

- induces caspase dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemia cells [J]. *Blood*, 2006, 108(2): 630-637.
- [8] Liang M, Fu J. Triptolide inhibits interferon gamma induces programmed death ligand 1 surface expression in breast cancer cell [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270(2): 337-341.
- [9] Le Saqé C, Naqel R, Eqan D A, et al. Regulation of the P27 (Kip) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation [J]. *EMBO J*, 2007, 12: 1-5.
- [10] Liu Y, Xi L, Liao G, et al. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through down regulation cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2 [J]. *BMC Cancer*, 2007, 29(7): 22-26.
- [11] Lee W K, Kim H J, Lee Y S, et al. Acteoside inhibits human promyelocytic HL-60 leukemia cell proliferation via cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and differentiation into monocyte [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1928-1936.
- [12] Vuocolo S, Soprano D R, Soprano K J, et al. P21/kip mediates retinoic acid induced suppression of ovarian carcinoma cell growth [J]. *Cell Physiol*, 2004, 199: 237-243.
- [13] Onumah, George E J, Zhao Y F, et al. Overexpression of catalase delays G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> to S phase transition during cell cycle progression in mouse aortic endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46: 1658-1667.
- [14] Srirupa R, Malikarjuna G, Kumaraguruparan R, et al. p21/Cip1 and p27/Kip1 are essential molecular targets of inositol hexaphosphate for its antitumor efficacy against prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 1166-1173.
- [15] Kim D H. Prognostic implications of cyclin B1, p34cdc2, p27 (kip1) and p53 expression in gastric cancer [J]. *Yonsei Med J*, 2007, 48: 694-700.

## 藤黄酸诱导胃癌细胞凋亡及抗肿瘤转移的实验研究

黄恺飞\*

(厦门市医药研究所 药物研发中心, 福建 厦门 361003)

**摘要:**目的 研究藤黄酸对人胃癌 BGC-803 细胞增殖和转移相关能力的影响及其机制。方法 MTT、Hoechst 染色法检测藤黄酸对 BGC-803 细胞的增殖和凋亡的影响; 侵袭小室模型等方法检测藤黄酸对 BGC-803 细胞侵袭、黏附、迁移的影响; 运用 RT-PCR、Western blotting 法分析藤黄酸对胃癌细胞凋亡和转移相关基因 bcl-2、bax、细胞黏附分子-1 (ICAM-1) mRNA 和蛋白表达的影响。结果 藤黄酸抑制 BGC-803 细胞的生长, 其抑制率与药物浓度及作用时间呈依赖关系。低浓度的藤黄酸处理 BGC-803 细胞后, 可明显降低胃癌细胞的黏附、迁移和侵袭能力。随着藤黄酸浓度的增大, bcl-2、ICAM-1 mRNA 和蛋白表达均下调, bax mRNA 和蛋白表达上调。结论 藤黄酸对胃癌细胞 BGC-803 有明显的生长抑制作用, 具有显著的促肿瘤细胞凋亡作用和抑制肿瘤细胞转移相关性, 其机制可能与下调 bcl-2、ICAM-1 及上调 bax 的表达有关。

**关键词:** 藤黄酸; 肿瘤; 侵袭; 细胞凋亡; 转移

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1823-06

## Experimental study on gambogic acid induced gastric cancer cell apoptosis and anti tumor metastasis

HUANG Kai fei

(Drug R & D Center, Xiamen Medicine Research Institute, Xiamen 361003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the inhibition of gambogic acid on proliferation and metastasis ability of BGC-803 cells and to study their preliminary mechanism further. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and Hoechst staining were used to study the effects of gambogic acid induced apoptosis in gastric cancer cell line BGC-803; Invasive methods were used to study the effects of invasion, adhesion, migration by gambogic acid; The influence of gambogic acid on the expression of bcl-2, bax, and ICAM-1 gene in gastric cancer cells was evaluated by RT-PCR and Western blotting. **Results** Gambogic acid was found not only to inhibit the growth of BGC-803 cells but also to induce the cell apoptosis in a dose and time dependent manner. The ability of adhesion, migration, and invasiveness was clearly inhibited by gambogic acid. With the increase of gambogic acid concentration, the expression of bcl-2, ICAM-1 gene, and protein were down regulated and the expression of bax gene and protein were up regulated. **Conclusion** Gambogic acid could inhibit the growth of gastric cancer cells BGC-803 significantly, have a significant role

