

# 线粒体参与介导 MOPDO 抑制 HepG2 细胞增殖、诱导其凋亡的作用

高晓文 刘海亮<sup>1</sup> 邓艳君<sup>2</sup> 黄偲元 徐力致 赵晓宁 高 静<sup>1\*</sup> 姚其正<sup>2</sup>  
(南京大学生命科学学院, 南京 210093; <sup>1</sup>江苏大学药学院, 镇江 212013; <sup>2</sup>中国药科大学药学院, 南京 210009)

**摘要** 研究新合成的一氧化氮供体——核苷衍生物 6-甲基-4-(2-氟-3,5-二-O-苯甲酰基-1-β-D-呋喃阿拉伯糖)-[1,2,5]噁二唑[3,4-d]嘧啶-5(4H),7(6H)-二酮 1-氧化物(MOPDO)抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖、诱导凋亡的作用。以不同浓度的 MOPDO 作用于人肝癌细胞 HepG2, MTT 检测与相差显微镜观察相结合, 分析 MOPDO 对 HepG2 细胞增殖的影响; 膜联蛋白-V/PI 双染检测细胞凋亡率; JC-1 染色检测线粒体膜电位( $\Delta\psi_m$ )变化; 硝酸酶法测定细胞培养液中 NO 的含量。结果发现, MOPDO 以时间和剂量依赖性方式抑制 HepG2 细胞的增殖, 细胞形态出现相应的变化; 细胞凋亡率的增加呈时-效和量-效关系; JC-1 染色显示, 线粒体膜电位随着 MOPDO 剂量的增加降低; MOPDO 释放的 NO 量呈剂量依赖性增加。表明线粒体可能参与介导 MOPDO 抑制 HepG2 细胞的增殖、诱导其凋亡的作用。

**关键词** MOPDO; 一氧化氮供体; 肝癌; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

噁二唑并[3,4-d]嘧啶衍生物是一种重要的一氧化氮(NO)供体, 在生理条件下可与巯醇类化合物, 如 N-乙酰基半胱胺、半胱氨酸和谷胱甘肽等作用, 释放出 NO<sup>[1]</sup>。噁二唑并[3,4-d]嘧啶衍生物也是非天然嘌呤兼尿嘧啶类似物, 与糖分子偶联, 形成噁二唑并[3,4-d]嘧啶核苷衍生物, 有助于细胞吸收。基于上述思路, 本课题组新合成了 6-甲基-4-(2-氟-3,5-二-O-苯甲酰基-1-β-D-呋喃阿拉伯糖基)-[1,2,5]噁二唑[3,4-d]嘧啶-5(4H),7(6H)-二酮 1-氧化物(MOPDO, 图 1)。在细胞内巯基化合物的作用下, MOPDO 应该可以释放 NO, 同时产生非天然核苷衍生物。

NO 作为一种多效应信号分子, 在体内的生理作用广泛, 如血管扩张、神经信号转导、免疫炎症的调节、肿瘤发生与转移等<sup>[2,3]</sup>。NO 的抗肿瘤作用主要在于: 一方面能够抑制线粒体呼吸, 通过线粒体介

导的途径引起细胞凋亡。另一方面, NO 与氧自由基结合, 破坏肿瘤细胞内的蛋白质、核酸等从而杀伤肿瘤细胞<sup>[4,5]</sup>。因此, MOPDO 可能利用释出的 NO 以及非天然尿苷衍生物<sup>[6]</sup>, 达到双效杀死肿瘤细胞的目的。

本研究选用人肝癌细胞株 HepG2, 检测了 MOPDO 对细胞的增殖的影响, 并通过细胞周期分析、凋亡率检测、线粒体膜电位观察等探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

MOPDO 由中国药科大学药学院姚其正教授合成, 白色粉状结晶, 贮存液(100 mmol/L)用二甲亚砜(DMSO)配制。应用液以含 10% 小牛血清的 DMEM (Gibco)配制。

### 1.2 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 培养于含 10% 已灭活小牛血清和青霉素、链霉素(各 100 U/L)的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。

