

芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究

胡太平¹, 曹建国²

(1. 广东药学院病理生理学教研室, 广州 510006; 2. 湖南师范大学医学院药理教研室, 长沙 410083)

[摘要] 目的: 研究芹菜素(apigenin, API)致人胃癌细胞凋亡作用及其机制。方法: 培养人胃癌 BGC823 细胞株, 加入不同浓度的 API, 孵育 48 h。PI 染色流式细胞术(FCM)分析测定凋亡率; 罗丹明染色 FCM 分析测定细胞线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$); Caspase-9 分光光度法检测试剂盒测定 caspase-9 活性; Western 印迹检测线粒体凋亡信号转导通路相关蛋白的表达, 包括 bax, bcl-2, caspase-9 和 caspase-3。结果: API(20, 40 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 48 h 能呈浓度依赖性诱导 BGC823 细胞凋亡。而且, API 也能降低 BGC823 细胞的 $\Delta\psi_m$, 增加 caspase-9 活性, 促进细胞色素 c (Cyt c) 释放, 上调 bax, caspase-9 和 caspase-3 蛋白的表达, 同时下调 bcl-2 蛋白表达, 且呈剂量依赖性。结论: API 通过活化线粒体信号转导途径诱导人胃癌细胞凋亡。

[关键词] 胃肿瘤; 芹菜素; 凋亡; 线粒体跨膜电位; caspase

[中图分类号] R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1773(2007)01-0006-05

Study on pro-apoptotic effect of apigenin on human gastric cancer cells and its underlying mechanisms

HU Tai-ping¹, CAO Jian-guo²

(1. Department of Pathophysiology, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006;

2. Department of Pharmacology, Medical College, Hunan Normal University, Changsha 4100078, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of apigenin (API) on induction of apoptotic death in human gastric cancer cells and its underlying mechanisms. **Methods** Human gastric cancer BGC823 cells line was cultured and treated with different concentrations of API for 48 h. Cell apoptosis and mitochondrial membrane potential was determined by flow cytometry (FCM) labeled with propidium iodide (PI) and Rhodamine123, respectively. Caspase-9 activity was determined by caspase-9 colorimetric assay kit. Western blot was used to analyze the expressions of apoptosis mitochondrial signal transduction pathway related proteins including bax, bcl-2, caspase-9 and caspase-3. **Results** Treatment with API (20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h could concentration-dependently induce the apoptotic death of BGC823 cells. Moreover, API could also decrease the cellular $\Delta\psi_m$, increase the activity of caspase-9 and enhance the releasing of cytochrome c. The protein expressions of bax, caspase-9 and caspase-3 were upregulated by treatment with API, associated with a downregulation of the protein expression of bcl-2. **Conclusion** API can induce the apoptosis of human gastric cancer cells via activating mitochondrial signal transduction pathway.

[Key words] gastric cancer; apigenin; apoptosis; mitochondrial membrane potential; caspase

[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(1):0006-05]

收稿日期: 2006-09-30 修回日期: 2006-12-20

作者简介: 胡太平(1964-), 男, 博士, 广东广州人, 主要从事心血管药理学方面的研究。

通讯作者: 曹建国, E-mail: hup001@163.com

芹菜素(5,7,4'-三羟基黄酮; apigenin, API)是一种分布广泛的黄酮类化合物,API在体外能够显著抑制白血病、结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤以及前列腺癌等肿瘤细胞的增殖作用。其作用机制主要包括以下几个方面:(1)诱导细胞凋亡:API通过提高细胞内活性氧水平,降低线粒体跨膜电位促使细胞色素C释放并激活caspase-9的作用,进而导致细胞内caspase-3蛋白酶活化,引起细胞凋亡^[1-2];(2)细胞周期阻滞:API通过下调细胞周期蛋白B1(cyclin B1)的表达及降低cyclin B1结合的周期蛋白依赖激酶CDK1活性将结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤细胞阻滞在G₂/M期^[3]。然而在人前列腺癌LNCaP细胞经API作用后细胞周期被阻滞在G₀/G₁期,这是由于API可下调细胞cyclin D1, D2和cyclin E以及通过p53途径上调CDK抑制因子p21 WAF1和p27 KIP1表达,从而抑制了CDK2, CDK4, CDK6活性^[4];(3)促进癌细胞分化:API可促进HL260细胞向单核细胞分化。

