



陈宁,赵丹,郑威,等.水鬼蕉生物碱对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响[J].黑龙江农业科学,2019(6):128-131,132.

水鬼蕉生物碱对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响

陈宁,赵丹,郑威,李均,杜娟,凌娜,宋冬雪,徐昶儒

(哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:为揭示水鬼蕉生物碱(AHL)对 HepG-2 细胞作用,采用 FITC-Annexin V/PI 双染色法检测 AHL 对 HepG-2 细胞凋亡的影响,并检测了 AHL 对 HepG-2 细胞内 Ca^{2+} 浓度、活性氧(ROS)、pH 的影响。结果表明:AHL 可以通过细胞内 ROS、 Ca^{2+} 、pH 三者间相互作用而诱导细胞凋亡。

关键词:水鬼蕉生物碱;FITC-Annexin V/PI 双染色法; Ca^{2+} 浓度;活性氧;pH

水鬼蕉(*Hymenocallis littoralis*),又被称为美洲水鬼蕉、蜘蛛兰、蜘蛛百合,为石蒜科(Amaryllidaceae)水鬼蕉属多年生鳞茎草本植物。据《中华本草》中记载,水鬼蕉其性温、味辛,多以叶及鳞茎入药,水鬼蕉具有抗肿瘤、抗病毒、消肿止痛,舒筋活血的作用。主要用于风湿性关节痛、跌打肿痛、疳疽疮肿;痔疮等^[1]。水鬼蕉属原产于美洲热带地区,西印度群岛。后来我国福建、云南、广西、广东等地区引种栽植。目前,在我国有着极其丰富的资源。水鬼蕉的鳞茎中含有大量的生物碱成分,其具有一定的抗肿瘤细胞毒活性,对抗肿瘤药物的新药开发提供理论依据。本文研究了水鬼蕉生物碱对人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响,为其抗肿瘤作用提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水鬼蕉总生物碱(AHL),由哈尔滨商业大学药学院药物工程技术研究中心提供;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、Fluo-3 AM(钙离子荧光探针)、BCECF AM(pH 荧光探针)、活性氧检测试剂盒均来自碧云天生物技术公司;TCS-SP2激光共聚焦扫描显微镜,德国 LEICA 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取对数期 HepG-2 细胞悬液,稀释成 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,6 孔板每孔加 2 mL 细胞悬液,5% CO_2 、37 °C 培养箱中培养。

1.2.2 分组及给药 培养 HepG-2 细胞 24 h 后,取出培养箱内的 6 孔板,在该板的每个细胞孔内加入已经配置好的 1 mL 的 AHL 药液,将给药组做 3 个平行孔,以确保实验数据的准确性。AHL(生物碱质量分数为 62.15%)的给药浓度分别为 1、2、4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;作为阳性药的羟基喜树碱的浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;空白对照组加入 1 mL 的 RPMI1640 培养液,将该 6 孔板放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.3 FITC-Annexin V/PI 双染 AHL 作用 HepG-2 细胞 48 h 后收集细胞培养液,转移置离心管中,1 000 g 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 轻悬,取 5×10^4 细胞,1 000 g 离心 5 min,弃上清液,加入 200 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。室温避光孵育 10 min。加入 10 μL 碘化丙啶染色液,混匀,冰浴避光放置,用激光共聚焦显微镜检测。

1.2.4 HepG-2 细胞的钙离子浓度检测 AHL 作用 HepG-2 细胞 48 h 后,六孔板内的 HepG-2 细胞被收集后,用 500 μL PBS 将细胞吹匀,再加入已配置好的 200 μL 的 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Fluo-3/AM,避光,37 °C 水浴孵育 1 h 后,离心去掉 Fluo-3/AM,用无菌的 PBS 洗 3 次,去掉 PBS,加入 400 μL PBS 轻轻吹匀细胞后将细胞悬液放入小皿内,用激光共聚焦显微镜检测 HepG-2 细胞的钙离子浓度。

1.2.5 HepG-2 细胞的 pH 测定 AHL 作用 HepG-2 细胞 48 h 后,六孔板内的 HepG-2 细胞被收集后,用在 500 μL PBS 吹匀细胞,再加入已配置好的 200 μL 的 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ BCECF/AM,做好避光措施,37 °C 水浴孵育 0.5 h 后离心去掉 BCECF/AM,用无菌 PBS 洗 3 次,去掉 PBS,加入 400 μL PBS 轻轻吹匀细胞后将细胞悬液放入

