

香蜂草苷诱导人肝癌细胞株 HepG2 凋亡及其作用机制

朱勋帅¹, 林 兴¹, 黄权芳², 林 军^{1*}

¹广西医科大学药学院, 南宁 530021; ²广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023

摘要: 为了研究香蜂草苷对肝癌细胞株 HepG2 凋亡的影响, 并探讨其作用机制, 利用 MTT 法检测香蜂草苷对 HepG2 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 试剂盒检测 caspase-3 和 caspase-9 活性, Western blot 检测 Bcl-2、Bax、RKIP、ERK、p-ERK 蛋白表达。实验结果表明香蜂草苷可抑制 HepG2 细胞增殖并诱导其凋亡, 其机制可能与提高 caspase-3 和 caspase-9 活性, 上调 Bax 和下调 Bcl-2 表达有关。此外, 我们的研究显示香蜂草苷诱导 HepG2 细胞凋亡可能还与其增加 RKIP 表达, 抑制 ERK/MAPK 信号通路有关。

关键词: 香蜂草苷; HepG2 细胞; 凋亡; Raf 激酶抑制剂; ERK/MAPK 信号通路

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.008

Apoptosis-inducing Effect of Didymin on Human Hepatoma Cell Line HepG 2 and Its Action Mechanism

ZHU Xun-Shuai¹, LIN Xing¹, HUANG Quan-fang², LIN Jun^{1*}

¹Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²The First Affiliated Hospital

of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China

Abstract: To investigate the effect of didymin on apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its action mechanism. MTT assay was used to investigate the effect of didymin on proliferation of HepG2 cells. Flow cytometry assay was used to analyze apoptosis rate of HepG2 cells. The effects of didymin on caspase-3 and caspase-9 activities were detected using available kits. The protein expressions of Bcl-2, Bax, RKIP, ERK and p-ERK were detected by Western blot. The experimental result showed that didymin can inhibit HepG2 proliferation and induce cell apoptosis, by activating caspase-3 and -9, regulating Bax and Bcl-2 level. Moreover, our study indicated that didymin increased RKIP expression, resulting in the inactivation of ERK/MAPK signaling pathways.

Key words: didymin; HepG2 cells; apoptosis; RKIP; ERK/MAPK signaling pathway

肝癌无论是在我国还是世界范围内都是最常见且死亡率很高的恶性肿瘤之一。近年来, 在天然药物中寻找抗肿瘤药物逐渐受到人们的广泛关注。流行病学研究表明, 多摄入富含类黄酮的水果和蔬菜可以降低癌症的发生率^[1-3]。香蜂草苷主要存在于柑橘类果实及牛至等草药中的一种黄酮类化合物, 已有研究认为, 香蜂草苷能够通过 Fas/Fas 配体凋亡系统诱导 A549 和 NCI-H460 细胞凋亡, 并且通过裸鼠实验证实, 香蜂草苷可以作为一种新型肿瘤化疗剂延缓非小细胞肺癌的生长^[4]。还有研究发现香蜂草苷通过抑制 N-Myc 和上调 RKIP 表达来抑制成神经细胞瘤的增殖并诱导其凋亡^[5], 这些研究生

都显示了香蜂草苷在抗肿瘤方面的潜在治疗作用。为了进一步了解香蜂草苷的抗肿瘤作用, 我们研究了香蜂草苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响, 并讨论其诱导 HepG2 细胞凋亡的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

香蜂草苷: 上海抚生实业有限公司, 纯度 > 98%, 白色粉末, DMSO 溶解分装 -20 °C 冻存。

二甲基亚砜(DMSO), 四甲基偶氮唑蓝(MTT), 碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司; locostatin(RKIP 特异性抑制剂)购自德国 Merck 公司; 胎牛血清购自美国 Life Sciences 公司; RPMI 1640 培养液购自美国 Hyclone 公司; caspase-3 和 caspase-9 活性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究; RKIP、ERK、p-ERK、Bcl-2、Bax、GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz

收稿日期: 2016-01-19 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(81260505; 81473431); 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118154)

* 通讯作者 Tel: 86-771-5358272; E-mail: junlin989@sina.com

公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 仪器

CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司), 离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司), 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司), 倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 流式细胞仪(BD FACSCalibur)等。

