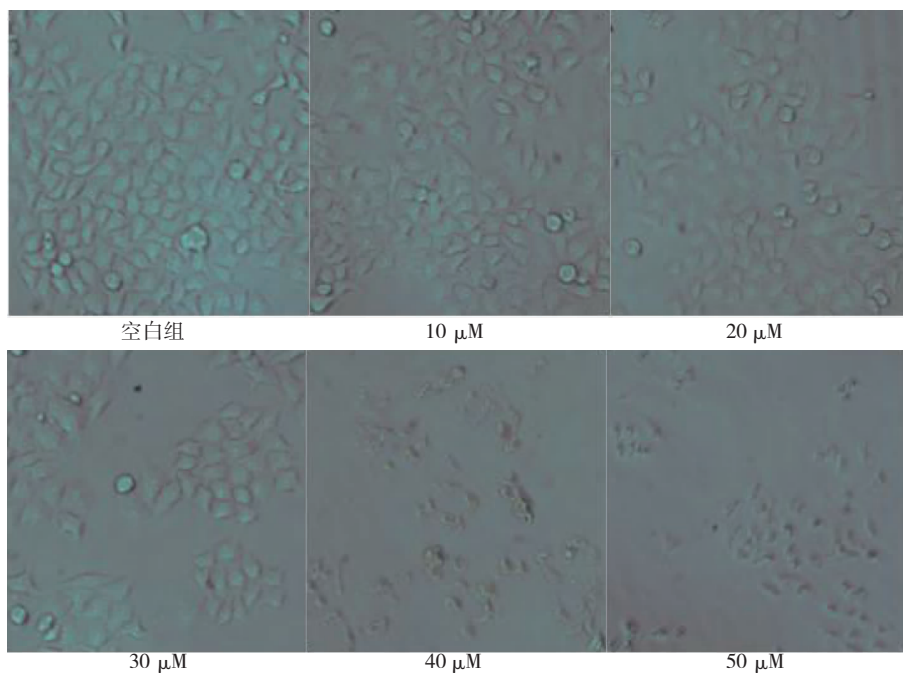


图 1 澳洲茄碱对胆管癌细胞形态的影响(200 \times)

Fig. 1 Effect of solasonine on cell morphology(200 \times)

所有蛋白样本进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12% 分离胶和 4% 浓缩胶),将蛋白转印到 PVDF 膜上,用含有 5% 脱脂奶粉的 TBS 进行封闭,一抗孵育 4 ℃ 过夜, TBST 洗 3 次,二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,在远红外检测器(美国 LICON 公司)中扫描成像。

1.2.5 数据统计

实验中所有数据均用 Mean ± SD 表示,多组之间的差异用 ONE WAY ANOVA 方法,两组之间的差异用 Student's T Test 方法。P < 0.05 (*) 表示差异显著, P < 0.01 (**) 表示差异极其显著。实验数据均采用 SPSS16.0 软件处理,实验图形均采用 Graph-Pad Prism5 软件处理。

2 实验结果

2.1 澳洲茄碱对胆管癌细胞形态的影响

利用不同浓度(0、10、20、30、40、50 μM)的澳洲茄碱处理胆管癌细胞 QBC939,24 h 后相差显微镜下观察并拍照。空白组细胞形态正常,紧密贴在培养板底部,呈现多边形状态,然而随着澳洲茄碱浓度的上调,细胞的形态变得越来越不规则,细胞贴壁的能力大大减弱,出现了细胞凋亡小体的结构(图 1)。这说明澳洲茄碱能够明显影响胆管癌细胞系 QBC939 的细胞活力和形态。