收稿日期:2019-03-02

基金项目:黑龙江省博士后基金(LBH-Z16095);黑龙江省自然科学基金(H2017 001);哈尔滨市应用技术与开发项目(2016RQQXJ127)。

第一作者简介:陈宁(1981-),男,博士,副教授,从事抗肿瘤药理研究。E-mail:13936689822@126.com。

小皿内,用激光共聚焦显微镜检测 BCECF 荧光强度。

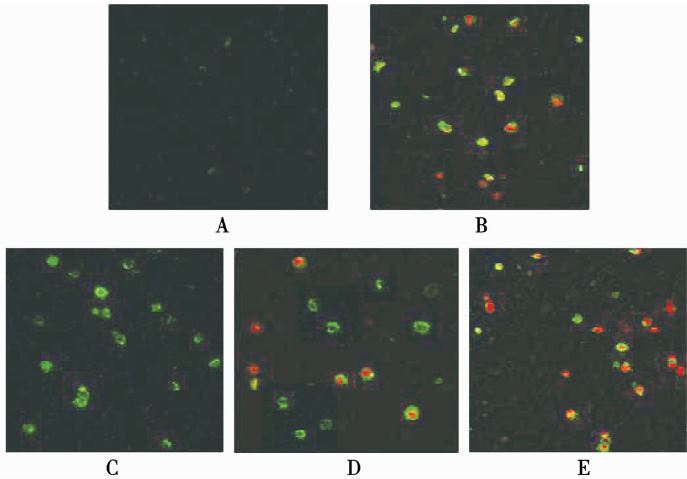
1.2.6 HepG-2 细胞活性氧含量测定 AHL 作用 HepG-2 细胞 48 h 后,六孔板内的 HepG-2 细胞被收集后,用 500 μL PBS 吹匀细胞,加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ DCFH-DA (1:1 000 用无血清的 RPMI1640 培养液稀释),吹匀细胞,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中避光孵育 20 min 后,用 PBS 洗涤 3 次,目的是充分除掉细胞内的 DCFH-DA 溶液,加入 400 μL PBS 轻轻吹匀细胞后将细胞悬液放入小皿内,用激光共聚焦显微镜检测 HepG-2 细胞活性氧含量。

1.2.7 数据分析 采用 SPSS 18.0 分析数据。

2 结果与分析

2.1 FITC-Annexin V/PI 双染色法检测 AHL 对 HepG-2 细胞凋亡的影响

由图 1 可见,空白对照组几乎没有荧光, HepG-2 细胞在阳性药 HCPT 作用 48 h 后,细胞凋亡明显,Annexin V 和 PI 高染,细胞核为明亮红色荧光,细胞膜为绿色荧光;HepG-2 细胞经不同浓度 AHL 作用 48 h 后,低剂量组 Annexin V 和 PI 均低染,细胞核几乎无荧光,细胞膜呈微弱绿色荧光;中剂量组 Annexin V 高染,PI 低染,细胞膜绿色荧光明亮,细胞核红色荧光微弱;高剂量组 Annexin V 和 PI 均高染,细胞核为明亮红色荧光,细胞膜为绿色荧光(图 1)。



A:空白对照组; B:羟基喜树碱组; C:低剂量组 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D:中剂量组 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; E:高剂量组 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
A:Control group; B:HPTC; C:Low group 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D:Middle group 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; E:High group 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 1 AHL 对 HepG-2 细胞凋亡的作用

Fig. 1 Effects of AHL on apoptosis in HepG-2 cell

激光共聚焦显微镜观察 AHL 对 HepG-2 细胞的影响,显示在给药浓度升高条件下,多数 HepG-2 细胞发生凋亡,并发现典型的晚期凋亡现象。

2.2 AHL 对 HepG-2 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

由表 1 和图 2 可知,HepG-2 细胞在阳性药 HCPT 作用 48 h 后,细胞内的 Ca^{2+} 浓度极显著高于空白对照组,差异有显著性意义($P<0.01$)。HepG-2 细胞经不同浓度 AHL 作用 48 h 后,各给药组细胞内 Ca^{2+} 浓度均极显著高于空白对照组($P<0.01$),随着 AHL 浓度的增加细胞内的 Ca^{2+} 浓度也逐渐升高。

激光共聚焦显微镜检测 AHL 对 HepG-2 细胞钙离子含量的影响,结果显示,AHL 作用 HepG-2 细胞后,细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高,且随