①收稿日期: 2010-02-05

作者简介: 黄恺飞(1982-), 男, 安徽桐城人, 研究实习员, 硕士研究生, 现工作于厦门市医药研究所, 主要从事药物研发等相关工作。Tel: (0592) 2050262 E-mail: hkf5306@163.com

in promoting tumor cell apoptosis, and inhibit tumor cell metastasis-associated properties. The mechanism may be related to decrease of bcl-2, ICAM-1 expression and increase bax expression.

**Key words:** gambogic acid; tumor; invasion; apoptosis; metastasis

藤黄酸 (gambogic acid) 是藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook. f. 的主要活性成分。近年研究表明, 藤黄酸对肝癌、胃癌等肿瘤细胞株均有明显的抑制作用<sup>[1-2]</sup>, 具有广泛的抗肿瘤作用<sup>[3-4]</sup>。目前研究认为其抗肿瘤作用可通过阻滞细胞周期由 G<sub>2</sub> 期向 M 期过渡<sup>[5]</sup>、抑制 NF-κB 信号通路<sup>[6]</sup>、抑制 TOPO IIα 的催化活性<sup>[7]</sup> 等途径来实现, 但是其确切机制尚未清楚。

肿瘤转移是恶性肿瘤生物学特征之一, 也是肿瘤临床治疗的难题<sup>[8]</sup>。目前对其研究较多的是有关其分子机制方面, 肿瘤转移是一个多阶段复杂的过程, 其中包括肿瘤细胞的脱落、迁移、黏附、生长等, 每一阶段都受不同因素的影响和调控<sup>[9]</sup>。胃癌细胞的淋巴转移也成为胃癌治疗的一大障碍, 对胃癌转移及其机制研究也逐渐成为热点<sup>[10]</sup>。

目前关于藤黄酸抑制肿瘤细胞侵袭和转移的研究报道很少, 因此本实验选用人胃癌细胞株 BGC-803 为研究对象, 考察藤黄酸诱导肿瘤细胞凋亡及其黏附、迁移和侵袭的影响, 并从分子水平上初步探讨其作用机制。

## 1 材料

1.1 药品与试剂: 藤黄酸 (质量分数 > 99%) 由中国药科大学郭青龙教授惠赠。兔抗人 bcl-2、bax、细胞黏附分子 1 (ICAM-1) 抗体、HRP-羊抗兔 IgG 抗体 (武汉博士德公司); Hoechst 33258 染料 (Sigma 公司); RPMI 1640 培养基干粉、小牛血清 (美国 Gibco 公司); 化学发光试剂盒和蛋白定量试剂盒。IV 型胶原蛋白 (美国 Sigma 公司), Thincert 侵袭小室 (Greiner 公司)。

1.2 仪器: 梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司); 凝胶成像仪及分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); 水平、垂直电泳槽 (南京大学仪器厂)。

1.3 细胞株: 胃癌细胞 BGC-803 由中国药科大学海洋药物中心提供。

## 2 方法

2.1 增殖抑制实验: 将 RPMI 1640 培养基培养的胃癌细胞 BGC-803 细胞每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 用不同浓度 (0、0.375、0.75、1.5、3、6 μmol/L) 藤黄酸分别处理 24、48、72 h 后, 结束前 4

h 每孔加入新鲜配制的 0.25 mg/mL MTT 液 100 μL, 继续培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL, 待完全溶解后, 酶标仪测定 570 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 重复 3 次。细胞抑制率 =  $(1 - A_{\text{加药}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ , 以 3 个复孔的平均值, 计算藤黄酸作用 48 h 的 IC<sub>50</sub>, 实验重复 3 次。

2.2 Hoechst 染色观察藤黄酸对胃癌细胞 BGC-803 凋亡的影响: 将细胞以  $6 \times 10^4$  / 孔接种于 24 孔细胞培养板, 24 h 细胞完全贴壁后, 更换含有 0、0.75、1.5、3 μmol/L 藤黄酸的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度条件下培养 48 h, PBS 洗涤两次, 用甲醇-醋酸 (3:1) 固定细胞 20 min, PBS 洗涤两次, 加入 Hoechst 溶液 37 °C 闭光温浴 10 min 后, 荧光显微镜下观察凋亡细胞。