2.2 澳洲茄碱对胆管癌细胞活力的影响

利用不同浓度(0、10、20、30、40、50 μM)的澳洲

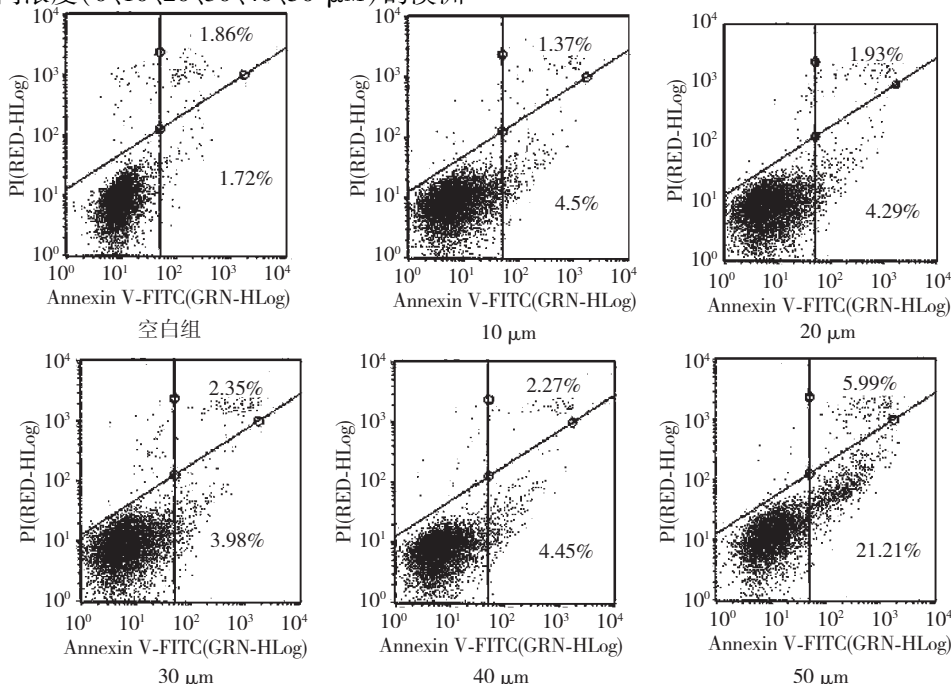


图 3 澳洲茄碱对 QBC939 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of solasonine on apoptosis of QBC939 cells

茄碱处理胆管癌细胞 QBC939,24 h 后加入 MTT,检测澳洲茄碱对 QBC939 细胞活力的影响。如图 2 所示,随着澳洲茄碱浓度的上升,胆管癌细胞的活力呈现迅速下调的趋势,通过计算澳洲茄碱对 QBC939 细胞的 IC₅₀(半抑制浓度)是 52 μM,这说明澳洲茄碱能够抑制 QBC939 细胞活力,诱导细胞的死亡,然而细胞究竟是通过什么方式进行的死亡,还需待进一步的研究。

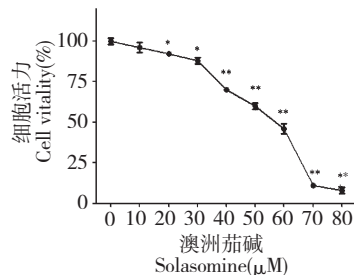


图 2 澳洲茄碱对 QBC939 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of solasonine on vitality of QBC939 cells

2.3 澳洲茄碱对胆管癌细胞凋亡的影响

利用不同浓度(0、10、20、30、40、50 μM)的澳洲茄碱处理胆管癌细胞 QBC939,24 h 后利用凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡程度。如图 3 所示,随着药物澳洲茄碱浓度的上调,细胞凋亡率也相应出现了上升,依次为 2.58%、5.87%、6.22%、6.33%、6.72% 和 27.20% (包括前期凋亡和后期凋亡),尤

其是澳洲茄碱在 50 μM 时,胆管癌细胞 QBC939 的凋亡率出现了很大程度的上调。这说明澳洲茄碱具有诱导胆管癌细胞 QBC939 细胞凋亡的作用。

2.4 澳洲茄碱对胆管癌细胞凋亡相关蛋白的影响

利用不同浓度(0、10、20、30、40、50 μM)的澳洲茄碱处理胆管癌细胞 QBC939,24 h 后提取总蛋白,进行蛋白杂交实验检测凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、caspase3、caspase7、PARP、cleaved PARP)的表达情况。研究发现澳洲茄碱可以上调 Bax、caspase3、caspase7 和 cleaved PARP 的蛋白表达,下调 Bcl-2 和 PARP 的蛋白表达(图 4)。这说明澳洲茄碱可以通过改变凋亡相关蛋白,上调诱导凋亡的蛋白和下调抑制凋亡的蛋白的表达,从而导致胆管癌 QBC939 细胞的凋亡。

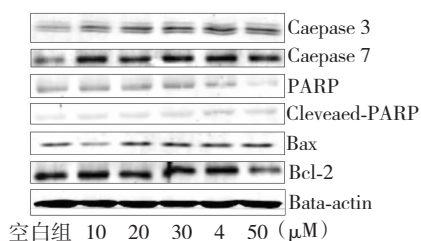


图 4 澳洲茄碱对胆管癌细胞凋亡相关蛋白的影响

Fig. 4 Effect of solanone on apoptosis-related proteins of cholangiocarcinoma cells

