

重组荞麦胰蛋白酶抑制剂诱导肝癌细胞 H₂₂ 凋亡的作用及其机制

白崇智 李玉英 李芳 张政 王转花*

(山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 为了研究重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)诱导癌细胞凋亡的作用及其机制, 采用细胞培养技术, 以肝癌细胞系 H₂₂ 为靶细胞, 以不同浓度的 rBTI 体外处理细胞不同时间后, 采用 MTT 检测、DNA 电泳分析、细胞核形态学观察、细胞色素 c 检测、caspases 活性检测等方法测定 rBTI 在体外诱导肝癌细胞 H₂₂ 凋亡的作用。结果显示 rBTI 能够在体外特异性地抑制 H₂₂ 细胞的生长, 诱导 H₂₂ 细胞凋亡, 随着 rBTI 浓度及作用时间的增加, 呈现剂量和时间依赖性效应。经 rBTI 处理的细胞可导致细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中, 并能增强 caspase-3、caspase-8、caspase-9 的活性。结果表明, rBTI 能特异性地诱导 H₂₂ 细胞凋亡, 其机制与 caspase-3 依赖性凋亡调节信号通路有关。

关键词 荞麦; 胰蛋白酶抑制剂; 肝癌; 凋亡; caspases

癌症是目前严重威胁人类健康与生命的“三大杀手”之一, 其发生率逐年增高, 但真正有效的抗肿瘤药物数量还相对较少, 科学工作者在大量的实验基础上寻找有效的抗肿瘤药物, 发现生物体内的蛋白酶抑制剂具有潜在的抗肿瘤作用^[1,2], 可能是一种新的抗肿瘤药物。蛋白酶抑制剂是生物体内的防御蛋白之一^[3], 作为一种潜在的抗肿瘤药物, 近年来受到国内外相关研究者的普遍关注^[4]。体外研究发现来自大豆和其他豆类中的 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂具有抗癌和消炎的活性, 尤其对肠癌的作用更加明显^[5]。虽然蛋白酶抑制剂对许多不同种类的肿瘤细胞有诱导凋亡的作用, 然而凋亡机制到目前为止仍不很清楚。

细胞凋亡是一个逐级调节的过程, 在诱导癌细胞死亡中它是一个必要的过程^[6]。这种自毁性的过程通常由 caspase-3 作为主要的执行者使 caspases 系列级联放大而实现。目前在哺乳动物细胞中有关细胞凋亡的途径主要有两种: 线粒体途径和死亡受体途径^[7,8]。前者, 凋亡信号激发了细胞色素 c 从线粒体间隙释放到细胞质中, 形成了 Apaf-1 和 dATP 复合物, 使 caspase-9 激活, 进而可增强 caspase-3 的活性, 最终启动一系列的凋亡事件并使细胞死亡^[9]。而死亡受体途径开始于一个死亡受体, 如 Fas 等。当 Fas 配体与 Fas 死亡受体结合时, 结合的大分子与另一个受体结合, 进而介导凋亡^[10]。

我们先前的研究发现荞麦胰蛋白酶抑制剂在体外对 IM-9、K562 等肿瘤细胞有明显的抑制增殖作用^[11,12]。为了揭示重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)的可能作用机制, 本研究通过体外实验研究 rBTI 对 H₂₂ 细胞诱导凋亡的影响及可能的作用机制, 从而为深入研究蛋白酶抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的分子事件及作用途径提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

H₂₂ 及正常肝细胞 7702 分别由山西医科大学第三医院和中国辐射防护研究院惠赠。RPMI1640 细胞培养基购自 Gibco Life Technologies (NY, USA) 公司, 小牛血清购自杭州血液研究所。MTT 购自 Sigma (St Louis, MO, USA) 公司。细胞色素 c 检测试剂盒和 caspase-3、caspase-8、caspase-9 检测试剂盒购自 Biovision (USA) 公司。重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)由本实验室制备。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞体外培养