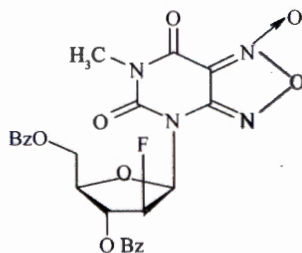


图 1 MOPDO 的化学结构式

收稿日期: 2008-03-25 接受日期: 2008-05-13

国家自然科学基金资助项目(No.30572240)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 0511-88791552, E-mail: jinggao@ujc.edu.cn

cn, jinggao@nju.edu.cn

### 1.3 MTT 法检测细胞的生长抑制率

取对数生长期的 HepG2 细胞, 消化、计数, 以  $2 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100  $\mu$ l。培养 24 h 后, 以 3.125、6.25、12.5、25、50 和 100  $\mu$ mol/L MOPDO 处理 HepG2 细胞。实验组每个浓度设 4 个复孔, 以含 DMSO 的培养液作对照。药物作用 48 h 后, 去上清液, 每孔加入 100  $\mu$ l 1 mg/ml MTT, 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO, 振荡混匀, 用酶标仪(Molecular, USA) 在 570 nm 处测定吸光度(A)值。计算抑制率。计算公式: 抑制率 =  $(1 - \text{实验组 } A / \text{对照组 } A) \times 100\%$ 。采用 IC<sub>50</sub> 计算软件(中国药科大学)求出半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 1.4 细胞形态学观察

倒置相差显微镜下观察上述各组细胞形态的变化。

### 1.5 细胞凋亡检测

以 10、20、40  $\mu$ mol/L MOPDO 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 用预冷 PBS 洗 2 遍后, 加入 400  $\mu$ l 结合缓冲液, 轻轻混匀细胞后加入 5  $\mu$ l 膜联蛋白 V-FITC 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶(PI), 避光温育 15 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。流式细胞检测双染图中: 位于左下角(LL)的细胞群为正常细胞; 左上角(UL)的细胞群为机械损伤细胞; 右下角(LR)的为早期凋亡细胞; 右上角(UR)的则为晚期凋亡细胞及坏死细胞。

### 1.6 线粒体膜电位( $\Delta\psi_m$ )检测

JC-1 是一种阳离子染料, 线粒体膜电位高时, 可聚集于线粒体, 形成多聚体, 发橙红色荧光; 线粒体膜下降时, 结合于线粒体的染料减少, 进入胞浆的多以单体形式存在, 发绿色荧光。

以 10、20、40  $\mu$ mol/L MOPDO 作用于六孔板培养的 HepG2 细胞, 48 h 后, 加入 1 mg/ml JC-1 (Molecular Probe, 终浓度为 5  $\mu$ g/ml)。在 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min 后, 荧光倒置显微镜观察。

### 1.7 细胞培养液中 NO 含量的测定

NO 与超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)作用形成过氧化亚硝基阴离子(ONOO<sup>-</sup>), 进而分解为 OH<sup>-</sup>和 NO<sub>2</sub> 自由基, 后者转化为亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 而亚硝酸盐又可进一步转化为硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。用硝酸还原酶法将亚硝酸盐还原为硝酸盐, 后者遇显色剂可生成淡红色偶氮化合物, 通过比色测定 NO 浓度。以 5、10、20、40、50  $\mu$ mol/L MOPDO 作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 收集上清液, NO 试剂盒(南京建成)于 550 nm 进行测定。按下列公式计算: NO 浓度 = (测定管 A / 标准管 A) ×

100  $\mu$ mol/L。

### 1.8 统计方法

采用 SAS 统计软件, ANOVA 方差分析, 组间比较采用 *q* 检验, 数据以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各实验至少重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 MOPDO 抑制 HepG2 细胞增殖

