

Tagitinin D 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制研究

杨 珊¹, 韦睿然¹, 陈远志², 杨 旭², 王 娟², 杨杏芝², 何志旭^{1*}, 丁 骁^{2*}¹贵州医科大学基础医学院 免疫学教研室组织工程与干细胞中心, 贵阳 550004;²中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

摘要: 菊科植物肿柄菊中富含 tagitinin D, 该化合物具有较强的抑制肿瘤细胞的作用。本文研究了 tagitinin D 诱导 HepG2 细胞凋亡的作用机制。采用克隆形成实验检测细胞成瘤能力、流式细胞仪测细胞周期及凋亡, DCFH-DA 探针测活性氧的水平及 Western blot 检测 ER stress 相关蛋白表达。结果表明, tagitinin D 抑制细胞成瘤, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期, 诱导细胞凋亡, 使细胞内 ROS 积累, 增加了 ER stress 伴侣蛋白 PDI、Calnexin、Ero1-L α 、Bip 的表达并激活了 IRE1 α 和 PERK 信号通路。综上所述 tagitinin D 依赖于 ROS 途径激活 ER stress 诱导细胞凋亡。

关键词: tagitinin D; ROS; 凋亡; ER stress 信号通路

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)3-0359-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.3.001

The mechanism of tagitinin D-induced apoptosis in HepG2 cells

YANG Shan¹, WEI Rui-ran¹, CHEN Yuan-zhi²,
YANG Xu², WANG Juan², YANG Xing-zhi², HE Zhi-xu^{1*}, DING Xiao^{2*}

¹Department of Immunology, Basic Medical College, Tissue Engineering and Stem Cell
Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

²State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China,
Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: Tagitinin D was identified as one of the main compounds present in Asteraceae, which exhibited anti-tumor activities. To explore the mechanism of apoptosis in HepG2 cells induced by tagitinin D, colony formation assay was used to detect the cell proliferation ability. Then the cell cycle and apoptosis were checked by flow cytometry, and the changes of reactive oxygen species (ROS) levels was detected by DCFH-DA, and ER stress-related protein expression levels were determined using Western blot assay. The results showed that tagitinin D increased ROS levels, inhibited the cell proliferation, arrested the cell cycle in the G2/M phase, and induced apoptosis in HepG2 cells. ER stress signaling pathway related protein levels such as PDI, Calnexin, Ero1-L α , Bip, IRE1-L α , and p-eIF2 α are increased. In summary, all the data suggested tagitinin D induced ROS which further elicited ER stress response and led to apoptosis in HepG2 cells.

Key words: tagitinin D; ROS; apoptosis; ER stress signaling pathway

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 肝癌已成为中国发病率和死亡率较高的癌症, 是全球癌症死亡的第三大原因^[1,2]; 肝癌的治疗包括外科手术、介入治疗、化学疗法和肝移植, 但治疗效果并不理想^[3]。尽管化学疗法极大地提高了患者的生存率, 但严重的毒副作用阻碍了抗癌药物的治

疗效果^[4]。寻找对肿瘤细胞具有抑制作用的天然小分子化合物, 是抗癌药物发现的重要来源。

Tagitinin D (图 1) 属于倍半萜内酯类天然小分子化合物^[5], 在菊科植物中大量存在。Tagitinin D 类化合物具有抗肿瘤^[6]、细胞毒性^[7]、抗炎^[8]、抗菌^[9]、抗真菌^[10]特性。据报道 tagitinin D 的类似物 tagitinin A 和 tagitinin C 能减少种子发芽和幼苗生长^[11]; tagitinin C 也具有多种生物活性, 包括抗癌作用, 且 tagitinin C 衍生物具有作为癌症治疗的巨大潜力^[12]。但是对 tagitinin D 的生物活性研究较少。

收稿日期: 2019-12-24 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 国家自然科学基金 (81703393)