2.3 细胞与 IV 型胶原蛋白间黏附能力的检测: 将 IV 型胶原蛋白储液用 PBS 稀释成 0.1 mg/mL, 按 50 μL / 孔加入到 96 孔培养板中, 4 °C 过夜后再于 37 °C 下孵育 2 h。将细胞分为两组: 黏附细胞组, 分别以 0、0.1、0.2、0.3 μmol/L 藤黄酸处理 BGC-803 细胞 2 h 后, 用 0.125% 胰蛋白酶消化细胞, 按  $1.5 \times 10^4$  / 孔接种到已包被 IV 型胶原蛋白的 96 孔培养板中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 用 PBS 洗涤未黏附的细胞, MTT 法测定黏附细胞的 A 值; 对照组细胞处理同黏附细胞组, 但不用 PBS 洗涤, 直接采用 MTT 法测定 A 值。每组设 6 个平行孔。同时, 测定 IV 型胶原蛋白包被但未接种细胞的孔作为空白组。按照如下公式计算黏附率。

$$\text{黏附率} = (A_{\text{黏附组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.4 二维水平细胞迁移实验: 将 BGC-803 细胞按  $6 \times 10^4$  / 孔接种到 24 孔培养板中, 培养 24 h, 待细胞长成均匀单层后, 用无菌 10 μL 移液器吸头延孔的中轴线轻轻划过。用 37 °C PBS 除去细胞残骸后, 加入 37 °C 含有 0.1、0.2、0.3 μmol/L 藤黄酸的培养基, 继续培养 0.5~1 h 后, 以这一时间作为零时间点, 分别在 0、12、24、48 h 时通过倒置显微镜 (50×) 观察细胞迁移情况, 并利用目镜刻度尺测量划痕宽度 (S), 每孔测量 5 处 (即两端、中点、左 1/4 处和右 1/4 处), 求平均值。每组细胞均设 3 个平行孔, 按照如下公式计算细胞迁移率。

$$\text{迁移率} = (S_{\text{零时间点}} - S_{\text{测试点}}) / S_{\text{零时间点}} \times 100\%$$

2.5 三维水平细胞迁移实验: 用无血清 RPMI 1640 培养基制备单细胞悬液, 调整浓度为  $2.5 \times 10^5$  / mL; 向 24 孔培养板中加入 600  $\mu$ L 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 然后将 Thincert 侵袭小室浸入, 再向小室中加入 200  $\mu$ L 含有 0、0.1、0.2、0.3  $\mu$ mol/L 藤黄酸的培养基处理过的细胞悬液 (即  $5.0 \times 10^4$  个细胞); 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 取出 Thincert 小室, 用手术刀片小心沿小室边缘将膜切下, 将膜下表面向上放在一个洁净的 24 孔培养板的孔中; 用甲醇冰醋酸 (3:1) 固定 10 min, 然后用 10% 姬姆萨染液染色 15~30 min; 将膜用蒸馏水漂洗干净后在倒置显微镜下 (200 $\times$ ) 随机选取 6 个视野 (上、下、左、右各一, 中央两个) 计数细胞 (呈紫色)。

2.6 RT-PCR 法检测 bcl2、bax、ICAM-1 基因的 mRNA 表达: 以 0、0.75、1.5、3  $\mu$ mol/L 藤黄酸处理 BGC-803 细胞 24 h 后, Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 取总 RNA 2  $\mu$ g, 用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录, PCR 扩增 bcl2、bax、ICAM-1, 同时扩增磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照, 引物由上海生工生物技术公司合成。bcl2 引物序列: 上游为 5'-TGTGTGTGGAGAGCGTCAACG-3', 下游为 5'-TTCAGAGACAGCCAGGAGAAATG-3'; bax 引物序列: 上游为 5'-TCAGGATGCGTCCACCAAGAA-3', 下游为 5'-TCCCGGAGGAAGTCCAATGTG-3'; ICAM-1 引物序列: 上游为 5'-TAGCCAACCAATGTGCTATT-3', 下游为 5'-CAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG-3'; 内参照 (GAPDH) 引物序列: 上游为 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', 下游为 5'-GCAGAAGGGCGGAGATGA-3'。PCR 反应程序: 预变性 94  $^{\circ}$ C、5 min, 变性 94  $^{\circ}$ C、1 min, 退火 58  $^{\circ}$ C、1 min, 延伸 72  $^{\circ}$ C、90 s, 循环 30 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察并拍照。通过 Quantity One 分析软件测定条带吸光度值, 以目的基因与 GAPDH 的比值表示各基因 mRNA 的相对表达水平。