1.3 细胞及培养

人肝癌细胞 HepG2 购自上海细胞库, 用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基培养, 并加入 100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中全湿培养, 每 2~3 d 换液 1 次。

2 实验方法

2.1 MTT 法检测药物对细胞毒性

将处于对数生长期肝癌细胞 HepG2 制成细胞悬液, 再以 3×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 细胞贴壁 24 h 后吸去旧的培养液, 换入含不同香蜂草苷浓度的新鲜培养液, 每个药物浓度重复 8 孔, 培养 24、48、72 h, 吸去培养液, 加入新鲜配制的 MTT 液 20 μL 后继续培养 4 h, 吸弃培养液, 每空加 DMSO 150 μL, 于摇床上振荡 10 min 使甲瓖充分溶解, 酶标仪于 490 nm 处读取吸光度值(A)。试验重复 3 次, 计算细胞抑制率和 IC₅₀, 细胞抑制率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%。

2.2 药物处理及分组

香蜂草苷和 locostatin 以 DMSO 溶解, 分装, -20 °C 冻存, 使用时以含有 10% FBS 的细胞培养液稀释成所需浓度。根据 MTT 实验结果, 细胞分为四个实验组, 分别是正常组、香蜂草苷组、locostatin 组、香蜂草苷 + locostatin 组; 正常组细胞用细胞培养液培养, 香蜂草苷组和 locostatin 组分别用加入 15 μmol/L 香蜂草苷和 25 μmol/locostatin 的细胞培养液培养, 香蜂草苷 + locostatin 组用加入 15 μmol/L 香蜂草苷和 25 μmol/locostatin 的培养液培养。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

收集对数生长期的 HepG2 细胞并制成单细胞悬浮液, 以 10×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 细胞贴壁 24 h 后, 按照实验分组分别加入含有药物的新鲜培养液培养 24 h, 收集各组细胞, 用预冷的 PBS 洗两次再重悬于缓冲溶液中, 按照染色试剂盒说明书分别加入 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光对细胞进行染色 20 min。加入 400 μL 缓冲液, 利用流式细胞仪

检测细胞凋亡率。

2.4 caspase-3 和 caspase-9 的活性检测

应用试剂盒检测 caspase-3 和 caspase-9 活性。各实验组经药物处理 24 h, 收集各实验组细胞, 按照试剂盒说明完成操作, 用酶标仪测定 405 nm 波长处的光吸收 A 值。

2.5 Western blot 检测相关蛋白的表达

分别收集各实验组不同药物处理 24 h 的 HepG2 细胞, 用预冷的 PBS 洗两次, 再加入预冷的 Western 细胞裂解液裂解, 后离心收集上清液, 应用 BCA 试剂盒测定样品蛋白浓度。定量后取各样品蛋白 50 μL 加入上样缓冲液, 经 95 °C 变性 10 min, 将各组蛋白样品经 SD-SPAGE 凝胶电泳后, 转膜、封闭, 分别加入 RKIP、ERK、p-ERK、Bcl-2、Bax、GAPDH 一抗在 4 °C 下孵育 12 h 后, 氨丁三醇盐酸吐温缓冲盐溶液(TBST)洗 3 次, 每次 10 min, 再加入经过稀释的荧光二抗, 避光孵育 2 h 后, 用 TBST 液避光洗 3 次, 每次 10 min, 于荧光扫描仪中扫描。

2.6 统计学处理

实验数据采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 对数据进行单因素方差分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 香蜂草苷对 HepG2 细胞增殖的影响

不同浓度的香蜂草苷经过不同时间作用于 HepG2 细胞, 用 MTT 法检测药物对细胞增殖的影响。香蜂草苷对 HepG2 细胞的抑制作用如图 1 所示, 药物对细胞增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖关系, HepG2 细胞经药物处理 24、48、72 h 的药物半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 42.4 ± 4.3 、 31.2 ± 3.7 、 20.65 ± 3.3 μmol/L。

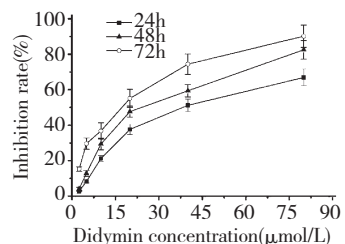


图 1 香蜂草苷对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effect of didymine on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 香蜂草苷对 HepG2 细胞凋亡的影响

