

冬凌草甲素通过诱导人宫颈癌 HeLa 细胞自噬下调凋亡的机制

崔 侨¹, 田代真一², 小野寺敏², 池岛乔^{1*}

(1. 沈阳药科大学 中日医药研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2. 昭和药科大学 病态科学教研室, 东京 194-8543, 日本)

摘要: 研究冬凌草甲素通过诱导人宫颈癌 HeLa 细胞自噬拮抗凋亡的机制。MTT 法测定冬凌草甲素对 HeLa 细胞的细胞毒作用。通过相差显微镜观察细胞形态学变化, 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段化, 用流式细胞仪检测细胞自噬和凋亡水平, 用 Western blotting 检测分析药物对蛋白质表达的影响。冬凌草甲素明显抑制 HeLa 细胞的增殖, 诱导 HeLa 细胞凋亡, 同时诱导 HeLa 细胞发生自噬。Western blotting 检测结果表明, 冬凌草甲素作用 24 h 后, 促凋亡蛋白 Bax、细胞色素 c 和控制 Bax 活力的去乙酰化酶 SIRT-1 的表达明显改变。冬凌草甲素 ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导的自噬通过影响 SIRT-1 和线粒体途径蛋白的表达下调凋亡。

关键词: 冬凌草甲素; HeLa 细胞; 自噬; 细胞凋亡

中图分类号: R282.71; R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)01 - 0035 - 05

Mechanism of downregulation of apoptosis by autophagy induced by oridonin in HeLa cells

CUI Qiao¹, TASHIRO Shin-ichi², ONODERA Satoshi², IKEJIMA Takashi^{1*}

(1. China-Japan Research Institute of Medical Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Department of Clinical and Biomedical Sciences, Showa Pharmaceutical University, Tokyo 194-8543, Japan)

Abstract: To study the mechanism of downregulation of apoptosis by autophagy induced by oridonin in HeLa cells, the cell viability was measured by MTT method. DNA fragmentation was assayed by agarose gel electrophoresis. Autophagic and apoptotic ratio was determined by flowcytometric analysis. Protein expression was detected by Western blotting analysis. Oridonin induced both apoptosis and autophagy in HeLa cells. Apoptosis was upregulated by introduction of the inhibitor of autophagy, 3-methyladenine (3-MA). Addition of oridonin increased Bax/Bcl-2 expression ratio and cytochrome c, whereas the expression of SIRT-1 was decreased, and 3-MA pre-application enhanced these changes. Oridonin-induced autophagy antagonized apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway.

Key words: oridonin; HeLa cells; autophagy; apoptosis

冬凌草甲素 (oridonin) 为唇形科植物冬凌草 (*Rabdosia rubescens* Hara) 叶中的二萜类成分。实验证明, 这种中药单体具有多种生物学、药理学和生理学功能, 例如抗癌、抑菌和防虫作用^[1,2]。

根据形态学可以把程序性细胞死亡分为凋亡和自噬两类。凋亡清除单个细胞, 而后由巨噬细胞通过胞吞作用清理细胞残骸^[3]。自噬则是一种胞质

降解过程, 负责清除包括细胞器在内的胞质组分, 其标志性步骤是内质网来源的“分离膜 (isolation membrane)”包裹住待降解部分形成自噬小体^[4]。

本实验室已对冬凌草甲素诱导肿瘤细胞凋亡进行了相关报道^[5], 但是目前冬凌草甲素诱导自噬及其与凋亡的关系却未见报道。本文考察了冬凌草甲素同时诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和自噬作用, 并对两者的相互关系和作用机制做了进一步探讨。

材料与方法

细胞 人宫颈癌 HeLa 细胞从美国 American

收稿日期: 2006-06-13.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 24 - 23844463,
E-mail: ikejimat@vip.sina.com

Type Culture Collection(ATCC, Rochville, MD, USA) 购买。

药品与仪器 酶联免疫分析仪 (Techan, 奥地利); 二氧化碳培养箱 (NuAair, USA); 倒置相差显微镜 (Leica, Nussloch, 德国); 荧光显微镜 (Olympus, Tokyo, 日本); RPMI 1640 培养基 (Gibco, Grand Island, NY, USA)。琼脂糖、溴化乙锭 (EB)、DNA 分子量标准、甲基噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、3-甲基腺嘌呤 (3-MA)、丹磺酰尸胺 (monodansylcadaverine, MDC) 及碘化丙锭 (PI) 均购于 Sigma (St. Louis, MO, USA) 公司。冬凌草甲素购于中国科学院昆明植物研究所, 用 DMSO 溶解 (终浓度 $\leq 0.01\%$)。抗 Bcl-2, Bax, 细胞色素 c, SIRT-1, Caspase-3 及 Caspase-9 的抗体购于 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 公司。