* 通信作者 Tel: 86-018487336458; E-mail: dingxiao@mail.kib.ac.cn,
hzx@gmc.edu.cn

本论文用人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,探讨 tagitinin D 对肝癌细胞的增殖、凋亡的影响,并检测 ER stress 信号通路相关蛋白的变化,探究其抑制肿瘤的可能机制,为开发利用其药用价值提供科学依据。

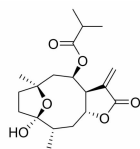


图1 Tagitinin D 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of tagitinin D

1 材料与仪器

1.1 受试细胞株

人肝癌 HepG2 细胞株由中国科学院昆明植物研究所活性筛选中心孔清华老师惠赠。

1.2 主要试剂

Tagitinin D, 购于云南西力生物技术有限公司, 纯度 99%, 碘化丙啶 PI、溴化四氮唑蓝 MTT (Bio-sharp 生物公司), Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(四正柏生物), 二甲基亚砜 DMSO (天津市飞船化学试剂科技有限公司), 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗(青霉素 10 000 U/mL、链霉素 10 mg/mL) (GIBCO), 抗体: Actin、PDI、Calnexin、Bip、Ero1-L α 、IRE1 α 、p-eIF2 α (CST)。

1.3 主要仪器

BD FACS Celesta3 激光流式细胞仪; 成像型微孔板检测仪 (BioTek Cytation1); 全自动化学发光图像分析系统 (tanon5200); 立式自动压力蒸汽灭菌器 (GR60DR); 1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜 (Thermo); SCIOGEX 离心机 (CF1524R)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

用含 10% 的 FBS (胎牛血清)、1% 双抗 (青霉素 10 000 U/mL、链霉素 10 mg/mL) 的高糖 DMEM 培养基培养 HepG2 细胞, 放置在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 取对数生长期且细胞状态良好的细胞用于后续实验。

2.2 检测人肝癌 HepG2 细胞活力

采用溴化四氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力^[13]。取对数生长期细胞, 胰酶消化后吹打呈单细胞悬液将其接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度 tagitinin D, 每个浓度作 4 个复孔, 置培养箱中 72 h, 弃上清, 每孔中加入 100 μ L MTT 溶

液 (5 mg/mL), 放入培养箱中继续培养 4 h, 弃上清后再加入 100 μ L DMSO, 用多功能酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的吸光度 (OD 值), 按下列公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{处理组平均 OD 值}}{\text{对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

2.3 克隆形成实验

取对数生长期细胞胰酶消化后呈单细胞悬液, 用细胞计数板计数, 按 300 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 tagitinin D (1 和 2 μ M), 继续培养 12 天, 弃培养基, PBS 洗三遍, 每孔加入考马斯亮蓝 R250 (2.5 mg/mL) 1 mL 染色 2 h, 弃染色液, PBS 洗三遍, 拍照。

2.4 细胞周期检测

取对数生长期细胞胰酶消化后呈单细胞悬液, 接种于 6 孔板, 待细胞长到 80% 左右, 加入不同浓度 tagitinin D 处理 12 h, 收集细胞制成单细胞悬液, 70% 乙醇 4 °C 过夜, PBS 洗一遍, 加入 500 μ L PBS 重悬细胞, 加入 20 μ L RNase, 放 37 °C 孵育 30 min, 再加入 50 μ L PI, 冰上放置 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

2.5 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞制呈单细胞悬液, 接种于 6 孔板, 待细胞长到 80% 左右, 加入 tagitinin D 20 μ M 处理不同时间 (24、48、72 h), 收集细胞制成单细胞悬液, PBS 洗一遍, 按凋亡试剂盒说明书加入试剂, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 检测活性氧的变化

取对数生长期细胞制呈单细胞悬液, 接种于 6 孔板, 待细胞长到 80% 左右, 加入不同浓度 tagitinin D 处理 12 h, 弃培养基, 加入无血清培养基 2 mL, 再加入 DCFH-DA (20 μ M), 室温孵育 15 min, 弃培养基, 加入 PBS 洗三遍, 拍照, 再收集细胞用流式细胞仪检测荧光强度。

