

## 蟾毒它灵对人胃癌 BGC - 823 细胞的促凋亡作用

吴兴新<sup>1</sup>, 孙洋<sup>1</sup>, 周晓斌<sup>1</sup>, 张剑<sup>1,2</sup>, 余伯阳<sup>2</sup>, 徐强<sup>1</sup> (1. 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093; 2. 中国药科大学中药复方研究室, 南京 210009)

**摘要:** 目的 考察蟾蜍甾烯类化合物的生物转化产物蟾毒它灵(bufotalin)对 BGC - 823 细胞的促凋亡作用, 初步探讨其作用机理。方法 MTT 法检测细胞毒作用、Hoechst 染色法和 Annexin V 染色法检测细胞凋亡, 免疫印迹杂交法检测裂解形式的 caspase - 3。结果 蟾毒它灵在 1 μmol/L 时对 BGC - 823 细胞的毒性作用达到 50% 以上, 形态学观察和流式细胞仪检测结果显示蟾毒它灵可明显促进 BGC - 823 细胞的凋亡, 上调 caspase - 3 的表达。结论 蟾毒它灵对 BGC - 823 细胞有明显的促凋亡作用, 其作用机理可能通过 caspase - 3 凋亡途径实现。

**关键词:** 蟾毒它灵; BGC - 823 细胞; 凋亡; 半胱天冬氨酸蛋白酶 3

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003 - 9783(2007)02 - 0117 - 03

### Effect of Bufotalin on the Apoptosis of BGC - 823 Cells

WU Xingxin<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>1</sup>, ZHOU Xiaobin<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1, 2</sup>, YU Boyang<sup>2</sup>, XU Qiang<sup>1</sup> (1. National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093; 2. Department of TCM Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of the bioconversion product of bufotalin from bufadienolide on the apoptosis of BGC - 823 cells and to explore its mechanism. **Methods** BGC - 823 cells were exposed to the compound and the cytotoxicity was measured with MTT assay. Hoechst 33258 staining and Annexin V staining were adopted to detect apoptosis, and western blotting method was used for the assay of cracked caspase - 3. **Results** Bufotalin showed a cytotoxicity against BGC - 823 cells in a concentration - dependent manner, the cytotoxicity of 1 μmol was up to 50% and above. Bufotalin promoted BGC - 823 cell apoptosis and increased the level of activated caspase - 3. **Conclusion** Bufotalin can induce the apoptosis of BGC - 823 cells and its mechanism may be through caspase - 3 pathway.

**Keywords:** Bufotalin; BGC - 823 cells; Apoptosis; Caspase - 3

蟾酥是传统的名贵药材, 它的主要有效成分是蟾蜍甾烯, 在抗肿瘤方面具有高效和抗癌谱广等特点<sup>[1-2]</sup>。蟾蜍甾烯同时也具有强心活性, 属于强心甙的范畴<sup>[3]</sup>。为了得到较为理想的活性化合物, 常需要对一些天然化合物进行结构改造。然而, 由于蟾蜍甾烯类化合物为复杂结构的天然有机化合物, 传统的有机合成方法很难对其进行结构修饰, 尤其是在母核上不活泼位点引入一些基团更是十分困难。生物转化是利用微生物培养过程中释放一些酶体系对外源化学成分进行结构改造, 具有底物选择性高, 无环境污染、反应条件温和及成本低廉等优点。目前应用此技术已经获得了大量结构新颖的天然产物衍生物, 为新药的研制与开发提供了极有价值的先导化合物<sup>[4-5]</sup>。为

此, 我们通过生物转化方法试图改变蟾蜍甾烯的结构。将蟾蜍甾烯经生物转化后得到一系列的化合物, 其中蟾毒它灵(图 1)对人胃癌 BGC - 823 细胞具有较强的杀伤作用。进一步研究发现, 这种杀伤作用是通过诱导 BGC - 823 细胞凋亡实现的。

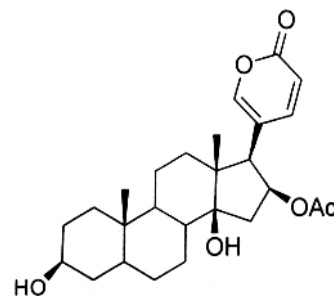


图 1 蟾毒它灵的结构式

收稿日期: 2006 - 09 - 05

作者简介: 吴兴新 (1983 - ), 男, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学方向。Tel: (025)83686552; Email: wx4670@163.com。通讯作者: 徐强, Email: molpharm@163.com。

