

## 木犀草素增强顺铂诱导的人肺癌细胞 A549 凋亡作用

李小林<sup>1</sup>, 徐玉英<sup>1</sup>, 孙向珏<sup>1</sup>, 郑一凡<sup>1</sup>, 沈汉明<sup>2</sup>, 朱心强<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学营养与食品安全研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 新加坡国立大学社区、职业与家庭医学系, 新加坡 117597)

**摘要:**目的 观察木犀草素与顺铂联合应用诱导体外培养的人肺癌细胞 A549 凋亡作用及对细胞周期的影响。方法 将木犀草素与顺铂单独及联合作用于 A549 细胞, AO/EB 荧光染料染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期, Western blotting 检测 p53 蛋白表达情况。结果 木犀草素 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 和顺铂 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 联用组诱导的 A549 细胞凋亡率和 S 期阻滞作用均显著强于木犀草素组或顺铂组, Western blotting 发现, 木犀草素和顺铂联用组 p53 蛋白水平也明显高于单独木犀草素组或顺铂组。结论 木犀草素能显著增强顺铂诱导的人肺癌细胞 A549 细胞凋亡和细胞周期阻滞, p53 蛋白可能参与调节木犀草素和顺铂联合诱导的肿瘤细胞凋亡。

**关键词:**木犀草素; 顺铂; 增敏; 凋亡; 细胞周期; p53

**中图分类号:**R286.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)03-0431-03

顺铂及其衍生物是目前最常用的抗肿瘤药物之一, 具有广泛的抗癌谱, 对肺癌、食道癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、宫颈癌等多种实体肿瘤有较好的疗效<sup>[1]</sup>。但是, 铂类药物往往具有较大的肾毒性、神经毒性、胃肠道毒性及耳毒性等, 一定程度上限制了其用药剂量和抗肿瘤效果<sup>[2]</sup>。因此, 寻找无毒或低毒的天然化学物作为增敏剂, 提高铂类抗肿瘤药物的疗效, 以减少其用量和不良反应, 是临床肿瘤治疗的策略之一。

体内及体外实验、流行病学调查研究均表明, 植物黄酮对于肿瘤的预防和治疗具有重要作用。木犀草素 (luteolin) 是一种广泛分布于植物界的黄酮类化合物, 国内外研究发现木犀草素具有防癌、抗癌的作用, 其作用机制包括抑制肿瘤细胞增殖, 阻滞细胞周期, 促进细胞凋亡, 抑制血管生成, 抑制 DNA 拓扑异构酶, 抗氧化、抗突变作用, 诱导 相代谢酶等<sup>[3]</sup>, 具有潜在的临床应用价值。前期研究发现, 木犀草素处理人结肠直肠癌 COLO205、HCT116 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞后, 显著增强了肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 诱导的细胞凋亡<sup>[4]</sup>。木犀草素还可通过抑制蛋白激酶 C 的活性和降解凋亡蛋白的 X 链接的抑制剂 (XIAP), 促进 caspase-8 的活性和 caspase-3 成熟, 对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 诱导的凋亡起增敏作用<sup>[5]</sup>。还发现木犀草素的增敏作用是 p53 依赖的, 可能机制是木犀草素通过活化 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), 通过磷酸化稳定 p53 蛋白, 减少其泛素化和蛋白降解, 提

高细胞内 p53 蛋白水平<sup>[6]</sup>。本研究观察木犀草素与顺铂联合应用, 对人肺癌细胞 A549 凋亡的作用, 以了解木犀草素是否能增强顺铂的抗肿瘤作用, 为寻找潜在的化疗增敏剂提供实验依据。

### 1 材料

木犀草素、顺铂均为 Sigma 公司产品。人肺癌细胞 A549 由浙江大学免疫学研究所提供。吖啶橙 (AO) 购自 Fluka 公司。溴化乙锭 (EB) 购自 Sigma 公司。Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒和细胞周期测定试剂盒为 Beckman Coulter 公司产品。p53 和  $\beta$ -actin 抗体购自 Cell signaling 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Amersham Life Sciences 公司, NC 膜购于 Millipore 公司, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 为中杉金桥公司产品, 其他 Western blotting 相关试剂分别购自 Amresco 公司和 Sigma 公司。

