

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.01.009

# 半胱氨酸酶在 NS-398 诱导 HepG2 细胞凋亡中的作用

胡东霞

## Significance of Caspase in NS-398 Induced Apoptosis of HepG2 Cell Line

HU Dong-xia

Department of Hematology and Oncology, Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China

**Abstract: Objective** To investigate the possible role of Bcl-2 and Caspase3 in NS-398 induced apoptosis of liver tumor HepG2 cell line. **Methods** Cell apoptosis is determined by flowcytometry analysis using PI staining. The expression of Bcl-2 and Caspase3 protein was detected by Western blot. Caspase3 activity was evaluated by active Caspase3 apoptosis kit with flow cytometry. **Results** Selective COX-2 inhibitor NS-398 can significantly induce apoptosis of HepG2 cells line significantly. Flow cytometry assay revealed the apoptotic rate of HepG2 cells treated with different concentrations of NS-398 (0, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{mol/L}$ ) was (10.51  $\pm$  1.04)%, (27.79  $\pm$  2.40)%, (45.72  $\pm$  3.32)%, (60.22  $\pm$  2.03)% ( $P < 0.01$ ) respectively, while the apoptotic peak did not appear in the control group ( $P < 0.01$ ). The expression of Caspase3 protein was up-regulated while Bcl-2 protein was down-regulated, and the percentage of the cells with active Caspase3 was (2.67  $\pm$  0.22)%, (9.53  $\pm$  0.15)%, (21.28  $\pm$  0.43)%, (39.63  $\pm$  0.8)%, (63.40  $\pm$  0.69)% ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Selective COX-2 inhibitor NS-398 may activate Caspase3 by down-regulating the expression of Bcl-2 protein, which causes apoptosis of HepG2 cells.

**Key words:** Cyclooxygenase2; Apoptosis; Caspase3; Bcl-2; HepG2

**摘要:目的** 探讨选择性环氧合酶(COX-2)抑制剂 NS-398 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的分子机制。**方法** 采用流式细胞术测定细胞凋亡情况;Western blot 法检测不同浓度 NS-398 处理后凋亡相关蛋白 Bcl-2、Caspase3 表达的变化;并以流式细胞术检测半胱氨酸酶-3(Caspase-3)酶活性的变化。**结果** 流式细胞术显示 NS-398(0、100、200、300、400  $\mu\text{mol/L}$ )作用 HepG2 细胞 24 h 后,对照处理组没有出现凋亡峰,其余各组(100、200、300、400  $\mu\text{mol/L}$ )出现明显的凋亡峰,其凋亡率分别为(10.51  $\pm$  1.04)%、(27.79  $\pm$  2.40)%、(45.72  $\pm$  3.32)%、(60.22  $\pm$  2.03)% ( $P < 0.01$ ),不同浓度 NS-398 处理后凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达下降,Caspase3 蛋白表达增加,随着 NS-398 处理浓度的增加,表达活性 Caspase3 的细胞百分率分别为(2.67  $\pm$  0.22)%、(9.53  $\pm$  0.15)%、(21.28  $\pm$  0.43)%、(39.63  $\pm$  0.8)%、(63.40  $\pm$  0.69)% ( $P < 0.01$ )。**结论** 选择性 COX-2 抑制剂可能通过调节 Bcl-2 蛋白表达活化 Caspase3,从而诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡。

**关键词:** 环氧水合酶类; Caspase3; Bcl-2; 凋亡; HepG2

**中图分类号:** R735.7; R73-35<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)01-0031-03

## 0 引言

近年研究表明,环氧合酶 2(COX-2)在多种恶性肿瘤中表达上调,能诱导肿瘤的发生、浸润和转移<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,非甾体抗炎药(NSAIDs)可降低消化系统恶性肿瘤的发生率和死亡率<sup>[2]</sup>,有研究报道,其抗癌机制和抑制 COX-2 有关。COX-2 在慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌组织中

