

汉黄芩素诱导人卵巢癌细胞 A2780 凋亡 及对细胞端粒酶活性的影响

黎丹戎¹, 侯华新², 张 玮¹, 李 力¹

Effects of Wogonin on Inducing Apoptosis of Human Ovarian Cancer A2780 Cells and Telomerase Activity

Li Dan-Rong¹, Hou Hua-Xin², Zhang Wei¹, Li Li¹

1. 广西肿瘤防治研究所临床实验
中心, 广西南宁 530021

2. 广西医科大学化学教研室,
广西南宁 530021

1. Clinic Experiment Center, Guangxi
Cancer Institute, Nanning, Guangxi,
530021, P. R. China

2. Department of Chemistry, Guangxi
Medical University, Nanning,
Guangxi, 530021, P. R. China

通讯作者: 黎丹戎

Correspondence to: Li Dan-Rong

Tel: 86 - 771 - 5322502

86 - 771 - 5358131

E-mail: danrongli@yahoo.com

基金项目: 广西自然科学基金资助 (桂
科回 0144008, 桂科自 0135030)

收稿日期: 2002-07-25

修回日期: 2003-03-27

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Inducing apoptosis and inhibiting the telomerase activity of tumor cells became a new therapeutic means for tumor. In vivo and in vitro experiments showed that wogonin possesses antioxidant activities and inhibitory effect on tumor cells growth. This study was designed to evaluate the effect of wogonin on telomerase activity and apoptosis of human ovarian carcinoma cell line A2780. **METHODS:** MTT assay, fluorescent microscopy, and DNA agarose gel electrophoresis were used to determine the role of wogonin on apoptosis of A2780 cells. The telomerase activity of A2780 cells were observed by using TRAP-ELISA method. **RESULTS:** A2780 cell growth was significantly inhibited by wogonin. The inhibiting effect showed concentration-dependent and time-dependent manners with IC₅₀ of 85 μg/ml. After treatment with 50 μg/ml and 100 μg/ml wogonin for 48 hours, A2780 cells showed morphological changes associated with the characters of apoptosis under fluorescent microscope. Typical DNA ladder was found using agarose gel electrophoresis. Telomerase activity of A2780 cells was gradually decreased with the increasing of wogonin concentration. When the concentration of wogonin was higher than 200 μg/ml, telomerase activity of A2780 cells was inhibited markedly. **CONCLUSION:** Wogonin can inhibit proliferation and induce apoptosis of A2780 cells within a certain concentration range (50 - 250 μg/ml). Anticancer effects of wogonin were associated with the induction of apoptosis and partly with the suppression of telomerase activity.

KEYWORDS: Wogonin; Ovarian tumor; Apoptosis; Telomerase

【摘要】背景与目的:诱导肿瘤细胞凋亡和调节端粒酶的活性可能成为肿瘤治疗的一条新途径,体内、外实验表明,汉黄芩素具有抗氧化活性和抑制肿瘤细胞生长的功效。本研究旨在评价汉黄芩素诱导卵巢癌 A2780 细胞凋亡作用和抑制端粒酶活性的能力。**方法:**应用 MTT 法、荧光显微镜及琼脂糖凝胶电泳等方法检测汉黄芩素对人卵巢癌细胞 A2780 的作用;利用 TRAP-ELISA 方法观察药物处理前后细胞端粒酶活性的变化。**结果:**汉黄芩素明显抑制 A2780 细胞增殖,抑制作用呈时间和浓度依赖性,48 h 的 IC₅₀ 为 85 μg/ml;用浓度为 50、100 μg/ml 的汉黄芩素作用 A2780 细胞 48 h,细胞出现明显的凋亡形态学改变,琼脂糖凝胶电泳出现典型的 DNA 梯状条带。端粒酶的活性随着汉黄芩素浓度的升高而降低;当汉黄芩素浓度大于 200 μg/ml 时, A2780 细胞端粒酶的活性受到明显的抑制。**结论:**50 ~ 250 μg/ml 汉黄芩素可抑制卵巢癌 A2780 细胞增殖和诱导细胞凋亡,其抗肿瘤作用机制与诱导凋亡有关,抑制端粒酶活性可能起部分作用。

