

胡椒碱对诱导肝癌细胞凋亡的体外实验研究

阿 荣 乔延江 博·格日勒图

【摘要】 目的 探讨胡椒碱对诱导肝癌细胞凋亡的作用。方法 采用 MTT 法检测胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞的细胞毒作用。采用 HE 法荧光染色后观察细胞形态。采用 Annexin V-PI 流式细胞术分析胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞各个细胞周期的影响。结果 胡椒碱对 SMMC-7721 细胞的抑制作用呈浓度依赖的形式,经计算 IC_{50} 为 $(18.5 \pm 4.33) \mu\text{mol/L}$ 。对照组中肝癌细胞 SMMC-7721 核表面发出均匀荧光,光滑不毛糙;实验组中肝癌细胞 SMMC-7721 核坏死碎片,包括皱缩等,荧光清晰但浓染致密,呈现出典型的细胞凋亡性状特点。与阴性对照组相比,胡椒碱 $25 \mu\text{mol/L}$ 和 $50 \mu\text{mol/L}$ 2 种浓度均对 SMMC-7721 细胞各个细胞周期有显著影响 ($P < 0.05$)。随着胡椒碱剂量的增加, G_0/G_1 期和 S 期细胞比率显著降低, G_2/M 细胞比率显著升高 ($P < 0.05$)。结论 胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的诱导凋亡作用,主要将其停留于 G_2/M 这一细胞周期,具有开发为治疗肝癌药物的潜在价值,其具体的作用机制还有待于进一步深入研究。

【关键词】 胡椒碱;肝癌;细胞周期;凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2015.06.004

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1001-5930(2015)06-0803-03

Study of Liver Cancer Cell Apoptosis Induced by Piperine in Vitro

A Rong QIAO Yanjiang BO Geriletu. Beijing University of Chinese Medicine Beijing 100102

【Abstract】 Objective To investigate the effect of liver cancer cell apoptosis induced by piperine in vitro. **Methods** MTT was used to investigate the cytotoxicity effect of piperine on liver cancer SMMC-7721 cell. HE dying was used to observe cell shape. The effect of piperine on liver cancer SMMC-7721 cell cycles was determined with Annexin V-PI flow cytometry. **Results** The inhibitive effect of piperine on liver cancer SMMC-7721 cell was dose-dependent, the IC_{50} was $18.5 \pm 4.33 \mu\text{mol/L}$. In the control group, SMMC-7721 cells showed a mean and smooth fluorescence in nuclear appearance, while SMMC-7721 cells in the experimental group showed nuclear necrotic debris and fluorescence was clear and intense, indicating an apparent apoptosis phenomenon. Compared with the control group, piperine at $25 \mu\text{mol/L}$ and $50 \mu\text{mol/L}$ had significant influence on SMMC-7721 cell cycle. G_0/G_1 and S phase cell ratio significantly decreased, while G_2/M phase cell ratio significantly increased ($P < 0.05$) with the increase of piperine. **Conclusion** Piperine has significant apoptosis induction effect on SMMC-7721 cells, which are sustained at G_2/M phase, it can be potential drug for liver cancer. But the specific mechanism need further investigating.

【Key words】 Piperine; Liver cancer; Cell cycle; Apoptosis

(The Practical Journal of Cancer 2015, 30: 803 ~ 805)

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。原发性肝癌全球发病率正逐年增长,在全球恶性肿瘤的发病率中排名第 5,死亡率位列第 3^[1]。细胞凋亡在恶性肿瘤的发生发展过程中具有重要的作用,国内外已将细胞凋亡作为评估抗肿瘤药物疗效的一个重要指标^[2-3]。胡椒碱(piperine)是从黑胡椒和茺菘中提取的植物生物碱,具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、抗惊厥和免疫调节

等生物活性^[4]。然而有关胡椒碱对诱导肝癌细胞凋亡的活性研究的报道较少,本文对胡椒碱在体外诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞株凋亡的作用进行探讨,为进一步开发和应用胡椒碱提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自中科院上海细胞生物学研究所;牛血清白蛋白(albumin bovine, Sigma); RPMI 1640(GIBCO 美国);其它试剂均为国产分析纯试剂;胡椒碱(中国药品生物制品检定所);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和全蛋白提取试剂盒

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院(阿 荣);010018 内蒙古农业大学理学院(阿 荣);100102 北京中医药大学(东校区)中药信息工程研究中心(乔延江);010021 内蒙古大学蒙药化学研究所(博·格日勒图)

通讯作者:乔延江

(南京凯基生物科技发展有限公司);超净工作台 (AIRTECH 苏净集团安泰公司);台式低温高速冷冻离心机 (3K3 ,Sigma ,美国);普通酶标仪 (DG-3022 ,美国);流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 细胞培养