各给药组的细胞凋亡率用流式细胞仪检测, 结

果显示,与正常组细胞对比,香蜂草苷显著诱导细胞凋亡,但香蜂草苷诱导 HepG2 细胞凋亡的作用被

locostatin 减弱,图 2 和表 1 所示。

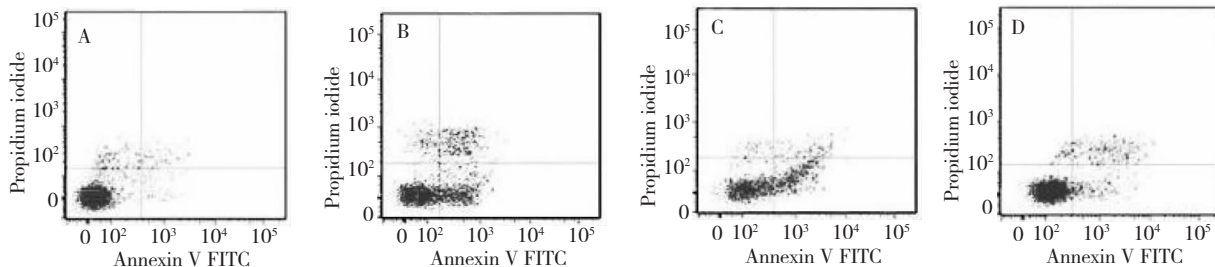


图 2 流式细胞仪检测香蜂草苷诱导对 HepG2 细胞凋亡的作用

Fig. 2 Effects of didymin on cell apoptosis of HepG2 cells detected by flow cytometry

A: 正常组, B: 香蜂草苷组, C: locostatin 组, D: locostatin + 香蜂草苷组

A: Normal control group, B: Didymin group, C: Locostatin group, D: Locostatin + Didymin group

表 1 香蜂草苷对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of didymin on cell apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	凋亡率 Apoptosis rate (%)
正常组 Normal control group	3.5 ± 0.6
香蜂草苷组 Didymin group	34.9 ± 4.3 ¹⁾²⁾
Locostatin 组 Locostatin group	26.2 ± 3.6 ¹⁾²⁾
Locostatin + 香蜂草苷组 Locostatin + Didymin group	11.6 ± 2.3

注:与正常组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与香蜂草苷 + locostatin 组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with didymin + locostatin group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.3 香蜂草苷对 HepG2 细胞 caspase-3 和 caspase-9 活性的影响

活性增高,但 RKIP 特异性抑制剂 locostatin 减弱了香蜂草苷的作用。

如表 2 所示,香蜂草苷使 caspase-3 和 caspase-9

表 2 香蜂草苷对 caspase-3 和 caspase-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of didymin on caspase-3 and caspase-9 activities of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	Caspase-3	Caspase-9
正常组 Normal control group	1.06 ± 0.04	0.97 ± 0.06
香蜂草苷组 Didymin group	1.88 ± 0.09 ¹⁾²⁾	1.79 ± 0.08 ¹⁾²⁾
Locostatin 组 Locostatin group	1.11 ± 0.08	1.07 ± 0.09
Locostatin + 香蜂草苷组 Locostatin + Didymin group	1.29 ± 0.08	1.18 ± 0.06

注:与正常组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与香蜂草苷 + locostatin 组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with didymin + locostatin group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.4 香蜂草苷对 HepG2 细胞相关蛋白表达的影响

RKIP 作为 ERK/MAPK 通路的抑制剂,通过与 Raf-1 和 MEK 结合来抑制 Raf-1/MEK 的作用,从而抑制 MEK 的活性及其下游靶点。在研究香蜂草苷对 HepG2 细胞的作用机制中,我们检测了 RKIP、ERK 及 p-ERK 的表达。我们的实验发现,香蜂草苷能显著增加 RKIP 的表达,同时明显抑制 ERK 的磷酸化水平;有意思的是,香蜂草苷的作用被 locostatin

HepG2 细胞经药物处理 24 h 后,各组细胞的凋亡相关蛋白表达如图 3 和表 3 所示,与对照组比较,香蜂草苷能明显降低 Bcl-2 的表达,增加 Bax 的表达。香蜂草苷与 RKIP 特异性抑制剂共同作用于细胞,香蜂草苷对细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响变弱。