着给药浓度的增大,钙离子的含量逐渐增加。

表 1 AHL 对 HepG-2 细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

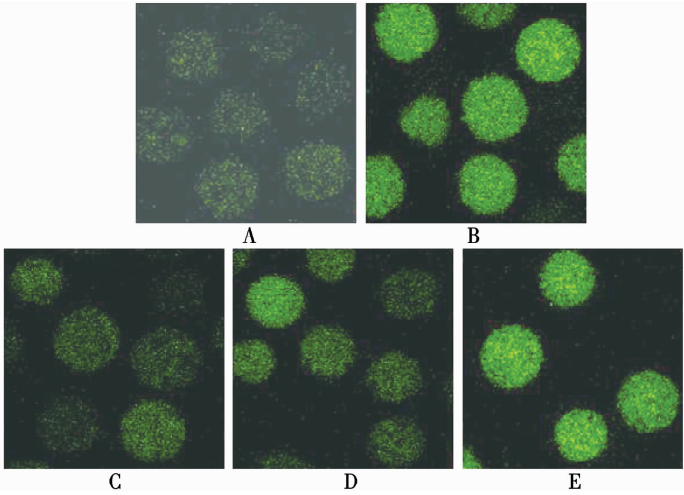
Table 1 Effects of AHL on intracellular fluorescent intensity of Ca^{2+} in HepG-2 cell

($\bar{x}\pm s,n=20$)

组别 Groups	剂量 Dose/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Ca^{2+} 变化(平均荧光强度) Variation of Ca^{2+} (Mean fluorescent intensity)
对照 Control	-	6.138 \pm 0.268
HCPT	10	85.459 \pm 3.628**
AHL 低 Low	1	12.936 \pm 1.105**
AHL 中 Mid	2	32.340 \pm 1.533**
AHL 高 High	4	82.762 \pm 4.181**

与空白对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ Compared with control.



A:空白对照组；B:羟基喜树碱组；C:低剂量组 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；D:中剂量组 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；E:高剂量组 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
A:Control group；B:HPTC；C:Low group $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；D:Middle group $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；E:High group $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
图2 AHL对HepG-2细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

Fig.2 Effects of AHL on intracellular fluorescent Intensity of Ca^{2+} in HepG-2 cell

2.3 AHL对HepG-2细胞内pH的影响

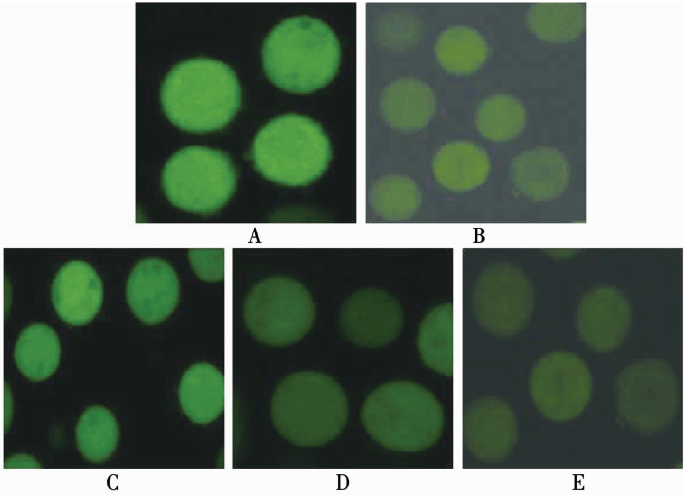
由表2结果显示，HepG-2细胞经阳性药HCPT作用48h后，细胞内的pH显著低于空白对照组，差异有显著性意义($P<0.01$)。HepG-2细胞经不同浓度AHL作用48h后，各给药组细胞内pH荧光强度均显著低于空白对照组($P<0.01$)，随着AHL浓度的增加细胞内的pH荧光强度逐渐降低(表2,图3)。

激光共聚焦显微镜检测AHL对HepG-2细胞pH的影响,结果显示,AHL作用HepG-2细胞后,随着给药浓度的增大,细胞内pH显著下降。

表2 AHL对HepG-2细胞pH的影响

Table 2 Effects of AHL on pH in HepG-2

cell($\bar{x}\pm s,n=20$)		
组别 Groups	剂量 Dose/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	pH变化(平均荧光强度) Variation of pH (Mean fluorescent intensity)
对照 Control	-	107.944 ± 1.462
HCPT	10	$21.313\pm0.800^{**}$
AHL低 Low	1	$91.104\pm3.873^{**}$
AHL中 Mid	2	$63.612\pm1.722^{**}$
AHL高 High	4	$32.324\pm1.512^{**}$