以 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100  $\mu$ mol/L MOPDO 作用于 HepG2 细胞 24 h、48 h 后, 结果显示, MOPDO 呈时间和剂量依赖性抑制 HepG2 细胞增殖, 随着 MOPDO 浓度的升高和作用时间增长, 抑制率逐渐增加, 100  $\mu$ mol/L 的 MOPDO 对 HepG2 细胞作用 48 h 时的抑制率达到 92.60% (图 2)。MOPDO 作用于 HepG2 细胞 24 h 和 48 h 后的 IC<sub>50</sub> 分别为 21.49 和 16.06  $\mu$ mol/L。

倒置相差显微镜下观察可见, MOPDO 作用 24 h 后, HepG2 细胞形态明显改变。未经药物处理的 HepG2 细胞轮廓清晰, 呈多边形, 贴壁生长。12.5  $\mu$ mol/L MOPDO 作用下出现少数皱缩、变圆、变小的损伤细胞, 25  $\mu$ mol/L MOPDO 作用下可见损伤、死亡的细胞增多, 50  $\mu$ mol/L MOPDO 作用下几乎所有细胞发生了形态学改变, 呈现脱落、漂浮的生长状态(图 3)。

### 2.2 MOPDO 诱导 HepG2 细胞凋亡

采用膜联蛋白-V/PI 双染, 流式细胞术分析凋亡表明: 随着 10  $\mu$ mol/L MOPDO 作用时间延长, 早期凋

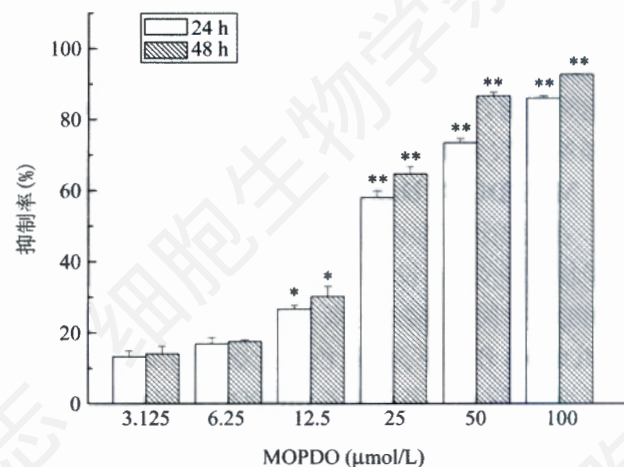


图 2 不同浓度的 MOPDO 处理 24 h 或 48 h 后对 HepG2 细胞增殖的影响

与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

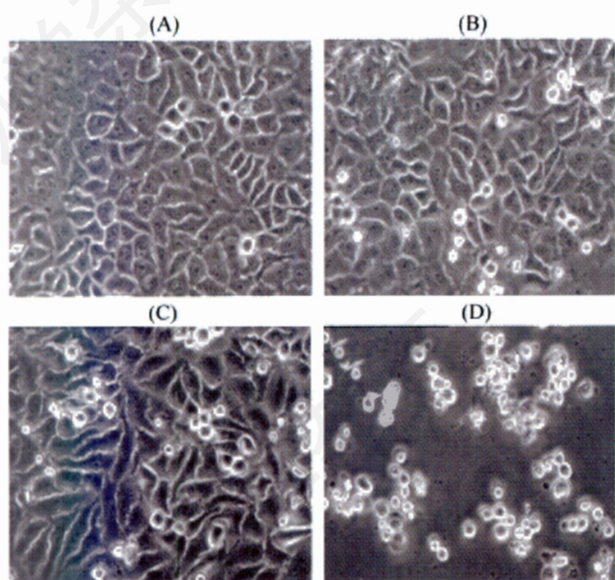


图3 MOPDO作用24 h对HepG2细胞形态的影响(200×)  
A: 对照组; B~D: 12.5、25、50 μmol/L MOPDO作用于HepG2细胞24 h。

表1 10 μmol/L MOPDO作用不同时间后HepG2细胞的凋亡率

组别	时间(h)	早期凋亡率(%)	晚期凋亡、坏死率(%)
对照	0	0.75	2.46
MOPDO	6	3.11	5.40
(10 μmol/L)	12	10.22	10.58
	18	22.72	17.76