2.7 Western blotting 法检测 Bcl-2、Bax、ICAM-1 蛋白表达变化: 以 0、0.75、1.5、3  $\mu$ mol/L 藤黄酸处理 BGC-803 细胞 24 h, 取样本离心收集细胞, 提取细胞总蛋白, 12% SDS-PAGE 电泳 (100 V) 2 h, 电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 10% 脱脂奶粉封闭, 加入 1:200 稀释兔抗人 Bcl-2、Bax、ICAM-1 多克隆抗体, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗后加入 HRP-

羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 2 h, 最后以化学发光法显色。以  $\beta$ -actin 作为内参。

2.8 统计学处理: 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析, 数据两两比较采用 *t* 检验, 多组之间比较用 ANOVA 进行。

### 3 结果

3.1 藤黄酸对胃癌细胞株 BGC-803 的增殖及凋亡的影响: 随着藤黄酸浓度的增加, 细胞存活率降低, 有明显的剂量依赖关系, 藤黄酸作用 48 h 的  $IC_{50}$  值为 1.54  $\mu$ mol/L (图 1)。Hoechst 染色结果, 对照组细胞饱满, 胞浆丰富, 胞核圆形或椭圆形, 染色质荧光着色均匀。3  $\mu$ mol/L 藤黄酸作用下明显看到细胞核体积变小、皱缩, 可见致密浓染荧光, 染色体 DNA 呈浓染的团块状、颗粒状分布, 提示出现了明显的凋亡 (图 2)。

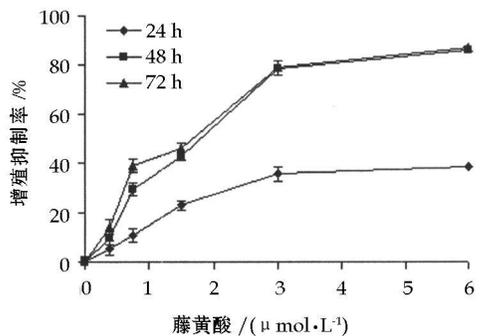
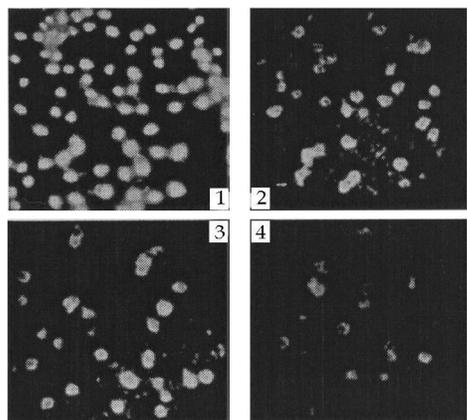


图 1 藤黄酸对 BGC 803 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Inhibition of gambogic acid on proliferation of BGC 803 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



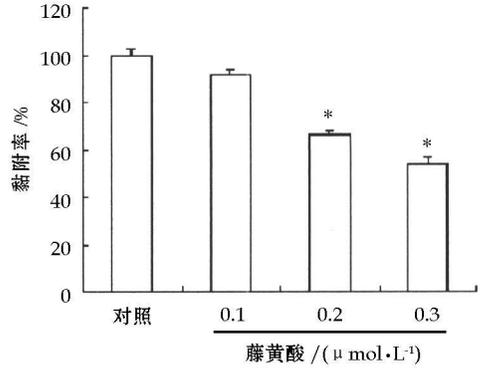
F 对照组 2~4 0.75、1.5、3  $\mu$ mol/L 藤黄酸组  
F control group 2~4 0.75, 1.5, and 3  $\mu$ mol/L gambogic acid group