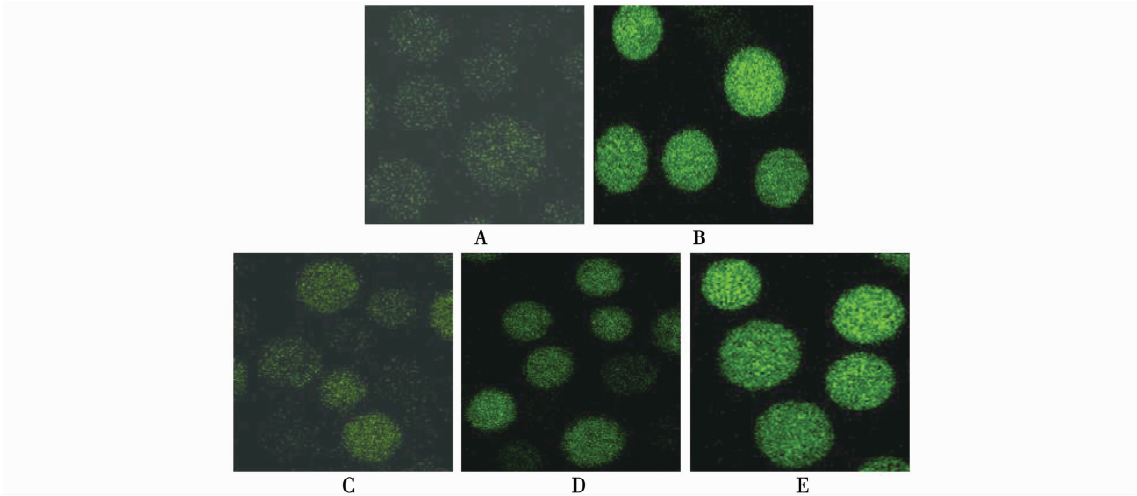
A:空白对照组；B:羟基喜树碱组；C:低剂量组 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；D:中剂量组 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；E:高剂量组 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
A:Control group；B:HPTC；C:Low group $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；D:Middle group $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；E:High group $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
图3 AHL对HepG-2细胞pH的影响

Fig.3 Effects of AHL on intracellular fluorescent intensity of pH in HepG-2 cell

2.4 AHL 对 HepG-2 细胞内活性氧(ROS)影响

实验结果显示, HepG-2 细胞经阳性药 HCPT 作用 48 h 后,细胞内的 ROS 水平显著高于空白对照组,差异有显著性意义($P<0.01$)。

HepG-2 细胞经不同浓度 AHL 作用 48 h 后,各给药组细胞内 ROS 水平均显著高于空白对照组($P<0.01$),随着 AHL 浓度的增加细胞内的 ROS 水平也逐渐升高(表 3,图 4)。



A:空白对照组; B:羟基喜树碱组; C:低剂量组 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D:中剂量组 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; E:高剂量组 $4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
A:Control group; B:HPTC; C:Low group $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D:Middle group $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; E:High group $4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

图 4 AHL 对 HepG-2 细胞 ROS 的影响

Fig. 4 Effects of AHL on intracellular fluorescent intensity of ROS in HepG-2 cell

表 3 AHL 对 HepG-2 细胞 ROS 的影响

Table 3 Effects of AHL on intracellular

fluorescent intensity of ROS in HepG-2 cell

($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别 Groups	剂量 Dose/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ROS 变化(平均荧光强度) Variation of ROS (Mean fluorescent intensity)
Control	-	5.191 ± 0.608
HCPT	10	$87.294\pm2.706^{**}$
Low	1	$13.776\pm1.227^{**}$
AHL Mid	2	$42.275\pm1.710^{**}$
High	4	$86.119\pm3.521^{**}$

与空白对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control.

激光共聚焦显微镜检测 AHL 对 HepG-2 细胞活性氧含量影响,结果显示, HepG-2 细胞在 AHL 作用后,随着给药浓度的增大,能够显著提高细胞内活性氧水平。

3 结论与讨论

本研究表明, AHL 可以通过细胞内 ROS、 Ca^{2+} 、pH 三者间相互作用而诱导细胞凋亡。水鬼蕉生物碱诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡,在内

质网应急状态下,细胞内无机磷酸盐浓度升高、线粒体内膜的去极化、活性氧增加和 Ca^{2+} 浓度的升高都能促使 MPTP 开放^[2-3]。MPTP 的开放,可使一些分子量小的物质通过,导致线粒体膜内外质子和电势梯度不稳定,线粒体膜内外的跨膜 H^{+} 梯度消失,离子浓度达到平衡,线粒体膜电位(MMP)迅速下降,引起线粒体基质高渗,外膜断裂,线粒体释放促凋亡因子,有利于 Caspase 自动执行凋亡程序^[4]。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 藏药卷[M]. 上海科学技术出版社, 2002.
[2] Parihar M S, Brewer G J. Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons[J]. Journal of Neuroscience Research, 2007, 85(5):1018-1032.
[3] Lemasters J J, Nieminen A L, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1366(1-2):177-196.
[4] Reynolds J, Wolf C, Eastman A. Intracellular acidification is associated with, but not required for caspase activation, DNA fragmentation or apoptosis[J]. International Journal of Oncology, 1997, 11(6):1241-1246.



