

文章编号: 1001-6880 (2010) 02-0223-05

## 肝源性磷脂酰乙醇胺的分离及其诱导肝癌细胞凋亡的研究

王 亮, 龙腾腾, 李治国, 周佳平, 辛 毅, 张翠丽\*

大连医科大学生物技术专业, 大连 116044

**摘 要:** 采用氧化铝柱色谱法以 95%乙醇-氯仿为洗脱剂分离纯化肝源性磷脂酰乙醇胺 (PE), 并采用 GF254 硅胶板薄层色谱法以氯仿-甲醇-水 (65: 25: 4, 体积比) 为展开剂检测 PE。结果表明, 以 95%乙醇-氯仿顺序洗脱氧化铝色谱柱中的磷脂时, PE 与磷脂酰胆碱 (PC) 可实现完全分离。采用四甲基偶氮唑蓝比色法 (MTT法) 测定了在不同时间点 25  $\mu\text{mol/L}$  PE 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响, 并与宫颈癌细胞 Hela 正常肝细胞 HL7702 做比较, 发现肝源性 PE 对肝癌细胞的生长具有明显的抑制作用, 且能诱导其发生凋亡。

**关键词:** 磷脂酰乙醇胺; 肝癌细胞; 增殖抑制; 凋亡; 猪肝

**中图分类号:** Q58; R285

**文献标识码:** A

## Purification of Phosphatidylethanolamine from Swine Liver and Determination of Inhibition Effect on Proliferation and Apoptosis of Hepatoma Cells

WANG Liang, LONG Teng-teng, LI Zhi-guo, ZHOU Jia-ping, XIN Yi, ZHANG Cui-li\*

Bio-technology Department of Dalian Medical University, Dalian 116044, China

**Abstract:** Phosphatidylethanolamine (PE) in crude phospholipids was purified from swine liver with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  column with 95% alcohol-chloroform as eluent. PE was determined by thin layer chromatography on GF254 silica gel plate, and eluent solvent was chloroform-methanol-water (65: 25: 4, v/v). The results showed that PE was completely purified from phosphatidylcholine (PC) by the sequence elution with 95% alcohol and chloroform. The effect of the PE at concentrations of 25  $\mu\text{mol/L}$  on the proliferation of human liver cancer SMMC-7721 cell line was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assays at different time and was compared with that of cervix cancer Hela cell line and normal human liver HL7702 cell line. Result shows that the PE derived from the swine liver inhibited the proliferation of SMMC-7721 significantly and induced its apoptosis.

**Key words:** phosphatidylethanolamine; hepatoma cells; proliferation inhibition; apoptosis; swine liver

磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 也称脑磷脂。在动、植物及微生物中广泛存在。PE 作为生物膜上重要的磷脂组分之一参与维持其正常的结构和功能, 与细胞的生长、增殖、分化及癌变密切相关, 其降解产物还参与细胞的信号转导和代谢调控, 具有抗衰老、降血脂、健脑、保肝等多种生理作用<sup>[1-2]</sup>。有研究表明, 肝源性 PE 的不饱和脂肪酸含量较高, 并且在肝脏中 PE 与磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 可以相互转化。同时, 不饱和脂肪酸和多烯磷脂酰胆碱有较为明显的抑制肿瘤细胞增

殖及保肝护肝的功效, 提示我们肝源性 PE 可能具抑制肿瘤细胞增殖的生物学活性。目前对 PE 的研究主要集中在其作为磷脂双分子层的药物包埋体<sup>[3]</sup>, 但把 PE 独立作为药物进行生物活性研究的报道较少, 本实验应用柱色谱法从肝脏总脂中分离得到 PE, 并对其抑制肝癌细胞增殖及机制进行了研究, 旨在为开发肝源性 PE 抗肝癌新药提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料及试剂

人肝癌细胞 SMMC-7721 由辽宁师范大学省分子生物学重点实验室馈赠; 宫颈癌细胞 Hela、正常人肝细胞 HL7702 购自中科院上海细胞所细胞库; PE、PC 纯品、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚

收稿日期: 2009-03-16 接受日期: 2009-07-03

基金项目: 辽宁省大学生课外学术科技作品竞赛项目; 大连医科大学大学生科技活动项目

\*通讯作者 Tel: 86-411-86110296; E-mail: biol.zhangcl@sina.com

砒 (DMSO)、琼脂糖购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶、RPMI1640培养基、小牛血清等均为美国 Thermo Scientific HyClone 产品;ECL<sup>TM</sup> (Amersham Corp., USA);Bcl-2, Caspase-3 抗体 (Santa Cruz Biotech., USA);羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DNA Maker-DL2000 (TaKara, 日本大连分公司);96孔板等细胞培养耗材 (NUNC, 丹麦);活性氧化铝 (色谱分离用, 100~250目, 国药集团化学试剂有限公司);新鲜猪肝由大连础明集团提供;自制磷脂粗提物<sup>[4,5]</sup>;国产 GF254 硅胶板;95%乙醇、氯仿等化学试剂均为国产分析纯。

## 1.2 主要仪器和设备

酶标仪 (Thermo Lab systems, USA);倒置显微镜 (Nikon, 日本);凝胶成像系统 (SM International Group, USA);CO<sub>2</sub> 孵箱 (Thermo Lab systems, USA);自动收集器、真空泵、恒温监控室、紫外检测器 (LKB, 瑞士);滤器 (Millipore, USA);722光栅分光光度计 (厦门分析仪器厂);垂直板电泳槽购于大连竞迈生物有限公司;国产  $\phi 15\text{ mm} \times 400\text{ mm}$  玻璃柱。

## 1.3 色谱柱及样品的制备

将适量新鲜猪肝在冰上匀浆后于甲醇/氯仿 1:2 (v/v) 抽提液抽提三次, 3000 r/min 离心 20 min, 收集下层氯仿相, 获得肝源磷脂粗提物。将  $\text{Al}_2\text{O}_3$  于 104 °C 干燥 4 h, 冷却后置于 5 倍以上体积的 95%乙醇中, 溶胀 24 h, 轻微搅拌, 将  $\text{Al}_2\text{O}_3$  的悬浊液灌入  $\phi 15\text{ mm} \times 400\text{ mm}$  玻璃柱中, 固定相高度为 25 cm, 保持柱内 pH 8.0, 柱温 20 °C<sup>[6]</sup>。用脱气的 95%乙醇平衡后, 将一定量磷脂粗提物溶解于 95%乙醇中, 经 0.8  $\mu\text{m}$  的滤膜抽滤后, 沿管壁缓缓加入色谱柱中, 上样高度约为 3 cm。打开色谱柱下端的流速控制器, 加入 95%乙醇开始第一阶段洗脱, 控制流速为 2.5 mL/min。当洗脱体积达到 750 mL 后, 开始用氯仿洗脱, 控制流速为 5 mL/min, 共收集 500 mL。

## 1.4 薄层色谱 (TLC) 检测

取待测样品 10  $\mu\text{L}$  点样于活化的 GF254 硅胶板上, 置于展开槽中以氯仿/甲醇/水 (体积比为 65:25:4) 为展开剂展开 15~20 min。然后取出硅胶板, 吹干, 用碘蒸汽显色 5~10 min。

## 1.5 MTT 检测 PE 对细胞增殖的抑制作用

将 0.25% (m/v) 胰蛋白酶消化单层培养的 SMMC-7721 细胞 (Hela 与 HL7702 采用同样方法处理) 用含 10% (v/v) 小牛血清的 RPMI1640 培养液配成单细胞悬液, 接种于 96 孔板上 ( $1 \times 10^4$  个/孔),

然后置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中于 37 °C 培养 24 h 后, 吸出培养液, 再在每孔中加入培养液和事先配置好的 PE 溶液共 200  $\mu\text{L}$ , PE 的终浓度分别为 25  $\mu\text{mol/L}$  (每个浓度平行 3 个孔), 以完全培养液作空白组, 培养 12、24、36、48 h 后各取 1 板, 每孔加入 MTT (5 g/L) 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养。4 h 后用 200  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液终止培养, 用全自动酶标仪于 490 nm 处测定吸光值, 计算抑制率。抑制率 =  $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ <sup>[7-9]</sup>。