小鼠肝癌细胞 H₂₂ 及正常人肝细胞 7702 在含体积分数为 10%~15% 的小牛血清、15 mmol/L

收稿日期: 2008-09-26 接受日期: 2008-12-09

国家自然科学基金(No.30671084, No.30870525)和山西省自然科学基金(No.2007011077)资助

* 通讯作者。Tel: 0351-7019371, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

HEPES、8 U/ml 庆大霉素的 RPMI1640 全培养基中, 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, H₂₂ 细胞是悬浮细胞, 7702 细胞呈贴壁生长, 2 ~ 3 天传代一次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞生长的 MTT 检测

取处于对数生长期的 H₂₂ 细胞和 7702 细胞, 调整细胞浓度至 1×10⁶ 个/ml, 每孔加入 100 μl 细胞液, 接种于 96 孔培养板中, 分别加入不同浓度(6.25 μg/ml、12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml)的 rBTI 溶液, 每组各设三个复孔, 正常细胞 7702 也加入以上四个浓度 rBTI 并对其进行处理 24 h。37 °C, 5% CO₂ 培养, 12 h、20 h、24 h 后每孔加入 20 μl 5.0 mg/ml MTT, 继续培养 4 h 后小心吸去板中的培养基, 每孔加入 80 μl DMSO 溶解结晶物, 于酶联免疫检测仪(Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, USA) 570 nm 处测定光吸收值^[13]。

1.4 细胞核形态学观察

H₂₂ 细胞在 96 孔板中经终浓度为 50 μg/ml 的 rBTI 处理 24 h 后, 收集细胞, 用预冷的磷酸缓冲溶液(20 mmol/L, pH 6.7)洗涤后重悬于固定液(4% 多聚甲醛)中。10 min 后, 悬液 2 000 r/min 离心, 收集沉淀, 用同样缓冲溶液洗涤两次。之后将细胞悬液滴到防脱载玻片上, 用 0.1 μg/ml DAPI (Sigma) 染色 5 min。荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化。

1.5 DNA 梯状条带的凝胶电泳检测

按照凯基公司的 DNA 提取操作说明书进行。经不同浓度(12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml)的 rBTI 处理 24 h 后的 H₂₂ 细胞(1×10⁶ 个/ml)用 PBS 洗涤, 4 500 r/min, 4 °C 离心 5 min, 收集细胞, 按比例每 10⁵ 个细胞加入 100 μl 裂解液, 冰上放置 5~10 min, 8 000 r/min 离心, 收集上清液, 加入 10 μl 10% SDS、2 μl RNase A, 混匀, 37 °C 放置 1 h。加入 2 μl 蛋白酶 K, 37 °C, 继续放置 2 h, 再依次加入 1 μl 核酸助沉剂、12 μl 3 mol/L 醋酸钠、250 μl 无水乙醇, 混匀后, -20 °C 温育 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 室温干燥沉淀。获得的 DNA 用双蒸水溶解后经 1% 琼脂糖凝胶电泳并进行凝胶成像分析。

1.6 线粒体与细胞质细胞色素 c 的检测

用 PBS 洗涤经 25 μg/ml、50 μg/ml rBTI 处理 24 h 后的细胞, 600 r/min, 4 °C 离心 5 min, 用 1.0 ml 细胞质抽提缓冲液重悬细胞, 冰浴放置 10 min, 混匀细胞, 4 °C, 700 r/min 离心 10 min。弃去沉淀, 将上清液至一个新的 1.5 ml 离心管中, 4 °C, 10 000 r/min 离心 30

min。上清液作为细胞质提取物, 沉淀重悬在 0.1 ml 线粒体抽提缓冲混合液中, 离心后作为线粒体提取物。从诱导前后的细胞中分别取 10 μg 细胞质和线粒体提取物在 15% SDS-PAGE 上进行电泳, 并做 Western 印迹, 之后用细胞色素 c 抗体进行检测^[14]。