2.7 Western blot 检测 ER stress 相关蛋白表达

取对数生长期细胞制呈单细胞悬液, 接种于 6 孔板, 待细胞长到 80% 左右, 加入 tagitinin D 6 μ M 处理不同时间 (12、24、36 h), 收集细胞制作蛋白样本。10% 聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温 2 h, PBST 洗涤 3 次, 加化学发光液放入全自动化学发光图像分析系统中曝光。

2.8 统计学分析

实验重复 3 次且每组至少 3 个复孔,用 Graph-Pad Prism 7 软件进行统计分析处理,结果以均值 ± 标准差表示,用 *t* 检验进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 Tagitinin D 对人肝癌 HepG2 细胞活力的影响

用 MTT 法检测 tagitinin D 对 HepG2 细胞活力的影响,加入不同浓度 tagitinin D 处理细胞 72 h,用酶标仪检测吸光度值,计算出 tagitinin D 作用于 HepG2 细胞的活力及 IC_{50} 值 = $7.79 \pm 0.58 \mu M$,如图 2 所示,说明 tagitinin D 能抑制 HepG2 细胞活力。

3.2 Tagitinin D 对 HepG2 细胞体外成瘤能力的抑制

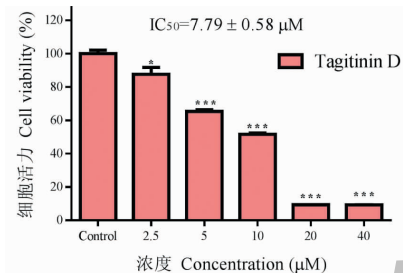
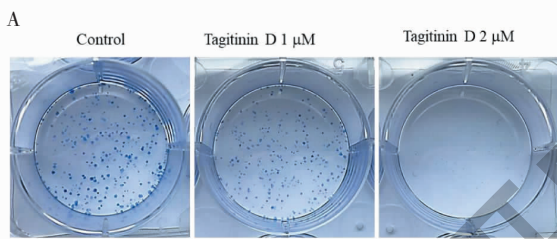


图 2 Tagitinin D 抑制 HepG2 细胞活力

Fig. 2 Tagitinin D inhibited cell viability of HepG2 cells

Tagitinin D 不同浓度 (1 和 2 μM) 作用于 HepG2 细胞 12 天后,两个处理组克隆球的数量和大小明显低于对照组 (图 3A),说明 tagitinin D 能显著抑制肿瘤细胞体外成瘤能力。

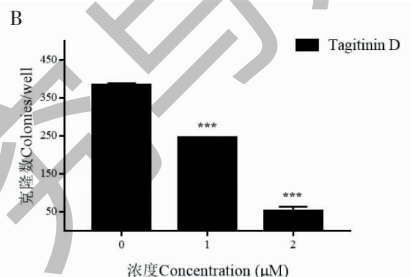


图 3 Tagitinin D 对 HepG2 细胞体外成瘤能力的影响

Fig. 3 Tagitinin D inhibited the colony formation ability of HepG2 cells

3.3 Tagitinin D 使人肝癌 HepG2 细胞周期阻滞在 G2/M 期

用流式细胞仪检测 tagitinin D 对 HepG2 细胞周期的影响,如图 4A 所示;tagitinin D 处理组细胞的 S

期比例由 26.1% 下降到 17.2%,G2/M 期比例由 28.9% 升高至 42.8%,说明 tagitinin D 处理可将大部分细胞阻滞在 G2/M 期。