细胞培养 将 HeLa 细胞接种于含 10% 胎牛血清、2% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

细胞生长抑制 将 HeLa 细胞以细胞数 5×10^5 孔接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 培养过夜后加入冬凌草甲素 (20, 40, 60, 80 及 160 μ mol \cdot L⁻¹), 分别于 12, 24, 36 和 48 h 用 MTT 法测定细胞死亡率, 并应用 Bliss 法计算 IC₅₀ 值。

细胞形态学变化的观察 HeLa 细胞以细胞数 1×10^6 接种, 培养 24 h 后, 先加入 2 mmol \cdot L⁻¹ 3-MA 作用 1 h 后再加入 64 μ mol \cdot L⁻¹ 冬凌草甲素, 继续培养 24 h 后用倒置显微镜观察。细胞用上述方法做相同处理后, 用 Hoechst 33258 (1 μ g \cdot mL⁻¹) 于 37 °C 染色 10 min, 用荧光显微镜观察细胞核变化。

流式细胞分析 HeLa 细胞 (细胞数 1×10^6) 提前 1 h 用 2 mmol \cdot L⁻¹ 3-MA 预处理后, 加入 64 μ mol \cdot L⁻¹ 冬凌草甲素, 作用 24 h 后胰酶消化收集细胞进行细胞周期分析和自噬水平分析。简言之, 细胞经 64 μ mol \cdot L⁻¹ 冬凌草甲素作用后, 胰酶消化收集, 1 000 \times g 离心 10 min。用于检测自噬的样品, 用 0.05 mmol \cdot L⁻¹ MDC 溶液于 37 °C 避光染色 1 h, 立即在 488 nm 激发波下检测荧光水平的变化, 反映自噬比率^[6]; 用于检测细胞周期的样品, 用 PBS 和 70% 乙醇于 4 °C 过夜固定, 隔天用 PBS 漂洗后, 用 50 mg \cdot L⁻¹ PI (含 1 g \cdot L⁻¹ RNase A) 避光染色 30 min, 检测细胞周期分布和凋亡率。

DNA 片段化电泳 收集细胞数 1×10^6 以上的 HeLa 细胞, 用 PBS 洗 2 次, 提取 DNA。用 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后在紫外光灯下观察^[7]。

Western blotting 检测 药物处理后收集悬浮及贴壁的细胞, 1 000 \times g 离心 10 min, 用 PBS 洗 2 次, 细胞裂解液 (10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4, 10 mmol \cdot L⁻¹ edetic acid pH 8.0, 0.5% Triton-X 100) 于冰浴裂解 1 h, 15 000 \times g 离心 5 min, 收集上清液。经 Bio-Rad 法测定蛋白含量后, 等量样品以 12% 十二烷基磺酸钠 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 一抗封闭过夜, 再以辣根过氧化物酶标记的二抗封闭液封闭 2 h, 二氨基联苯胺 (DAB) 溶液显色, 扫描记录^[8]。

统计学分析 结果数据用 Students *t* 检验比较组间显著性差异。

结果

1 冬凌草甲素对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用

冬凌草甲素 (20 ~ 160 μ mol \cdot L⁻¹) 对细胞均有不同程度的抑制作用, 其诱导 HeLa 细胞死亡呈现时间和剂量依赖关系 (图 1)。64 μ mol \cdot L⁻¹ 冬凌草甲素作用 24 h 后, 细胞死亡率接近 50%。24 h 冬凌草甲素作用的 IC₅₀ 值为 63.2 μ mol \cdot L⁻¹。

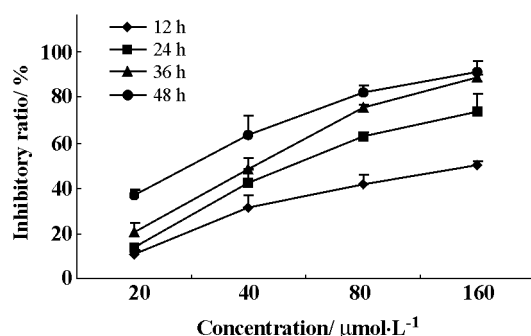


Figure 1 Effect of oridonin on HeLa cell death. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2 冬凌草甲素诱导 HeLa 细胞形态学变化