图 2 Hoechst 染色观察藤黄酸对 BGC 803 细胞凋亡形态学的影响

Fig. 2 Effect of gambogic acid on morphology of BGC 803 cells apoptosis observed via Hoechst staining

3.2 藤黄酸对 BGC-803 细胞黏附、迁移、侵袭的影响: 藤黄酸对胃癌细胞 BGC-803 和 IV 型胶原蛋白的黏附有明显的影响, 藤黄酸浓度为 0.3、0.2、0.1  $\mu\text{mol/L}$  时黏附率分别为  $(54.39 \pm 2.42)\%$ 、 $(66.64 \pm 1.98)\%$ 、 $(91.90 \pm 2.09)\%$ , 其中后两组与对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 3), 表明藤黄酸能够显著降低胃癌细胞 BGC-803 与 IV 型胶原蛋白间的黏附能力。与对照组相比, BGC-803 细胞在给予藤黄酸 0.1、0.2、0.3  $\mu\text{mol/L}$  后, 48 h 内的迁移率表现出明显的降低 (图 4), 表明藤黄酸可以显著抑制 BGC-803 细胞在二维水平上的迁移。藤黄酸浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  时, BGC-803 细胞从 Thiercert 侵袭小室上室穿过 8  $\mu\text{m}$  孔径的 PET 膜迁移到下室的细胞数目表现出轻微的减少, 细胞数目为  $(168 \pm 40.5)$  个。当剂量增大到 0.2、0.3  $\mu\text{mol/L}$  时, 迁移细胞数目逐渐减少, 细胞数目分别为  $(113 \pm 32.3)$ 、 $(101 \pm 36.3)$  个, 对照组为

$(175 \pm 37.6)$  个 (图 5)。表明藤黄酸可以显著抑制胃癌细胞 BGC-803 在三维水平上的迁移。



与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 3 藤黄酸对 BGC 803 细胞和 IV 型胶原黏附的影响

Fig. 3 Effect of gambogic acid on adhesion of BGC 803 cell to type IV collagen

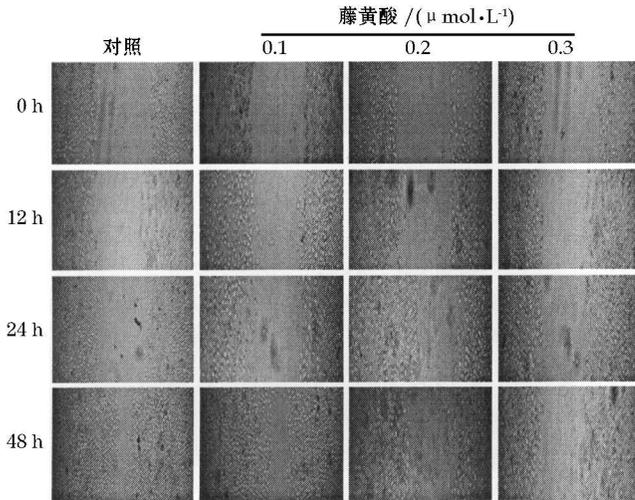
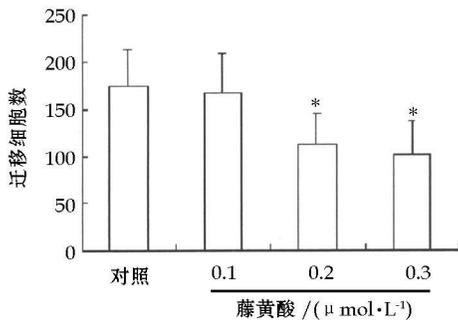


图 4 藤黄酸对 BGC 803 细胞二维水平迁移的影响

Fig. 4 Effect of gambogic acid on BGC 803 cell migration in two dimensions

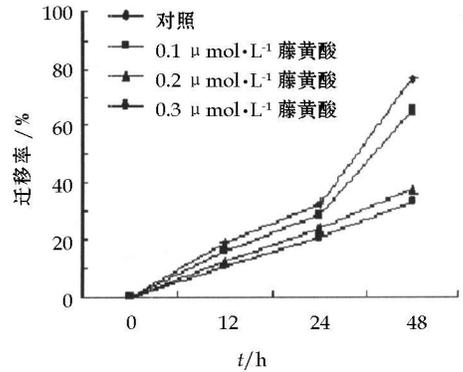


与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 5 藤黄酸对 BGC 803 细胞侵袭的影响

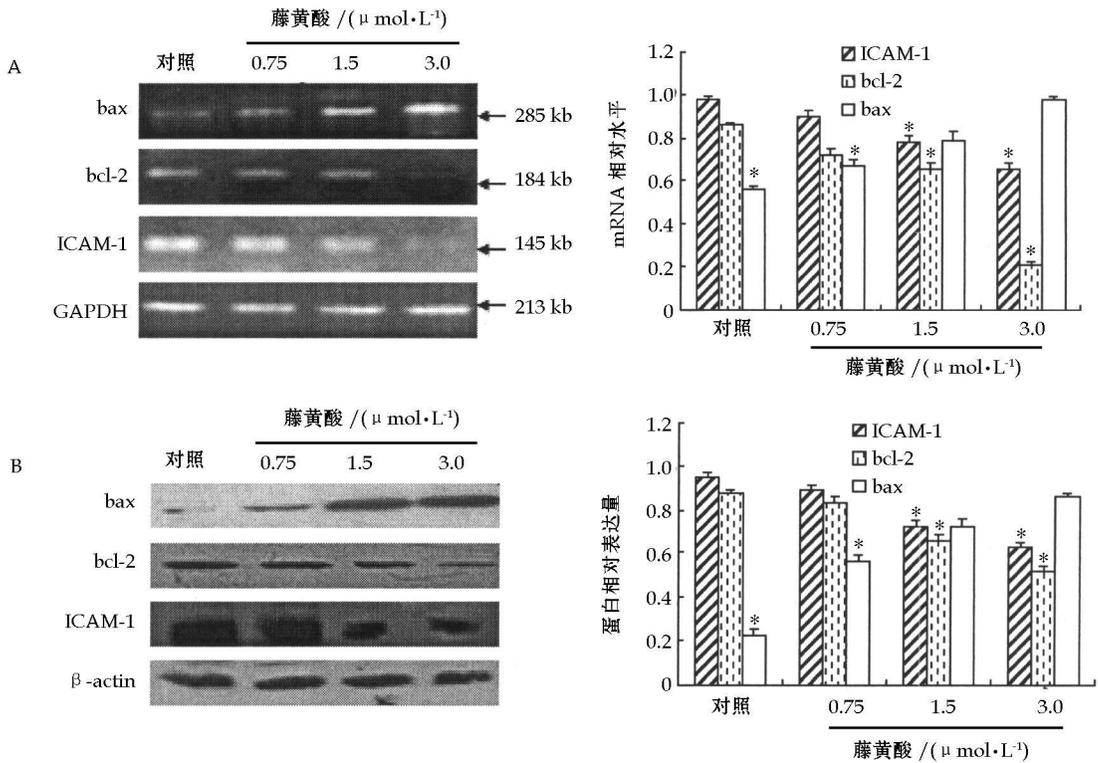
Fig. 5 Effect of gambogic acid on BGC 803 cell invasion



3.3 藤黄酸对胃癌细胞 BGC-803、bc1-2、bax、ICAM-1 基因 mRNA 和蛋白表达的影响: 实验结果表明藤黄酸能导致人胃癌细胞 BGC-803 中 bc1-2 和 IACM-1 基因 mRNA 和蛋白表达明显下调, 并随着藤黄酸的浓度升高而降低; 促凋亡基因 bax 表达明显增加, 并随着藤黄酸的浓度升高而增加, 呈一定浓度依赖性。提示藤黄酸可能通过抑制 bc1-2 基因表达、降低 bc1-2/bax 值而诱导细胞凋亡。同时减少 ICAM-1 基因表达而抑制胃癌细胞 BGC-803 的黏附和转移 (图 6)。

#### 4 讨论

藤黄酸作为一种有效的抗肿瘤药物已被众人所



与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 6 藤黄酸对 BGC 803 细胞 bax, bcl-2, ICAM-1 基因 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响

Fig. 6 Effect of gambogic acid on gene and protein expression of bax, bcl-2, and ICAM-1 of BGC 803 cells

关注,近年来关于其机制有所研究,但具体的机制仍不清楚。本研究发现藤黄酸可以通过减少 bcl-2 基因表达,降低 bcl-2 与 bax 比率诱导肿瘤细胞凋亡,同时通过减少 ICAM-1 基因表达而抑制胃癌细胞 BGC-803 的黏附、迁移、侵袭。

肿瘤转移是一个多阶段复杂的过程,包括肿瘤细胞的脱落、迁移、黏附、生长等,每一阶段都受不同因素的影响和调控。首先,原发肿瘤细胞从原部位脱落,侵入细胞外基质 (ECM) 与基底膜 (BM) 中大分子蛋白黏附。其次,激活细胞合成并分泌各种降解酶类,降解 BM 及 ECM,穿过脉管壁进入循环系统,在循环中逃避免疫系统攻击,最后穿过脉管,外渗到达继发部位形成克隆,增殖形成转移灶<sup>[8]</sup>。ICAM-1 是一种重要表面黏附分子,属免疫球蛋白超家族,为 80~115 000 单链糖蛋白,在人体正常组织基本不表达,在一些恶性肿瘤中过度表达,在肿瘤细胞的黏附和侵袭转移过程中具有重要作用<sup>[11]</sup>。

细胞凋亡是受基因控制的,有众多基因参与凋亡过程,bcl-2 原癌基因是迄今为止研究得最为深入和广泛的凋亡调控基因之一。在许多肿瘤的发生过

程中,Bcl-2 蛋白表达率呈逐渐增加的趋势,提示 Bcl-2 蛋白表达增加是肿瘤细胞凋亡受抑的重要机制之一。同时,Miyake 等<sup>[12]</sup>也发现 Bcl-2 可以通过延长不利环境下细胞生存而增强肿瘤细胞的转移能力。

综上所述,藤黄酸可以诱导胃癌细胞 BGC-803 的凋亡并抑制其黏附和转移,其诱导凋亡的机制可能与下调 Bcl-2,上调 Bax 相关;同时可能通过下调 bcl-2、ICAM-1 基因的表达而抑制肿瘤细胞的黏附和转移。

致谢:奚涛教授对本论文的指导和支持。

参考文献:

- [1] Liu W, Guo Q L, You Q D, et al. Anticancer effect and apoptosis induction of gambogic acid in human gastric cancer line BGC 803 [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (24): 3655-3659
- [2] Guo Q L, You Q D, Wu Z Q, et al. General gambogic acids inhibited growth of human hepatoma SMMC-7721 cells *in vitro* and innude mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (6): 769-774
- [3] 崔国惠, 舒文秀, 吴青, 等. 藤黄酸对 K562 细胞 HERG 钾通道蛋白的调控作用 [J]. *中草药*, 2009, 40 (6): 915-919
- [4] 舒文秀, 陈燕, 何静, 等. 藤黄酸对急性白血病细胞 U937 增殖和凋亡的影响及对核孔蛋白 Nup88 的调控作用

- [J]. 中草药, 2008, 39(1): 74-78
- [5] Chen J, Gu H Y, Lu N, *et al.* Microtubule depolymerization and phosphorylation of cJun N-terminal kinase 1 and p38 were involved in gambogic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast carcinoma MCF7 cells [J]. *Life Sci*, 2008, 83(34): 103-109
- [6] Pandey M K, Sung B, Ahn K S, *et al.* Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor kappa B signaling pathway [J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3517-3525
- [7] Qin Y, Meng L, Hu C, *et al.* Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II<sub>A</sub> by binding to its ATPase domain [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(9): 2429-2440
- [8] 张润玲. 肿瘤转移的分子机制 [J]. 兰州医学院学报, 2000, 26(2): 54-56
- [9] 佟玲, 王文萍, 邢玉庆. 肿瘤转移的分子机制研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(3): 185-187
- [10] 赵静丽, 季峰. 胃癌细胞转移相关促移动因子研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(3): 178-180
- [11] Gho Y S, Kim P N, Li H C, *et al.* Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule 1 [J]. *Carcinoma Res*, 2001, 61: 4253-4257
- [12] Miyake H, Hara I, Yamanaka K, *et al.* Over expression of Bcl-2 enhances metastatic potential of human bladder cancer [J]. *Bri J Cancer*, 1999, 79(11): 1651-1656

## 白杨素提高肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡能力的研究

李欣<sup>1</sup>, 王剑宁<sup>2</sup>, 熊习昆<sup>1</sup>, 陈美芬<sup>1</sup>, 古梅英<sup>1</sup>, 杨颖<sup>1</sup>, 王凤岩<sup>1</sup>, 杨杏芬<sup>1</sup>, 黄俊明<sup>1\*</sup>

(1. 广东省疾病预防控制中心 毒理所, 广东 广州 510300; 2. 中山大学光华口腔医学院

附属口腔医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

**摘要:**目的 研究白杨素提高肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的能力, 并对其分子机制进行初步探讨。方法 白杨素以不同浓度 (10、20、40  $\mu$ mol/L) 单独或联合 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 处理 HepG2 细胞后, 于普通及荧光倒置显微镜下观察细胞形态变化, 获得细胞死亡的定性资料; 流式细胞术检测 sub G1 峰, 分析峰值变化规律, 获得细胞死亡的定量资料; 并以 Western blotting 方法检测凋亡标志蛋白 caspase 3、caspase 8 和 PARP 原蛋白和相应的裂解产物的变化情况及凋亡抑制蛋白 Bcl-xL、cIAPs、xIAP、cFLIP 的时间-效应变化规律。结果 形态学观察可发现白杨素联合 TNF- $\alpha$  处理 HepG2 细胞后, 与对照组比较细胞出现明显的死亡数量增加, 而单独白杨素组、TNF- $\alpha$  组与对照组比较则未观察到明显的细胞减少 ( $P > 0.05$ ); 流式细胞术分析 sub G1 的定量资料也支持这一结果, 联合处理组 sub G1 值随着白杨素剂量增加而增大, 最高达到 (27.84  $\pm$  0.54)%, 与对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ), Hoechst 33342 荧光染色在联合处理组可观察到明显的核固缩细胞增加; Western blotting 检测到凋亡标志蛋白 caspase 3、caspase 8 和 PARP 原蛋白减少、相应的活化裂解片段出现; 全 caspase 酶抑制剂 z-VAD-fmk 可有效抑制联合处理组 HepG2 细胞死亡、sub G1 峰消失比值减少, 阻止凋亡标志蛋白 caspase 3、caspase 8 和 PARP 的活化降解; TNF- $\alpha$  引起的凋亡抑制蛋白 cFLIP-1 表达量增加, 随联合处理时间延长而明显下调, 与对照组比较有明显差异, Bcl-xL、xIAP 等其他凋亡抑制蛋白没有明显改变。结论 白杨素能够有效提高 TNF- $\alpha$  诱导 HepG2 细胞凋亡的能力, NF- $\kappa$ B 调节的凋亡抑制蛋白 cFLIP-1 表达减少是其重要的分子机制。

**关键词:** 白杨素; 肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ); 细胞凋亡

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1828-07

### Acceleration of chrysin on apoptosis of hepatoma cell lines HepG2 induced by TNF- $\alpha$

LI Xin<sup>1</sup>, WANG Jian-ning<sup>2</sup>, XIONG Xi-kun<sup>1</sup>, CHEN Mei-fen<sup>1</sup>, GU Mei-ying<sup>1</sup>,  
YANG Ying<sup>1</sup>, WANG Feng-yan<sup>1</sup>, YANG Xing-fen<sup>1</sup>, HUANG Jun-ming<sup>1</sup>

(1. Institute of Toxicology, Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China;

2. Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

**Abstract: Objective** To research whether chrysin can sensitize the cell death of hepatoma (HepG2) cell lines induced by TNF- $\alpha$  and explore the molecular mechanism of this sensitization. **Methods** HepG2 Cells were pretreated with designed dose of chrysin (10, 20, and 40  $\mu$ mol/L) for 2 h, then followed TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 24 h, the morphologic changes were observed under inverted microscope and the percentage of sub G1 was measured using flow cytometry, the proprotein and cleavage of caspase 3,

①收稿日期: 2010-03-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (9151030003000004); 广东省中医药强省科研发立项资助项目 (2009431)

作者简介: 李欣 (1973-), 女, 副主任医师, 医学硕士, 研究方向为天然产物的生物学活性。

\* 通讯作者 黄俊明 Tel: (020) 84452254 E-mail: lixinsm@gmail.com