1.7 Caspases 活性的检测

经 50 μg/ml rBTI 作用 24 h 后(2×10⁶ 个/ml)的细胞裂解产物溶解在抽提缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L MgCl₂、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、25 μg/L 亮抑酶肽、25 μg/L 抑蛋白酶肽, pH 7.5)中, 冰浴 30 min。12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。细胞提取物(30 μg)放在带有 20 ng DEVD-pNA9 (caspase-3 为 DEVD-pNA, caspase-8 为 IETD-pNA, caspase-9 为 LEHD-pNA)的 96 孔板中, 37 °C 温育 2 h, 酶联免疫检测仪(Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, USA) 405 nm 处检测 caspases 活性。以未处理的细胞作对照。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 软件, 进行统计分析。用单因素 ANOVA 分析差异, 用 Scheffe 检测、分析组间的差异。应用 Two-tailed 检测和 5% 的显著差异标准。

2 结果

2.1 rBTI 抑制 H₂₂ 细胞生长的 MTT 检测

通过 MTT 检测 rBTI 体外抑制细胞生长的活性, 图 1 表明, 经不同浓度(6.25 μg/ml、12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml)的 rBTI 处理 24 h 后, H₂₂ 肿瘤细胞的抑制率(1 - 实验组平均值 / 对照组平均值 × 100%) 分别为 17.8%、27.3%、43.6% 和 62.7%, 随着 rBTI 浓度的增大对 H₂₂ 细胞增殖的抑制效果愈加明显。

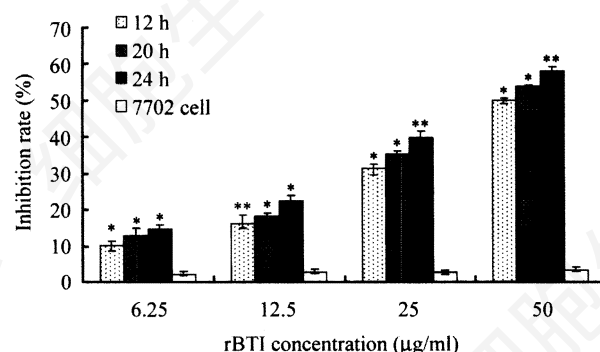


Fig.1 Effects of rBTI treatment on H₂₂ and 7702 cells (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs 7702 cells)

同样, 随着处理时间的增加, 抑制率也随之增加。rBTI抑制H₂₂细胞增长呈剂量依赖性关系和时间依赖性关系。而对 rBTI 处理 24 h 后的正常肝细胞 7702 作用很小。实验组中同一时间不同浓度及同一浓度不同时间抑制率间均具有显著差异。

2.2 细胞核形态学观察

采用DAPI核染rBTI处理后和未处理的H₂₂细胞, 荧光显微镜下观察, 从图2可见, 经 50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI 处理 24 h 后的H₂₂细胞呈现出明显的细胞核浓缩和形态改变, 与对照组相比, 细胞核出现碎裂, 形状变得不规则, 少量伴有凋亡小体。结果表明, 经 rBTI 处理的 H₂₂ 细胞出现了凋亡。

2.3 DNA 电泳分析

从图3可见, 经 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI 处理 24 h 的 H₂₂ 细胞在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中呈现明显的梯状条带, 而且随着 rBTI 浓度的增加, DNA 梯状条带越来越清晰。而对照组(条带2)电泳条带整齐, 未见“梯状”现象。结果表明, 细胞凋亡晚期时, DNA 被核酸内切酶在核小体连接处切断, 产生 200 bp 或 200 bp 整倍数大小的 DNA 片段, 在琼脂糖凝胶电泳中出现了细胞凋亡的最典型特征。

