

# 芹菜素通过升高 ROS 促进不同细胞凋亡的实验研究

廖月霞, 孔桂美, 陶文华, 卜平\*

扬州大学医学院中西医结合肿瘤防治实验室, 扬州 225001

**摘要:** 芹菜素是一种具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎活性的天然植物黄酮, 本研究应用 MTT 法测芹菜素对小鼠脾细胞和 S<sub>180</sub> 细胞增殖的影响, 流式细胞仪测细胞凋亡和细胞内活性氧水平。结果显示: 芹菜素剂量依赖地抑制小鼠脾细胞和 S<sub>180</sub> 细胞增殖, 促进脾细胞和 S<sub>180</sub> 细胞凋亡, 显著升高脾细胞和 S<sub>180</sub> 细胞内活性氧水平。这些结果提示: 芹菜素可能通过升高不同细胞内 ROS 水平, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 具有进一步研究开发价值。

**关键词:** 芹菜素; 细胞增殖; 细胞凋亡; 活性氧

中图分类号: Q932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.024

## Apigenin Inducing Different Cells Apoptosis through Increasing ROS

LIAO Yue-xia, KONG Gui-mei, TAO Wen-hua, BO Ping\*

*Laboratory of Combine Traditional Chinese and Western Medicine, Medical*

*College of Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225001, China*

**Abstract:** Apigenin is a naturally occurring plant flavonoid that possesses antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory properties. To investigate the effect of apigenin in mice spleen cells and mouse sarcoma S<sub>180</sub> cells, the spleen cells and S<sub>180</sub> cells were incubated with different concentrations of apigenin. The rates of viable cells were determined by MTT assay, apoptosis and the level of intercellular ROS were determined by flow cytometric analysis. The results showed that apigenin inhibited the proliferation of spleen cells and S<sub>180</sub> cells, induced cell apoptosis and increased intercellular ROS.

**Key words:** apigenin; cell proliferation; apoptosis; ROS

芹菜素(4',5,7-三羟基黄酮, Apigenin)是一种天然植物黄酮,广泛存在于蔬菜、水果、豆类、中草药、红酒和啤酒中,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等黄酮类生物活性<sup>[1,2]</sup>。流行病学研究结果显示饮食中富含芹菜素可以降低肠癌、卵巢癌、肺癌等肿瘤发生的风险<sup>[3]</sup>。一些研究结果提示芹菜素能通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤细胞生长<sup>[4,5]</sup>。Munyendo等<sup>[6]</sup>应用磷脂混合胶技术研究芹菜素抗肿瘤活性,结果显示口服芹菜素混合胶可明显提高芹菜素对S<sub>180</sub>移植瘤抑瘤活性。此外,芹菜素具有抑制免疫细胞生长,诱导细胞周期阻滞,促进细胞凋亡作用,具有潜在的调控肥大细胞介导的炎症反应活性和抑制脐静脉内皮细胞表达IL-6、IL-8、ICAM-1等炎症因子活性<sup>[7-9]</sup>。对其机制研究结果显示芹菜素可以通过对相应基因和蛋白的抑制或激活,调节信号分子,干预酶作用等途径调节细胞周期与凋亡、抑制侵袭

与迁移、抑制血管新生、调节免疫等机制发挥生物活性<sup>[10]</sup>。本实验应用不同浓度芹菜素作用于正常小鼠脾细胞和小鼠S<sub>180</sub>肉瘤细胞,观察其对不同细胞增殖的调节作用,以期合理开发利用芹菜素提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

MTT、硫酸亚铁、水杨酸, DPPH [2, 2-di (4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl]、碘化丙啶(PI)为Sigma公司产品,芹菜素(apigenin, HPLC > 98%)为南京替斯艾么中药技术研究所产品,活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司, RPMI 1640 购自 Gibco 公司,其他实际均为国产分析纯试剂。

#### 1.1.2 主要仪器

多功能酶标仪(Biotek, USA), SUV-2120 分光光度仪(SCINCO, 韩国), 分析型流式细胞仪(BD FAC-SCalibur, USA), 倒置荧光显微镜(Nikon, 日本)。

收稿日期: 2014-02-13 接受日期: 2015-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(NSFC30873343)

\* 通讯作者 Tel: 86-514-87978872; E-mail: boping@yzu.edu.cn

### 1.1.3 细胞及动物

小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞购自中国科学院上海细胞库; 4~6 周龄 SPF 级 ICR 小鼠购自江苏省比较医学中心(合格证 No.: 2023469)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养