基金项目: 中国博士后基金(20060400916)。

## 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂** Hoechst 33258 (Molecule Probe, USA); Annexin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天, 杭州, 中国); 24、96 - well plate (Costar); RPMI 1640 (GIBCO); 喜树碱 (CPT, Sigma); 四甲基偶氮唑盐 [3 - (4, 5 - dimethyl - 2 - thiazol) - 2, 5 - diphenyl - 2H - tetrazolium bromide, MTT, Sigma]; 二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO, 分析纯, 苏州正兴化工研究所); 蛋白定量试剂盒 (PIERCE, USA); 过硫酸铵 (宜兴市第二化学试剂厂); N, N, N', N' - Tetramethyl - ethylenediamine (TEMED, 和光纯药工业株式会社, 日本); Actin 抗体 (BA0410) (博士德, 武汉, 中国); PVDF 膜 (Millipore, USA); 预染 marker (PIERCE, USA); HRP 底物 (KPL); X - 医用感光胶片 (上海申贝办公机械有限公司感光材料厂)。

**1.2 细胞** BGC - 823 细胞 (上海细胞所)。

**1.3 仪器** 酶标仪 (Sunrise, TECAN 公司); 流式细胞仪 (Calibur, BD); 装有 CCD 的倒置荧光显微镜 (Zeiss, 德国)。

### 1.4 方法

**1.4.1 对 BGC - 823 细胞的细胞毒作用** 取对数生长期细胞, 制成  $8 \times 10^7/L$  的悬液, 按每孔  $100 \mu L$ , 接种于 96 孔培养板, 培养 12 h, 药物组浓度分别为  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7} mol/L$ , 空白对照组加  $100 \mu L$  培养液, 溶剂对照组加等体积的溶剂量, 每组设 3 复孔,  $37^\circ C$ ,  $5\% CO_2$  培养 24 h。然后轻轻吸取细胞培养基, 加入  $0.5 g/L$  的 MTT  $200 \mu L$ , 于培养箱中孵育 4 h, 吸取上清, 每孔加入  $150 \mu L$  的 DMSO, 充分震荡, 用酶标仪于  $540 nm$  检测各孔的光密度吸收值, 以不加药物组作为空白对照组计算抑制率。

**1.4.2 Hoechst 33258 染色** 细胞接种于 96 孔培养板 ( $2 \times 10^4/孔$ ), 药物处理组加入蟾毒它灵 (浓度分别为  $0.1 \mu mol/L$ ,  $1 \mu mol/L$  和  $10 \mu mol/L$ ), 空白对照组加入  $100 \mu L$  培养液,  $37^\circ C$ ,  $5\% CO_2$  培养 12 h 后, 弃去培养基, 用冷 PBS (pH 7.2) 洗一遍, 然后用  $0.5\%$  的多聚甲醛固定 30 min, 加入 Hoechst 33258 使其终浓度分别为  $5 \mu g/mL$ 。5 min 后, 用装有 CCD 的倒置荧光显微镜拍照, 每个样本随机选取 5 个视野。

**1.4.3 Annexin V - FITC 染色** 药物处理组和对照组细胞用胰酶消化,  $1000 r/min$  离心 5 min ( $4^\circ C$ ), 收集细胞, 弃上清, PBS 洗, 弃上清, 细胞沉淀重悬于结合缓冲液, 加入 Annexin V - FITC  $1.25 \mu L$ , 轻轻混匀, 避光反应 10 min, 同时以不加 Annexin V - FITC

的细胞作为阴性对照, 用流式细胞仪检测 FL1 通道荧光。

**1.4.4 免疫印迹杂交** 取药物处理组和对照组细胞用  $150 \mu L$  的裂解液 ( $10 mmol/L$  HEPES;  $2 mmol/L$  EDTA;  $0.1\%$  CHAPS;  $5 mmol/L$  DTT;  $1 mmol/L$  PMSF) 裂解。冰浴 0.5 h, 离心  $12000 g$ , 2 min,  $4^\circ C$ , 取上清。用蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。制备  $12\%$  的 SDS - PAGE 胶, 以  $50 \mu g$  的蛋白量上样,  $4^\circ C$  低温下电泳, 恒定电流  $20 mA/枚$ , 时间为 1 h。电泳结束后, 用半干法转至 PVDF。转移完后用膜用丽春红 S ( $0.5\%$  ponceaus S in  $1\%$  acetic acid) 染色, 直至红条带出现。根据预染 maker 将膜剪成所需大小, 用  $0.1 mmol/L$  的 NaOH 洗除丽春红 S。膜用阻断液 ( $2\%$  free fat milk in  $10 mmol/L$  Tris - Cl,  $50 mmol/L$  NaCl,  $0.1\%$  Tween 20, pH 7.4) 阻断,  $4^\circ C$  过夜。过夜后, 膜用洗涤溶液 ( $10 mmol/L$  Tris - Cl,  $50 mmol/L$  NaCl,  $0.1\%$  Tween 20, pH 7.4) 洗涤 3 次, 第 1、2 次 5 min, 第 3 次 10 min。膜与适当稀释的一抗共孵,  $4^\circ C$  过夜, 同法洗涤 3 次, 与适当稀释的二抗共孵, 室温 2 h, 膜同法洗涤 3 次, 与底物共孵 2 min。膜与 X - 感光胶片在暗盒曝光。

**1.5 统计方法** 数据以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。先用单因素方差进行分析, 再用 Dunnett's test 来检验组间的差异。

## 2 结果

**2.1 蟾毒它灵对 BGC - 823 细胞的细胞毒作用** 由图 2 可见, 蟾毒它灵能剂量依赖地抑制 BGC - 823 细胞的存活, 在  $1 \mu mol/L$  时抑制率达到  $61\%$ 。

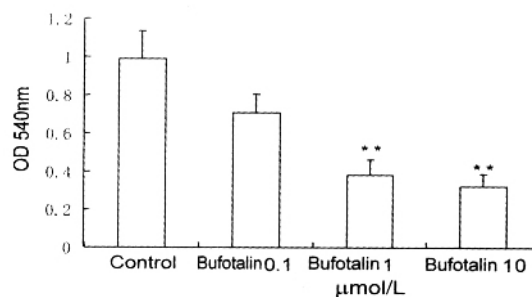


图 2 蟾毒它灵对 BGC - 823 细胞毒作用的考察  
Control 为空白对照组, \*\* $P < 0.01$

**2.2 蟾毒它灵诱导 BGC - 823 细胞凋亡作用** 由图 3 可见, 与空白对照组相比, 蟾毒它灵在  $0.1 \mu mol/L$ ,  $1 \mu mol/L$  和  $10 \mu mol/L$  呈剂量依赖性地使细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。磷脂酰丝氨酸外翻是细胞发生早期凋亡的特征之一, Annexin V 检测暴露在细胞膜表面的磷脂酰丝氨酸。如图 4 所示, 蟾毒

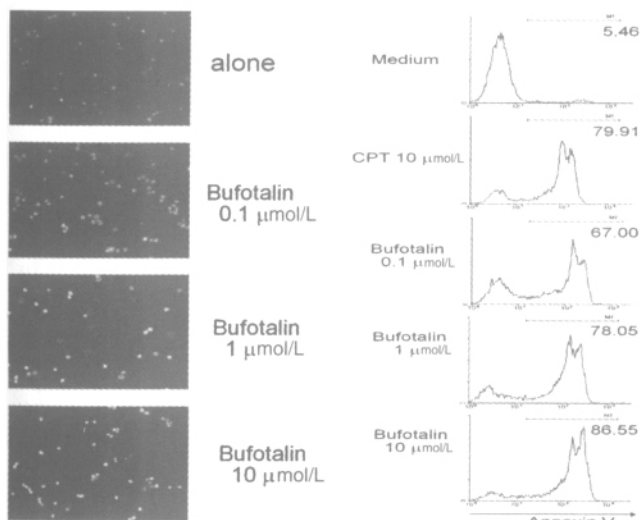


图3 Hoechst 33258 染色检测蟾毒它灵促凋亡作用 图4 Annexin V 染色分析蟾毒它灵诱导 BGC-823 凋亡作用

它灵在 0.1 μmol/L, 1 μmol/L 和 10 μmol/L 呈剂量依赖性地促进了 BGC-823 细胞的磷脂酰丝氨酸的外翻。在 1 μmol/L 浓度时, 其促凋亡能力与 10 μmol/L 喜树碱(CPT)相当。

**2.3 蟾毒它灵促 BGC-823 细胞凋亡过程中 caspase-3 的变化** 活化的 caspase-3 仅在凋亡细胞中发现。因此, 检测活化形式的 caspase-3 有助于发现早期的凋亡细胞。从图 5 可以看出, 随着蟾毒它灵浓度的增加, 活化形式的 caspase-3 明显增加, 其中以 10 μmol/L 的浓度时最为明显。

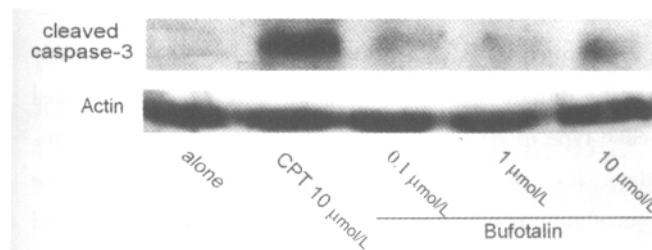


图5 蟾毒它灵诱导 BGC-823 凋亡中 caspase-3 的变化

### 3 讨论

在以往对蟾蜍甾烯类化合物药理活性的研究中发现, 该类化合物的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>、选择性诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>以及抗菌活性<sup>[8]</sup>等表现出明显的结构与功能的相关性, 化学结构上细微的变化(某一个取代基的改变或取代位置的变化)会引起活性很大的变化<sup>[9]</sup>。我们通过生物转化的方法对蟾蜍甾烯进行结构上的改变, 得到了一系列化合物。以人胃癌细胞 BGC-823 为筛选平台, 进而得到了抑制肿瘤细胞生长作用明显的化合物——蟾毒它灵。进一步, 分别通过 Hoechst 33258 染色和流式细胞仪检测 Annexin V 从定性和定

量二个方面证实了该化合物能浓度依赖性地促进 BGC-823 细胞的凋亡。然而, 在实验中所用最高浓度对正常脾淋巴细胞却无明显的细胞毒作用(数据未列出)。由此可见, 蟾毒它灵可选择性诱导肿瘤细胞的凋亡而不影响正常淋巴细胞的存活。蟾毒灵和蟾毒它灵有类似的结构。有报道表明, 蟾毒灵是细胞拓扑异构酶 II 的抑制剂, 对中国仓鼠细胞的 X 射线损伤修复具有破坏作用, 进而促进细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。在检测活化的 caspase-3 时, 我们发现蟾毒它灵能促进 caspase-3 活性形式的增加。这表明蟾毒它灵促进 BGC-823 细胞的凋亡可能通过 caspase-3 这条通路。caspase-3 作为凋亡通路中的一个枢纽, 其上游可能是内质网、死亡受体如 Fas 或线粒体途径, 故其机理仍需进一步的研究。

本研究从蟾蜍甾烯的生物转化产物中筛选出了选择性较强的活性化合物蟾毒它灵, 并初步探讨了其对 BGC-823 细胞的促凋亡作用的机理, 为进一步研究其促凋亡机理打下了基础。

### 参考文献:

- [1] 杨立宏. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究[J]. 药学学报, 1992, 27(9): 679-683.
- [2] 聂淑琴. 蟾蜍二烯羟酸内酯的抗肿瘤作用[J]. 国外医学·中医中药分册, 2000, 22(4): 233.
- [3] Kellerman TS, Coetzer JAW, Naudé TW. Plant Poisoning and Mycotoxins of Livestock in Southern Africa[M]. Oxford Univ. Press, Cape Town, 1998: 99-105.
- [4] Wendy A, Loughlin. Biotransformation in organic synthesis[J]. Biore-source Technol, 2000, 74: 49-62.
- [5] Hanson JR. The microbiological transformation of diterpenoids[J]. Nat. Prod. Rep, 1992, 9: 139-151.
- [6] Kamano Y, Yamashita A, Nogawa T, et al. QSAR evaluation of the Ch'an Su and related bufadienolides against the colchicines-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5[J]. J. Med. Chem, 2002, 45: 5440-5447.
- [7] Daniel D, Susal C, Kopp B, et al. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac Steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives[J]. Int. Immunopharmacol, 2003, 3: 1791-1801.
- [8] Cunha Filho GA, Schwartz CA, Resck IS, et al. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major component from skin secretion of the toad Bufo rubescens[J]. Toxicon, 2005, 45: 777-782.
- [9] Goto A, Yamada K, Yagi N, et al. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors[J]. Pharmacol. Rev, 1992, 44: 377-399.
- [10] Pastor N, Cortes F. Bufalin influences the repair of X-ray-induced DNA breaks in Chinese hamster cells[J]. DNA Repair, 2003, 2: 1353-1360.

(编辑: 邓响潮)