3 讨论

胆管癌是一种恶性的消化道肿瘤,临床上的治疗方法主要是手术切除和化疗,其效果不佳,且复发率比较高^[1,3]。因此,寻求有效的治疗药物是现代医学治疗胆管癌的难点之一。近年来,中医药在抗肿瘤的治疗中扮演着越来越重要的角色^[2,4]。龙葵是一种药用植物,其味苦性寒,有小毒,具有清热解毒、利尿消肿的功效,可以治疗咽喉肿痛、小便不利等症状^[5]。随着天然产物化学的发展,科学家们从龙葵中分离出来了澳洲茄碱、澳洲茄胺、澳洲茄边碱和龙葵碱等具有生物活性的单体化合物,为研究龙葵提供了方便^[6]。现代药理学研究表明龙葵具有抗炎、抗肿瘤的作用^[5]。澳洲茄碱是来自龙葵的一种重要的甾体生物碱,其对肺癌具有抑制作用,能够诱导肺癌细胞的凋亡^[7-9]。然而澳洲茄碱对胆管癌的药理作用至今还没有进行研究,本文在前人的基础上研究了龙葵中生物碱澳洲茄碱对胆管癌细胞系 QBC939 的抑制作用及其机制。

通过利用不同浓度的澳洲茄碱处理胆管癌 QBC939 细胞 24 h,显微镜观察发现澳洲茄碱能够影响细胞的形态,减弱细胞附着的能力,减少细胞生长的数量(图 1)。通过 MTT 检测细胞活力发现,澳洲茄碱能够减少细胞活力,通过计算,其 IC_{50} 是 52 μM (图 2)。细胞凋亡是细胞死亡的一种重要方式,其在组织的更新换代以及肿瘤形成过程中发挥着重要的作用^[10]。肿瘤微环境中抑制细胞凋亡的因素出现上调,从而能够解除机体对肿瘤细胞的控制,导致肿瘤的形成,因此诱导细胞凋亡是抗肿瘤的重要方式之一^[11]。本研究利用流式细胞仪检测了澳洲茄碱处理的胆管癌 QBC939 细胞凋亡的情况,结果发现,澳洲茄碱能够明显诱导胆管癌细胞的凋亡(图 3)。细胞凋亡是由多种蛋白参与的复杂有序的死亡过程,Bcl-2 家族、caspase 家族和抑癌基因 p53 等都参与了凋亡过程^[12,13]。本研究利用 Western blot 技术检测 Bax、Bcl-2、caspase3、caspase7 和 PARP 等蛋白的表达情况,研究发现澳洲茄碱能够上调 Bax、caspase3、caspase7 和 cleaved PARP 的蛋白表达,下调 Bcl-2 和 PARP 的蛋白表达(图 4)。这说明澳洲茄碱能够通过影响凋亡相关蛋白诱导胆管癌 QBC939 细胞凋亡,从而达到抑制胆管癌的作用。

综上所述,澳洲茄碱能够通过诱导胆管癌细胞的凋亡,从而表现出抑制胆管癌细胞增殖的作用,澳洲茄碱有望成为临床上治疗胆管癌的有效药物,然而关于澳洲茄碱诱导凋亡的机制以及抗胆管癌的药理作用还需进一步的研究。

参考文献

- 1 Wu W(吴伟),Gong JP(龚建平). Current understand and the research progress of treatment of cholangiocarcinoma. *Chin J Gastroenterol Hepatol* (胃肠病学和肝病学杂志), 2015,24:1270-1274.
- 2 He J(赫军),Zhou CD(周畅钧),Ma BZ(马秉智),et al. Research progress of chemical constituents and antitumor pharmacological activity of *solanumnigrum* L. *China Pharm* (中国药房),2015,26:4433-4436.
- 3 Esnaola NF,Meyer JE,Karachristos A,et al. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepaticcholangiocarcinoma. *Cancer*,2016,122:1349-1369.
- 4 Zhao ZL(赵治龙),Geng Y(耿耘). Discussion on Chinese medicine treatment of cholangiocarcinoma. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine* (中华中医药学刊),2014,32:262-263.