亡率和晚期凋亡/坏死率都逐渐增加(表1),说明凋亡细胞随处理时间的延长增多;而随着化合物浓度升高,早期凋亡率下降,晚期凋亡、坏死率增加(图4),低浓度组主要诱导细胞早期凋亡,中高浓度组主要诱导细胞晚期凋亡和坏死,提示中高浓度的MOPDO对肿瘤细胞有较强的杀伤作用。

### 2.3 MOPDO对HepG2细胞线粒体 $\Delta\psi_m$ 的影响

在荧光倒置显微镜下观察可见,正常细胞内线粒体呈橘红色荧光,说明线粒体 $\Delta\psi_m$ 较高;10 μmol/L MOPDO作用下,橘红色荧光明显减弱;20、40 μmol/L MOPDO作用下,橘红色荧光逐渐消失,绿色荧光明显增强(图5)。表明随着MOPDO浓度增加, $\Delta\psi_m$ 逐渐下降。

### 2.4 MOPDO在HepG2细胞中释放NO的观察

以5、10、20、40和50 μmol/L MOPDO作用于HepG2细胞24 h后,HepG2细胞培养液中NO

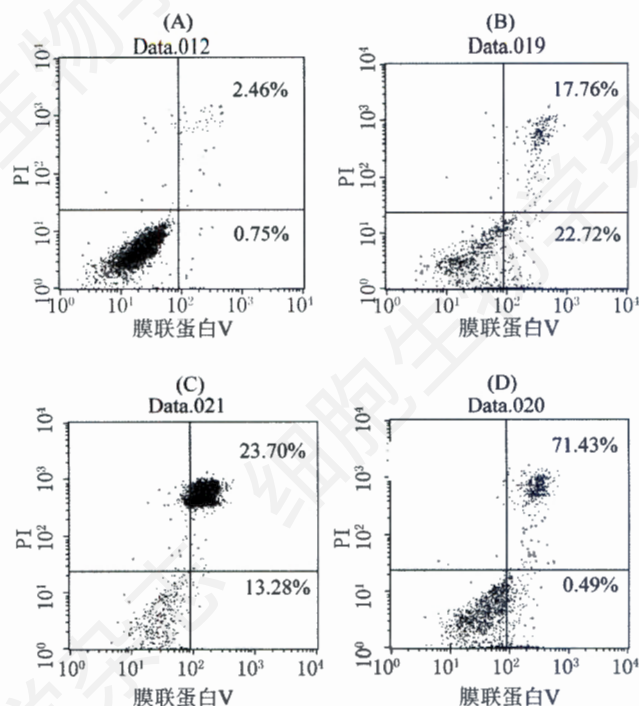


图4 流式细胞术检测不同浓度MOPDO作用下HepG2细胞的凋亡率

A: 对照组; B~D: 10、20、40 μmol/L MOPDO作用18 h。

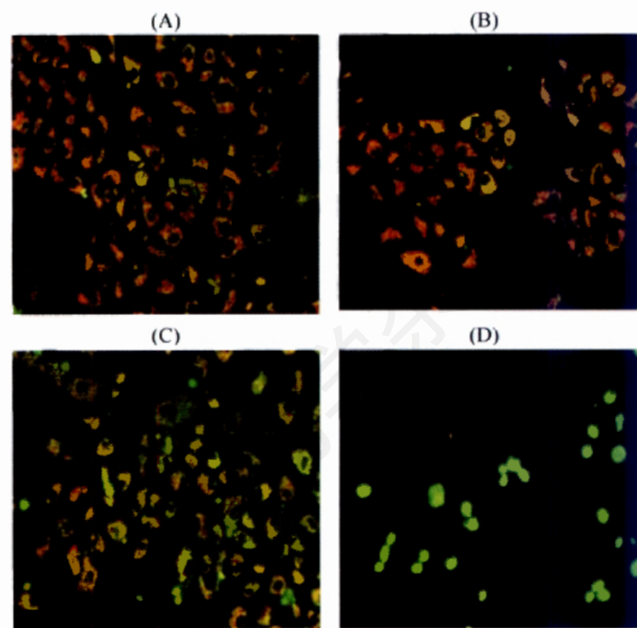


图5 MOPDO剂量依赖性诱导HepG2细胞线粒体膜电位下降(200×)