#### 1.2.1.1 小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞

S<sub>180</sub> 细胞培养于完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS, 100 IU/mL 青霉素和链霉素 100 (g/mL), 取对数生长期 S<sub>180</sub> 细胞, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$ /mL。

#### 1.2.1.2 小鼠脾细胞

4~6 周 SPF 级 ICR 小鼠脱颈处死, 75% 乙醇浸泡 10 min, 无菌操作取鼠脾脏, 放在装有预冷 PBS 的平皿中漂洗去血渍剔除外膜。用 PBS 溶液冲洗两遍, 轻柔碾碎, 200 目金属细胞滤网过滤, 收集细胞悬液, 加入红细胞裂解液, 静置 5 min 后, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 调整细胞浓度  $5 \times 10^5$ /mL。

#### 1.2.2 MTT 检测细胞增殖情况

将与不同浓度芹菜素孵育细胞培养 48 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL) 工作液, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 4 h, 离心去上清, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 于振荡器上震荡 10 min, 检测吸光度, 并计算细胞增殖率。细胞增殖抑制率 =  $1 - (\text{实验孔 A 均值} - \text{空白孔 A 均值}) / (\text{溶媒空均值} - \text{空白孔 A 均值}) \times 100\%$ 。每组实验设平行 6 复孔, 重复 3 次。

#### 1.2.3 PI 单染测细胞凋亡

同上细胞浓度种板, 以 5% 血清培养基重悬细胞, 24 h 后收集细胞。以 PBS 重悬细胞, 加入 -20 °C 预冷的 75% 乙醇中固定。4 °C 过夜后 PBS 重悬细胞 5 min。200 目筛网收集细胞。加入 1 mL PI 染色

液 (50  $\mu$ g/mL), 4 °C、避光孵育 45 min。流式细胞仪分析 PI 荧光 Sub-G<sub>1</sub> 细胞百分率, 实验重复 3 次。

### 1.2.4 细胞内活性氧浓度测定

应用不同浓度芹菜素 (12.5、25、50、100  $\mu$ mol/L) 刺激 S<sub>180</sub> 细胞和脾细胞 24 h, 调整 S<sub>180</sub> 细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /mL, 脾细胞浓度  $5 \times 10^7$ /mL, 参考文献<sup>[11]</sup> 实验方法, 应用碧云天活性氧检测试剂盒, 步骤简述如下: 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10  $\mu$ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 37 °C DCFH-DA 中 45 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, ROS 阳性对照或不同浓度芹菜素 (12.5、25、50、100  $\mu$ mol/L) 刺激细胞 30 min。收集细胞后流式细胞仪检测, 使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 检测刺激前后荧光的强弱, 实验重复 3 次。

### 1.2.5 数据处理

定量数据取平均值, 表示为  $\bar{x} \pm s$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。流式细胞实验数据采用 WinMDI 2.9 分析软件分析门内细胞平均荧光强度并叠图。数据输入 SPSS13.0, 进行 One-way ANOVA 方差分析和 SNK 检验。

## 2 实验结果

### 2.1 芹菜素对细胞活力的影响

MTT 实验结果显示, 芹菜素对正常 ICR 小鼠来源的脾细胞具有明显抑制细胞增殖作用, 与溶媒对照组比较, 25  $\mu$ mol/L 芹菜素可抑制 60% 左右的细胞增殖, IC<sub>50</sub> 约为 20  $\mu$ mol/L。对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞也具有明显抑制细胞增殖作用, IC<sub>50</sub> 约为 50  $\mu$ mol/L。结果提示芹菜素对不同细胞增殖作用可能没有特异性(图 1)。

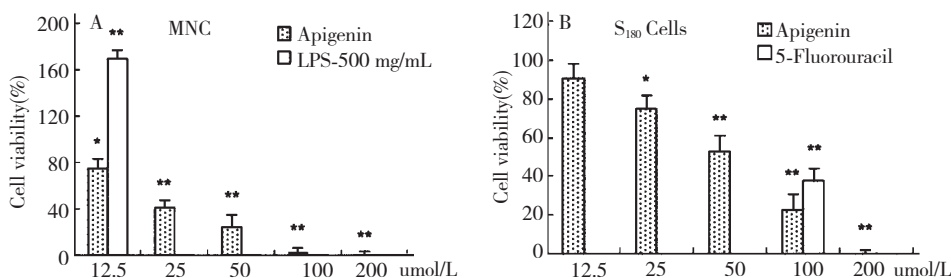


图 1 芹菜素抑制小鼠来源脾细胞(A)及 S<sub>180</sub> 细胞(B)增殖 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 1 Apigenin inhibited the proliferation of mice spleen cells (A) and S<sub>180</sub> cells (B) (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