细胞凋亡的调控根据其起始信号的细胞部位不同,主要有2条诱导途径:死亡受体途径和线粒体途径,不同的死亡信号通过不同的途径诱导细胞凋亡。最近的研究表明线粒体是细胞内死亡信号的重要感受器与放大器,在细胞凋亡早期,核染色体DNA还未改变之前,已出现结构和功能的变化,说明线粒体在细胞凋亡调控过程中起重要作用^[5-6]。有研究表明API经线粒体途径诱导急性髓性白血病细胞凋亡^[1]。本研究旨在验证API是否通过活化线粒体信号转导通路诱导人胃癌BGC823细胞凋亡。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 Apigenin购自Sigma公司, RPMI-1640培养液购自Gibco公司,新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司,罗丹明123, caspase-9分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物公司, caspase-9抑制剂(Ac-LEHD-CHO)购自Alexis公司, bcl-2, bax, cyt c, caspase-9, caspase-3和 β -actin抗体购自Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗均购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养 人胃癌细胞株BGC823由中科院上海细胞生物学研究所引进。用含有10%小牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI-1640培养液,在37 $^{\circ}$ C,含5% CO₂的饱和湿度的培养箱内培养传代。

1.3 PI染色流式细胞术测定细胞凋亡率 收集PBS, API(20, 40, 80 μ g/mL)作用48 h后的细胞 2.0×10^6 个,用4 $^{\circ}$ C预冷体积分数为0.75的乙醇固定细胞,加入碘化丙啶(PI)均匀染色,30 min后用流式细胞仪检测凋亡率。

1.4 细胞线粒体跨膜电位($\Delta\psi$ m)检测 收集PBS, API(20, 40, 80 μ g/mL)和API 40 μ g/mL加Ac-LEHD-CHO作用48 h后细胞 2.0×10^6 个,用PBS洗涤细胞2次,重悬于罗丹明123染色液(终浓度5 μ g/mL)中,于37 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,再用PBS洗涤细胞2次,利用流式细胞仪以罗丹明123为荧光指示剂检测细胞线粒体 $\Delta\psi$ m的改变。罗丹明123的激发波长为475 nm,发射波长为525 nm。

1.5 Caspase-9活性测定 取未处理和经药物处理48 h的细胞 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个,按caspase-9分光光度法检测试剂盒说明书进行操作,即用50 μ L冰冷Lysis Buffer悬浮细胞,置冰上20 min;4 $^{\circ}$ C离心(10 000 r/min)3 min,把离心上清转移至新的管中,置冰上;用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;吸取50 μ L含50~200 μ g蛋白的细胞裂解上清;如体积不足50 μ L用Lysis Buffer补足至总体积50 μ L;加入50 μ L的2 \times Reaction Buffer(使用前每50 μ L 2 \times Reaction Buffer加入0.5 μ L DTT);加入5 μ L caspase-9底物并于37 $^{\circ}$ C避光孵育4 h;用酶标仪在 $\lambda = 405$ nm测定其吸光值。通过计算 $OD_{\text{诱导剂}}/OD_{\text{阴性对照}}$ 的倍数来确定凋亡诱导剂组caspase-9的活化程度。以Lysis Buffer和Reaction Buffer混合物作为参比。

1.6 Western印迹分析 收集 1×10^6 以上细胞,2 500 r/min离心10 min,冰PBS洗2次,加入100 μ L细胞裂解液(10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 20% SDS, 5 mmol/L DTT和10 mmol/L PMSF)于冰上裂解1 h,12 000 r/min离心5 min,收集上清。Lowry法测

定蛋白含量。加入 20 μL 的 5 \times 上样缓冲液 (250 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 50% 甘油, 0.5% 溴酚蓝, 5% 二巯基乙醇), 加热变性。用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (检测 Cyt c 时用 15%) 电泳分离蛋白质。凝胶上的蛋白带转移到 PVDF 膜上, 封闭液封闭膜上的蛋白结合位点 2 h。加入一抗 (bcl-2, bax, caspase-9, caspase-3, Cyt c, 1:200; β -actin, 1:400), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加相应辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。ECL 检测, 扫描。

收集细胞 ($1 \times 10^8/\text{mL}$), 于冰浴预冷的匀浆缓冲液 (250 mmol/L Sucrose, 20 mmol/L Hepes/KOH, pH7.5, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF) 400 μL 重悬, 移入玻璃匀浆器内于冰浴中匀浆 5 min, 匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 r/min 离心 10 min, 共 2 次, 取上清于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 15 min, 收集的上清即为不含细胞核和线粒体的胞浆成分。测定蛋白含量后进行 Western 印迹分析。