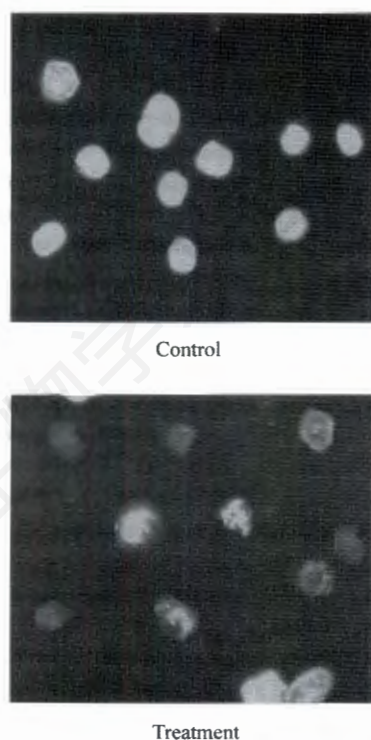


Fig.2 Representative photographs of normal and apoptotic H₂₂ cells stained with DAPI after incubated without or with 50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI for 24 h

2.4 Western 印迹分析

细胞色素 *c* 在细胞凋亡中起着很重要的作用, 它通常位于线粒体外膜和内膜的空隙中, 当细胞凋亡时细胞色素 *c* 从线粒体释放到细胞质中。H₂₂ 细胞经 rBTI (25 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$) 处理 24 h 后分别抽提出细胞的线粒体和细胞质组分, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜后, 用抗细胞色素 *c* 的抗体进行 Western 印迹分析。图4结果表明, 在 rBTI 处理的细胞中, 细胞色素 *c* 主要存在于细胞质中(条带3、5), 而线粒体中含量相对较少(条带4、6)。说明凋亡的 H₂₂ 细胞中的

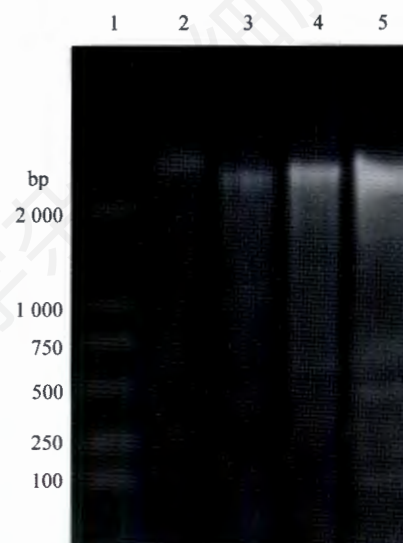


Fig.3 Internucleosomal DNA fragmentation in H22 cells treated with or without rBTI

1: marker; 2: DNA extracts without treatment; 3, 4, 5: DNA extracts treated with 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI, respectively.

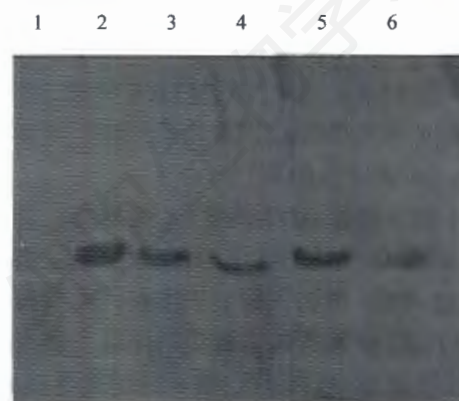


Fig.4 Western blotting assay of cytochrome *c*

1, 3, 5: cytochrome *c* in cytosolic after 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI treatment; 2, 4, 6: cytochrome *c* in mitochondrial after 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ rBTI treatment.

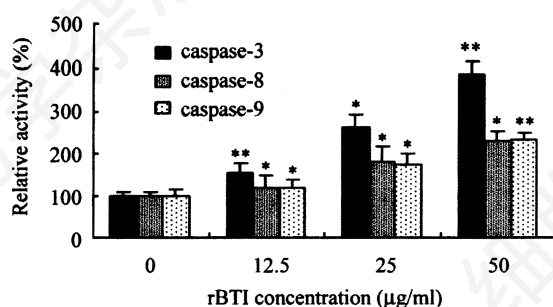


Fig.5 Activation of caspases by rBTI in H₂₂ cells (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs untreated cells)

细胞色素 *c* 从线粒体释放到了细胞质中。通过用 SynGene GeneTools 分析计算细胞质中和线粒体中细胞色素 *c* 的相对含量, 得知经 25 µg/ml rBTI 处理 24 h 后, 约有 54.1% 细胞色素 *c* 释放到细胞质中; 经 50 µg/ml rBTI 处理 24 h 后, 约有 74.6% 细胞色素 *c* 释放到细胞质中。

