

花旗松素对人肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用及其机制研究

李 雪¹, 赵明智^{2*}, 郭瑞霞¹

1. 邯郸市第一医院 呼吸二科, 河北 邯郸 056002

2. 河北大学附属医院 肿瘤科, 河北 保定 071000

摘 要: **目的** 研究花旗松素对人肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用, 并探讨其诱导细胞凋亡的可能机制。**方法** WST-1 法检测不同质量浓度 (0~200 $\mu\text{g/mL}$) 花旗松素对 A549 细胞增殖的影响; Annexin-V/PI 双染法检测花旗松素对 A549 细胞凋亡的影响; 细胞免疫荧光法观察花旗松素处理后 A549 细胞中凋亡蛋白 Bax 的表达; Western blotting 法检测 Bcl-2、Akt、P53 蛋白表达的变化。**结果** WST-1 法检测到花旗松素能有效抑制 A549 细胞的增殖, 呈现时间-剂量-效应关系。通过流式细胞仪分析, 花旗松素诱导细胞凋亡, 上调了促凋亡蛋白 Bax 的表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 抑制 Akt 的过表达, 并且促进 P53 的表达。**结论** 花旗松素对 A549 细胞的增殖具有显著的抑制作用, 其诱导的凋亡机制可能与 Bcl-2、Akt 相关信号通路的激活有关。

关键词: 花旗松素; 人肺癌细胞 A549; 抑制作用; 机制

中图分类号: R966; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)03-0249-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.03.004

Inhibition of taxifolin on proliferation of human lung cancer cell A549 and its mechanism

LI Xue¹, ZHAO Ming-zhi², GUO Rui-xia¹

1. Second Department of Respiratory Medicine, Handan First Hospital, Handan 056002, China

2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of taxifolin on proliferation of human lung cancer cell A549, and study the possible mechanism of inducing cell apoptosis. **Methods** WST-1 assay was employed to evaluate the inhibition of taxifolin with various concentrations from 0 $\mu\text{g/mL}$ to 200 $\mu\text{g/mL}$ on proliferation of A549 cells. With Annexin V and PI dual parameter markers, A549 cell apoptosis was detected by flow cytometry of taxifolin. The expressions of Bax, Bcl-2, Akt, and P53 were evaluated by Western blotting or immunocytochemistry. **Results** The WST-1 results showed that taxifolin could inhibit A549 cell viability with time-drug concentration-proliferation inhibition rate relationships. The results of Western blotting and fluorescence microscope showed that taxifolin could induce apoptosis of A549, up-regulate express of pro apoptotic protein Bax, down-regulate express of anti apoptotic protein Bcl-2, inhibit expression of Akt, and also induced the expression of P53. **Conclusion** Taxifolin can significantly inhibit the proliferation of A549 cell, and its mechanism may be related to activate the pathway of Bcl-2 and Akt-dependent apoptosis in A549 cells.

Key words: taxifolin; human lung cancer cell A549; inhibitory action; mechanism

花旗松素是一种具有多种生物活性的二氢黄酮类化合物, 广泛地存在于各种植物、水果和食物中。已有一些报道证实花旗松素对多种癌细胞如肝癌细胞、乳腺癌细胞、宫颈癌细胞等均有抑制作用^[1-3]。目前世界范围内肺癌所引起的死亡占有肿瘤引起

的死亡的首位。本研究以人肺癌细胞 A549 为研究对象, 通过观察花旗松素对 A549 的抑制效应, 进一步研究花旗松素抑制肺癌细胞增殖的作用机制, 为深入研究花旗松素抗肿瘤机制提供实验基础, 应用于临床治疗肺癌提供理论依据。

收稿日期: 2014-12-28

作者简介: 李 雪, 女, 主治医师, 本科, 研究方向为呼吸内科。Tel: 13784228027 E-mail: 3166425349@qq.com

*通信作者 赵明智, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为肿瘤学。Tel: 18931212718 E-mail: zmz2008lx@163.com

1 试药与仪器

人肺癌细胞 A549 由天津医科大学惠赠, 细胞来自 ATCC 细胞库。花旗松素 (质量分数 >97%, 美国 Sigma 公司), 二甲基亚砜 (DMSO)、WST-1 试剂盒 (产品货号 C0038, 碧云天生物技术研究); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (货号 KGA107, 南京凯基生物科技发展有限公司); Bcl-2 (货号 SC-7382)、Bax (货号 SC-1616)、Akt (货号 sc-65487)、P53 (货号 sc-126)、 β -actin (货号 sc-47778) 鼠单抗 (美国 Santa Cruz 公司); PVDF 膜 (美国 Roche 公司); ECL 试剂盒 (NCI 5080, 美国 Amersham Bioscience 公司); 胎牛血清、RPMI-1640 细胞培养液 (美国 Hyclone 公司)。