A: 对照组; B~D: 10、20、40 μmol/L MOPDO作用于HepG2细胞48 h。

的量随化合物浓度的增高而升高,与对照组比较,差异显著(图6)。

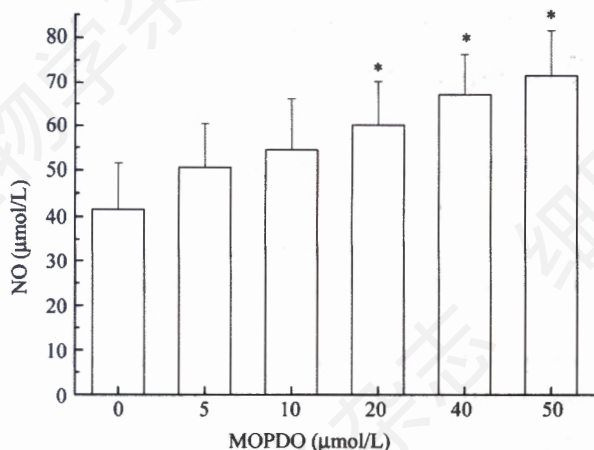


图6 不同浓度的 MOPDO 上调 HepG2 细胞中的 NO 含量与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

NO 可透过细胞膜、线粒体膜等生物膜, 发挥抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>。NO 供体化合物与其他分子结合, 可生成新型的抗肿瘤化合物, 是提高 NO 抗肿瘤活性的新途径<sup>[8]</sup>。本研究观察了新型核苷类似物 MOPDO 对人肝癌细胞株 HepG2 的增殖抑制作用, 发现 MOPDO 作用 48 h 后, 3.125 ~ 100 μmol/L MOPDO 均能显著抑制细胞的增殖。作用 24 h 时, HepG2 细胞出现皱缩、体积变小等形态变化。另外, 不同浓度 MOPDO 作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 细胞培养液中 NO 代谢终产物呈剂量依赖性增加, 说明 MOPDO 是具有释放 NO 功能的核苷类似物。但是, 常见 NO 供体如 SNAP, 浓度达到 100 μmol/L 时才诱导细胞发生凋亡<sup>[9]</sup>, 而 3.125 μmol/L MOPDO 即可以抑制 HepG2 细胞的增殖, 说明 MOPDO 除释放 NO 外, 还可以通过其他的途径发挥抗肿瘤作用。已知核苷类似物主要通过干扰核苷酸的合成进而阻滞细胞周期, 影响 DNA 的修复过程, 也可以直接或间接的影响线粒体及其相关蛋白质的变化<sup>[10]</sup>。

细胞的增殖、分化、凋亡三者之间的平衡失调可导致肿瘤的发生, 许多抗肿瘤药物的治疗作用与诱导细胞凋亡有关<sup>[11]</sup>。本研究表明, 以 10 μmol/L 的 MOPDO 作用不同时间, 呈现时间依赖性的 HepG2 细

胞凋亡, 且作用 18 h 时, MOPDO 的促凋亡作用最为明显; 以不同浓度的 MOPDO 作用 18 h, 可见剂量依赖性的 HepG2 细胞凋亡或坏死, 提示 MOPDO 可诱导 HepG2 细胞凋亡, 且低浓度诱导的细胞凋亡率较高, 中高浓度主要与诱发细胞坏死有关。