的表达明显增高<sup>[3-4]</sup>。因而,选择性阻断或抑制 COX-2 的活性,可能有利于肝细胞癌的预防和治疗。本实验观察 NS-398 对体外培养肝癌细胞 HepG2 的作用,并探讨抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的可能机制,为 NS-398 的抗癌作用提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料与试剂** NS-398 纯品、培养基 RPMI 1640(美国 Sigma 公司),鼠抗人 Bcl-2、Caspase3 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),RNase、1kb DNA ladder、碘化丙啶(PI)和 Caspase3 活性检测试剂盒(深圳晶美公司)。

收稿日期:2007-12-27;修回日期:2008-04-10

基金项目:湖北教育厅基金资助项目(D200511008)

作者单位:430064 武汉科技大学附属医院血液肿瘤科

作者简介:胡东霞(1961-),女,副主任医师,本科,硕士在读,主要从事肿瘤的内科综合治疗研究

1.2 细胞培养 人肝肿瘤细胞株 HepG2 购自上海科学院细胞中心。在含有 10% 的胎牛血清、青霉素 100 u/ml 及链霉素 100 u/ml 的 RPMI-1640 培养基中 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养箱中贴壁培养, 每 48h 换液传代一次, 取生长良好, 细胞活性大于 98% 的细胞进行实验。

1.3 细胞周期测定 将终浓度为 100、200、300、400 μmol/L 的 NS-398 与肝癌细胞作用 24 h 后, 0.25% 胰酶消化, 收集制成 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞的单细胞悬液, 收集六孔板内细胞制备单细胞悬液。磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 70% 冰乙醇固定。检测时以 PBS 洗 2 次, 加入 200 μl RNaseA(1 g/L), 37℃ 水浴 30 min, 再加 PI 染色液避光反应 30 min, 上机检测, Multicycle 软件分析亚二倍体峰。

1.4 细胞蛋白质样品制备及蛋白定量 HepG2 细胞 Bcl-2 和 Caspase3 蛋白质表达: 以 1 × 10<sup>6</sup> 个 HepG2 细胞接种于 100ml 培养瓶, 细胞贴壁后换液, 加入不同浓度的 NS-398 的使其终浓度分别为 100、200、300、400 μmol/L。设不进行药物干预的细胞为对照组。经处理后的细胞立即弃去培养液, 洗涤, 离心。加预冷的细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris HCl, pH 7.6, 0.001 mol/L EDTA, 100 μg/ml PMSF, 2 μg/ml Leupeptin)0.1 ml, 裂解 30 min, 然后与 10 000 g 离心 10 min, 取上清备用。以上所有操作均在 4℃ 下进行。测定蛋白, 并调各组蛋白浓度一致。

1.5 Western blot 分析 Bcl-2 和 Caspase3 内参照 β-actin 表达水平 按文献<sup>[5]</sup>报道的 Western blot 方法检测, 蛋白提取物经定量后, 取 25 μg 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳。转膜到醋酸纤维素膜上, 丽春红染色观察转膜情况。转膜成功后, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h。加一抗 COX-2 抗体, 内参照 β-actin 抗体)在 4℃ 条件下过夜孵育; 充分用 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 再用二抗(1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG)震荡孵育 2h。洗去未结合的二抗, 滴加 ECL 化学发光试剂, X 线片曝光显影。扫描 X 线片, 计算机软件处理, 软件进行扫描定量, 每个浓度组重复 3 次, 取均值代表测定结果。

1.6 Caspase3 活性检测 采用 Active Caspase3 Apoptosis Kit 检测 Caspase3 活化情况。不同浓度 NS-398 (0、100、200、300、400 μmol/L) 处理的 HepG2 细胞六孔板内培养 24 h 后, 收集细胞制备单细胞悬液, 1.5ml PBS 清洗后加破膜剂 A 100 μl, 避光孵育 15 min 后, 以 2 ml PBS 清洗, 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μl B 液 + Caspase3-PE 抗体或同型对照抗体, 置 4℃ 反应 20 min, 再以 2

ml PBS 清洗, 离心弃上清, 再以 1 ml PBS 重悬, 并上机分析。用标准荧光微球校准光路和流路, 以 FS 和 SS 设门, 用阴性对照确定阴性范围, 依次上机检测, 每个样本检测 1 × 10<sup>5</sup> 细胞。