### 2 方法

2.1 细胞培养: 人肺癌细胞 A549 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度孵箱中培养。

2.2 AO/EB 荧光染料染色检测细胞凋亡: 根据前期实验结果<sup>[6]</sup>, 选择单独作用只能引起少量 A549 细胞凋亡的木犀草素 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 和顺铂 (10  $\mu\text{g/mL}$ )。木犀草素、顺铂和两者联用 (其中木犀草素提前 2 h 给药) 作用于 A549 细胞 24 h 后, 消化细胞制成单细胞悬液, 滴片, AO/EB 染色, 荧光显微

\* 收稿日期: 2008-07-17

作者简介: 李小林 (1980—), 男, 安徽怀宁县人, 硕士研究生, 现工作单位为上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心。

Tel/Fax: (021) 68544059 E-mail: lixl@shciq.gov.cn

\* 通讯作者 朱心强 Tel/Fax: (0571) 88208143 E-mail: zhuxq@zju.edu.cn

镜下观察并计数 200 个细胞,计数凋亡细胞,并计算细胞凋亡率,同时设对照组,每组设 3 个复孔。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期:木犀草素 40 μmol/L、顺铂 10 μg/mL 以及二者联用(木犀草素提前 2 h 给药)分别作用于 A549 细胞 24 h。制备单细胞悬液,1 000 r/min,4 离心 5 min,弃上清液。预冷的 PBS 清洗,离心并重悬,加入 Annexin V-FITC 和 PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,加入 300 μL 结合缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡。取细胞悬液,经离心后,弃上清液,无水乙醇-20 固定细胞 24 h,预冷的 PBS 清洗并重悬,离心洗涤,去上清液,加 RNA 酶,37 水浴 30 min,PI 染色,用流式细胞仪检测细胞周期。

2.4 Western blotting 检测 p53 蛋白表达:木犀草素 40 μmol/L、顺铂 10 μg/mL 以及二者联用(木犀草素提前 2 h 给药)分别作用于 A549 细胞 24 h 后,收集细胞,PBS 洗两次,加入蛋白裂解液,混旋 20 min,15 000 r/min 离心 30 min,取上清,用蛋白定量试剂盒测定蛋白质样品浓度,分装,-70 储存,SDS-PAGE 电泳,卸胶,转膜,封闭,加一抗,4 孵育过夜,PBST 洗膜,加二抗,室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 30 min,显影,定影,胶片拍照,Quantity One 软件分析。

2.5 统计学处理:各试验均重复 3 次,数据用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

### 3 结果

3.1 木犀草素与顺铂诱导人肺癌细胞 A549 凋亡的作用:AO/EB 荧光染料染色实验发现,对照组、木犀草素(40 μmol/L)和顺铂(10 μg/mL)处理组仅能引起少量细胞凋亡,木犀草素和顺铂单用组凋亡率分别为(16.87 ± 0.21)%和(14.61 ± 3.77)%,而二者联用组的凋亡率为(53.54 ± 1.45)%,与木犀草素或顺铂单独作用组比较差异均有显著性(P < 0.05),见图 1。

3.2 流式细胞仪检测细胞凋亡:木犀草素和顺铂处理 A549 细胞 24 h 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果见图 2。木犀草素(40 μmol/L)单独作用组的细胞凋亡率为(7.47 ± 0.52)%,顺铂(10 μg/mL)单独作用组的细胞凋亡率为(4.89 ± 0.68)%,而二者联用组可以引起(14.05 ± 0.98)%的细胞凋亡,二者联用组与木犀草素或顺铂单独作用组比较差异均有显著性(P < 0.05)。其趋势与荧光染色法的结果相同,说明木犀草素能增强顺铂诱导的 A549 细胞凋亡作用。

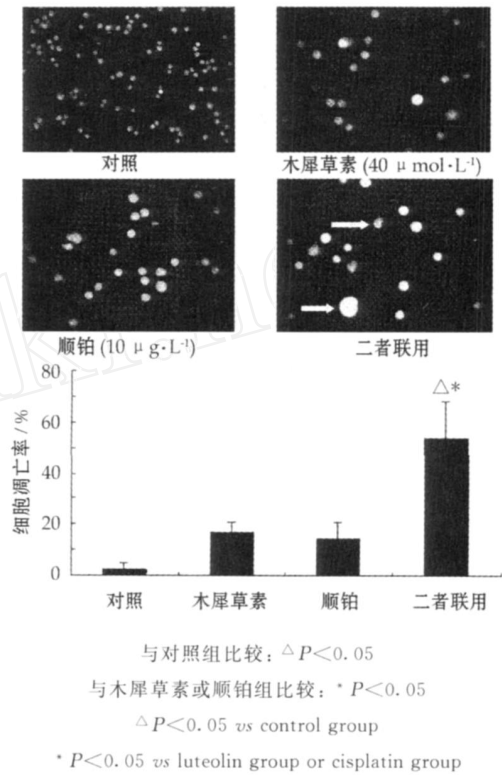


图 1 木犀草素和顺铂对 A549 细胞凋亡的影响 (AO/EB 染色) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 1 Effect of luteolin and cisplatin on apoptosis of A549 cells (AO/EB Staining) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

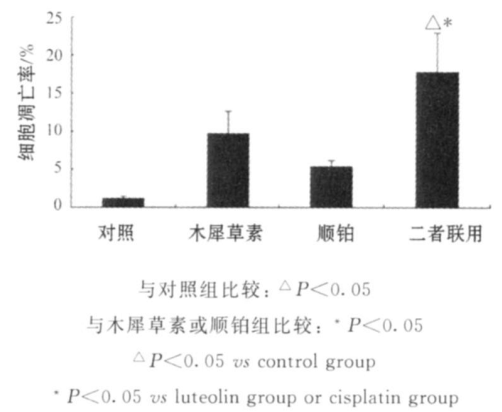
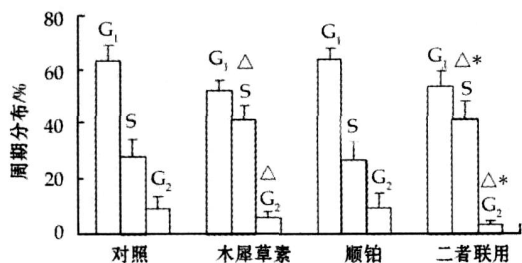


图 2 木犀草素与顺铂处理 A549 细胞 24 h 后细胞凋亡的影响 (流式细胞仪) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effect of luteolin and cisplatin on apoptosis of A549 cells after treated for 24 h (FCM) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.3 木犀草素和顺铂对 A549 细胞周期的影响:木犀草素 40 μmol/L、顺铂 10 μg/mL 以及两者联合处理 A549 细胞 24 h 后,用流式细胞仪检测对细胞周期的影响。结果发现,联用组能够明显诱导细胞周期阻滞(图 3),木犀草素和二者联用组能够引起 S 期的细胞明显增多,G<sub>2</sub> 期细胞明显减少,联用组与顺铂单独作用组比较均有显著差异。木犀草素和顺铂联用主要在 S 期引起 A549 细胞周期阻滞。

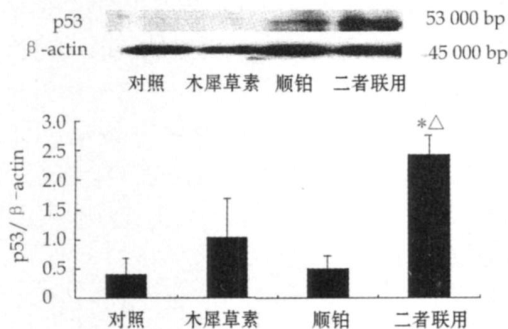


与对照组比较:  $P < 0.05$   
 与木犀草素或顺铂组比较: \*  $P < 0.05$   
 $P < 0.05$  vs control group  
 \*  $P < 0.05$  vs luteolin group or cisplatin group

图 3 流式细胞仪检测木犀草素与顺铂处理 A549 细胞引起细胞周期的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 3 Effects of luteolin and cisplatin on cell cycle distribution of A549 cells as determined by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

3.4 Western blotting 检测 p53 蛋白表达情况:木犀草素和顺铂联用引起 p53 蛋白水平明显增加(图 4)。实验所得图像通过 Quantity One 软件分析,数据通过 SPSS 13.0 统计分析,联用组 p53 表达与木犀草素或顺铂单独作用组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。



与对照组比较:  $P < 0.05$   
 与木犀草素或顺铂组比较: \*  $P < 0.05$   
 $P < 0.05$  vs control group  
 \*  $P < 0.05$  vs luteolin group or cisplatin group

图 4 木犀草素与顺铂处理对 A549 细胞 p53 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 4 Effects of luteolin and cisplatin on p53 protein expression in A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

#### 4 讨论

诱导肿瘤细胞凋亡是包括顺铂在内的许多化疗药物发挥杀伤作用的重要机制之一,也是治疗肿瘤

的重要靶点和新途径。通常许多肿瘤能够引起前凋亡蛋白如肿瘤抑制因子 p53 突变失活,上调 BCL-2 和 IAP 家族等抗凋亡蛋白表达,引起癌细胞的特异突变从而逃脱凋亡,对诱导凋亡的化疗药物产生耐药性。化疗药物与肿瘤细胞凋亡基因突变相关的药物联用,对肿瘤细胞进行选择性地诱导凋亡的靶疗法可能是很有潜力的抗癌策略。

木犀草素为天然植物类黄酮,其来源广泛,价格低廉,对人体毒性较小。本实验结果显示,木犀草素能够促进顺铂诱导的体外培养人肺癌细胞 A549 凋亡和细胞周期阻滞,木犀草素还可以显著提高 A549 细胞内 p53 蛋白水平,提示 p53 蛋白在木犀草素和顺铂联合诱导肿瘤细胞凋亡过程中可能起重要作用。与已发现的木犀草素与顺铂联合对人肝癌细胞 Hep G2、结肠癌细胞 HCT 116 以及人鼻咽癌细胞 CNE1 的作用相似<sup>[6]</sup>。最近研究表明,木犀草素对人胃癌细胞 AGS 也有类似的化学增敏作用<sup>[7]</sup>。说明木犀草素及其衍生物可能是很有潜力的化疗增敏剂。应该进一步用不同肿瘤细胞、不同化疗药物进行体外、体内相结合的联合抗肿瘤作用研究,发现其抗肿瘤谱、最佳剂量组合和治疗方案,并深入探讨其作用机制,为开发有临床应用价值的天然低毒的化疗和放疗增敏剂提供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11 (3): 559-595.
- [2] Markman M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2003, 2 (6): 597-607.
- [3] 张芳芳,沈汉明,朱心强. 木犀草素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *浙江大学学报:医学版*, 2006, 35 (5): 573-578.
- [4] Shi R X, Ong C N, Shen H M. Luteolin sensitizes tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in human tumor cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7712-7721.
- [5] Shi R X, Ong C N, Shen H M. Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 7815-7823.
- [6] Shi R X, Huang Q, Zhu X Q, et al. Luteolin sensitizes the anti-cancer effect of cisplatin via JNK-mediated p53 phosphorylation and stabilization [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6 (4): 1338-1347.
- [7] Wu B, Zhang Q, Shen W, et al. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 313 (1-2): 125-132.