## 1.6 细胞凋亡检测法

将对数生长期的 SMMC-7721 接种在两个 200 mL 的培养瓶中, 其中一瓶加入 25  $\mu\text{mol/L}$  PE 处理 24 h。分别收集两个培养瓶中的细胞, 提取 DNA。将制备好的 DNA 样品 20  $\mu\text{L}$ , 经 1.5% 琼脂糖凝胶, 36 V 电压下电泳 3 h, 凝胶成像系统下观察拍照。

## 1.7 凋亡蛋白表达的检测

用终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  PE 作用于对数生长期 SMMC-7721 细胞 24 h 后收集细胞提取总蛋白。经考马斯亮蓝比色法定量后进行 SDS-PAGE, 将电泳后的蛋白转移至 PVDF 膜上; 经封闭后与一抗 (1:1000) 37 °C 杂交, 而后结合二抗 (1:2000), 经 ECL 显色后, 在暗室中进行 X 光胶片感光; 室温显影, 定影。通过 SM 凝胶成像系统中的点密度半定量分析软件扫描蛋白灰度并记录相应条带的透射光积分光密度值 (ICD)。

# 2 结果与讨论

## 2.1 肝源性 PE 的制备

肝细胞的生物膜中上有一大类在 sn-1 和 sn-2 位含有酰基、在 sn-3 位含有一个极性基团的磷酸酯, 主要包括 PE、PC、磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 和鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 等。因此, 利用极性差异就可以实现各磷脂组分的分离。PE 通常为非极性, PC 为强极性, 而 PI 和 PS 的极性介于两者之间。我们选择以  $\text{Al}_2\text{O}_3$  为固定相、95%乙醇/氯仿为洗脱剂的柱色谱法对 PE 进行顺序洗脱。在 pH = 8.0, 柱温 20 °C 的色谱条件下, 肝细胞膜磷脂各主要成分得到较好的分离, 同时获得了纯度较高的 PE (如图 1)。实验发现, 在 95%乙醇洗脱下, 洗脱体积在 0~750 mL 内未检测到 PE (图 1B-b)。继续用氯仿洗柱, TLC 检测氯仿洗脱液, 发现大量 PE 被洗脱下来 (图 1B-c)。

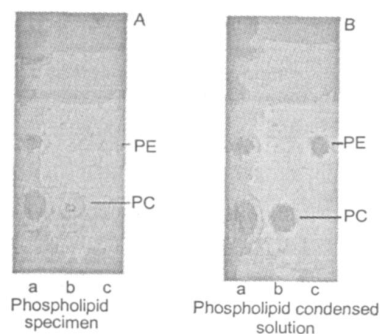


图 1 薄层色谱法检测 PE

Fig. 1 TLC determination of PE from swine liver eluting components

注:将猪肝按照 Folch法处理,下层(氯仿层)点板,进行薄层色谱检测,展开剂氯仿-甲醇-水(体积比为 65:25:4),温度 20℃,碘蒸气显色。A/B-a:肝脏总脂;A-b:PC标准品;A-c:PE标准品;B-b:0~750 mL 乙醇洗脱液;B-c:500 mL 氯仿浓缩液。Note: The livers were subjected to Folch partition, the lower layer was applied to the TLC plate and developed by the mixture of chloroform, methanol and H<sub>2</sub>O (65:25:4 (V/V)), Temperature: 20℃, and visualized by I<sub>2</sub> vapor). A/B-a: The total phospholipids of the liver A-b: Standard marker of phosphatidylcholine A-c: Standard marker of phosphatidylethanolamine B-b: The EtOH eluting components 0~750 mL B-c: Condensed chloroform eluting components 500 mL.