1.7 统计学处理 实验均重复 3 次。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 API 促进 BGC823 细胞凋亡作用 PI 染色 FCM 分析结果显示, API (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 BGC823 细胞 48 h 后的凋亡率分别为 13.1%, 20.6%, 34.0%, 较对照组 2.9% 高。说明 API 具有促进 BGC823 细胞凋亡作用, 呈浓度依赖性 (图 1, 封二)。

2.2 API 对 BGC823 细胞线粒体跨膜电位的影响 用罗丹明 123 作为荧光探针测定线粒体跨膜电位, 其被线粒体摄取量与 $\Delta\psi\text{m}$ 成正比。API (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理后, BGC823 细胞的罗丹明 123 的荧光强度分别为 105.0 ± 3.3 , 98.4 ± 3.3 , 65.7 ± 5.0 , 较对照组 (138.0 ± 3.5) 明显降低 (图 2, 封二), 且随着 API 浓度增加荧光强度降低。表明 API 降低 BGC823 细胞线粒体跨膜电位, 与剂量呈正相

关。而 API 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Ac-LEHD-CHO 组罗丹明 123 的荧光强度 (115.2 ± 11.0) 仅稍低于对照组, 说明 Ac-LEHD-CHO 能抑制 API 降低 BGC823 细胞线粒体跨膜电位的作用。

2.3 API 对 BGC823 细胞 caspase-9 活性的影响 Caspase-9 是线粒体诱导凋亡途径中的关键 caspase, API (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 BGC823 细胞 48 h 后, 分光光度法检测 caspase-9 活性, 结果发现 caspase-9 活性分别为对照组的 5.0, 7.0 和 8.5 倍, 而 API 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 合用 caspase-9 抑制剂组的 caspase-9 活性仅比对照组增加 1.4 倍 (图 3)。可见 API 以剂量依赖方式增加 caspase-9 活性, caspase-9 抑制剂能显著抑制 API 增强 caspase-9 活性作用。说明 API 诱导 BGC823 细胞凋亡与活化线粒体途径相关。

2.4 API 对凋亡线粒体途径相关蛋白表达的影响 为进一步证实 API 通过活化线粒体途径诱导 BGC823 凋亡, 本研究进一步检测凋亡线粒体途径相关蛋白的表达 (图 4)。结果提示, 随着 API 浓度增大, bax 蛋白表达增加, bcl-2 蛋白表达降低, bax/bcl-2 比值逐渐增大, Cyt c 释放随 API 浓度升高而增加, caspase-9 和 caspase-3 蛋白表达也随 API 浓度升高而增加。Caspase-9 抑制剂 Ac-LEHD-CHO 能阻断 API 的上述作用。

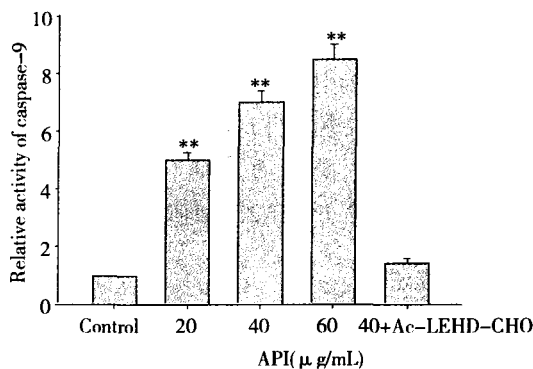


图 3 芹菜素 (API) 对 BGC823 细胞 caspase-9 活性的影响。不同浓度的 API (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 BGC823 细胞 48 h 后检测 caspase-9 活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) 与对照组比较, * * $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of API on activity of caspase-9 in BGC823 cells. BGC823 cells were treated with different concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of API for 48 h, and then activity of caspase-9 was determined ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) Compared with control, * * $P < 0.01$