关键词:汉黄芩素; 卵巢肿瘤; 凋亡; 端粒酶

中图分类号: R730; R96 文献标识码: A

文章编号: 1000 - 467X(2003)08 - 0801 - 05

细胞凋亡涉及一个相当复杂的调控过程。正常情况下,细胞增殖和细胞凋亡处于一种平衡状态,癌症的发生就是细胞增殖和凋亡失去平衡的结果。大多数恶性肿瘤细胞获得突变使他们绕过限制而无限增殖。从目前的研究结果来看,正常细胞的有限增殖是由末端复制的端粒缩短来决定的。但肿瘤细胞大多表现高的端粒酶活性,而使细胞保持不死。可见细胞凋亡和端粒酶的表达在肿瘤的发生和发展中扮演着重要的角色,如何诱导肿瘤细胞凋亡和调节端粒酶的活性成为肿瘤治疗的一条新途径。本研究观察从黄芩中获得的一种黄酮类化合物——汉黄芩素(Wogonin)诱导人卵巢癌细胞 A2780 凋亡的作用及对细胞端粒酶活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

汉黄芩素是从黄芩根中分离出的一种单体,分子量为 284 kDa,黄色晶体,其化学结构、理化性质、光谱数据参见文献 [1]。人卵巢癌细胞 A2780 购自中国医学科学院肿瘤研究所,由广西肿瘤研究所临床实验中心传代保存。

1.2 试剂及仪器

MTT(噻唑蓝)为 Sigma 公司产品,RPMI-1640 为 Gibco 公司产品;端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。酶标仪为芬兰 Labsystems 公司生产,480 DNA 扩增仪为珠海黑马医学有限公司生产,荧光显微镜为德国 Leica 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞毒实验 取对数生长期的人卵巢癌细胞 A2780 细胞悬液(1.0×10^4 /ml),分装于 96 孔板,每孔 0.1 ml,常规培养于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,分别加入不同浓度的汉黄芩素,每组设 3 个平行孔,空白对照组以生理盐水代替汉黄芩素。加药完毕继续孵育 48 h,用 MTT 法检测汉黄芩素对 A2780 细胞的生长抑制作用。实验终止前加入 2 mg/ml MTT 液,再培养 4 h,测试前加入 DMSO,充分摇匀后,测定 490 nm 处每孔的吸光度(A)值,按下式求出生长抑制率(IR),以吸光度(A)值对浓度的对数作图,从图中求出半数抑制浓度(IC₅₀)。细胞生长抑制率 = (1 - 用药组平均 A 值/对照组平均 A 值) \times 100%。

1.3.2 细胞生长曲线 将 2×10^4 个对数生长期细

胞置于 25 ml 培养瓶中,培养 24 h 后去培养液,分别换入含 50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 汉黄芩素的培养液,对照组加等量的培养液,连续培养 6 天,每天取 3 瓶细胞,加入 0.25% 胰蛋白酶液 0.5 ml,37 $^{\circ}$ C 温箱消化至细胞接近脱落瓶壁,弃去消化液,加入少量培养液,轻轻吹打成细胞悬液。台盼蓝拒染法检测活细胞数,以拒染台盼蓝者为活细胞计数,取活细胞数的均值绘制生长曲线。

1.3.3 端粒酶活性测定 不同浓度的汉黄芩素处理 A2780 细胞不同时间后,制备端粒酶提取液。取细胞提取液 5 μ l,加入 25 μ l TRAP PCR 扩增液,在 PCR 扩增仪上按以下步骤进行引物的延伸及扩增反应:25 $^{\circ}$ C 30 min、90 $^{\circ}$ C 5 min,循环 1 个周期;再 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 平衡 10 min。取上述 PCR 产物 5 μ l,加变性液 20 μ l 混匀,置室温 10 min,加入杂交液 225 μ l,混匀后取出 100 μ l,包被于抗地高辛的酶标板中室温作用 2 h,加入过氧化物酶并与底物显色作用 30 min 后终止反应,测定 450nm 和 690nm 处的 A 值。