2.5 Caspases 活性检测

如图 5 所示, rBTI 诱导 H₂₂ 细胞凋亡和 caspase-3 的激活都与 rBTI 成剂量依赖性关系。而经 rBTI 处理后的细胞中一部分的 caspase-8 和 caspase-9 也被激活。表明 rBTI 诱导 H₂₂ 细胞凋亡是与 caspase-3 依赖性凋亡调节信号通路有关。相对活性计算公式为: 实验组平均值 / 对照组平均值 × 100%。

3 讨论

先前, 我们通过克隆、表达及一步亲和纯化获得高纯度的 rBTI, 功能分析显示 rBTI 在体外对 IM-9 和 K562 细胞有抗肿瘤活性^[11,12]。在此研究中, 我们证明 rBTI 在体外对肿瘤细胞 H₂₂ 有较强的抑制生长作用。在 6.25 µg/ml、12.5 µg/ml、25 µg/ml、50 µg/ml 浓度下 rBTI 作用 24 h 后对肿瘤细胞的抑制率分别达到了 17.8%、27.3%、43.6% 和 62.7%。rBTI 对 H₂₂ 细胞生长的抑制成剂量依赖性和时间依赖性关系(图 1), 并诱导细胞凋亡。

为了初步确定 rBTI 诱导 H₂₂ 细胞凋亡的可能机制, 我们检测处理后的细胞中细胞色素 *c*, 实验证实经 rBTI 处理后, 细胞色素 *c* 从线粒体释放到细胞质中, 说明 rBTI 引起的细胞凋亡的途径可能为线粒体途径。有报道指出, 细胞色素 *c* 的释放是 caspase-9 激活的先决条件^[15,16]。caspase-9 的活性被形成的大分子复合物如凋亡小体所调节, 并伴随细胞色素 *c* 从线粒体中释放^[17]。本实验中, 当用 rBTI 作用于 H₂₂ 细胞后(图 5), caspase-8 和 caspase-9 同时被激活, 表明

caspase-9 可能是通过直接激活 caspase-8 进而激活 caspase-3 来诱导 H₂₂ 细胞发生凋亡的^[18]。rBTI 使线粒体释放细胞色素 *c* 入细胞质中有三种可能性: rBTI 直接作用线粒体, 使线粒体的跨膜通透性增, 释放细胞色素 *c* 入细胞质中; rBTI 可能使得内质网膜通透性增加, 钙离子释放入胞浆, 促使线粒体释放细胞色素 *c* (钙离子可以使得核酸内切酶活性增加造成 DNA 断裂); rBTI 可能作用于死亡受体, 激活 caspase-8, 使得 Bid 活化, 它可以使线粒体释放细胞色素 *c* (caspase-8 还可以使得内质网剪切, 诱导钙离子释放)。其中前两种的可能性最大, 因为 rBTI 是一种蛋白酶抑制剂, 其进入细胞对蛋白酶进行抑制, 使一些蛋白质不能降解, 从而使得线粒体、内质网的跨膜通透性增加。或者 rBTI 可能抑制一些功能的蛋白质的合成, 这些蛋白能够维持线粒体膜通透孔紧闭的状态。这些都是造成线粒体功能紊乱的可能原因^[19,20]。