极大削弱(图3,表3)。

表3 香蜂草苷对 HepG2 细胞相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of didymin on relative proteins expression of HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	RKIP/GAPDH	p-ERK/ERK
正常组 Normal control group	0.66 ± 0.07	0.25 ± 0.04	0.18733 ± 0.05	0.63 ± 0.07
香蜂草苷组 Didymin group	0.32 ± 0.04 ¹⁾²⁾	0.66 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.45775 ± 0.06 ¹⁾²⁾	0.35 ± 0.05 ¹⁾²⁾
Locostatin 组 Locostatin group	0.62 ± 0.08	0.42 ± 0.05	0.13027 ± 0.04	0.71 ± 0.08
Locostatin + 香蜂草苷组 Locostatin + Didymin group	0.69 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.23405 ± 0.05	0.65 ± 0.05

注:与正常组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与香蜂草苷 + locostatin 组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with didymin + locostatin group, ²⁾ $P < 0.05$.

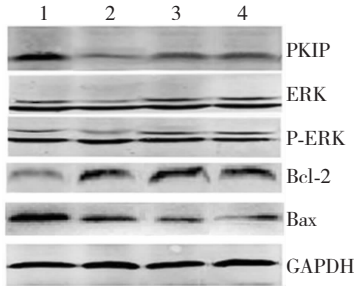


图3 Western blot 检测相关蛋白的表达

Fig. 3 The expression of relative proteins detected by western blot

1: 香蜂草苷组, 2: locostatin 组, 3: locostatin + 香蜂草苷组, 4: 正常组
1: didymin group, 2: locostatin group, 3: locostatin + didymin group, 4: normal control group

4 讨论与结论

细胞凋亡在细胞增殖、分化、衰老和死亡中发挥极其重要的作用,在抗肿瘤药物研究中,诱导细胞凋亡已经成为一个重要的研究领域^[6],已有研究证实,细胞凋亡与肿瘤发生、发展密切相关^[7]。在本次实验研究中,香蜂草苷对人肝癌细胞 HepG2 有明显的细胞毒性,利用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测香蜂草苷对 HepG2 细胞凋亡的影响,结果显示,香蜂草苷能显著诱导 HepG2 凋亡。提示,香蜂草苷有可能通过诱导 HepG2 细胞凋亡发挥潜在的抗肿瘤作用。

有研究证实 Bcl-2 的高度表达能够抑制细胞凋亡,而增加 Bax 的表达则可以诱导细胞的凋亡,主要通过抑制 Bcl-2 的活性来实现的^[8]。还有报道认为 Bcl-2 和 Bax 两蛋白之间的比例关系在细胞凋亡过程中发挥极其重要的作用^[9],本实验结果表明,香蜂草苷可以通过调节 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达,即通过上调 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达来调控

HepG2 细胞凋亡。

在细胞凋亡调控过程中,Caspase 家族起到关键作用,其中 Caspase-9 主要参与诱导线粒体损伤介导细胞凋亡的途径^[10],活化的 Caspase-9 激活 Caspase-3, Caspase-3 作为凋亡的“执行者”通过酶切下游底物,从而引起细胞凋亡^[11]。在研究香蜂草苷诱导 HepG2 细胞凋亡中,我们检测到香蜂草苷使 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性显著升高,这表明 Caspase 介导的线粒体途径可能参与香蜂草苷诱导的细胞凋亡。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)在细胞信号传导过程中发挥了极其重要的作用,主要参与了细胞生长、发育、分裂和凋亡等多种生理过程,MAPK 家族中主要包括细胞外信号调节激酶(ERK), C-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 P38 激酶。ERK 作为 MAPK 家族的一员,与细胞的增殖和凋亡相关,在多种癌症中均存在 ERK 的过度激活^[12]。在我们的研究中,香蜂草苷抑制 ERK 及 p-ERK 的表达,这表明,香蜂草苷诱导 HepG2 细胞凋亡可能还与 MAPK 信号通路相关。Raf 激酶抑制剂蛋白(RKIP)是一个特定的 MAPK 信号通道抑制剂^[13,14],有研究认为, RKIP 通过与 Raf-1 和 MEK 结合来干扰 Raf-1/MEK 的作用,从而抑制 MEK 的活性及其下游靶点^[15]。在研究香蜂草苷诱导 HepG2 细胞凋亡机制中,我们发现香蜂草苷能够显著增加 RKIP 的表达,为了确定香蜂草苷在 HepG2 细胞中对 RKIP 的作用,实验中加入 RKIP 特异性抑制剂 locostatin,我们发现 locostatin 能够削弱香蜂草苷对 HepG2 细胞的作用,它能减弱香蜂草苷对 HepG2 细胞凋亡的影响,此外,locostatin 还减弱了香蜂草苷对 MAPK 信号通路的作用。以上实验结果表明,上调 RKIP 可能是香蜂草苷抗癌的潜在作用