1.3.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳 不同浓度(200、100 和 50 μ g/ml)的汉黄芩素作用 A2780 细胞一定时间后,收集细胞,用 PBS 洗涤数次,加入 0.5 ml 细胞裂解液、10 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)置 37 $^{\circ}$ C 水浴中过夜后,用等体积的饱和酚萃取,10 000 r/min 离心 5 min,取上层,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)除蛋白,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 3 倍体积的无水乙醇、1/10 体积(3 mol/L)的醋酸钠,置 -20 $^{\circ}$ C 20 min 后取出,10 000 r/min 离心 15 min,将沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次,空气干燥。加入 200 μ l TE 溶解,RNase 酶 2 μ l(10 mg/ml)反应 30 min(37 $^{\circ}$ C)。取上述样品 10 μ l,在 2% 琼脂糖凝胶电泳,75 V 电泳 1.5 h,摄像。

1.3.5 细胞形态学观察 细胞爬片后,加入 IC₅₀ 的汉黄芩素作用 48 h,PBS 洗涤,乙醇固定,HE 染色,光镜观察,摄片。细胞荧光染色:经 IC₅₀ 的汉黄芩素作用 48 h 的细胞制成细胞悬液,浓度为 1×10^7 /ml,取 95 μ l 细胞悬液,加入吖啶橙储存液(10 μ g/ml)5 μ l,吸一滴混合液于载玻片上,加盖玻片,荧光显微镜观察,摄片。

2 结 果

2.1 汉黄芩素对 A2780 细胞的细胞毒作用

如表 1 所示,随着药物浓度的升高,汉黄芩素对细胞的抑制作用也越强,其抑制作用呈浓度依赖

表 1 不同浓度汉黄芩素对卵巢癌细胞 A2780 的生长抑制率 (n = 3)

Tab. 1 Inhibitory Rate of Ovarian Tumor A2780 Cells after Treated with Different Concentrations of Wogonin

Concentration of wogonin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	A value ($\bar{x} \pm s$)	Inhibitory rate (%)
0	0.523 \pm 0.031	-
20	0.498 \pm 0.025	4.78
50	0.452 \pm 0.029	13.57
100	0.235 \pm 0.019	55.06
200	0.216 \pm 0.026	58.69
250	0.118 \pm 0.021	77.43
500	0.072 \pm 0.013	86.23

性。作用 48 h 对 A2780 细胞的 IC_{50} 为 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2 汉黄芩素对 A2780 细胞生长的影响

随着药物浓度的升高和作用时间的延长, 细胞生长抑制现象越明显。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 汉黄芩素作用 72 h 后, 细胞出现死亡, 活细胞数目比对照组减少了 30%, 见图 1。

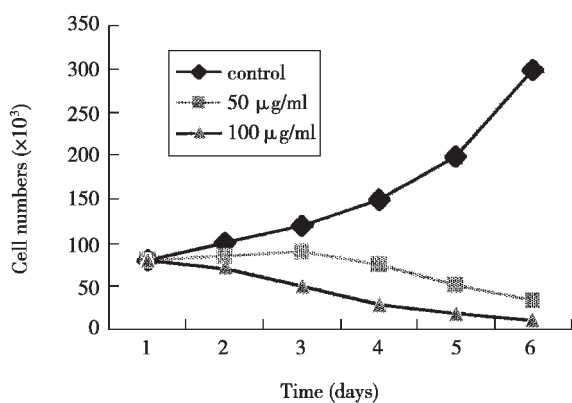


图 1 汉黄芩素作用后 A2780 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of ovarian tumor A2780 cells at different time after treated with wogonin