BX-61 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); BIO-RAD iMark 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

采用 10% 血清的高糖 DMEM 培养基, 将 A549 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞对数生长, 且呈单层贴壁, 根据实验需求, 调整不同细胞浓度。接种细胞 12 h 后开始进行不同浓度药物处理。

2.2 WST-1 法检测花旗松素对 A549 增殖的影响^[4-5]

调整细胞密度为 6.0×10^4 /mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 设对照和 5 个复孔, 接种 12 h, 细胞融合良好。实验组加不同质量浓度花旗松素溶液, 使终质量浓度分别为 25、50、100、150、200 μ g/mL。对照组加入等体积的培养基。细胞给药后, 在培养箱分别继续培养 3、6、12 h。结束培养前 1 h, 每孔加 WST-1 溶液 10 μ L, 继续培养 1 h。在酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度 (*A*) 值, 根据细胞活力 = $A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$ 计算细胞活力。

2.3 Annexin-V/PI 双染法检测花旗松素对 A549 细胞凋亡的影响

采用流式细胞技术检测花旗松素对 A549 凋亡的影响。细胞以 1×10^6 接种于 6 孔板中, 12 h 后加入终质量浓度分别为 50、100、200 μ g/mL 花旗松素溶液, 并设对照组, 分别于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 12 h 后胰酶消化收获细胞。离心收集悬浮细胞, 微量离心机 2 000 r/min 离心 5 min, 弃培养基。用冷 PBS 洗涤离心细胞两次。用 400 μ L

Binding Buffer 悬浮细胞, 在细胞悬浮液中加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 4 °C 避光条件下孵育 3 min。加入 10 μ L PI 后混匀, 于室温避光孵育 1 min。立即进行流式细胞仪检测。结果用 BD FACSCalibur 流式细胞仪进行数据分析。

2.4 细胞免疫荧光观察花旗松素对凋亡蛋白 Bax 表达的影响

1×10^5 细胞采用细胞爬片的方法接种于 24 孔板中, 12 h 后加入终质量浓度分别为 50、100、200 μ g/mL 花旗松素溶液, 并设对照组, 分别于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 12 h。吸出上清液, -20 °C 甲醇固定 20 min 后, PBS 洗 3 次, 1% Triton 通透 15 min, PBS 洗 2 次, 5% BSA 封闭 20 min, 孵育 Bax 一抗, 4 °C 过夜, 次日 PBS 洗净, 荧光二抗室温 1 h, PBS 洗净, 在荧光显微镜下观察。

2.5 Western blotting 检测花旗松素对蛋白表达的影响

收集各组细胞, PBS 洗 3 次, 用蛋白裂解液冰上裂解 30 min 后, 4 °C、12 000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清用 Bradford 法测定蛋白, 配平各组蛋白浓度, 100 °C 蛋白变性。上样量为每孔 30 μ g 蛋白, SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭 2 h, 鼠抗 4 °C 冰箱过夜 (1:100), TBST 清洗 5 min $\times$ 3 次, 二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 min $\times$ 4 次, ECL 系统显影。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 花旗松素对 A549 增殖的影响

花旗松素质量浓度在 50 μ g/mL 以下时对 A549 细胞增殖无明显抑制作用。不同孵育时间时, 花旗松素的 IC₅₀ 也不同, 3、6、12 h 的 IC₅₀ 分别是 128.24、95.16、82.76 μ g/mL, 提示花旗松素的抑制作用呈现时间-效应关系。孵育时间为 12 h 时, 25 μ g/mL 花旗松素溶液的细胞活力为 87.84%, 而 200 μ g/mL 花旗松素溶液的细胞活力仅为 23.86%, 提示花旗松素的抑制作用呈现浓度-效应关系。结果见表 1。由于 200、150 μ g/mL 花旗松素溶液作用 12 h 对 A549 的活力影响差异没有显著性, 因此接下来的实验采用 50、100、150 μ g/mL 终质量浓度的花旗松素溶液作用 12 h。

3.2 花旗松素对 A549 细胞凋亡的影响

流式细胞 Annexin V/PI 检测细胞凋亡表明, 花旗松素作用 12 h, 随着质量浓度的增高, 早期凋亡和晚期凋亡细胞的比例都逐渐增加, 对照组的凋亡率为 1.33%, 说明细胞状态良好, 50 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松