机制,与 ERK/MAPK 信号通路密切相关。

综上所述,香蜂草苷对人肝癌 HepG2 细胞有明显的细胞毒性,能够显著抑制 HepG2 细胞活力,主要通过调节 Bcl-2 家族蛋白表达和 caspase-3 和 caspase9 的活性来诱导体外 HepG2 细胞凋亡。此外,香蜂草苷还能够增强 RKIP 的表达,导致 MAPK 信号通路失活,引发 HepG2 细胞的凋亡。我们的实验结果表明,香蜂草苷具有体外抗肝癌细胞的作用,为开发香蜂草苷的抗肝癌作用提供理论依据。

参考文献

- 1 Arts IC. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. *J Nutr*, 2008, 138: 1561S-1566S.
- 2 Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J*, 2004, 3 (1): 1.
- 3 Yang CS, Landau JM, Huang MT, et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Rev Nutr*, 2001, 21: 381-406.
- 4 Hung JY, Hsu YL, Ko YC, et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Lung Cancer*, 2010, 68: 366-374.
- 5 Singhal J, Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, et al. Didymin induces apoptosis by inhibiting N-Myc and upregulating RKIP in neuroblastoma. *Cancer Prevent Res*, 2012, 5: 473-483.
- 6 Krysko DV, Berghe TV, D' Herde K, et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 2008, 44: 205-221.
- 7 Shukla S, Rizvi F, Raisuddin S, et al. FoxO proteins' nuclear retention and BH3-only protein Bim induction evoke mito-

chondrial dysfunction-mediated apoptosis in berberine-treated HepG2 cells. *Free Radical Biol Med*, 2014, 76: 185-199.

- 8 Wang HY (王海燕), Cai B (蔡兵), Cui CB (崔承彬), et al. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia* L., induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40(1): 27-31.
- 9 Sukhotnik I, Voskoboynik K, Lurie M, et al. Involvement of the bax and bcl-2 system in the induction of germ cell apoptosis is correlated with the time of reperfusion after testicular ischemia in a rat model. *Fertility Sterility*, 2009, 92: 1466-1469.
- 10 Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 231-237.
- 11 Oudejans JJ, Muris JJ, Meijer CJ. Inhibition of caspase 9 and not caspase 8 mediated apoptosis may determine clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Cell Cycle*, 2005, 4: 526-528.
- 12 Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 3329-3334.
- 13 Keller ET, Fu Z, Brennan M. The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68: 1049-1053.
- 14 Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, 1999, 401: 173-177.
- 15 Yeung K, Janosch P, McFerran B, et al. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Molecular Cellular Biol*, 2000, 20: 3079-3085.

(上接第 604 页)

- 10 Badamali SK, Luque R, Clark JH, et al. Unprecedented oxidative properties of mesoporous silica materials: towards microwave-assisted oxidation of lignin model compounds. *Catal Commun*, 2013, 31: 1-4.
- 11 Kim YS, Chang HM, Kadla JF. Polyoxometalate (POM) oxidation of lignin model compounds. *Holzforchung*, 2008, 62: 38-49.
- 12 Deng HB, Lin L, Liu SJ. Catalysis of Cu-doped Co-based per-

ovskite-type oxide in wet oxidation of lignin to produce aromatic aldehydes. *Energ Fuel*, 2010, 24: 4797-4802.

- 13 Dominguez-Ramos A, Aldaco R, Irabien A. Electrochemical oxidation of lignosulfonate: Total organic carbon oxidation kinetics. *Ind Eng Chem Res*, 2008, 47: 9848-9853.
- 14 Lanzalunga O, Biatti M. Photo- and radiation chemical induced degradation of lignin model compounds. *J Photochem Photobiol B*, 2000, 56: 85-108.