2.3 汉黄芩素对 A2780 细胞端粒酶活性的影响

经不同浓度的汉黄芩素处理 48 h 后, 细胞中端粒酶的活性呈现出随浓度增加而降低的趋势, 汉黄芩素浓度在 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 端粒酶活性无显著的变化; 当浓度大于 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, A2780 的端粒酶活性受到明显的抑制, 见表 2。同时我们还观察了 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素处理 A2780 细胞不同时间后, 端粒酶活性先降低后升高, 见表 3。

2.4 凋亡细胞的形态学改变

2.4.1 倒置显微镜观察 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素作用于 A2780 细胞 6 ~ 12 h 后, 细胞逐渐变圆, 体积变小, 胞膜完整, 培养液中有许多漂浮的桑椹样细胞, 细胞膜表面有小泡形成; 24 h 后上述改变更明

表 2 不同浓度汉黄芩素对 A2780 细胞端粒酶活性的影响

Tab. 2 Effect of Different Concentrations of Wogonin on Telomerase Activity of A2780 Cells for 48 Hours

Concentration of wogonin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Activity of telomerase
0	1.60
20	1.58
50	1.45
100	1.38
200	1.32
250	0.20
500	0.10

表 3 汉黄芩素作用后不同时间 A2780 细胞端粒酶活性的变化

Tab. 3 Telomerase Activity Changes of A2780 Induced by Wogonin at Different Time

85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin incubation time (hours)	Activity of telomerase
0	1.60
24	1.50
48	1.38
72	0.87
96	0.52
120	0.25
144	1.18

显。200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素作用 6 ~ 12 h 后细胞明显肿胀、体积增大。不同浓度汉黄芩素作用细胞 48 h 时, 细胞全部破裂; 未加药者细胞则无明显改变, 仅见少许漂浮的细胞。

2.4.2 光镜和荧光显微镜观察 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素处理 A2780 细胞 12 ~ 24 h 后观察, 部分细胞体积缩小, 细胞膜上出现小泡及胞膜皱缩, 胞浆变少, 细胞核明显固缩, 染色质浓染, 有的呈月牙状边集, 部分细胞裂解为碎片状; 48 h 时上述改变更明显。未加药的 A2780 细胞改变不明显, 仅见散在的细胞浆红染、核固缩。吖啶橙染色后荧光显微镜观察, 对照组 A2780 细胞呈均匀荧光染色, 而经汉黄芩素处理的细胞则可见凋亡细胞, 即细胞核或细胞浆内出现致密浓染颗粒块荧光, 见图 2。

2.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳

A2780 细胞经 0、50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 汉黄芩素处理 24 h 后, 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组出现典型的 DNA 梯形条带, 而 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 汉黄芩素组细胞出现坏死。见图 3。