细胞凋亡的主要途径之一是线粒体介导的凋亡通路<sup>[12]</sup>。线粒体是细胞能量代谢的中心, 是一个双层膜围成的囊状结构, 线粒体膜两侧质子及其他离子的不对称分布形成了线粒体  $\Delta\psi_m$ , 线粒体  $\Delta\psi_m$  的降低是细胞发生凋亡的标志事件<sup>[13]</sup>。MOPDO 作用于 HepG2 细胞 48 h 后, HepG2 细胞  $\Delta\psi_m$  以剂量依赖的方式下降, 提示 MOPDO 诱导 HepG2 细胞凋亡过程与引起线粒体外膜通透性改变有关。同时发现, 随着 MOPDO 处理剂量的增加, NO 释放量增加。已有报道, NO 可引发转录因子 p53 在细胞内累积<sup>[14]</sup>, 促进 Bax 等蛋白质表达, 从而诱导线粒体外膜通透性增加、 $\Delta\psi_m$  下降以及细胞色素 c 释放, 最终启动线粒体介导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。

总之, MOPDO 可能通过在细胞内释放 NO, 激活线粒体介导的凋亡通路, 破坏线粒体膜的稳定性, 降低  $\Delta\psi_m$ , 最终诱导细胞凋亡, 也可能作为核苷类似物影响细胞周期、抑制肿瘤细胞增殖。其详细机制以及新化合物作用的靶点还有待进一步的研究。

### 参考文献(References)

- [1] 邓艳君等. 化学学报, 2006, 64: 1911
- [2] Fukumura D et al. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 521
- [3] Mocellin S et al. *Med Res Rev*, 2007, 27: 317
- [4] Hirst D et al. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59: 3
- [5] Wink DA et al. *Free Radical Biol Med*, 2003, 34: 951
- [6] Wang PG et al. *Chem Rev* 2002, 102: 1091
- [7] Blaise GA et al. *Toxicology*, 2005, 208: 177
- [8] 王兰等. 中国新药杂志, 2006, 15: 1818
- [9] Kwon KB et al. *Life Sci*, 2005, 76: 917
- [10] Galmarini CM et al. *Lancet Oncol*, 2002, 3: 415
- [11] Kasibhatla S et al. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2: 573
- [12] Bras M et al. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70: 231
- [13] Bouchier-Haye L et al. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2640
- [14] Hofseth LJ et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 143
- [15] Halestrap AP et al. *Biochem Soc Symp*, 2000, 28: 170

## Mitochondria was Involved in Mediating MOPDO-induced Proliferation Inhibition and Apoptosis in HepG2 Cells

Xiao-Wen Gao, Hai-Liang Liu<sup>1</sup>, Yan-jun Deng<sup>2</sup>, Si-Yuan Huang, Li-Zhi Xu,

Xiao-Ning Zhao, Jing-Gao<sup>1\*</sup>, Qi-Zheng Yao<sup>2</sup>

(School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; <sup>1</sup>School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; <sup>2</sup>School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract** To investigate the anticancer effect of a newly synthesized 6-Methyl-4-(2-fluoro-3,5-di-O-benzoyl-1-β-D-ribofuranosyl)-[1,2,5]-oxadiazolo[3,4-d]pyrimidine-5(4H),7(6H)-dione 1-oxide (MOPDO), a nitric oxide donating-compound derivated from nucleotide analogue, in human hepatoma cell line HepG2. Cell proliferation was assessed by MTT assay and morphological observation. Cell apoptotic rate was detected by flow cytometry (FCM) following annexin-V/PI staining. Mitochondrial membrane potential was observed by fluorescence microscopy with JC-1 loading. NO levels were measured by quantifying the content of nitrite and nitrate in the cell culture medium. The results showed that MOPDO inhibited the HepG2 cell viability significantly in a both concentration- and time-dependent manner. Apoptosis properties were observed, as characterized by annexin-V/PI double staining, showing that apoptotic rate increased in a concentration- and time-dependent manner. Moreover, MOPDO caused a loss of mitochondrial membrane potential in a dose-dependent manner. In addition, NO assay indicated that MOPDO elevated NO level in a concentration-dependent manner. The above data indicated that mitochondria might be involved in mediating the MOPDO-induced proliferation inhibition and apoptosis in HepG2 cells.

**Key words** MOPDO; NO donor; hepatoma; apoptosis; mitochondrial membrane potential

Received: March 25, 2008 Accepted: May 13, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30572240)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-511-88791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn, jinggao@nju.edu.cn