## 2.2 芹菜素对细胞凋亡的影响

为进一步研究芹菜素对不同细胞的作用,对芹菜素作用 24 h 后的细胞进行单染分析,结果显示 > 25  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素作用的小鼠来源的脾细胞组 Sub-G<sub>1</sub> 期细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ ),提示芹菜素可能通过促进小鼠脾细胞凋亡抑制其细胞增殖(图

2)。对 S<sub>180</sub> 细胞作用结果也显示 > 25  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素作用的 S<sub>180</sub> 细胞组 Sub-G<sub>1</sub> 期细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ ),提示芹菜素可能也是通过促进小鼠脾细胞凋亡抑制其细胞增殖(图 3)。这些结果提示芹菜素可能非特异性地诱导不同细胞发生凋亡。

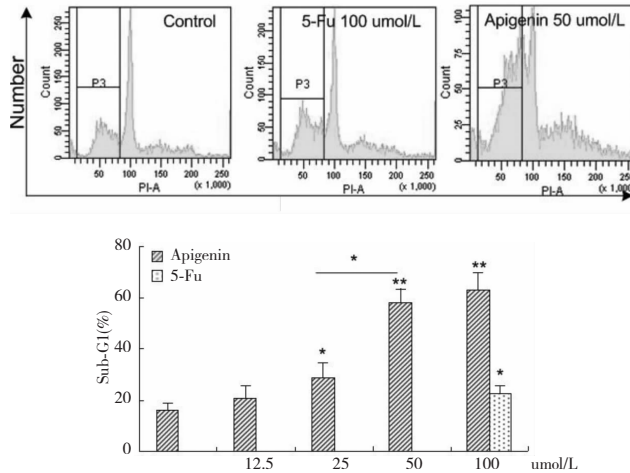


图 2 芹菜素诱导小鼠来源脾细胞凋亡 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 2 Apigenin induced the mice spleen cell apoptosis (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

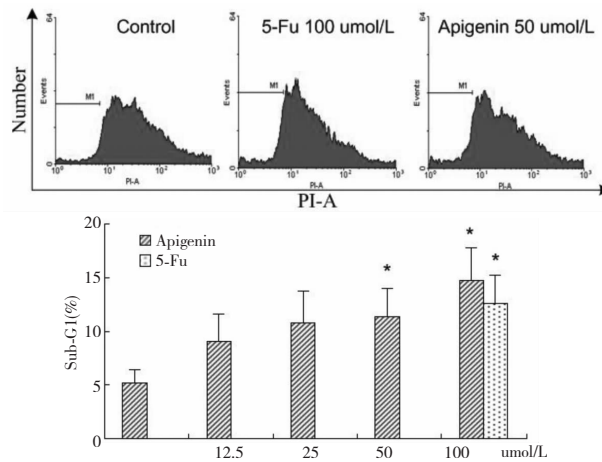


图 3 芹菜素诱导 S<sub>180</sub> 肉瘤细胞凋亡 (\*,  $P < 0.05$ )

Fig. 3 Apigenin induced the S<sub>180</sub> cell apoptosis (\*,  $P < 0.05$ )

## 2.3 芹菜素对不同细胞内活性氧作用

实验结果显示芹菜素在较低浓度时即明显升高 ICR 小鼠来源脾细胞内活性氧产生,在量效关系上呈现低浓度上升,较高浓度下降的特点,且对脾细胞不同细胞群细胞内活性氧均有增加作用(图 4)。图 5 结果显示芹菜素显著促进 S<sub>180</sub> 小鼠肉瘤细胞内活性氧产生,在量效关系上也呈现低浓度上升,较高浓

度下降的特点,这些结果提示芹菜素对不同细胞内活性氧产生也存在非特异性调节作用,且较低浓度即明显促进细胞内活性氧生成,推测其在较高浓度的下降趋势可能与细胞凋亡增加有关。