表 1 不同质量浓度花旗松素对人肺癌细胞 A549 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Effects of taxifolin with various concentrations on cell viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活力/%		
	给药 3 h	给药 6 h	给药 12 h
0 (对照)	100	100	100
25	91.83 $\pm$ 5.21	90.86 $\pm$ 2.54	87.84 $\pm$ 3.16
50	84.44 $\pm$ 4.89	82.68 $\pm$ 6.14	78.84 $\pm$ 2.58
100	54.86 $\pm$ 4.12*	45.11 $\pm$ 3.65*	35.47 $\pm$ 1.59*
150	39.22 $\pm$ 2.35*	36.53 $\pm$ 2.45*	27.21 $\pm$ 6.01*
200	34.52 $\pm$ 3.17*	26.42 $\pm$ 4.56*	23.86 $\pm$ 4.13*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

素溶液给药组的凋亡率为 15.78%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液给药组的凋亡率为 30.74%, 与对照组比较差异均具有显著性 ($P<0.05$)。结果见表 2、图 1。

3.3 花旗松素对凋亡蛋白 Bax 表达的影响

细胞免疫荧光结果显示, 对照组凋亡蛋白 Bax 表达微弱, 随着花旗松素质量浓度的增加, 细胞的数量减少, 但荧光强度逐渐增加, 提示花旗松素上调了促凋亡蛋白 Bax 的表达。结果见图 2。

表 2 不同质量浓度花旗松素处理 A549 细胞后对凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effects of taxifolin with various concentrations on apoptosis in A549 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	凋亡率/%
0 (对照)	1.33 $\pm$ 0.12
50	15.78 $\pm$ 3.14*
100	30.74 $\pm$ 2.45*
150	73.18 $\pm$ 2.61*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

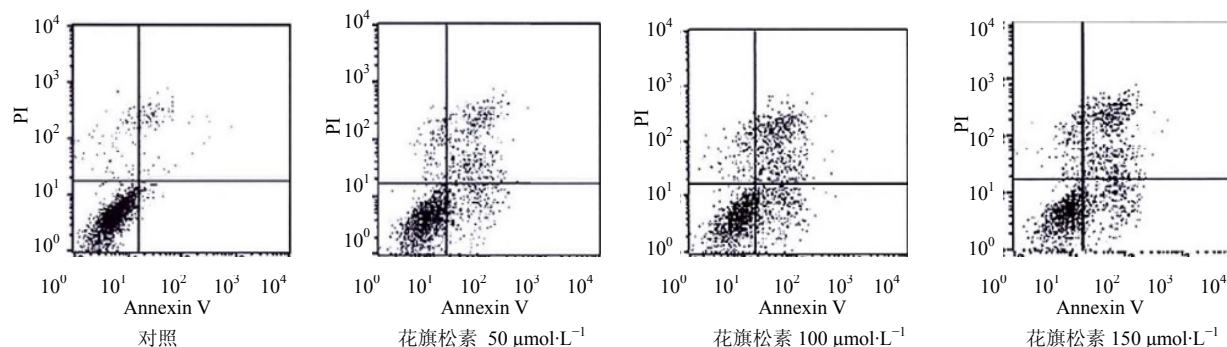


图 1 花旗松素对 A549 细胞凋亡率的影响

Fig. 1 Effects of taxifolin on apoptosis rates of A549 cells

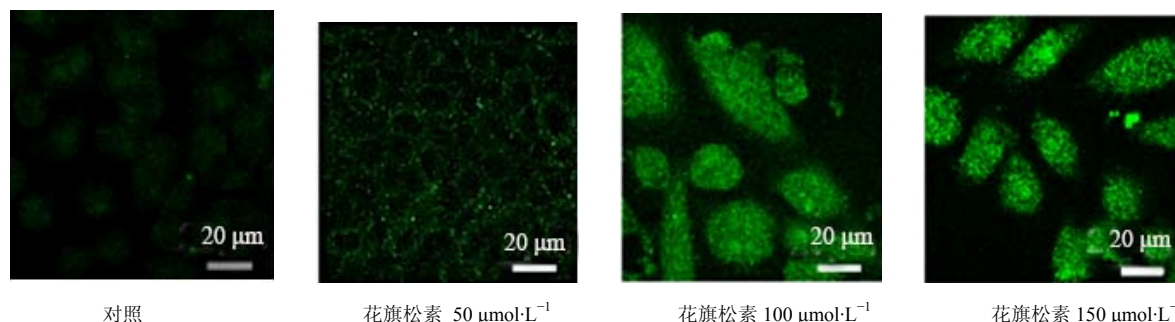


图 2 花旗松素上调 A549 细胞中 Bax 蛋白表达

Fig. 2 Effects of taxifolin on Bax expression of A549 cells

3.4 花旗松素对蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果表明, 花旗松素作用于细胞后, 50 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液对抗凋亡蛋白 Bcl-2 的影响不显著, 但是 100 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液显著下调了 Bcl-2 的表达; 同时对 Akt 通路也有显著的影响, 并且激活了 P53 通路。随着花旗松素质量浓度的增加, 调控作用也越来越明显。结果见图 3。