## 2.2 肝源性 PE对细胞增殖抑制的影响

我们观察了不同浓度的 PE对人肝癌细胞

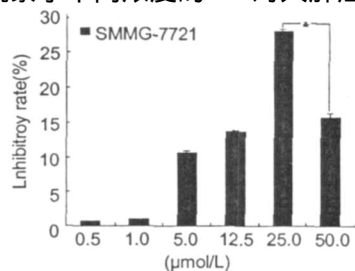


图 2 不同浓度 PE对 SMMC-7721增殖抑制的影响

Fig. 2 Average inhibitory rate with treatment of PE by MTT test

注:将细胞按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96孔板,含 10% FBS的培养基培养 24 h后,用不同浓度的 PE (0.5, 1.0, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h,然后用 MTT处理活细胞,用 DMSO溶解产生的结晶 甲臜。用酶标仪在 490 nm下检测吸光值。统计学分析:竖条信号代表标准偏差。\*  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。Note: Cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in 96-well plate with a medium supplemented with 10% FBS and incubated for 24 h Cells were then treated with different concentrations (0.5, 1.0, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0  $\mu\text{mol/L}$ ) of PE for 24 h And then viable cells were treated with MTT and resulting formazan crystals were dissolved with DMSO. The absorbance at 490 nm was measured with a multiscan plate reader Statistical treatment vertical bars represent SD. \*  $P < 0.01$ ,  $n = 3$

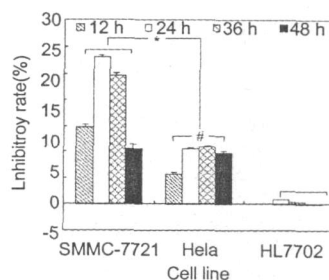


图 3 PE对细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 Average inhibitory rate with treatment of PE by MTT test at different time

注:将细胞按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96孔板,含 10% FBS的培养基培养 24 h后,用 25  $\mu\text{mol/L}$  PE 12, 24, 36, 48 h,然后用 MTT处理活细胞,用 DMSO溶解产生的结晶 甲臜。用酶标仪在 490 nm下检测吸光值。统计学分析:竖条信号代表标准偏差。\*  $P < 0.01$ , # $P > 0.05$ ,  $n = 3$ 。Note: Cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in 96-well plate with a medium supplemented with 10% FBS and incubated for 24 h Cells were then treated with 25  $\mu\text{mol/L}$  PE for 12, 24, 36, 48 h And then viable cells were treated with MTT and resulting formazan crystals were dissolved with DMSO. The absorbance at 490 nm was measured with a multiscan plate reader Statistical treatment vertical bars represent SD. \*  $P < 0.01$ , # $P > 0.05$ ,  $n = 3$

SMMC-7721细胞增殖的影响(图 2),并与人子宫癌细胞 HeLa,正常人肝细胞 HL7702细胞在同浓度不同作用时间下做了比较(图 3)。结果如图 2,3所示,发现:(1)肝源性 PE对 SMMC-7721的生长具有明显的抑制作用,且存在剂量依赖关系,在 PE浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ 时,其最高抑制率为 28.13%。(2)25  $\mu\text{mol/L}$ 的 PE对 HeLa细胞的增殖有一定的抑制作用且与作用时间关系不明显,平均抑制率低于 10%;(3)25  $\mu\text{mol/L}$ 的 PE对 HL7702的增殖基本无影响。实验结果表明,肝源性 PE对癌细胞的增殖抑制作用可能具有组织特异性,这可能与肝脏中特殊的 PE代谢路径及其不同分子种类有关。这个结果为今后开发低毒副作用的抗肝癌药物提供了新思路。

## 2.3 肝源性 PE对 SMMC-7721细胞凋亡的影响

细胞凋亡时主要的生化特征是其染色质发生浓缩,染色质 DNA在核小体单位之间的连接处断裂,可形成 180~200 bp 整数倍的寡核苷酸片段,在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱(DNA ladder)<sup>[10-13]</sup>。如图 4所示,25  $\mu\text{mol/L}$  PE处理 SMMC-7721细胞 24 h,琼脂糖凝胶电泳图谱上可以观察到较为明显的 DNA降解的特征性梯状条带。结果表明,肝源性 PE可以诱导人肝癌细胞 SMMC-7721发生凋亡。

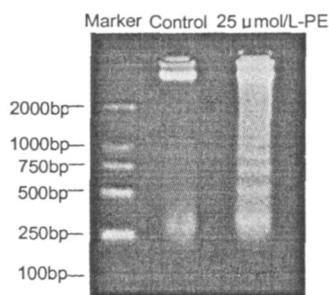


图 4 DNA ladder检测

Fig. 4 Agarose gel electrophoretic pattern showing DNA fragments  
注:提取基因组 DNA 并进行琼脂糖凝胶电泳。Note: The genomic DNA was extracted and subjected to agarose gel electrophoresis