3 讨论

大量实验研究表明, 恶性肿瘤增殖失控关键在

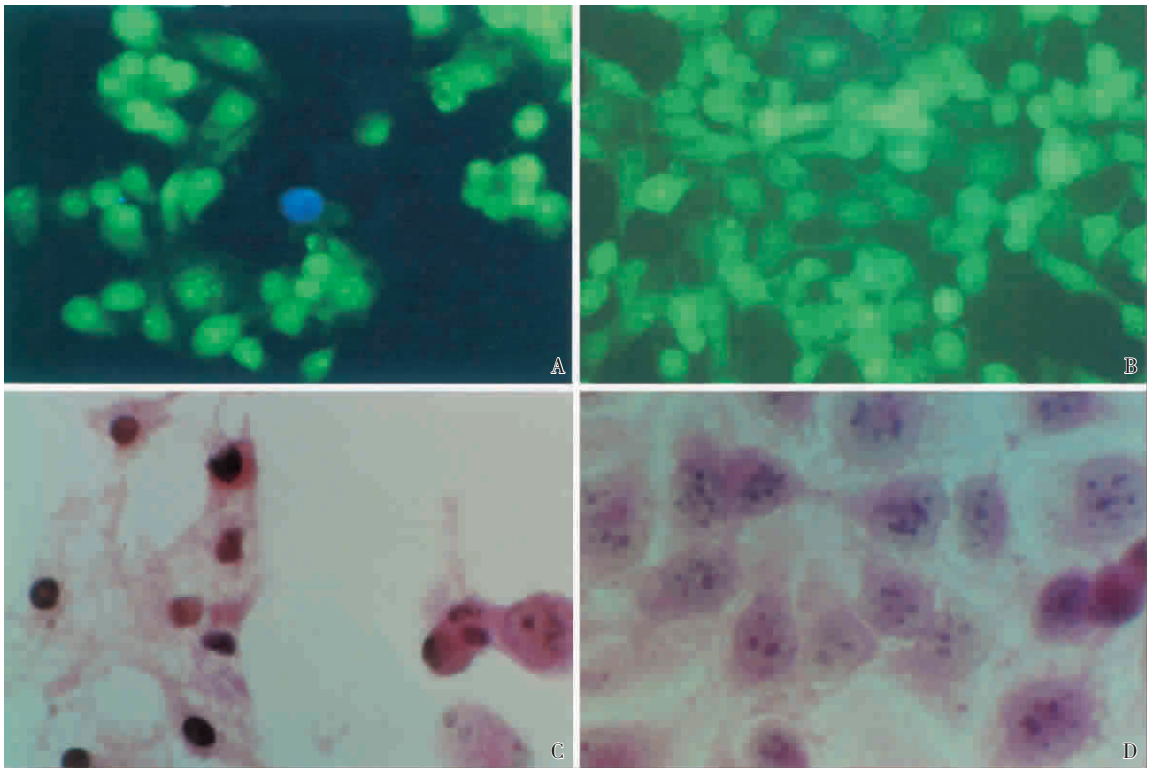


图 2 药物作用前后细胞形态学的改变

Fig. 2 Changes in the morphology of A2780 cells untreated and treated with wogonin

(A) Apoptosis in A2780 cells treated with 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin for 24 hours and determined by acridine orange staining using fluorescence microscopy ($\times 400$). (B) Control group. (C) Apoptosis in A2780 cells treated with 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin for 24 h and determined by HE staining using light microscopy ($\times 400$). (D) Control group.

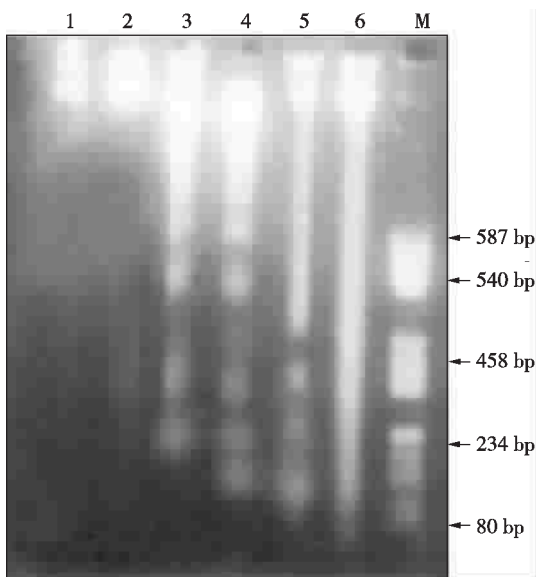


图 3 DNA 凝胶电泳图

Fig. 3 DNA ladder was observed during gel electrophoresis.

Lane M: DNA Marker, Lane 1 and 2: control cells; Lane 3: A2780 treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin; Lane 4: A2780 treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin; Lane 5: A2780 treated with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin; Lane 6: A2780 treated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wogonin.

于端粒酶的激活,永生化细胞和恶性肿瘤细胞通过激活端粒酶活性来维持端粒长度并阻止细胞死亡^[2]。由于大多数肿瘤细胞表达端粒酶活性,而正常细胞并不表达端粒酶活性,因此抑制端粒酶活性可作为肿瘤治疗的一个新的突破口。许多合成的化合物和天然产物对肿瘤具有预防作用,一些已进入临床实验阶段,这些化合物包括多酚类化合物和黄酮类化合物。汉黄芩素为中药黄芩的主要成分之一,属于典型的黄酮类化合物,体内、外实验证明它具有抗氧化和抑制肿瘤细胞生长的功效^[3,4]。但对于它能否作为端粒酶的抑制剂,诱导肿瘤细胞的凋亡,国内外未见报道。

细胞凋亡是生物体维持自身稳定和平衡的一个重要机制,是消除异常增殖细胞的一个理想途径,诱导肿瘤细胞凋亡在癌症的治疗中具有重要作用,是许多化疗药物抑制肿瘤细胞生长的机制之一,提示在肿瘤的治疗中筛选并应用能特异地诱导肿瘤细胞凋亡的药物或其它手段可提高治疗效果。近年,国内外学者对妇科恶性肿瘤中的细胞凋亡进行了研究,表明治疗卵巢癌的常用化疗药,如环磷酰胺、顺铂、

紫杉醇等均可诱导卵巢癌细胞发生凋亡^[5-8]。常用的化疗药物虽然具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,但其毒副作用相对较大,长期使用易产生耐药性。目前抗癌药物的研究已逐渐转向对动植物来源的天然化合物的研究,我国传统的中医中药已越来越受到人们的青睐。本实验发现,不同浓度的汉黄芩素对卵巢癌 A2780 细胞生长具有抑制作用,其生长抑制作用呈时间和浓度依赖性,浓度越高、作用时间越长,其抑制作用越明显。采用光镜、荧光显微镜和 DNA 琼脂糖凝胶电泳等也观察到 A2780 细胞发生凋亡的情况。本研究从形态学、DNA 结构断裂等方面均证实不同浓度的汉黄芩素能诱导卵巢癌细胞发生凋亡。

端粒酶在肿瘤发生过程中的作用已日益为人们所关注,Herbert 等^[9]发现,端粒酶的激活是癌症发展过程中的一个早期事件,化学预防剂如他莫昔芬能抑制端粒酶的活性,因此可以认为端粒酶活性是癌症化学预防研究的一个有效标志物。Mori 等^[10]也认为,在癌症的化学预防研究中除了细胞增殖标志物外,一些新的标志物如细胞凋亡和端粒酶活性也很重要,如果结合应用一些动物模型,就可以进行化学预防剂的短期筛选研究。本研究在体外观察了不同浓度的汉黄芩素对卵巢癌 A2780 细胞生长增殖的影响,证实 50~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素能诱导卵巢癌细胞产生凋亡,浓度大于或等于 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的汉黄芩素能抑制端粒酶活性的表达。汉黄芩素来源于常用的中草药,毒性低,价格便宜,有可能是一种具有应用前景的诱导肿瘤细胞凋亡的天然药物。

[参 考 文 献]

- [1] Ishimaru K, Nishikawa K, Omoto T, et al. Two flavone 2'-glucosides from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(1): 279 - 281.
- [2] Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12): 884 - 887.
- [3] Tsai TH, Chou CJ, Tsai TR, et al. Determination of wogonin in rat plasma by liquid chromatography and its pharmacokinetic application [J]. *Planta Medica*, 1996, 62: 263 - 266.
- [4] Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, et al. Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. *Urology*, 2000, 55(6): 951 - 955.
- [5] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73: 2017 - 2020.
- [6] Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau J. Chemotherapy induce apoptosis in epithelial ovarian cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 1995, 85: 1007 - 1010.
- [7] Fesus L, Sxondy C, Uray I, et al. Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventive agent [J]. *J Cell Biochem*, 1995, 85: 151 - 154.
- [8] Gibb RK, Taylor DD, Wan T, et al. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines [J]. *Gynecol Oncol*, 1997, 65: 13 - 14.
- [9] Herbert BS, Wright AC, Passons CM, et al. Effects of chemopreventive and antitelomerase agents on the spontaneous immortalization of breast epithelial cells [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 39 - 45.
- [10] Mori H, Sugie S, Yoshimi N, et al. Control of cell proliferation in cancer prevention [J]. *Mut Res*, 1999, 16, 428: 291 - 298.

[编辑:张 菊;校对:甘可建]