1.7 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件包进行 t 检验分析。

## 2 结果

2.1 NS-398 对 HepG2 细胞周期和凋亡率的影响 FCM 显示, 不同浓度 NS-398 作用 24 h 后, 呈浓度依赖性改变细胞周期分布, 一方面增高 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的比例, 另一方面降低 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例, 见表 1。

表 1 NS-398 对 HepG2 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 1 NS-398 effected on HepG2 cell cycle( $\bar{x} \pm s$ )

NS-398 concentration (μmol/L)	Cell cycle(%)		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	52.56 ± 2.11	27.12 ± 1.02	20.04 ± 0.23
100	55.14 ± 1.63	23.37 ± 1.23	18.12 ± 1.32
200	62.19 ± 0.88	17.10 ± 2.73	15.16 ± 2.12
300	70.17 ± 1.14	15.98 ± 1.18	12.23 ± 1.17
400	77.11 ± 1.12	12.62 ± 1.15	10.14 ± 2.10

### 2.2 FCM 分析细胞凋亡

在 DNA 图谱 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期前出现一个代表凋亡细胞的亚 G<sub>1</sub> 峰, 对亚 G<sub>1</sub> 峰进行定量分析表明, 4 种不同浓度的 NS-398 作用于 HepG2 细胞 24 小时后, 均显示亚 G<sub>1</sub> 峰, NS-398 呈剂量依赖性非线性方式诱导其凋亡, 见图 1。

### 2.3 NS-398 对 HepG2 细胞 Bcl-2、Caspase 蛋白表达的影响

HepG2 细胞经不同浓度 NS-398 (0、100、200、300、400 μmol/L) 处理 24 h 后, Western blot 显示随着 NS-398 处理浓度的增加, Bcl-2 蛋白表达下降, Caspase3 蛋白表达上调, 见图 2。

### 2.4 NS-398 对 HepG2 细胞 Caspase3 活性的影响

随着 NS-398 浓度的增高, Caspase3 明显活化, 并且以高浓度为明显。不同浓度(0、100、200、300、400 μmmol/L)NS-398 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 表达活化 Caspase3 的细胞百分率分别为 (2.67 ± 0.22)%、(9.53 ± 0.15)%、(21.28 ± 0.43)%、(39.63 ± 0.8)%、(63.40 ± 0.69)%。呈明显的剂量依赖性(P < 0.01)。

## 3 讨论

有研究报道<sup>[6-7]</sup> COX-2 的抑制剂对人类前列腺

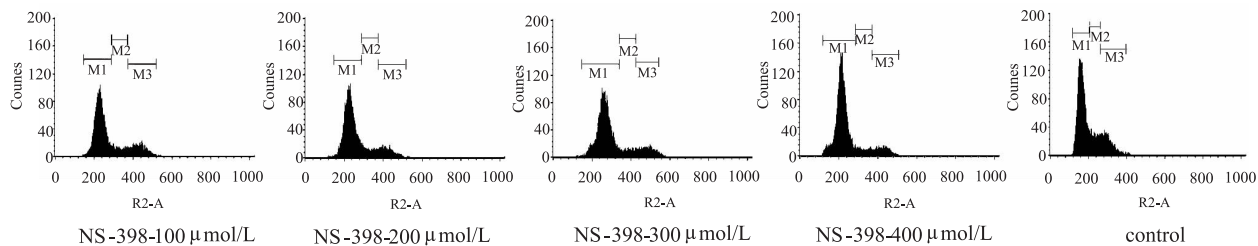


图 1 不同浓度 NS-398 处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 后细胞凋亡率变化

Fig 1 Different concentration of NS-398 induced HepG2 cell apoptosis

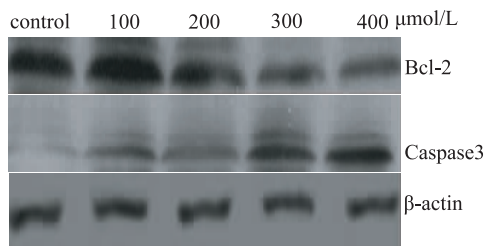


图 2 不同浓度 NS-398 处理肝癌 HepG2 细胞 24 h Bcl-2、Caspase3 蛋白表达变化

Fig 2 The expression of Bcl-2 and Caspase3 of HepG2 cells treated with different concentrations of NS-398 for 24 h

癌和胰腺癌细胞有抑制增殖和诱导凋亡的作用。本组实验结果显示, NS-398 处理后在 DNA 图谱  $G_0/G_1$  期前出现一个代表凋亡细胞的亚  $G_1$  峰, 对亚  $G_1$  峰进行定量分析了解细胞凋亡率, 结果显示 NS-398 其凋亡诱导作用随药物浓度升高而增强, 这表明选择性 COX2 抑制剂 NS-398 对肝癌 HepG2 细胞有凋亡诱导作用。然而选择性 COX-2 抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制目前仍不清楚。Bcl-2 家族是最重要的凋亡调节因子之一, 它通过调节线粒体的功能来调节凋亡<sup>[8]</sup>。Bcl-2 可稳定线粒体膜并通过蛋白相关转换孔维持膜的通透性, 线粒体内膜很少有死亡启动因子, 诸如细胞色素 C (cytochrome C) 和半胱氨酸酶 (Caspase) 等。Caspase 是一组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶, 其家族成员中研究最多、功能相对较明确的为 Caspase3, 它广泛分布于各种类型的细胞中, 在细胞内以无活性的前体 (酶原) 形式存在, 被激活后在细胞凋亡中发挥关键作用, Caspase3 为凋亡的效应分子, 是凋亡途径下游进行底物酶解的关键蛋白酶, 被称为凋亡的“执行者”。本实验发现, 不同浓度的 NS-398 诱导 HepG2 细胞凋亡的同时发现 HepG2 细胞 Caspase3 蛋白表达增加, 而 Bcl-2 蛋白表达水平呈剂量依赖性下降。使处理后的 HepG2 细胞呈程序性死亡<sup>[9-10]</sup> 研究结果证实 Bcl-2 在线粒体膜上形成蛋白孔道使细胞线粒体跨膜电位下降, 细胞线粒体下降后释放细胞色素 C, 激活 Caspase 蛋白酶级联反应<sup>[11]</sup>。本实验结果显示 NS-398 处理 HepG2 细胞后其 Caspase3 酶活

性升高, 因此我们推测 NS-398 可能通过调节 Bcl-2 蛋白的表达激活 Caspase3, 从而诱导肝癌细胞发生凋亡。

总之, 我们的实验结果表明选择性 COX-2 抑制剂能够诱导肿瘤细胞凋亡, 这种效应可能与 Caspase3 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达下降, 从而活化 Caspase3 有关。确切的机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998, 93 (5): 705-716.
- [2] Sandler RS, Galanko JC, Murray SC, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas[J]. Gastroenterology, 1998, 114(3): 441-447.
- [3] Shiota G, Okubo M, Noumi T, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepato2 cellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(25): 407-412.
- [4] Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(2): 362-366.
- [5] Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [6] Kamijo T, Sato T, Nagatomi Y, et al. Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cell lines[J]. Int J Urol, 2001, 8(7): 35-39.
- [7] Tucker ON, Dannerberg AJ, Yang EK, et al. cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 1999, 59(5): 987-990.
- [8] Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family[J]. Nature, 1997, 387(6635): 773-776.
- [9] Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin [J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 54(3): 269-277.
- [10] Anto R J, Mukhopadhyay A, Denning K, et al. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of Caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release; its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-x[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 143-150.
- [11] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132.