## 2.4 肝源性 PE 对 SMMC-7721 细胞凋亡关键蛋白表达的影响

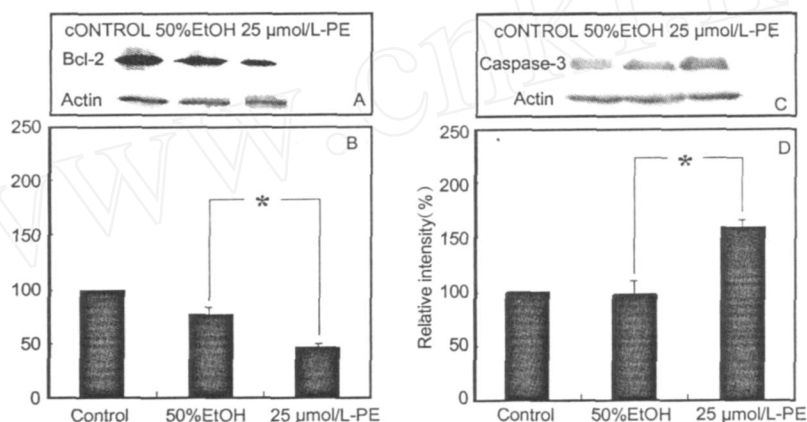


图 5 PE 对 Bcl-2/Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of PE on Bcl-2/Caspase-3 proteins

注: 25 μmol/L PE 处理 SMMC-7721 24 h。SDS-PAGE 每孔道上样蛋白 50 μg, 蛋白条带被转移到 PVDF 膜上与 Bcl-2/Caspase-3 特异性一抗 (1:1000) 结合然后用羊抗兔二抗 (1:2000) 处理, ECL 显色。胶片曝光 10~120 s 避免过度曝光, 然后用 QuantiScan 软件扫描胶片的相对敏感灰度, 人为设定对照为 100%, A/C 为蛋白条带, B/D 为 3 次实验的扫描结果。统计学分析: 竖条信号代表标准偏差。\*  $P < 0.01$ 。Note: The SMMC-7721 cells were incubated with 25 μmol/L PE for 24 h. Proteins (50 μg) from cell lysate was applied per lane for 10% SDS-PAGE, the protein bands were transferred onto a PVDF membrane and the membranes were probed with specific antibodies (1:1000) of Bcl-2/Caspase-3 and the protein bands were then treated with goat against rabbit IgG-HRP (1:2000), and visualized by ECL using the procedure recommended by the manufacturer (Amersham Corp.). The negative film was exposed to the membrane for times ranging from 10 to 120 s to avoid overexposure and then was developed. Intensities of the bands were scanned by using QuantiScan software and the results were expressed as relative intensity, with the control arbitrarily set as 100%. A/C Western profile, B/D Scanning of the Western profile ( $n = 3$ ). Statistical treatment: vertical bars represent SD. \*  $P < 0.01$ .

## 3 小结

肝癌是我国常见恶性肿瘤之一, 死亡率高, 在恶性肿瘤死亡排序中仅次于胃癌、食道癌而居第三位。因此, 近年来肝癌新药的研究越来越受到广泛关注。研究的领域从蛋白、脂类、多糖一直延伸到有机小分子。随着现代分离技术及质谱技术的发展, 脂类以

Bcl-2 蛋白是原癌基因 bcl-2 的编码产物, 其可通过阻止细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质<sup>[14-15]</sup>, 从而抑制细胞凋亡, 是众所周知的抗凋亡蛋白。Caspase 家族在细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 Caspase-3 为关键的执行分子, 在细胞凋亡中具有不可替代性。本实验以 Bcl-2/Caspase-3 蛋白为靶蛋白进行研究, 发现: 25 μmol/L 的 PE 处理 SMMC-7721 24 h, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显降低 (图 5A, B), 而 Caspase-3 的表达量则显著升高 (图 5C, D)。结果表明, 25 μmol/L 的 PE 作用肝癌细胞 SMMC-7721, 通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 及上调凋亡执行蛋白 Caspase-3 的表达来诱导其发生凋亡, 从而表现为 SMMC-7721 增殖抑制。