复苏 SMMC-7721 细胞株 ,采用含 10% 小牛血清、双抗 (终浓度:青霉素 100 IU/mL ,链霉素 100 μg/mL) 的 RPMI 1640 培养液接种于培养瓶 ,于 37.5℃、5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。隔天换液 ,胞贴壁约 70% ~ 80% 传代。实验时选取对数生长期细胞作为实验对象。

1.3 细胞毒性研究

通过细胞计数将细胞浓度调整至 1 × 10⁵ /mL ,加 100 μL 细胞悬液至 96 孔板中培养 16 h。胡椒碱在 DMSO 中 ,设置不同浓度 (400 μmol/L、200 μmol/L、100 μmol/L、50 μmol/L、25 μmol/L、12.5 μmol/L、6.25 μmol/L 和 3.13 μmol/L) ,取 100 μL 分别加入 96 孔板的细胞悬液中 ,于培养箱中培养 48 h (37℃ ,5% ,90% RH) 随后加入 MTT 再培养 4 ~ 5 h ,用 10% SDS 终止反应 ,约 12 h 溶解后于酶标分析仪 570 nm 波长处测各孔 OD 值。另外设置空白孔 (只含培养基)、对照孔 (不加入胡椒碱) 和阳性对照孔 (阿霉素)。

1.4 HE 法荧光染色后观察细胞形态

根据 MTT 实验结果 ,选定一定浓度的胡椒碱溶液 ,通过细胞计数将细胞浓度调整至 1 × 10⁵ /mL ,至 6

孔板中培养 24 h。加入选定浓度的胡椒碱溶液 ,分别培育 0 h (阴性对照组) 和 24 h (实验组) ,观察前采用 HE 染色 ,通过倒置荧光显微镜观察活细胞生长情况并记录。

1.5 流式细胞仪分析^[5]

通过细胞计数将细胞浓度调整至 1 × 10⁵ /mL ,每孔 10⁵ 个细胞 ,20 mol/L 的胡椒碱处理 24 h ,0.25% 胰蛋白酶消化 ,离心 (1 000 rpm × 5 min) ,收集细胞 ,用 PBS 重悬细胞 ,然后利用荧光标记了的 Annexin 作为染色探针染色 5 min ,离心 (1 000 rpm × 5 min) ,重悬 ,加入 PI 染液避光染色 10 min ,上机检测细胞凋亡情况。

1.6 统计方法

所有资料应用 SPSS 13.0 进行分析处理 ,计数资料采用 χ² 检验 ,计量资料采用均数 ± 标准差表示 ,行 t 检验 ,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测结果

不同浓度的胡椒碱对 SMMC-7721 细胞周期的影响结果见表 1。结果显示 ,与阴性对照组相比 ,胡椒碱 25 μmol/L 和 50 μmol/L 2 种浓度均对 SMMC-7721 细胞各个细胞周期有显著影响 (P < 0.05)。随着胡椒碱剂量的增加 ,G₀/G₁ 期和 S 期细胞比率显著降低 ,G₂/M 细胞显著升高 (P < 0.05)。

表 1 不同浓度的胡椒碱对 SMMC-7721 细胞周期的影响 (x̄ ± s ,%)

浓度	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率 /%
阴性对照胡椒碱	60.45 ± 2.33	32.56 ± 0.79	12.45 ± 0.58	-
25 μmol/L	19.58 ± 2.15*	18.49 ± 1.49*	40.35 ± 1.23*	8.23
50 μmol/L	6.44 ± 3.25*	10.56 ± 2.32*	83.25 ± 2.56*	22.55

* 为与阴性对照组比较 ,有显著性差异 P < 0.05。

2.2 MTT 实验结果

不同浓度胡椒碱对 SMMC-7721 细胞的抑制作用见图 1。结果显示 ,胡椒碱对 SMMC-7721 细胞的抑制作用呈浓度依赖的形式 ,经计算 IC₅₀ 为 (18.5 ± 4.33) μmol/L。

3 讨论

原发性肝细胞癌是常见的恶性肿瘤 ,其发病率高、临床侵袭性强、预后差^[6]。目前 ,肝癌主要是手术干预和局部射频消融 ,对早期局部的小肿瘤具有良好的疗效 ,而更晚期的肿瘤则很难治愈。阿霉素和 5-氟尿