缪珊,夏振平,李志强. NaCl 胁迫对三种狼尾草生长及生理特性的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2019(6):132-136.

NaCl 胁迫对三种狼尾草生长及生理特性的影响

缪珊,夏振平,李志强

(北京农业职业学院, 北京 102442)

摘要:为掌握 3 种狼尾草的耐盐性, 对它们进行为期 30 d 的 NaCl 盐胁迫试验, 设置 5 个土壤含盐量梯度处理, 分别为 0.25, 0.35, 0.50, 0.60, 0.8 g·kg⁻¹, 以清水为对照。测定相关形态及生理指标, 结合死亡率、枯叶率和茎叶生长量进行分析。结果表明: 3 种狼尾草耐盐能力由强至弱的次序为长穗狼尾草、矮株狼尾草、东方狼尾草, 它们能够忍受的土壤 NaCl 含量分别为 0.60, 0.60, 0.50 g·kg⁻¹。随着土壤含盐量的增加, 3 种狼尾草叶片中 SOD 及 CAT 的活性均呈现先升高后降低的变化趋势; MDA 含量呈先上升后下降, 最后又上升的变化趋势, 且与 SOD 和 CAT 活性的变化有一定的关系。

关键词:狼尾草; 耐盐性; 盐胁迫

狼尾草属植物种类繁多, 广泛分布于热带、亚热带及温带地区, 少数种类可达温寒带地区。我国东北、华北、华东、中南以及西南各省均有野生资源分布^[1]。狼尾草属植物在我国最早是作为牧草栽培利用, 作为观赏草在园林中的应用相对较晚, 在 20 世纪末才开始在园林绿地中应用栽植^[2]。其姿态优美、观赏性佳, 具有四季鲜明景观和质朴自然的气质, 而且生命力强健、抗逆性强、病虫害少、适应性广, 容易栽培, 因此很快成为生态园林中较为常见的一类观赏草, 特别在华北、西北水资源短缺地区有着广阔的应用空间和发展前景^[3]。

目前, 对狼尾草属植物的研究主要集中在引

种栽培、繁育及应用方面, 对耐盐性的研究较少^[4-6]。本研究选用了长穗狼尾草、东方狼尾草、矮株狼尾草为试材, 对其在盐胁迫下的形态与生理变化规律进行研究, 以期为狼尾草属植物在园林中的引种驯化、推广应用提供理论和实践依据, 同时也为探索观赏草的抗逆性评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在北京农业职业学院智能温室进行。2018 年 5 月从北京草业与环境研究发展中心引种栽培长穗狼尾草 (*Pennisetum alopecuroides* ‘Changsui’)、东方狼尾草 (*P. orientale*) 和矮株狼尾草 (*P. alopecuroides* ‘Aizhu’), 均为当年分株苗, 定植于 1 加仑盆中, 盆土以草炭和园土按体积比 1:1 配制。每盆加入干重为 1.2 kg 的培养土。缓苗后于 5 月底进行盐胁迫处理。试验期间, 温室日平均气温 20~30 ℃, 空气相对湿度 60%~90%。

收稿日期: 2018-12-18

基金项目: 北京农业职业学院(XY-YF-17-02)。

第一作者简介: 缪珊(1972-), 女, 硕士, 副教授, 从事园林植物栽培研究。E-mail: mlaoshanhan@sohu.com。

Effects of Alkaloids of *Hymenocallis littoralis* on Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells

CHEN Ning, ZHAO Dan, ZHENG Wei, LI Jun, DU Juan, LING Na, SONG Dong-xue, XU Chang-ru

(Life Sciences and Environmental Sciences Research Center, Harbin 150076, China)

Abstract: In order to reveal the effect of alkaloids of Amaryllidaceae plant *Hymenocallis littoralis* (AHL) on HepG-2 cells, FITC-Annexin V/PI double staining was used to detect the effect of AHL on apoptosis of HepG-2 cells and on Ca²⁺ concentration, reactive oxygen species (ROS) and pH in HepG-2 cells. The results show that: AHL could induce apoptosis through the interaction of ROS, Ca²⁺, and pH in cells.

Keywords: alkaloids of *Hymenocallis littoralis*; FITC-Annexin V/PI double staining method; Ca²⁺ concentration; reactive oxygen species; pH