其独特的理化性质受到了越来越多的关注。目前脂类中研究较为深入和广泛的就是 PC, 其中多烯磷脂酰胆碱已经而作为临床药物应用。然而肝源性 PE 在 sn-1 和 sn-2 位上连接的不饱和度较高脂肪酸在其双键含量上与多烯磷脂酰胆碱相差无几, 并且在肝脏中 PE 与 PC 间存在着独特的相互转化途径, 这可能决定了肝源性 PE 具有抑制肝癌细胞增殖的活

性。因此,本实验研究了肝源性 PE 对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖及凋亡的影响,并与子宫颈癌细胞 Hela 正常人肝细胞 HL7702 做比较,发现肝源性 PE 特异性抑制人肝癌细胞的增殖,而对正常的肝细胞无细胞毒作用,并且下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 及上调凋亡执行蛋白 Capase-3 的表达。结果提示我们,肝源性 PE 可能作为某种信号或信号的载体且能与肝癌细胞表面的受体特异性识别,进而激活了肝癌细胞凋亡过程中关键性调节基因 bcl-2 和 capase-3 的表达,从而诱发肝癌细胞凋亡。同时 PE 作为细胞膜重要的组成成分,参与维持其正常的结构和功能,并与细胞的生长、增殖、分化密切相关。这为研发肝源性 PE 成为低毒副作用抗肝癌新药奠定了理论基础,也为肝癌的治疗提供了新思路。

#### 参考文献

- 1 Xu LX (徐丽珊), Lou FP (楼芬萍). Effects of soybean phospholipid on learning, memory and antioxidative functions *Acta Nutrimenta Sinica* (营养学报), 2000, 22: 287-288
- 2 Zhang L (张 朗), Song YF (宋焱峰), Hou YP (侯一平). Effect of phosphatidylcholine on spatial learning and memory in rats with vascular demntia *Acta Nutrimenta Sinica* (营养学报), 2007, 29: 20-22
- 3 Chen Y (陈鹰), Chen S (陈松), Tang R (汤韧), et al Studies of adriamycin liposomal nanoparticle compound *Pham J Chin People's Liberation Army* (解放军药化学学报), 2001, 17: 233-237.
- 4 Lu J (卢洁), Huang K (黄凯), Zang N (臧宁), et al Analysis of fatty acids in tissues of *Penaeus vannamei* cultured in sea and fresh waters by ultrasonic extraction-capillary gas chromatography *Chin J Chromatography* (色谱), 2005, 23: 193
- 5 Folch J, Less M, Stanley CH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues *J Biol Chem*, 1957, 226: 4
- 6 Wang L (王亮), Liu CP (刘翠平), Jia D (贾丹), et al Separation and purification of phosphatidylcholine in swine liver and its inhibition effect on proliferation of rat hepatoma cells *Chin J Chromatography* (色谱), 2006, 24: 271-274
- 7 Wang JH (王剑虹), Huang QK (黄庆科), Chen MX (陈民新). Stable inhibition of nuclear factor kappa B in SMMC-7721 cells increases sensitivity to doxorubicin *Chin J Hepatology* (中华肝脏病杂志), 2004, 12: 375
- 8 Situ ZQ (司徒镇强), Wu NZ (吴年正). Cell Culture (细胞培养). Beijing World Publishing Corp, 1996, 138: 186
- 9 Hertel C, Terzi E, Hauser N, et al Inhibition of electrostatic interaction between  $\beta$ -amyloid peptide and membranes prevents  $\beta$ -amyloid-induced toxicity *Proc Nat Acad Sci USA* (美国科学院院刊), 1997, 94: 9412
- 10 Savitskiy VP, Shman TV, Potapnev MP. Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques *Cytometry B Clin Cytom*, 2003, 56: 16
- 11 Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview experimental *Exp Gerontol*, 1998, 33: 525
- 12 Zhan XA (占秀安), Wang M (王敏), Xu ZR (许梓荣), et al Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs *Arch Toxicol*, 2006, 80: 74-80
- 13 Schwerdt G, Freudinger R, Schuster C, et al Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells *Toxicol Sci*, 2005, 85: 735
- 14 Yao G, Yang L, Hu Y, et al Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization *Mol Immunol*, 2006, 43: 915
- 15 Lizard G, Foumel S, Genestier L, et al Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis *Cytometry*, 1995, 21: 275