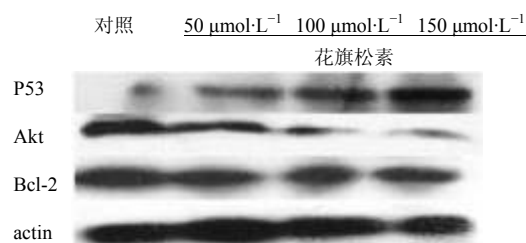


图3 花旗松素处理 A549 细胞后对 Bcl-2、Akt 和 P53 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of taxifolin on the expressions of Bcl-2, Akt, and P53 in A549 cells

4 讨论

WST-1 实验结果表明, 固定给药时间, 细胞活力随着花旗松素质量浓度的增加而降低, 孵育 12 h 时, 25 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液的细胞活力为 87.84%, 而 200 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液的细胞活力降至 23.86%。100 $\mu\text{g/mL}$ 花旗松素溶液作用 3、6、12 h 时, 细胞活力逐渐降低, 分别为 54.86%、45.11%、35.47%。提示花旗松素对 A549 细胞的增殖的抑制作用呈现时间 - 剂量 - 效应关系。细胞凋亡实验也进一步验证了花旗松素对细胞活力的抑制作用。

Bcl-2 蛋白家族参与了内源性凋亡信号通路, 因此实验检测了 Bcl-2 蛋白家族中与凋亡相关的蛋白的表达, 即 Bcl-2 和 Bax 的表达。Western blotting 结果显示, 随着花旗松素质量浓度的增加, 会下调 Bcl-2 蛋白的表达, 促进细胞凋亡。免疫荧光结果表明, 随着花旗松素质量浓度的增加, 绿色荧光强度明显增强, 提示促进了 Bax 蛋白的表达, 这一结果与 Western blotting 的结果一致, 皆证实了花旗松素激活了凋亡信号通路。

细胞凋亡过程是一个复杂的过程, 还有多种蛋

白和信号通路也参与其中, 包括 Akt 信号通路。Akt 表达水平的升高, 可以起到保护细胞, 并且抑制细胞凋亡的作用。Akt 的下游信号传导通路包括 Akt 的活化, 激活 NF- κ B 蛋白, 刺激 COX2 的表达^[6-7], 抑制细胞凋亡。Akt 的活化也会抑制 p53 蛋白的激活, 从而抑制细胞凋亡。Akt 和 Bcl-2 蛋白家族也有关联, 通过促进 Bax 蛋白磷酸化而失活, 实现抑制凋亡。Western blotting 实验结果显示, 花旗松素可以抑制 Akt 的过表达, 并且促进 P53 的表达, 随着剂量的增加, 调节作用增强, 进一步证实了花旗松素抑制 A549 增殖的分子机制。

综上所述, 花旗松素具有明显的诱导 A549 细胞凋亡的作用, 所涉及的信号通路是一个复杂过程, 本研究初步探讨了其分子机制, 对其详细的分子机制有待完善。花旗松素具有毒副作用小、来源广泛等优点, 深入探讨其作用的分子机制具有十分重要的科学意义和应用前景。

参考文献

- [1] 翟延君, 程 飞, 王添敏, 等. 花旗松素对人宫颈癌 Hela 细胞的体外抗肿瘤活性及其机理研究 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2052-2055.
- [2] 翟延君, 佟苗苗, 程 飞, 等. 花旗松素和 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷对肿瘤细胞的增殖抑制作用 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 217-220.
- [3] 乔 华, 谢 鑫, 张晓云. 花旗松素的生物活性及其应用 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 附 15-18.
- [4] 董虹玲, 赵娜夏, 商 倩, 等. 赤芝子实体中三萜酸类成分及其抗人乳腺癌 SKBR3 细胞增殖活性 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 132-137.
- [5] 韩龙哲, 张 娟, 倪 慧, 等. 胀果甘草药渣总黄酮和甘草查尔酮 A 的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 668-672.
- [6] Plummer S M, Holloway K A, Manson M M, et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex [J]. *Oncogene*, 1999, 18(44): 6013-6020.
- [7] Peng G, Dixon D A, Muga S J, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis [J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(5): 309-319.