## 3 讨论

本节研究结果显示芹菜素显著抑制了小鼠脾细

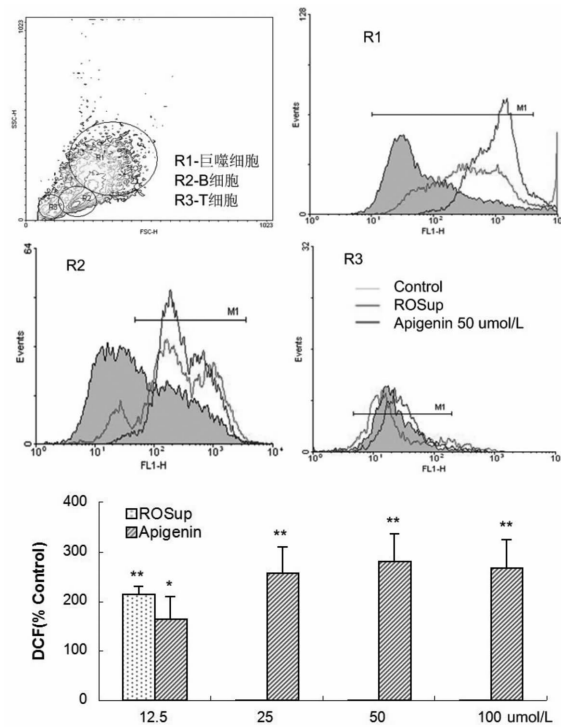


图4 芹菜素升高了脾细胞内活性氧水平 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 4 Apigenin increased the level of intercellular ROS of mice spleen cells (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

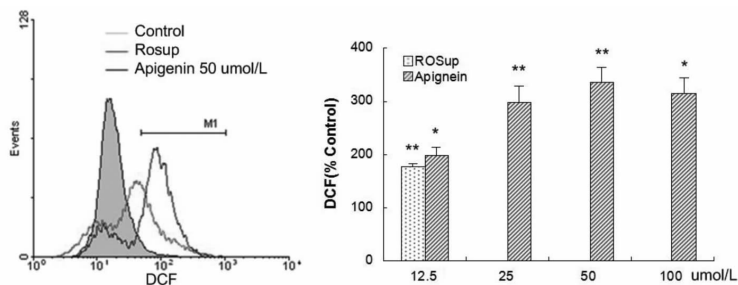


图5 芹菜素升高了  $S_{180}$  细胞内活性氧水平 (\*\*,  $P < 0.01$ )

Fig. 5 Apigenin increased the level of intercellular ROS of  $S_{180}$  cells (\*\*,  $P < 0.01$ )

胞和  $S_{180}$  细胞增殖并诱导其凋亡,同时,芹菜素显著升高细胞内活性氧水平。这些结果提示芹菜素可能是通过升高细胞内活性氧水平,诱导不同细胞发生凋亡。

药物或毒物抑制细胞增殖通常通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和促进细胞坏死等途径<sup>[12]</sup>,本次实验中,采用流式细胞仪检测细胞凋亡变化,结果显示芹菜素显著诱导  $S_{180}$  细胞和脾细胞发生凋亡,随着浓度的增加,细胞凋亡率逐渐增加。这些结果提示芹菜素可能通过促进  $S_{180}$  细胞和脾细胞凋亡从而抑制细胞增殖。

由超氧离子、过氧化氢和羟自由基组成的活性

氧是细胞代谢的副产品,在细胞增殖、分化和凋亡中具有调控作用<sup>[13]</sup>。研究证实,细胞内氧化和抗氧化基本处于平衡状态,当低微水平的活性氧升高可促进细胞增殖,而较高水平的活性氧则引发细胞凋亡,更高水平的活性氧则直接导致细胞坏死<sup>[14]</sup>。本次实验结果显示芹菜素明显升高了  $S_{180}$  细胞和脾细胞内活性氧水平,这与文献<sup>[14]</sup>报道结论基本一致,提示芹菜素可能是通过升高细胞内活性氧水平,进一步影响活性氧下游的细胞信号系统,促进了  $S_{180}$  细胞和脾细胞的凋亡。