光学显微镜下观察 64 μ mol \cdot L⁻¹ 冬凌草甲素作用于 HeLa 细胞 24 h 后, 细胞变圆, 膜皱缩、发泡, 产生凋亡小体。提前 1 h 用细胞自噬特异性抑制剂 3-MA 处理细胞, 同样产生上述典型的凋亡特征。而单独使用 3-MA 对细胞的形态并无明显影响 (图 2A)。Hoechst 33258 染色, 冬凌草甲素单独作用组和冬凌草甲素与 3-MA 联合作用组均可见明显的 DNA 碎片, 对照组和 3-MA 单独作用组的细胞形态保持完整 (图 2B)。

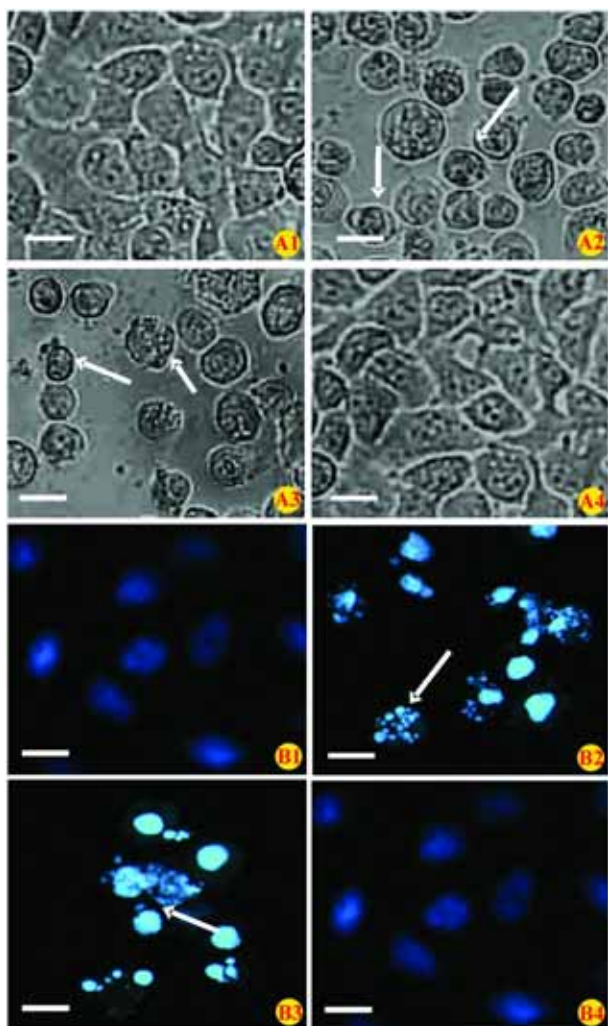


Figure 2 Effect of oridonin on morphologic changes of HeLa cells. A: Cellular morphology; B: Images of Hoechst 33258 staining. A1, B1: Control; A2, B2: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); A3, B3: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); A4, B4: 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Arrow: The apoptotic HeLa cells displaying membrane bleb (A), apoptotic bodies and nuclear cleavage (A, B). Bar = $20 \mu\text{m}$ ($\times 400$ magnification)

3 冬凌草甲素对细胞自噬水平和细胞周期变化的影响

$64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素可在 HeLa细胞中同时诱导发生自噬和凋亡。细胞发生自噬形成的自噬体为酸性,而自荧光化的染料丹磺酰尸胺 (MDC)是一种弱碱性物质,可以通过质子化募集到细胞的酸性部分,近年来一直被用于体内标记自噬体^[6]。MDC染色结果显示, $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素可显著提高细胞的自噬比率,当使用自噬特异性抑制剂 3-MA 预处理后,自噬水平下降至接近对照组水平