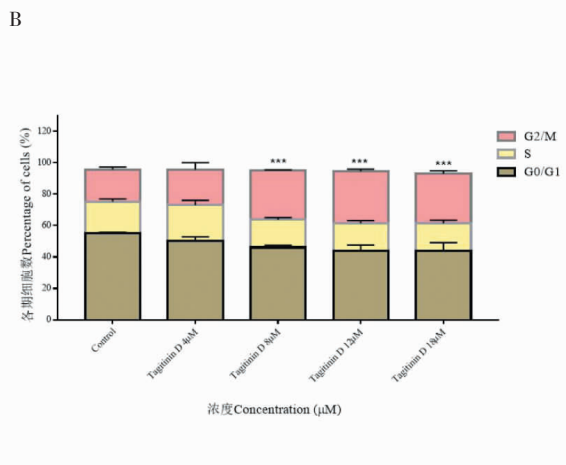
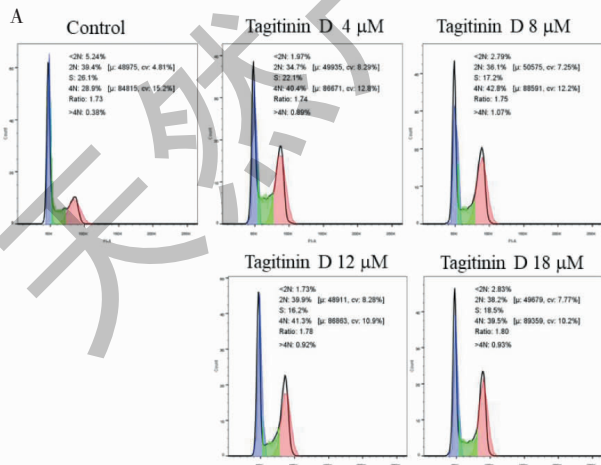


图 4 Tagitinin D 对 HepG2 细胞周期的影响

Fig. 4 Tagitinin D induced cell cycle arrest at the G2/M phase in HepG2 cells

3.4 Tagitinin D 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡

用流式细胞仪检测 tagitinin D 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡,如图 5A 所示,当处理浓度为 20

μM ,处理时间为 24、48、72 h 细胞凋亡率(早期凋亡+晚期凋亡)分别为 22%、59.7%、96.6%;说明 tagitinin D 促进细胞凋亡是时间依赖的。

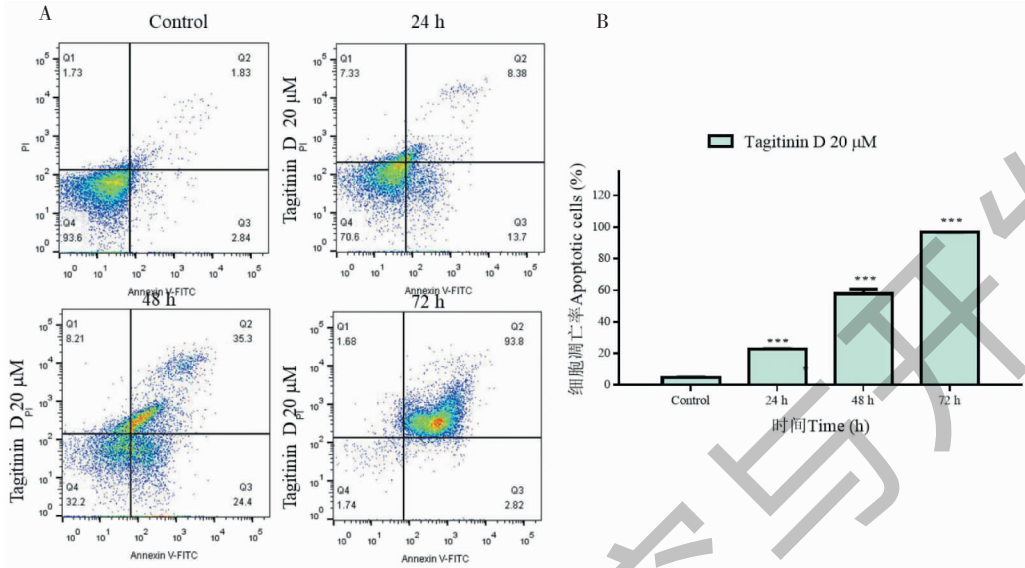


图 5 Tagitinin D 促进 HepG2 细胞凋亡

Fig. 5 Tagitinin D induced apoptosis of HepG2 cells in a time-dependent manner

3.5 Tagitinin D 增加人肝癌 HepG2 细胞内活性氧

3.5.1 Tagitinin D 和 NAC 联用使人肝癌 HepG2 细胞活力回复

为研究 tagitinin D 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用途径,加入活性氧(reactive oxygen species,

ROS)清除剂 NAC 和泛 caspases 抑制剂 Z-VAD-FMK 与 tagitinin D 联合处理,如图 6 所示:加入 Z-VAD-FMK,细胞活力没有回复;加入 NAC 后,细胞活力明显回复。以上结果说明 tagitinin D 降低肿瘤细胞活力是依赖于 ROS 途径的。

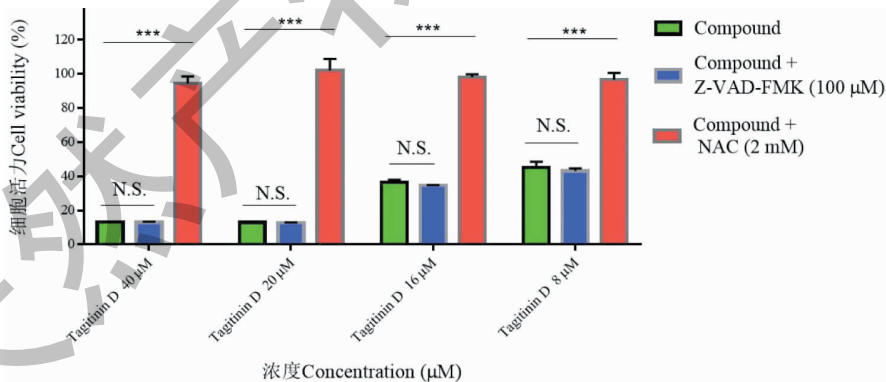


图 6 Tagitinin D 和 NAC 联用使人肝癌 HepG2 细胞活力回复

Fig. 6 The cell death induced by tagitinin D can be rescued by the ROS scavenger, NAC

3.5.2 DCFH-DA 检测人肝癌 HepG2 细胞内活性氧变化

用探针 DCFH-DA 检测细胞内源性活性氧的累积。如图 7 所示,随着 tagitinin D 处理浓度增加,荧光强度逐渐增强(图 7A)及平均荧光强度增加(图

7B);加 NAC 后,荧光强度有所回复;说明 tagitinin D 能显著引起细胞内源性 ROS 的增加。

3.6 Tagitinin D 对人肝癌 HepG2 细胞 ER stress 相关蛋白的影响

ER stress 作为 ROS 的下游,并且持续、强烈的

ER stress 能显著促进细胞凋亡。既然 tagitinin D 促进细胞凋亡依赖于 ROS,且不依赖于 caspases 途径,因此检测 tagitinin D 对 ER stress 的影响是必要的。如图 8 所示,tagitinin D 处理组浓度 6 μM ,随着处理

时间的变化,ER stress 相关蛋白 PDI、Ero1-L α 、Calnexin、Bip、IRE1 α 、p-eIF2 α 表达水平升高,表明 tagitinin D 是通过增加 ROS 引起 ER stress 并激活 IRE1 α 和 PERK 信号通路进而诱导细胞凋亡。