脾脏是体内最大的外周免疫器官,在机体免疫,尤其抗肿瘤免疫方面占有十分重要的地位,脾脏富

含大量的免疫细胞和免疫因子参与肿瘤免疫,如淋巴细胞、巨噬细胞、DC 细胞和调理素、补体等,通过不同的机制参与免疫反应,发挥免疫功能<sup>[15]</sup>。脾脏功能在肿瘤的不同阶段扮演不同的角色,具有双向性、时向性特点,有实验证实,脾脏切除对大鼠肿瘤的发生、发展和扩散有显著的促进作用<sup>[16]</sup>。本实验结果显示芹菜素同时抑制脾细胞和 S<sub>180</sub> 肿瘤细胞增殖,提示其作用可能具有非特异性,这种非特异性作用在芹菜素抗肿瘤机制的意义和作用有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Lordan S, O'Neill C, O'Brien NM. Effects of apigenin, lycopene and astaxanthin on 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis and Akt phosphorylation in U937 cells. *Br J Nutr*, 2008, 100:287-296.
- 2 Tong X, Pelling JC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13:971-978.
- 3 Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*, 2010, 27:962-978.
- 4 Mafuvadze B, Liang Y, Besch-Williford C, et al. Apigenin induces apoptosis and blocks growth of medroxyprogesterone acetate-dependent BT-474 xenograft tumors. *Horm Cancer*, 2012, 3:160-171.
- 5 Cao X, Liu B, Cao W, et al. Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25:212-222.
- 6 Munyendo WL, Zhang Z, Abbad S, et al. Micelles of TPGS modified apigenin phospholipid complex for oral administration: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9:2034-2047.
- 7 Kang OH, Lee JH, Kwon DY. Apigenin inhibits release of inflammatory mediators by blocking the NF-kappaB activation pathways in the HMC-1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33:473-479.
- 8 Wang J, Liao Y, Fan J, et al. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and *in vivo*. *Inflammation*, 2012, 35:1466-1476.
- 9 Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett*, 2013, 332:304-312.
- 10 Chen KK (陈况况), Zhang HH (章宏慧), Chen JC (陈健初). Research progress in mechanism of apigenin's anticarcinogenic activity on cancer cells. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 3:392-395.
- 11 Ju W, Wang X, Shi H, et al. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol Pharmacol*, 2007, 71:1381-1388.
- 12 Kohda T, Sakuma S, Abe M, et al. Monochloramine suppresses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2 by both apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Cell Biochem Funct*, 2013, 32:188-193.
- 13 Yi J (易静). Study on the mechanisms underlying that reactive oxygen species regulate post-translational modification of the proteins and affect the behaviors of cancer cells. *J Shanghai Jiaotong Univ, Med Sci* (上海交通大学学报, 医学版), 2012, 32:1122-1127.
- 14 Milisav I, Poljsak B, Suput D. Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:10771-10806.
- 15 Jiang CQ (姜从桥). How to think about the antitumor function of the spleen. *Chin Arch General Surgery, Electroniv Version* (中华普通外科学文献, 电子版), 2008, 6:444-445.
- 16 Yi J (易坚), Zou ZS (邹志森). The spleen and tumor immunity. *Prac J Cancer* (实用癌症杂志), 1999, 3:80-81.

(上接第 1186 页)

- 24 Shen GX (沈根祥), Yuan DW (袁大伟), Ling XF (凌霞芬), et al. Application of Hsp microorganism used for composting of cow dung. *Agro-Environ Protect* (农业环境保护), 1999, 18:62-64.
- 25 He LY (何琳燕), Cao GX (曹广祥), Sheng XF (盛下放), et al. Effects of decomposing microbial inoculums NMF on quick decomposition of cow dung. *Chin J Soil Sci* (土壤通报), 2006, 37:761-763.
- 26 Zhang WJ (张文君), Liu ZH (刘兆辉), Jiang LH (江丽华), et al. Effects of the organic-inorganic fertilizer on crop yield and quality. *Shandong Agric Sci* (山东农业科学), 2005, 3:57-58.
- 27 Li QK (李庆康), Wu L (吴雷). The status and outlook of treatment on excreta from intensive animal farming in china. *Agro-Environ Protect* (农业环境保护), 2000, 19:251-254.
- 28 Feng HW (冯海玮), Zhou P (周培), Mao L (毛亮), et al. Screening of microbes with high quality of cellulose-decomposing enzyme and optimization of the conditions for cellulose production. *J Shanghai Jiaotong Univ, Agric Sci* (上海交通大学学报, 农科版), 2013, 31:24-29.
- 29 Waldron CR, Becker-Vallone CA, Eveleigh DE. Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 24:477-486.