通过本研究我们证实, rBTI 在体外对肝癌细胞 H₂₂ 具有较强的抗肿瘤活性, 并且显示出明显的剂量和时间依赖性, 但对人正常肝细胞 7702 的生长几乎没有影响。其可能机制为 rBTI 进入 H₂₂ 细胞体内诱导线粒体功能紊乱, 进而激活 caspases 家族诱导细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Foehr MW, Tomei LD, Goddard JG, *et al.* Antiapoptotic activity of the Bowman-Birk inhibitor can be attributed to copurified phospholipids, *Nutr Cancer*, 1999, 34(2): 199-205
- [2] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, *et al.* Protective role of urinary trypsin inhibitor in acute lung injury induced by lipopolysaccharide, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005, 230(4): 281-287
- [3] Birk Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans, *Int J Pept Protein Res*, 1985, 25(2):113-131
- [4] Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents, *Med Res Rev*, 2003, 23(5): 535-558
- [5] Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, *et al.* Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen, *Cancer Res*, 1983, 43(5 suppl): 2454s-2459s
- [6] Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway, *Lancet Oncol*, 2003, 4(12): 721-729
- [7] Dias N, Bailly C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth, *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(1): 1-12
- [8] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program, *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 372-380
- [9] Chin AC, Flynn AN, Fedwick JP, *et al.* The role of caspase-3 in

- lipopolysaccharide- mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions, *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(10): 1043-1050
- [10] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing, *Cell Signal*, 2004, 16(2): 139-144
- [11] Wang ZH, Gao L, Li YY, *et al.* Induction of apoptosis by buckwheat trypsin inhibitor in chronic myeloid leukemia K562 cells, *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 783-786
- [12] Zhang Z, Li YY, Li C, *et al.* Expression of a buckwheat trypsin inhibitor gene in *Escherichia coli* and its effect on multiple myeloma IM-9 cell proliferation, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(9): 701-707
- [13] Dai Y, Liu XJ, Zhen YS. Antitumor effect of the novel immunoconjugate composed of pingyangmyc in and anti-type IV collagenase monoclonal antibody, *Yao Xue Xue Bao*, 2006, 41(1): 41-46
- [14] Qiu Q, Wang Z, Jiang JM, *et al.* Effect of lidamycin on mitochondria initiated apoptotic pathway in human cancer cells, *Yao Xue Xue Bao*, 2007, 42(2): 132-138
- [15] Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, *et al.* Apaf-1/Cytochrome *c*-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells, *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 24453-24456
- [16] Dirsch VM, Müller IM, Eichhorst ST, *et al.* Cephalostatin 1 selectively triggers the release of Smac/DIABLO and subsequent apoptosis that is characterized by an increased density of the mitochondrial matrix, *Cancer Res*, 2003, 63(24): 8869-8876
- [17] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-290
- [18] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 2000, 407(6805): 770-776
- [19] Narayanan S, Surolia A, Karande AA. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells, *Biochem J*, 2004, 377(pt1): 233-240
- [20] Narayanan BA, Condon MS, Bosland MC, *et al.* Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosterone-induced rate prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanism(s), *Clin Cancer Res*, 2003, 9(9): 3503-3513

Anti-tumor Effects and Mechanism of Recombinant Buckwheat Trypsin Inhibitor on H₂₂

Chong-Zhi Bai, Yu-Ying Li, Fang Li, Zheng Zhang, Zhuan-Hua Wang*

(Key Laboratory for Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-tumor effects of rBTI on hepatic cancer. Apoptosis of the H₂₂ cell line induced by rBTI was identified by MTT assays, DNA electrophoresis analysis, morphological observation of nuclei, the measurement of cytochrome *c* and caspases activation assess. We found that rBTI inhibited cell viability by inducing apoptosis, as evidenced by the formation of apoptotic bodies, and DNA fragmentation. rBTI induced apoptosis was correlated with mitochondrial dysfunction, leading to the release of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol, as well as the proteolytic activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9. Our results suggested that one of the pathways rBTI-induced apoptosis in H₂₂ cells was mainly mediated by mitochondrial pathways via caspase-3. Moreover, rBTI could specifically inhibit the growth of cells of H₂₂ hepatic carcinoma *in vitro* with a concentration-dependent and time-dependent effect, but there were minimal effects on normal mice liver cell.

Key words common buckwheat; trypsin inhibitor; hepatocellular carcinoma; apoptosis; caspases

Received: September 26, 2008 Accepted: December 9, 2008

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671084, No.30870525) and Natural Science Foundation of Shanxi Province (No.2007011077)

*Corresponding author. Tel: 86-351-7019371, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn