

线粒体 ROS 改变参与石蒜碱诱导的 HepG2 细胞凋亡

抗晶晶, 刘晓宁

(黄河科技学院医学院生化教研室, 河南 郑州 450063)

[摘要] 探究石蒜碱诱导 HepG2 细胞凋亡的分子机理. CCK-8 实验检测细胞增殖情况;流式细胞术检测加或不加 SS31 情况下,石蒜碱对 HepG2 细胞凋亡比例的影响;用核酸染料 Hoechst 33342 评估凋亡细胞细胞核的形态变化;用 Western blot 分析技术检测 PARP 片段的表达情况. 成功构建靶向线粒体的 Mito-Grx1-roGFP2 转基因稳定株肝癌细胞系 HepG2. SS31 作为线粒体 ROS 的定向清除剂,能够改善石蒜碱引起的 HepG2 细胞形态学损伤及细胞核内 PARP 切割,抑制石蒜碱诱导的细胞凋亡,降低反映线粒体 ROS 含量的 405 nm/488 nm 荧光比值. 研究结果提示,线粒体内 ROS 水平的改变是石蒜碱诱导 HepG2 细胞凋亡的机制之一. 石蒜碱有望成为治疗肝癌的潜力药物,值得更深入的研究.

[关键词] 石蒜碱,人类肝癌 HepG2 细胞,细胞凋亡,mito-Grx1-roGFP2,线粒体 ROS,SS31

[中图分类号] R392.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2019)04-0091-06

Mitochondrial ROS Contributes to Lycorine-induced Apoptosis in HepG2 Cells

Kang Jingjing, Liu Xiaoning

(Department of Biochemistry, School of Medicine, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China)

Abstract: To further explore the underlying apoptotic molecular mechanism of lycorine on HepG2 cells. The growth of HepG2 cells were measured with TransDetect Cell Counting Kit (CCK-8) assay. Apoptosis percentages of cells exposed to lycorine with or without SS31 was determined by flow cytometry. Apoptotic nuclear morphology was assessed using Hoechst 33342. Western blot analysis was used to examine the expression of fragmented PARP. It was successfully established that an human hepatoma cell line HepG2 with mito-Grx1-roGFP2 probe stably expressed which could be used as a real-time reporter of dynamic redox changes. As an antioxidant which could remove the ROS of mitochondria, the treatment of SS31 improved the morphology of HepG2 cells injured by lycorine and inhibited lycorine-induced cell apoptosis. It was also found that SS31 significantly inhibited the fragment of PARP induced by lycorine. Furthermore, SS31 attenuated lycorine-induced rise of 405/488 fluorescence ratio which could reflect the level of ROS in mitochondria. The findings suggest that mitochondrial ROS contribute to lycorine-induced apoptosis in HepG2 cells and lycorine is expected to be a potential drug for the treatment of liver cancer, it worth profound study.

Key words: Lycorine, human hepatoma HepG2 cells, apoptosis, mito-Grx1-roGFP2, mitochondrial ROS, SS31

石蒜碱(Lycorine)是从中药石蒜(*Lycoris radiata* Herb.)鳞茎中提取出的一种天然生物碱,因其具备抗病毒、抗肿瘤、抗疟疾、抗炎等多种生物效应受到广泛关注^[1-6]. 然而,关于石蒜碱在人肝癌 HepG2 细胞中的抗肿瘤作用的研究却较少,基于线粒体 ROS(mtROS)介导的线粒体凋亡途径在石蒜碱抗肿瘤中的作用及机制更鲜见报道. 本研究前期构建了靶向线粒体的 mito-Grx1-roGFP2 转基因稳定株肝癌细胞系 HepG2,能够实现对 HepG2 肿瘤细胞 mtROS 的快速、高灵敏、特异性检测,在此基础上,本实验进一步应用靶向线

收稿日期:2018-10-27.

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(172102310208).

通讯联系人:抗晶晶,硕士,讲师,研究方向:中药抗肿瘤抗炎机制研究. E-mail:kangjingjingkuail@163.com

粒体的抗氧化剂 SS31 处理细胞,分析抑制 mtROS 对石蒜碱诱导细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响,拟揭示石蒜碱诱导 HepG2 细胞凋亡的机制。

1 材料

1.1 抗体及试剂

石蒜碱(含量>98%, Aladdin, CAS:2188-68-3), GFP、GAPDH、PARP、 β -actin 多克隆抗体(CST), 所有二抗(CST), SS31(上海康肽德), TransDetect Cell Counting Kit CCK-8(全式金生物)。其他未说明的试剂均购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 主要仪器

酶联免疫检测仪 ELx 808 Universal Microplate Reader (BIO-TEK, INC); 流式细胞检测仪 BD FACS Calibur (BD Biosciences); 激光共聚焦扫描仪(尼康 AR1); 激光共聚焦扫描显微镜 OLYMPUS FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan)。

2 方法

2.1 构建靶向线粒体的 mito-Grx1-roGFP2 转基因稳定株肝癌细胞系 HepG2

mito-Grx1-roGFP2 质粒由 Tobias P Dick 教授慷慨赠与,本研究前期已成功构建靶向线粒体的 mito-Grx1-roGFP2 转基因稳定株肝癌细胞系 HepG2,获得稳定表达的稳定株(命名为 HepG2-mito-Grx1-roGFP2)。且利用过表达慢病毒中目的基因携带 GFP 标签,通过 Western blot 实验检测过表达慢病毒感染 HepG2 细胞筛选获得的稳定株样品^[7]。

2.2 细胞培养

在 37 °C, 5% CO₂ 条件下,用含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和抗生素(100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)的 DMEM 完全培养液(Hyclone 公司)培养细胞。

2.3 细胞生长抑制实验(CCK-8)

取对数生长期的 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞悬液 100 μ L 接种于 96 孔板,根据实验需要在 37 °C 细胞培养箱中预培养 12 h~24 h。加入多个浓度(10 μ mol/L~120 μ mol/L)的石蒜碱正常培养多个时间段后,每孔加入 CCK Solution(10 μ L/孔),37 °C 培养 4 h,弃尽培养液,加入 DMSO(100 μ L/孔),振荡 10 min,酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

2.4 激光共聚焦技术(CLSM)检测细胞 mtROS 的变化

HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞经石蒜碱(90 μ M)或石蒜碱(90 μ M)+SS31(100 nM)处理后,胰酶消化细胞,离心收集,取适量细胞于激光共聚焦培养皿中,用激光共聚焦扫描仪在 405 nm 和 488 nm 两个通道中进行 roGFP 观察,每个样品选取细胞进行层扫拍摄,分别输出 405 nm 通道和 488 nm 通道的图片。利用 IMAGEJ 软件处理输出图片,得到 405/488 比值图片,比值的颜色等级代表不同的氧化还原状态,其中蓝色代表完全的还原状态,黄色代表完全的氧化状态^[8]。加 H₂O₂ 或 DTT 处理细胞后,检测方法同上。

2.5 流式细胞术(FCM)分析石蒜碱对细胞凋亡率的影响

HepG2-Mito-Grx1-roGFP2 细胞经石蒜碱(90 μ mol/L)或石蒜碱(90 μ mol/L)+SS31(100 nmol/L)处理后,胰酶消化,离心收集细胞,加入 100 μ L 预冷的 Annexin V Binding Buffer,重悬细胞后加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,轻轻混匀。室温避光反应 15 min,加入 400 μ L 预冷的 Annexin V Binding Buffer,轻轻混匀,将样品于冰上避光放置,1 h 内用流式细胞仪检测。

2.6 细胞核染色观察石蒜碱对细胞核形态的影响

用 Hoechst 33342 观察凋亡细胞核的形态变化。将 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞分为 3 组,接种于培养板中过夜。随后换液,一组加 DMEM,一组只加石蒜碱(90 μ mol/L),最后一组加石蒜碱(90 μ mol/L)+SS31(100 nmol/L),3 组孵育 8 h 后,加 Hoechst 33342(1 mg/mL)于 37 °C 染色 30 min, PBS 清洗细胞,用激光共聚焦扫描显微镜在 350 nm 激发光谱和 461 nm 发射光谱下观察石蒜碱及 SS31 对 HepG2-Mito-Grx1-roGFP2 细胞核形态的影响。

2.7 Western blot 分析石蒜碱对细胞内 PARP 片段化的影响

HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞+石蒜碱(90 $\mu\text{mol/L}$)或石蒜碱(90 $\mu\text{mol/L}$)+SS31(100 nmol/L)培养 8 h 后,PBS 清洗细胞,随后加入细胞裂解液冰上匀浆,然后将细胞裂解物在 4 $^{\circ}\text{C}$,15 000 g 条件下离心 15 min. 离心结束后,收取离心上清液,取等量蛋白进行 SDS-PAGE,电泳结束后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上. 随后用 TBS(含 5%脱脂奶粉)封闭 1 h,TBST 洗涤,每次 5 min,共洗涤 3 次. 加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤,最后,用 Ddy800 的荧光二抗孵育 0.5 h,Odyssey 红外显像系统观测结果^[9].

2.8 数据处理

使用 SPSS 10.0 软件进行两组间 t 检验,所有数值均表示为(mean \pm S.D),并设置多个重复, $P<0.05$ 为有统计学差异. 所有实验均重复 3 次并具有相同趋势.

3 结果

3.1 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞响应 H_2O_2 和 DTT 引起的氧化还原改变

为了确定 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞能否响应线粒体内氧化还原变化,用 H_2O_2 (1 mmol/L)处理细胞,180 s 后加入 DTT(1 mmol/L). 如图 1 所示, H_2O_2 的加入使得 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞的 405/488 nm 荧光比值从 1.21 增加至 3.68,而 DTT 的加入又使比值回落至 1.23. 此外,405 nm 和 488 nm 通道融合后的图像也从视觉上显示了细胞线粒体中氧化还原状态的改变情况. 以上结果提示,HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞能够灵敏响应线粒体内氧化还原改变.

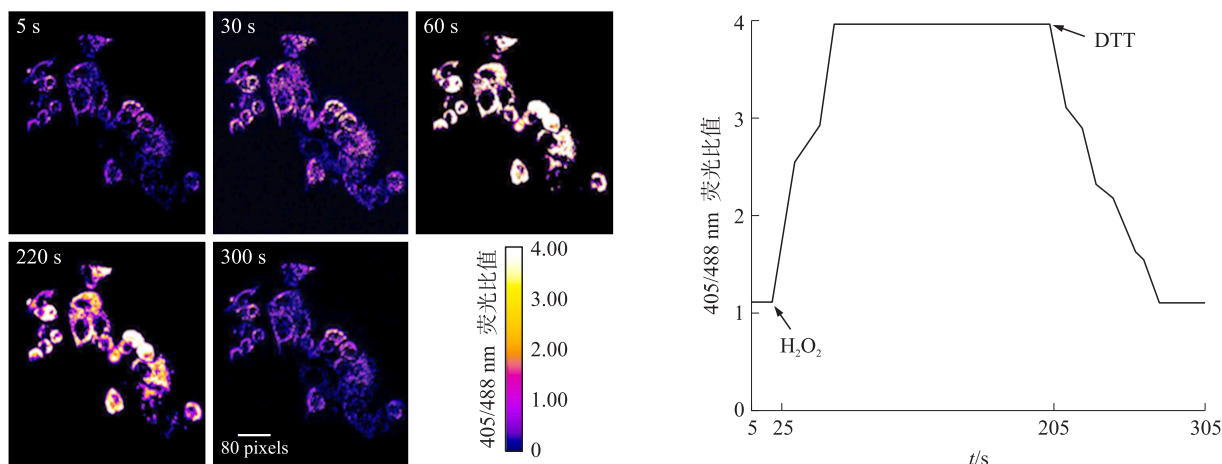


图 1 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞灵敏响应线粒体内氧化还原改变

Fig. 1 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 cells responds to mitochondrial redox changes

3.2 石蒜碱抑制 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞生长

本实验采用 CCK-8 法检测石蒜碱对 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞生长的影响. 用 10 $\mu\text{mol/L}$ ~120 $\mu\text{mol/L}$ 的石蒜碱处理细胞 8 h,结果如图 2 所示,石蒜碱能够以剂量依赖性的方式降低 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞的存活率,且半数抑制率为 90 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$).

3.3 石蒜碱促进 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞中 mtROS 的产生

如上所述,405/488 nm 荧光比值可反应 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞线粒体内的氧化还原状态,这也从侧面反映了细胞中 mtROS 水平. 如图 3 所示,发现用石蒜碱(90 $\mu\text{mol/L}$)刺激 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞,可导致细胞线粒体内氧化水平显著提升($P<0.05$),405/488 nm 荧光比值增加至原来的 3 倍,且在 160 min 后趋于稳定,表明石蒜碱可促进 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞中 mtROS 的产生. 正如预期的那样,SS31 作为线粒体 ROS 的清除剂,可阻

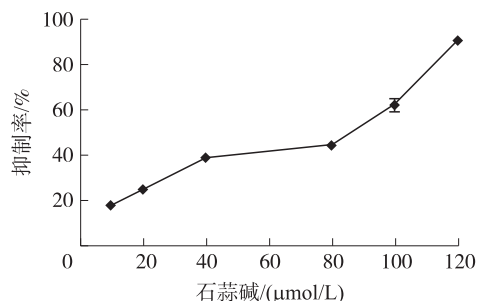


图 2 石蒜碱抑制 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞生长

Fig. 2 Lycorine inhibits the growth of HepG2-mito-Grx1-roGFP2 cells

止石蒜碱诱导的 mtROS 的产生,使得 405/488 nm 荧光比值从 3.68 下降到 1.26.

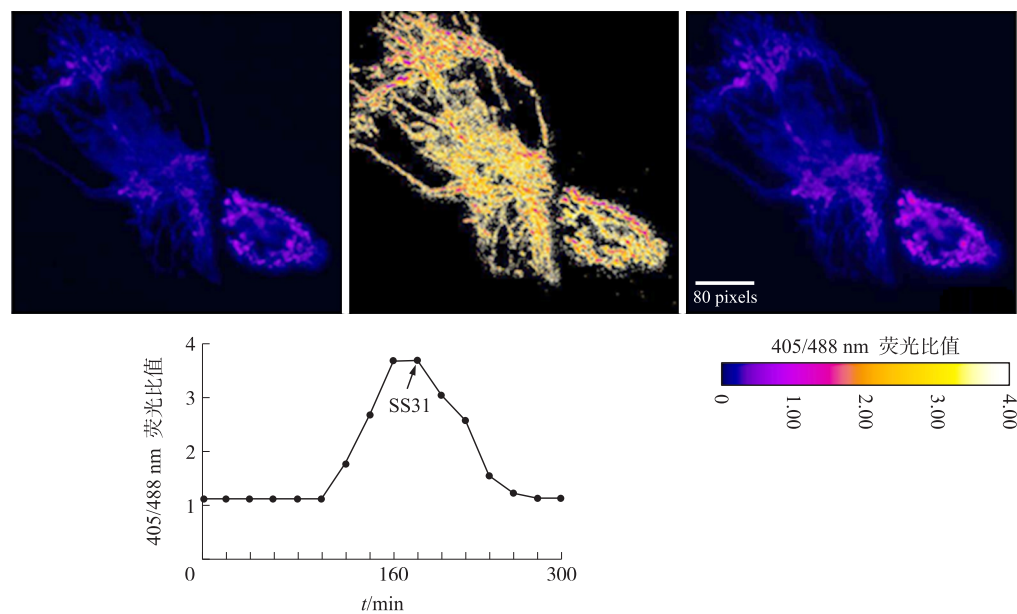


图 3 石蒜碱促进 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞中 mtROS 的产生

Fig. 3 Lycorine promotes the growth of mitochondrial ROS in HepG2-mito-Grx1-roGFP2 cells

3.4 石蒜碱诱导 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞的凋亡和核形态学改变

本实验采用流式细胞技术探究石蒜碱诱导 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞凋亡的作用. SS31 是一种靶向线粒体的抗氧化剂,用 SS31 处理细胞,探究 mtROS 在石蒜碱诱导的细胞凋亡中的作用^[10]. 如图 4A 所示,用石蒜碱 (90 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞,可导致大约 39.41% 的细胞凋亡 ($P < 0.05$). 相反,SS31 的加入明显减弱了石蒜碱诱导的细胞凋亡,使得细胞凋亡率降低到 4.05%. 以上结果提示,mtROS 的增加是石蒜碱诱导细胞凋亡的重要环节.

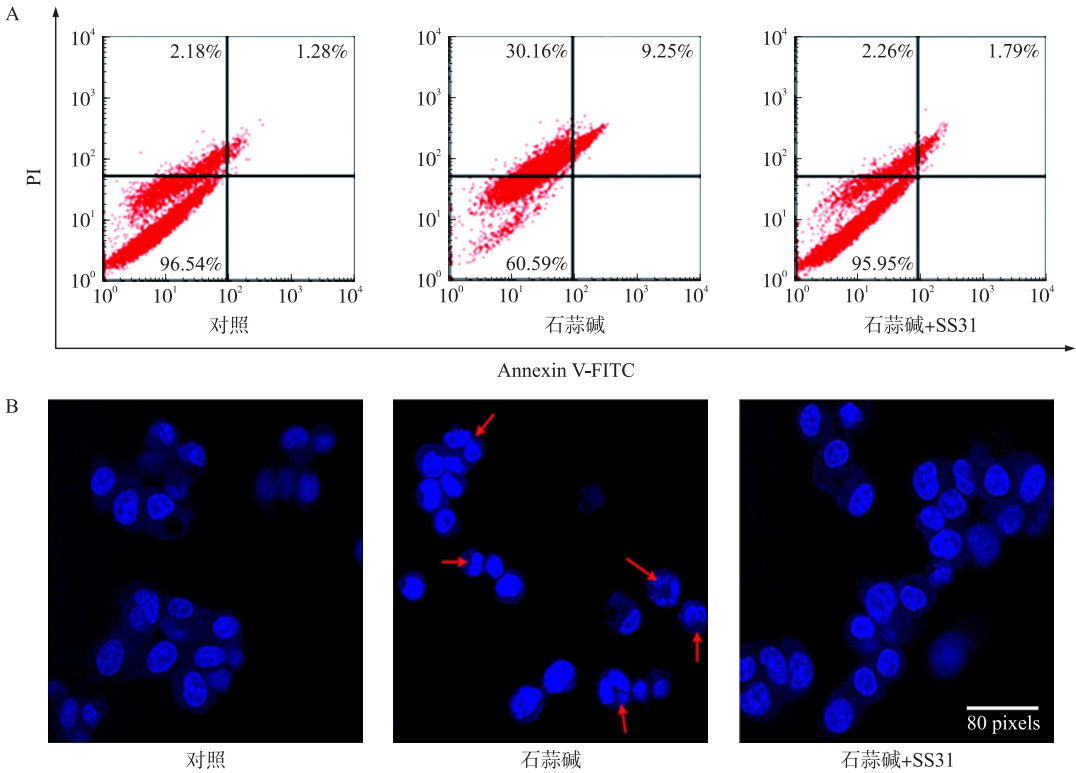


图 4 石蒜碱诱导 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞的凋亡和核形态学改变

Fig. 4 Lycorine induces apoptosis and morphological changes of HepG2-mito-Grx1-roGFP2 cells

Hoechst 33342 染色后,用激光共焦扫描显微镜观察石蒜碱对细胞凋亡形态学的影响,如图 4 B 所示,石蒜碱处理 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞后,可观察到细胞核浓缩、破碎等细胞凋亡特征,而 SS31 的加入显著减弱了石蒜碱诱导的核形态学改变,这与上述流式细胞术观察到的结果一致。

3.5 石蒜碱促进 PARP 的切割

PARP 是一种分子大小为 116 kD 的核苷酸聚合酶,它可以被 caspase 蛋白切割成两部分(24 kD 和 89 kD),PARP 的切割可作为细胞正在发生细胞凋亡的标识^[11]。为了进一步验证石蒜碱诱导 HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞凋亡的作用,本实验用 Western blot 检测 PARP 切割片段的表达。结果如图 5 所示,经石蒜碱处理后, HepG2-mito-Grx1-roGFP2 细胞中的 PARP 片段增加,表明细胞正在发生凋亡,而 SS31 的加入抑制了石蒜碱诱导的 PARP 切割($P<0.05$)。以上结果进一步表明石蒜碱可能通过增加细胞中 mtROS 的含量,促进细胞凋亡。

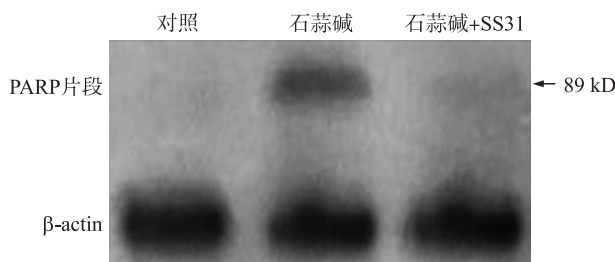


图 5 石蒜碱促进 PARP 的切割

Fig. 5 Lycorine increases the cleavage of PARP

4 讨论

细胞凋亡是一个多因素参与的生理过程,从天然产物中寻找诱导肿瘤细胞凋亡的有效成分,是目前抗肿瘤药物研究的一个热点^[12]。ROS 是细胞内物质代谢的产物,细胞中的 ROS 含量可反映细胞内的氧化还原状态^[13]。线粒体是 ROS 产生的主要场所,研究表明,mtROS 可介导肿瘤细胞内线粒体依赖的凋亡途径^[14],然而,由于缺乏精准的检测机制,mtROS 介导的线粒体凋亡途径在天然产物抗肿瘤中的研究鲜有报道。

近年来,Dick 项目团队将 Grx1-roGFP2 蛋白与 ATP 合成酶 9 的线粒体定位序列融合,构建了靶向线粒体的氧化还原生物感应系统 mito-Grx1-roGFP2,从而实现了细胞凋亡相关的氧化还原改变的动态化分析^[15]。本课题组从 Dick 处申请获得 mito-Grx1-roGFP2 质粒,通过稳定株筛选实验和 Western Blot 检测实验成功构建了靶向线粒体的 Mito-Grx1-roGFP2 转基因稳定株肝癌细胞系 HepG2-Mito-Grx1-roGFP2。H₂O₂ 和 DTT 加入实验表明, HepG2-Mito-Grx1-roGFP2 能够灵敏、可视化地响应氧化还原刺激,可实现对 HepG2 细胞中 mtROS 的实时、高灵敏、可视化检测。

石蒜碱是一种常见的异喹啉类生物碱,具有多种药理活性^[16-17],研究表明,石蒜碱可诱导多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 细胞的程序化坏死,其机制与线粒体功能丧失、ROS 产生有关^[18],提示石蒜碱的抗肿瘤作用可能以 ROS 为靶点。最新研究显示,石蒜碱可剂量依赖性抑制 HepG2 细胞增殖与迁移^[19],但关于 mtROS 在石蒜碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡中的作用机制研究却很少。本研究中,CCK-8 实验结果表明,石蒜碱能够剂量依赖性地抑制 HepG2-Mito-Grx1-roGFP2 细胞生长,且半数抑制率为 90 μmol/L,这与 Liu Wuyi 等的研究结果一致。在随后实验中,以石蒜碱(90 μmol/L)为实验用药浓度。SS31 是一种靶向线粒体的 ROS 清除剂,观测到 SS31 可下调细胞线粒体中由石蒜碱诱导产生的 mtROS 含量,使得 405/488 nm 荧光比值下降,与此同时,还发现 SS31 还可明显减弱石蒜碱诱导的细胞凋亡,细胞核形态改变以及细胞中 PARP 切割实验都验证了这一结论。以上结果提示,mtROS 改变参与石蒜碱诱导的 HepG2 细胞凋亡。

综上,本研究结果表明,石蒜碱可能通过增加 HepG2 细胞中 mtROS 含量的方式促进 HepG2 细胞凋亡,这为石蒜碱成为治疗肝癌的潜力药物提供了一定的理论基础,值得更深入的研究。

[参考文献]

- [1] SENER B, ORHAN I, SATAYAVIVAD J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae[J]. Phytother Res, 2003, 17(10): 1220-1223.
- [2] MIKAMI M, KITAHARA M, KITANO M, et al. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model[J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(7):

674-678.

- [3] KANG J,ZHANG Y,CAO X,et al. Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge[J]. Int Immunopharmacol,2012,12(1):249-256.
- [4] LIU X S,JIANG J,JIAO X Y,et al. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells[J]. Cancer Lett,2009,274(1):16-24.
- [5] LIU J,HU W X,HE L F,et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis[J]. Febs Lett,2004,578(3):245-250.
- [6] LI Y,LIU J,TANG L J,et al. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest[J]. Oncol Rep,2007,17(2):377-384.
- [7] 刘晓宁,薄惠,刘翠娥. 靶向线粒体的 mt-roGFP2 荧光探针检测人肝癌 HepG2 细胞线粒体 ROS 水平动态变化[J]. 山东医药,2018,58(8):14-17.
- [8] BARATA A G,DICK T P. *In vivo* imaging of H2O2 production in Drosophila.[J]. Methods enzymol,2013,526:61-82.
- [9] LI G,KANG J,YAO X,et al. The component of green tea,L-theanine protects human hepatic L02 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Eur Food Res Technol,2011,233(3):427-435.
- [10] LI J,CHEN X,XIAO W,et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells[J]. Biochem Bioph Res Co,2011,404(1):349-356.
- [11] GADDUCCI A,GUERRIERI M E. PARP inhibitors in epithelial ovarian cancer:state of art and perspectives of clinical research[J]. Anticancer research,2016,36(5):2055-2064.
- [12] LOPERGOLO A,PENNATI M,GANDELLINI P,et al. Apollon gene silencing induces apoptosis in breast cancer cells through p53 stabilisation and caspase-3 activation[J]. Brit J Cancer,2016,100(5):739-746.
- [13] SCHAAR C E,DUES D J,SPIELBAUER K K,et al. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan[J]. Plos Genet,2015,11(2):1-24.
- [14] WOLIN M S,AHMAD M,GUPTE S A. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms:basic concepts, current controversies,and potential importance of cytosolic NADPH[J]. Am J Physiol-lung C,2005,289(2):159-173.
- [15] MÜLLER A,SCHNEIDER J F,DEGROSSOLI A,et al. Systematic *in vitro* assessment of responses of roGFP2-based probes to physiologically relevant oxidant species[J]. Free radical biology and medicine,2017,106:329-338.
- [16] 李居伟,杨扬. 石蒜碱药理作用的研究进展[J]. 中国保健营养,2017,27(6):28-29.
- [17] YU H,QIU Y,PANG X,et al. Lycorine promotes autophagy and apoptosis via TCRP1/Akt/mTOR axis inactivation in human hepatocellular carcinoma[J]. Molecular cancer therapeutics,2017,16(12):2711-2723.
- [18] LUO Y,ROY M,XIAO X,et al. Lycorine induces programmed necrosis in the multiple myeloma cell line ARH-77[J]. Tumor biology,2015,36(4):2937-2945.
- [19] WUYI L,QIAN Z,QIN T,et al. Lycorine inhibits cell proliferation and migration by inhibiting ROCK1/cofilin-induced actin dynamics in HepG2 hepatoblastoma cells[J]. Oncology reports,2018,40(4):2298-2306.

[责任编辑:黄 敏]