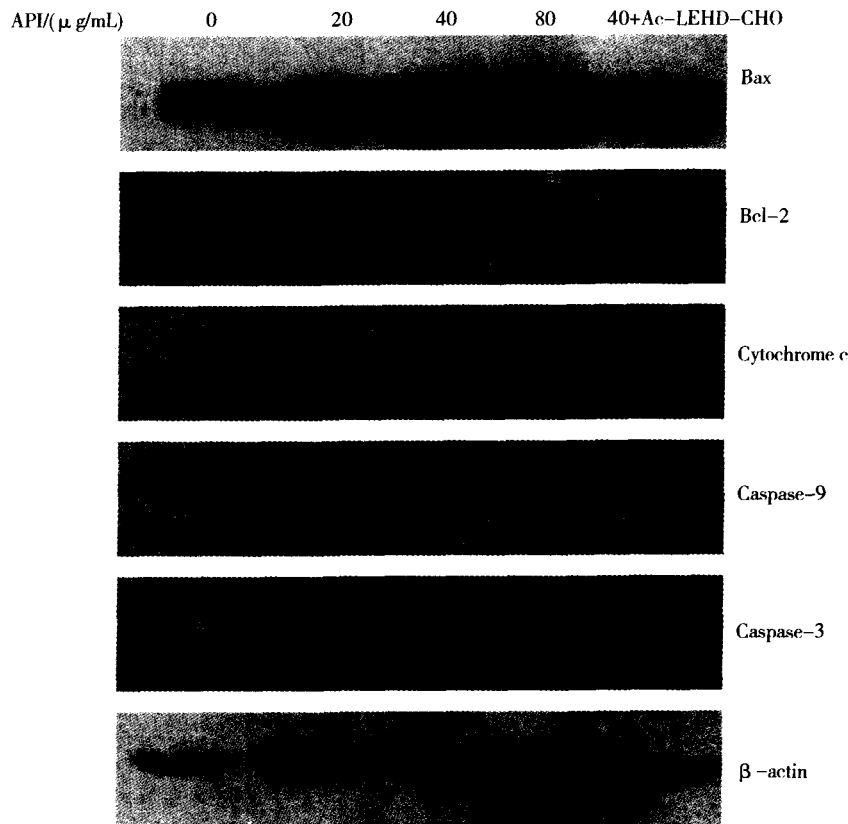


图4 芹菜素(API)对BGC823细胞线粒体信号途径相关蛋白的影响。不同浓度的API(20,40,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理BGC823细胞48 h,Western印迹分别检测bax, bcl-2, 细胞色素c, caspase-3和caspase-9的表达

Fig. 4 Effect of API on the expression of mitochondrial signal pathway related proteins in apoptosis in BGC823. BGC823 cells were treated with different concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of API for 48 h, and then protein expressions of bax, bcl-2, cytochrome c, caspase-3 and caspase-9 were determined by Western blot

3 讨 论

API可以使人前列腺癌细胞及人白血病细胞HL-60发生选择性周期阻滞,并诱导细胞凋亡。其诱导凋亡的机制可能是通过细胞色素C的释放及半胱氨酸酶(caspase-9, caspase-3)的激活而实现^[1,4]。此外,API也可以通过激活P53/waf1途径发挥抗肿瘤作用。API能使肿瘤细胞内P53蛋白、P21/WAF1蛋白水平升高,二者可以使细胞周期发生阻滞,并通过P53途径诱导肿瘤细胞凋亡^[7]。核因子- κB (NF- κB)、B细胞淋巴瘤/白血病2(bcl-2), bax(bcl-2的家族成员)也参与了API的诱导肿瘤细胞凋亡作用^[7-8]。NF- κB 的活化能阻止处于半胱氨酸酶反应上游的caspase-8活化,并引起凋亡抑制剂蛋白的表达。API能够抑制NF- κB 蛋白的表达,使bax, bcl-2的比值发生转变,最终诱导

细胞凋亡的发生。本文采用PI染色FCM分析发现:随着API浓度升高,BGC823细胞凋亡率增加。说明API具有促进BGC823细胞凋亡作用。

线粒体跨膜电位在维持线粒体膜的完整性和功能方面起着重要作用^[6]。本研究用一种能被线粒体选择性吸收的荧光染料罗丹明123作为指示剂,它的吸收率与 $\Delta\psi\text{m}$ 成正比,FCM分析测定结果显示,API能降低BGC823细胞中罗丹明123的荧光强度,呈剂量依赖性。表明API能以剂量依赖方式降低BGC823细胞中 $\Delta\psi\text{m}$ 。线粒体依赖性细胞凋亡通路中,线粒体跨膜电位降低导致Cyt c释放增加。本研究用Western印迹检测BGC823细胞胞浆中细胞色素c蛋白的表达,结果证实随着API浓度增大,细胞色素c表达增加。以上结果表明,API能降低BGC823细胞线粒体跨膜电位,促进细胞色素c

释放。

细胞色素 c 从线粒体释放后与 ATP、凋亡蛋白酶激活因子 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 联合作用, 依次激活 caspase-9, caspase-3 和 PARP 等, 导致细胞凋亡。本实验用 caspase-9 分光光度法检测试剂盒检测 caspase-9 的活性, 发现 API 能增加 BGC823 细胞中 caspase-9 的活性。用 Western 印迹检测发现 API 能上调 caspase-9 和 caspase-3 蛋白的表达。Bcl-2 家族成员在细胞凋亡的线粒体途径中起重要调控作用^[2,9]。在细胞凋亡过程中, bcl-2 家族促凋亡成员如 bax 过表达, 形成同源二聚体后被激活, 发生构象改变, 可引起线粒体大量释放 Cyt c; 而抗凋亡成员如 bcl-2 和 bcl-XL 过表达, 与 bax 形成异源二聚体, 可对 Apaf-1 结构进行调控, 抑制 Cyt c 释放, 最终发挥抑制细胞凋亡作用^[10-11]。本文用 Western 印迹检测 BGC823 细胞中 bax 和 bcl-2 蛋白的表达情况, 发现 API 以剂量依赖方式上调 bax 的表达, 下调 bcl-2 的表达, 使 bax/bcl-2 的比值增大。而 caspase-9 抑制剂 Ac-LEHD-CHO 能阻断 API 的上述作用。说明 API 通过调节 bax/bcl-2 比值激活 BGC823 细胞中 caspase-9, caspase-3 级联反应。

综上所述, API 能上调 bcl-2 家族促凋亡成员 bax 蛋白表达, 下调 bcl-2 蛋白表达, 使 bax/bcl-2 比值升高, 降低线粒体跨膜电位, 促进 Cyt c 释放, 从而激活 caspase-9, caspase-3 级联反应, 通过调控线粒体凋亡诱导途径诱导人胃癌 BGC823 细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Wang I K, Lin-Shiau S Y, Lin J K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(10):1517.
- [2] 陆立鹤, 吴伟康. 细胞死亡方式研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005, 25(6):507-510.
LU Li-he, WU Wei-kang. Research progress of cell death [J]. *Int J Pathol Clin Med*, 2005, 25(6):507-510.
- [3] Wang W, Heideman I, Chung C S, et al. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines [J]. *Mol Carcinog*, 2000, 28(2):102.
- [4] Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2002, (21):3727-3738.
- [5] Gamen S, Anel A, Perez Galan P, et al. Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes loss, caspase-9 activity and apoptosis in jurkat cell [J]. *Exper Cell Res*, 2000, 258(1):223-235.
- [6] 李丽, 陈杰斌, 李双杰. 心力衰竭与线粒体凋亡调控通路的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005, 25(4):294-297.
LI Li, CHEN Jie-bin, LI Shuang-jie. Advance of heart failure and mitochondrion apoptosis regulation [J]. *Int J Pathol Clin Med*, 2005, 26(4):294-297.
- [7] Mc Vean M, Xiao H, Isobe K, et al. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(4):633-639.
- [8] 屈朝法, 马礼坤. Bcl-2 家族与心肌细胞凋亡的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2005, 25(4):291-293.
QU Chao-fa, MA Li-kun. Advance of bcl-2 family and cardiac muscle cell apoptosis [J]. *Int J Pathol Clin Med*, 2005, 25(4):291-293.
- [9] Desagher S, Osensand A, Nichols A, et al. Bid induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome C release during apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(3):891-901.
- [10] 谢奇朋, 叶艳, 郝延璋, 等. bcl-2 家族 BH3-only 蛋白在依托泊苷诱导胃腺癌细胞凋亡中的作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(7):502-505.
XIE Qi-peng, YE Yan, HAO Yan-zhang, et al. Association of BH3 only proteins with Etoposide-induced apoptosis of gastric adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Res Prevention Treatment*, 2006, 33(7):502-505.
- [11] 范学军, 郭科, 肖波, 等. 七叶皂甙钠对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2 和 Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2005, 30(3):261-265.
FAN Xue-jun, GUO Ke, XIAO Bo, et al. Effects of sodium aescinate on Bcl-2 and Caspase-3 expression and apoptosis after focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2005, 30(3):261-265.

芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究

(正文见第6~10页)

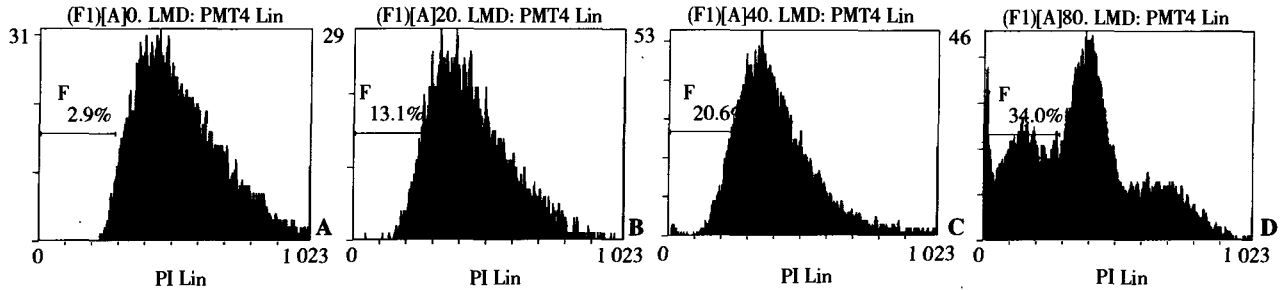


图1 芹菜素(API)对BGC823细胞凋亡的影响 不同浓度的API(20,40,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理BGC823细胞48 h,PI染色FCM检测细胞凋亡 A: 对照组;B:20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API处理组;C:40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API处理组;D:80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API处理组

Fig.1 Effect of API on apoptotic death of BGC823 cells BGC823 cells were treated with different concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of API for 48 h, and then FCM with PI staining were used to determine cell apoptosis A: Control; B: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API; C: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API; D: 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API

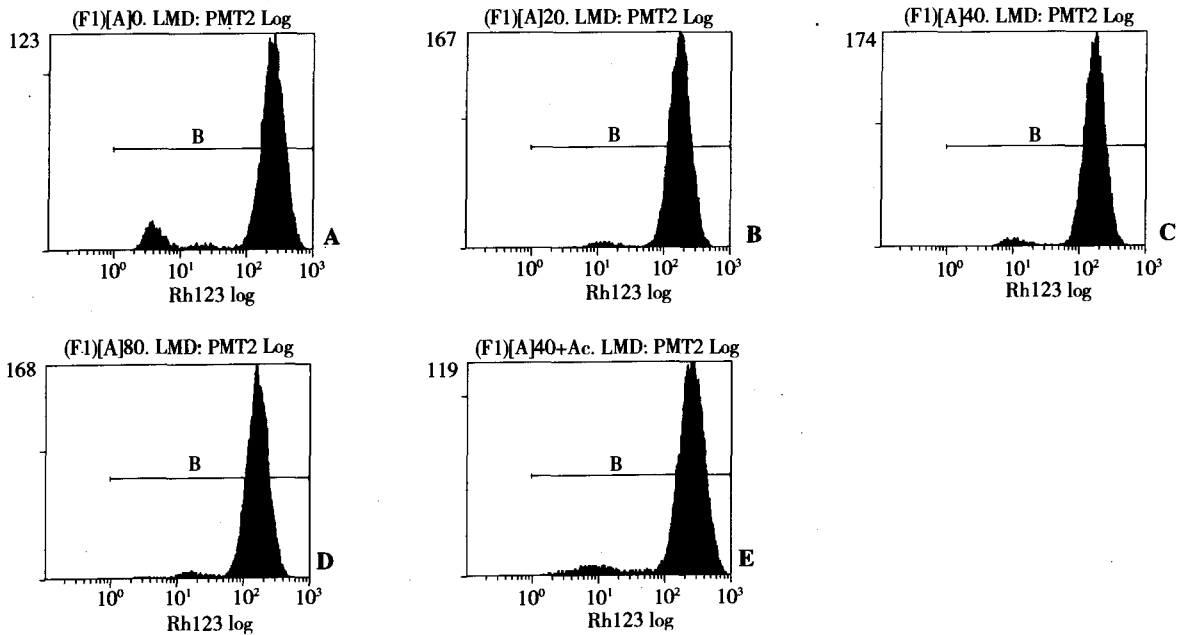


图2 芹菜素(API)对BGC823细胞线粒体跨膜电位的影响 不同浓度的API(20,40,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理BGC823细胞48 h,用罗丹明123作为荧光探针测定线粒体跨膜电位 A: 对照组;B:20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API;C:40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API;D:80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API;E:40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API加caspase-9抑制剂Ac-LEHD-CHO

Fig.2 Effect of API on mitochondrial membrane potential in BGC823 cells BGC823 cells were treated with different concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of API for 48 h, and then mitochondrial membrane potential were determined using Rhodamine123 A: Control; B: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API; C: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API; D: 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API; E: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ API supplemented with Ac-LEHD-CHO, a specific inhibitor of caspase-9