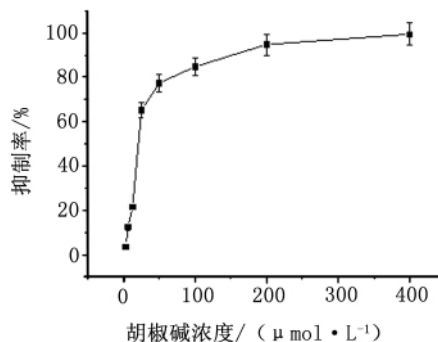


图 1 不同浓度胡椒碱对 SMMC-7721 细胞的抑制作用

嘧啶是治疗肝癌的主要药物,但效率低下,寻找和开发新的特异性高疗效好的抗肿瘤药物成为肝癌治疗的研究热点^[7]。

胡椒碱是生物碱类物质,是胡椒、荜茇的主要生理活性成分之一。其化学结构属于桂皮酰胺类,已有研究证明这类化合物具有多种药理活性,如镇静、催眠、抗惊厥、骨骼肌松弛和抗抑郁等^[8]。本文研究发现,胡椒碱对 SMMC-7721 细胞的抑制作用呈浓度依赖的形式,其 IC₅₀ 为(18.5 ± 4.33) μmol/L。曾龙辉等^[4]报道称,胡椒碱本身的细胞毒性较小,但与棉酚联用时,表现出协同作用。郑斌等^[9]报道称胡椒碱对 HepG2 细胞增殖的抑制率随着浓度的升高而增加,半量抑制浓度为(15.13 ± 3.21) μmol/L。针对胡椒碱抗肿瘤作用的报道较多,国外学者发现其可抑制 B16F-10 黑色素瘤诱导的肺转移,降低苯并芘诱导的肺癌小鼠体内脂质过氧化水平与核苷酸的含量以及多胺合成,抑制 ATF-2、NF-κappa b 以及致炎细胞因子的基因表达^[10]。

细胞凋亡是细胞分化、机体生长发育过程中,细胞自主死亡的过程,其能力的减弱与肿瘤细胞的扩散转移和迅速生长相关。有关胡椒碱诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡机制的研究还未见报道。本文 HE 染色细胞形态图结果发现:对照组中肝癌细胞 SMMC-7721 核表面发出均匀荧光,光滑不毛糙;实验组中人肝癌细胞 SMMC-7721 核坏死碎片,包括皱缩等,荧光清晰但浓染致密,呈现出典型的细胞凋亡性状特点。表明胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的诱导凋亡作用。

通过染色和流式细胞仪的检测,可把坏死细胞、凋亡细胞和活细胞定量地区分开来^[11]。利用细胞内 DNA 能够和荧光染料,如 PI 结合的特性。细胞各个时期由于其 DNA 含量不同从而结合的荧光染料不同,流式检测的荧光轻度也不一样。对其机制进行深入的探讨发现,胡椒碱 25 μmol/L 和 50 μmol/L 2 种浓度均对 SMMC-7721 细胞各个细胞周期有显著影响($P < 0.05$)。随着胡椒碱剂量的增加,G₀/G₁ 期和 S 期细胞比率显著降低,G₂/M 细胞显著升高,提示人肝癌细胞 SMMC-7721 无法于分裂后期脱离,即停留于 G₂/M 这一细胞周期。在肝癌的发展过程中肿瘤细胞的增殖

往往伴随着细胞凋亡减少。因此,胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞的诱导凋亡作用可用于肝癌的治疗。

综上所述,胡椒碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显的诱导凋亡作用,主要将其停留于 G₂/M 这一细胞周期,具有开发为治疗肝癌药物的潜在价值,其具体的作用机制还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 邵杰. 人参皂苷 Rg3 及其与奥沙利铂和索拉非尼联合诱导肝癌细胞凋亡的实验研究(D). 南京: 南京中医药大学 2012.
- [2] Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV and HCV-associated hepatocellular carcinoma (J). Nature reviews Cancer 2013, 13(2): 123-135.
- [3] 郑炜望, 华海清. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展(J). 世界华人消化杂志 2009, 17(28): 2915-2918.
- [4] 曾龙辉, 徐丽慧, 何贤辉, 等. 胡椒碱与棉酚联用对前列腺癌 DU145 细胞生长抑制的协同作用(J). 中国药理学通报 2012, 28(8): 1101-1105.
- [5] 岑钧华. 二氢杨梅素诱导肝癌细胞株 HepG2 凋亡途径的探讨(J). 实用医学杂志 2014, 30(11): 1712-1715.
- [6] 桂尤胜, 曹献英, 陈筠. 斑蝥酸钠体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研究(J). 武汉大学学报, 2004, 25(5): 493-496.
- [7] Breitenstein S, Apestegui C, Petrowsky H et al. State of the art in liver resection and living donor liver transplantation: a worldwide survey of 100 liver centers (J). World J Surg, 2009, 33(4): 797-803.
- [8] 呼日乐巴根. 胡椒碱的药理作用研究概况(J). 中国民族医药杂志 2009, 15(2): 68-69.
- [9] 郑斌, 王欣, 麻彬辉. 胡椒碱对人肝癌 HepG2 细胞抗肿瘤活性的体外实验研究(J). 中国实验诊断学, 2012, 16(2): 218-220.
- [10] Pradeep CR, Kuttan G. Piperine is a potent inhibition of nuclear factor-κappa B (NF-κappa B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16-10 melanoma cells (J). Int Immunopharmacol, 2004, 4(14): 1795-1803.
- [11] 徐静道. 胡椒碱对 3T3-L1 前脂肪细胞的干预研究(D). 昆明: 云南中医学院 2013.

(收稿日期 2014-11-05 修回日期 2015-03-25)

(编辑: 吴小红)