(图 3A)。并且,当自噬被阻断后,细胞生长抑制率和凋亡程度明显增加(图 3B, 3C)。

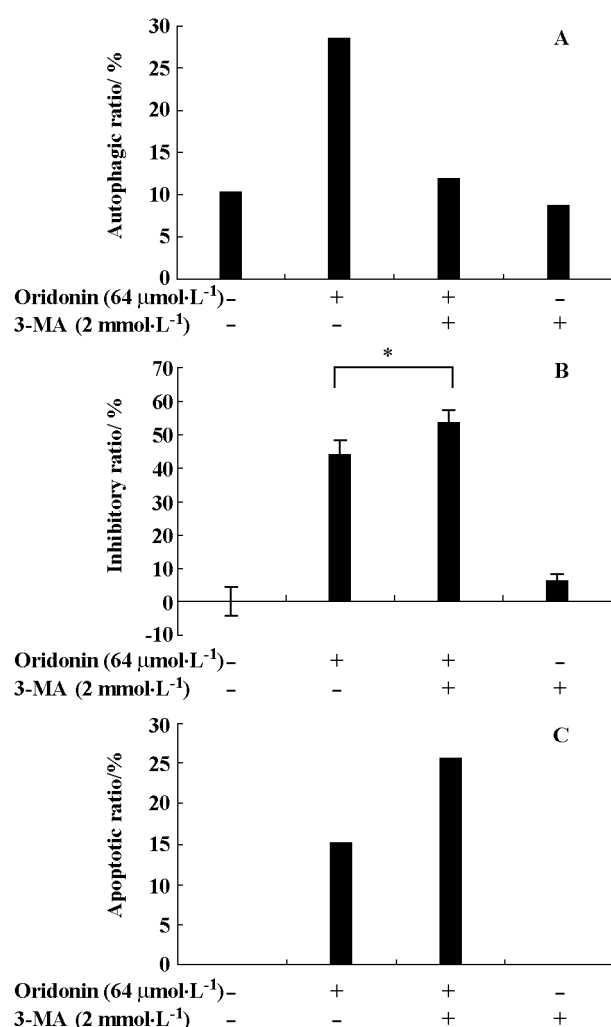


Figure 3 The relationship between apoptosis and autophagy induced by oridonin tested by flowcytometric analysis. Autophagic ratio induced by oridonin and its suppression by 3-MA (A). The inhibitory effects of oridonin and 3-MA on HeLa cell growth (B). * $P < 0.05$ vs oridonin alone treated group. Inhibition of autophagy enhanced apoptotic ratio (C)

4 冬凌草甲素对 DNA 片段化的影响

细胞发生凋亡时,较显著的生化标志是 DNA 被核酸内切酶在核小体之间降解,断裂为 $180 \sim 200 \text{bp}$ 倍数的片段,在琼脂糖凝胶电泳上呈现梯状图谱 (DNA ladder)。 $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素作用于 HeLa 细胞 24 h 后即发生明显的 DNA 片段化,当使用 3-MA 预处理后, DNA 片段化现象趋于显著,提示在本实验体系中自噬虽不能完全抑制凋亡,但可以部分阻断或延缓凋亡的发生(图 4)。

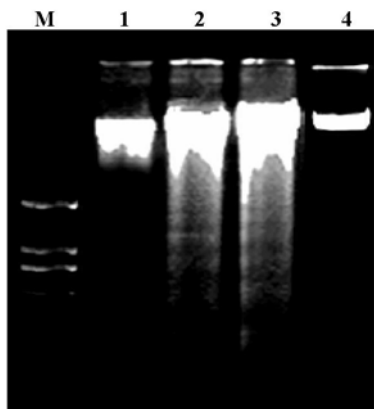


Figure 4 Effect of oridonin on DNA fragmentation in HeLa cells. M: Marker; Lane 1: Medium control; Lane 2: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); Lane 3: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); Lane 4: 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

的前体表达减少,说明冬凌草甲素激活了这两者,参与诱导 HeLa细胞凋亡。当自噬被抑制时,上述蛋白表达变化更为明显。而 Bcl-2表达没有明显变化(图 5)。

讨论

凋亡可以被许多分子调控, Bcl-2家族成员即是其中的一部分。Bcl-2是线粒体内膜上的一种抗凋亡蛋白^[11,12],它可与 Bax形成异源二聚体阻止凋亡发生, Bax自身形成的同源二聚体或寡聚体也能在线粒体外膜上促进凋亡^[13],因此 Bax/Bcl-2比率在细胞凋亡中起着重要作用。从线粒体释放的细胞色素 c与 Caspase-9、凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease-activating factor-1, Apaf1)结合形成复合物后激活 Caspase-9,活化的 Caspase-9 剪切并激活 Caspase-3,促进细胞凋亡^[14,15]。

近年来的研究发现,自噬与凋亡的机制之间有许多重叠的部分,人们推测自噬是凋亡的引导机制。有观点认为自噬可以通过募集细胞色素 c帮助细胞避免凋亡^[16],而另有一些观点则认为自噬是凋亡必需的,自噬受到抑制会延缓凋亡的发生^[17]。作者的研究首次提出,冬凌草甲素诱导 HeLa细胞发生的自噬与凋亡是相互拮抗的。研究结果表明,冬凌草甲素激活了促凋亡蛋白 Bax,促进了细胞色素 c的释放,并且抑制了抗凋亡蛋白 Bcl-2和 SIRT-1的表达,这种作用在自噬被 3-MA特异性抑制后变得更加明显。

上述结果证明,在 HeLa细胞中冬凌草甲素诱导的自噬与凋亡之间存在交叉的机制,许多蛋白,诸如 Bax, Bcl-2和 SIRT-1同时与凋亡和自噬相关。SIRT-1控制着 Bax/Bcl-2的平衡,进而调控细胞色素 c从线粒体的释放,决定细胞是否凋亡。因此,作者可以得出这样的结论,自噬可以保护 HeLa细胞免受冬凌草甲素诱导的凋亡的损害,是一种细胞的保护机制。

在凋亡和自噬机制的交互重叠中包括许多激酶,如 PI3K, PKB/Akt, PTEN, c-Myc, Ras等^[18-21],但它们在凋亡和自噬的相互关系中的具体作用机制还有待进一步研究。

References

[1] Fuji K, Node M, Ito N, et al. Antitumor activity of diterpenoids from *Rabdosia shikokiana* var. *occidentalis* [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 33: 1038 - 1042.

5 冬凌草甲素对 SIRT-1, Bax, Bcl2和细胞色素 c表达的影响

Bcl-2家族调控线粒体途径,主要包括 Bcl-2, Bcl-X_L等抗凋亡蛋白和 Bax, Bid, Bak等促凋亡蛋白^[9],而去乙酰化酶 SIRT-1则处在 Bax的上游,调节 Bax/Ku70的相互作用,从而控制着 Bax向线粒体的移动^[10]。当 $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素作用于 HeLa细胞 24 h后, Bax和胞浆内细胞色素 c的表达增加, SIRT-1表达减少;此外, Caspase-9和 Caspase-3

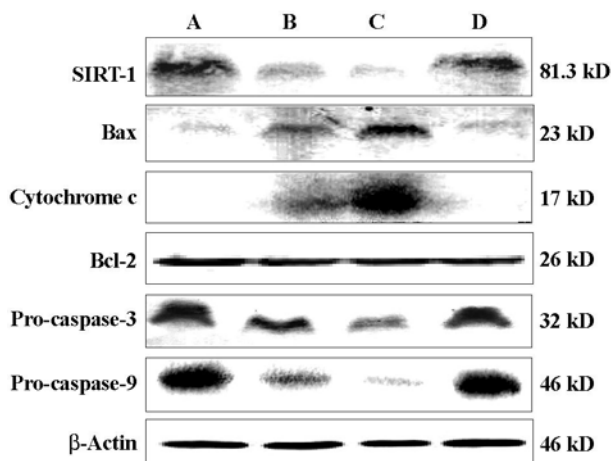


Figure 5 Effect of oridonin on the expression of Bax, Bcl-2, cytochrome c, SIRT-1, pro-caspase-9 and pro-caspase-3 in HeLa cells. The cells were treated with $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oridonin for 24 h. A: Control; B: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); C: Oridonin ($64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); D: 3-MA ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

- [2] Osawa K, Yasuda H, Manuyama T, et al. Antibacterial trichorabdol diterpenes from *Rabdosia trichocarpa* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 1287 - 1291.
- [3] Juhasz G, Sass M. Hid can induce, but is not required for autophagy in polyploid larval *Drosophila* tissues [J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84: 491 - 502.
- [4] Abeliovich H, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65: 463 - 479.
- [5] Zhang CL, Wu LJ, Tashiro S, et al. Oridonin induced A375-S2 cell apoptosis via Bax-regulated caspase pathway activation, dependent of cytochrome c / caspase-9 apoptosome [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6: 127 - 138.
- [6] Biederbick A, Kem HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles [J]. *Eur J Cell Biol*, 1995, 66: 3 - 14.
- [7] Fei XF, Wang BX, Tashiro S, et al. Apoptotic effects of ginsenoside Rh2 on human malignant melanoma A375-S2 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23: 315 - 322.
- [8] Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 β [J]. *J Immunol*, 2001, 167: 5940 - 5947.
- [9] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281: 1322 - 1326.
- [10] Cohen HY, Miller C, Bitteman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 305: 390 - 392.
- [11] Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcript, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 5214 - 5218.
- [12] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74: 609 - 619.
- [13] Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo* [J]. *Nature*, 1997, 385: 637 - 640.
- [14] Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 6067 - 6070.
- [15] Zou H, Li Y, Liu X, et al. An Apaf1 / cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 11549 - 11556.
- [16] Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366: 177 - 196.
- [17] Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 14: 180 - 198.
- [18] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2891 - 2906.
- [19] Tsuneoka M, Umata T, Kimura H, et al. c-myc Induces autophagy in rat 3Y1 fibroblast cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2003, 28: 195 - 204.
- [20] Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, et al. Increased ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94: 358 - 368.
- [21] Arico S, Petiot A, Bauvy C, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 35243 - 35246.