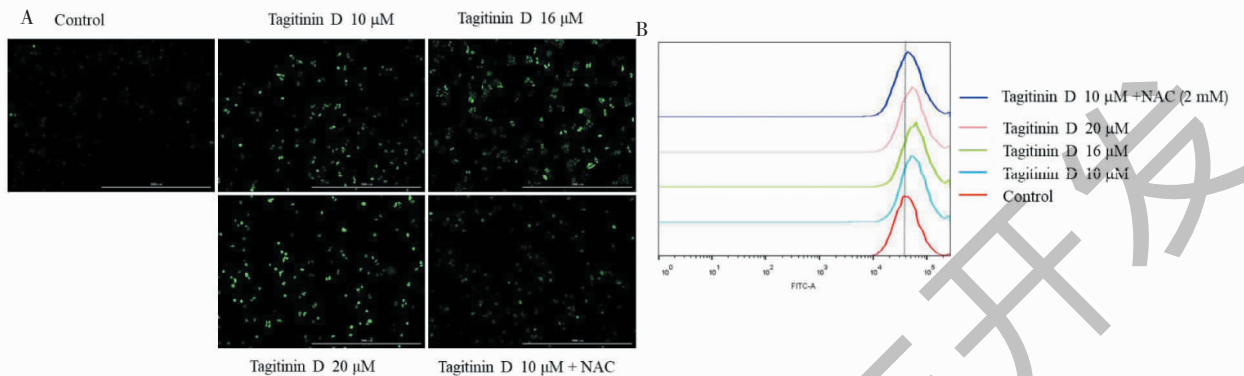


图 7 Tagitinin D 使 HepG2 细胞内源性活性氧增加

Fig. 7 Tagitinin D increased the endogenous ROS levels in HepG2 cells

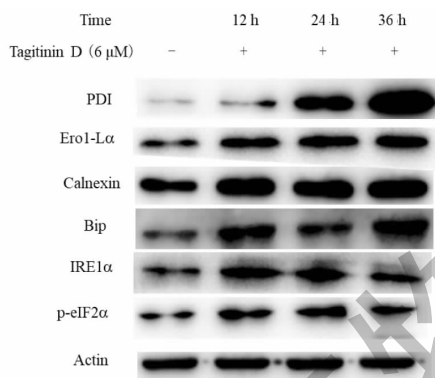


图 8 Tagitinin D 激活 ER stress

Fig. 8 Tagitinin D activated the ER stress signaling pathway in HepG2 cells

4 讨论与结论

近年来,由于抗癌药物的局限性,天然小分子化合物为新药的研发起到促进作用,有报道抗癌药物中一半来源于天然产物及其衍生物^[14,15],天然产物因具有广泛的不同化学结构从而其生物学活性也有区别,包括抗菌、免疫抑制、抗癌、抗炎等^[16]。因此,发现更多天然产物的药用价值以期为临床研究提供依据是必不可少的。本文主要从周期阻滞、诱导细胞凋亡及 ER stress 信号通路的影响研究 tagitinin D 促进人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制。

本实验中,我们首先用 MTT 法检测 tagitinin D 对人肝癌 HepG2 细胞活力的影响,实验结果显示随着药物处理浓度的增加,HepG2 细胞活力显著降

低;通过克隆形成实验表明,与对照组相比,随着药物处理浓度的增加,处理组克隆球形成变小且数量减少;用流式细胞仪检测细胞周期,发现经过 tagitinin D 处理后且随着浓度的增加,G2/M 期比例逐渐升高,以上结果说明 tagitinin D 能显著抑制 HepG2 细胞的活力和成瘤能力,并且将大部分细胞阻滞在 G2/M 期。

内质网途径是细胞凋亡途径之一^[17],越来越多的证据表明,内质网应激可能与 ROS 产生有关,并诱导细胞凋亡^[18,19]。ROS 是指超氧化物、过氧化氢、过氧亚硝酸盐和羟自由基,他们是不稳定的分子种类,可以破坏细胞内的蛋白质和脂质,并激活细胞内信号传导级联^[20]。有研究表明,雷公藤甲素能增加细胞内 ROS 诱导内质网应激使细胞凋亡^[21]。本研究通过凋亡和 ROS 检测实验结果发现,tagitinin D 诱导 HepG2 细胞凋亡且细胞内 ROS 增加,说明 tagitinin D 通过依赖于 ROS 诱导细胞凋亡。

内质网应激由多种因素引起,如钙离子失调、ROS 积累等造成大量未折叠蛋白和错误折叠蛋白聚集,引发 ER stress^[22]。一旦产生这种应激时间过长,内质网稳态失衡,就会激活内质网凋亡信号,引起细胞凋亡。为进一步探讨 tagitinin D 是否通过细胞内 ROS 积累激活 ER stress 信号通路或 caspases 途径引起细胞凋亡。加入 ROS 清除剂 NAC 和泛 caspases 抑制剂 Z-VAD-FMK 后,明显看到加 NAC 后细胞活力回复;用探针 DCFH-DA 检测到细胞内

ROS 的增加; Western blot 结果可得: PDI、Ero1- α 、Calnexin、Bip、IRE1 α 、p-eIF2 α 蛋白表达增加; 说明 tagitinin D 通过细胞内 ROS 增加, 激活 ER stress 信号通路诱导细胞凋亡。

综上所述, tagitinin D 抑制人肝癌 HepG2 细胞活力和体外成瘤能力; 通过阻滞细胞在 G2/M 期影响细胞增殖; 同时使细胞内 ROS 的增加激活 ER stress 信号通路诱导细胞凋亡。

参考文献

- 1 Mokdad AA, Singal AG, Yopp AC. Advances in local and systemic therapies for hepatocellular cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2016, 18(2):9.
- 2 Schlachterman A, Jr WWC, Hilgenfeldt E, et al. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroentero*, 2015, 21:8478-8491.
- 3 Lin J, Wu L, Bai X, et al. Combination treatment including targeted therapy for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7:71036-71051.
- 4 Krishnan V, Rajasekaran AK. Clinical nanomedicine: a solution to the chemotherapy conundrum in pediatric leukemia therapy [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 95:168-178.
- 5 Baruah NC, Sharma RP, Madhusudanan KP, et al. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. stereochemistry of the tagitinins and related compounds [J]. *J Org Chem*, 1979, 44:1831-1835.
- 6 Lee SH, Lee MY, Kang HM, et al. Anti-tumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from *Artemisa* [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2003, 11:4545-4549.
- 7 Scotti MT, Fernandes MB, Ferreira MJ, et al. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2007, 15:2927-2934.
- 8 Youn UJ, Park EJ, Kondratyuk TP, et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22:5559-5562.
- 9 Fortuna AM, Juárez ZN, Bach H, et al. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones and inositol derivatives from *Hymenoxys robusta* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72:2413-2418.
- 10 Barrero AF, Oltra JE, Alvarez M, et al. New sources and anti-fungal activity of sesquiterpene lactones [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71(1):60-64.
- 11 Miranda MA, Varela RM, Torres A, et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78:1083-1092.
- 12 Tran TTT, Tran VH, Lam TT. Encapsulation of tagitinin C in liposomes coated by *Tithonia diversifolia* pectin [J]. *J Microencapsul*, 2019, 36(1):53-61.
- 13 Yan C, Zhang WQ, Sun M, et al. Carpescernolides A and B, rare oxygen bridge-containing sesquiterpene lactones from *Carpesium cernuum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2018, 59:4063-4066.
- 14 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75:311-335.
- 15 Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents [J]. *Chem Rev*, 2009, 109:3012-3043.
- 16 Pham JV, Yilma MA, Feliz A, et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:1404.
- 17 Fu BT, Zhang P. D-limonene protects pancreatic MIN6 cells against tunicamycin induced cellular damage [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:1793-1797.
- 18 Hsieh YH, Su IJ, Lei HY, et al. Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2007, 359:643-648.
- 19 Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2007, 9:2277-2293.
- 20 Tse G, Yan BP, Chan YW, et al. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction; the link with cardiac arrhythmogenesis [J]. *Front Physiol*, 2016, 7:313.
- 21 Tan BJ, Chiu GN. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and ERK activation in triptolide-induced apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42:1605-1612.
- 22 Gu S, Yang XC, Xiang XY, et al. Sanguinarine-induced apoptosis in lung adenocarcinoma cells is dependent on reactive oxygen species production and endoplasmic reticulum stress [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34:913-919.