

莱菔硫烷诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的 p38MAPK 途径研究

孙胜男^{1,2}, 邹翔^{1,2,3}, 高鹏^{1,2}, 季宇彬^{1,2,3}

1 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2 哈尔滨商业大学药物所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076

3 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要 **目的:** 探讨莱菔硫烷 (sulforaphane, SFN) 诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡过程中, p38MAPK 途径的作用。**方法:** 流式细胞仪检测 SFN 对 HepG-2 细胞凋亡率的影响, Western Blotting 方法检测细胞内 p38 及 p-p38 蛋白表达。**结果:** SFN 可明显诱导 HepG-2 细胞凋亡, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 作用 48 h 后, 对 HepG-2 细胞的抑制率分别达到 27.42%、46.53%、58.92%; 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 SFN 可上调 HepG-2 细胞内 p-p38 蛋白的表达, 而对 p38 的表达无明显影响。**结论:** SFN 可诱导 HepG-2 细胞的凋亡, 而且这一过程与阻断 p38MAPK 途径有关。

关键词 莱菔硫烷; 细胞凋亡; p38

中图分类号: R735.7 R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 01-0029-05

Study on p38MAPK pathway in HepG-2 cells apoptosis induced by sulforaphane

SUN Sheng-nan^{1,2}, ZOU Xiang^{1,2,3}, GAO Peng^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

1 Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin, 150076, China

2 Institute of Materia Medica and Postdoctoral Programme of Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3 Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract **Objective:** To investigate the roles of p38 mitogen/activated protein kinase in the apoptosis induced by sulforaphane (SFN) in HepG-2 cells. **Methods:** Annexin V-FITC staining was used to observe the morphology of apoptotic cells treated with different dosages of SFN for 48 h. Western Blotting was employed to detect the expression of p38 and p-p38 proteins. **Results:** SFN could obviously induce the cell apoptosis of HepG-2 cells and the apoptotic rate after treated with SFN at the dosage of 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$ was 27.42%, 46.53%, and 58.92%, respectively. Western Blotting pointed that the expression of p-p38 proteins was evidently reduced by SFN ($P < 0.05$), meanwhile, there was no remarkable change on the expression of p38 protein. **Conclusion:** SFN could induce the cell apoptosis of HepG-2 cells by interdicting p38MAPK pathway in HepG-2 cells.

Key words apoptosis; sulforaphane; p38

收稿日期: 2009-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300284); 黑龙江省自然科学基金项目 (D200802); 黑龙江省骨干教师项目 (1154G36)

作者简介: 孙胜男 (1983-), 女, 医学硕士, 研究方向为抗肿瘤药物研究。E-mail: sunshengnan111@yahoo.com.cn

莱菔硫烷 (Sulforaphane, SFN), 为异硫代氰酸盐衍生物, 广泛存在于十字花科植物中, 在西兰花中含量最多^[1], 是蔬菜中防癌抗癌效果最好的天然活性物质之一^[2]。近年来的研究发现, SFN 引起的肿瘤细胞凋亡与 bcl-2 基因家族中的 bax 基因过度表达有关^[3], 而相应地, 在 NO 通过刺激 bax 流入线粒体而导致神经元细胞凋亡的过程中, 正是 p38MAPK 的活化起到关键作用^[4]。凋亡的 HepG-2 细胞中, SFN 各剂量组均可使细胞的 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性升高, 并呈一定的剂量依赖性。本实验在前期研究的基础上, 考察 SFN 诱导 HepG-2 细胞凋亡的作用, 以及在这一过程中 p38MAPK 途径的作用。

1 材料和仪器

1.1 药品和试剂

莱菔硫烷 (Sulforaphane, SFN; Alexis 公司); 阿霉素 (浙江海正药业股份有限公司, 批号 07C80113); RPMI 1640 培养基干粉、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); 二甲亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司); Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒 (南京博泰生物技术有限公司)。

1.2 癌细胞株

人肝癌 HepG-2 细胞株 (由哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站传代保种)。

1.3 实验仪器

流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 公司); CO₂ 恒温培养箱 (日本三洋公司); 酶标仪 (美国 Bio-rad 公司); 超净工作台 (苏净集团); 电泳仪、电转仪 (美国 Bio-rad 公司)。

1.4 细胞培养

人肝癌细胞系 HepG-2 常规细胞复苏后, 培养于含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液中, 置于 CO₂ 培养箱 (37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂, 相对湿度 95%) 培养。2~3 d 传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

2 实验方法

2.1 流式细胞仪检测 SFN 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

取对数生长期的人肝癌细胞 HepG-2, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶液消化细胞, 使贴壁细胞脱落。用含 10% 胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 /mL 的细胞悬液并转移到离心管内, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 重悬细胞并计数。取 10 万重悬的细胞, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温 (20~25 °C) 避光孵育 10 min, 可以使用铝箔进行避光。 $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加 10 μ L 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。300 目筛网过滤后上流式细胞仪检测, 检测波长 488 nm。

2.2 Western blotting 方法检测 SFN 对 HepG-2 细胞内 p38 和 p-p38 蛋白表达的影响

将对数生长期细胞用胰酶消化后, 传代培养于细胞培养瓶, 24 h 贴壁后给药。各给药组设计为: SFN 给药组 (终浓度 10、20、40 μ mol/L)、空白对照组 (加等体积 RPMI 1640)、阳性对照组 (终浓度 0.5 μ mol/L)。48 h 后, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 2~3 次、离心, 加入裂解液冰上裂解 1.5 h, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min 提取总蛋白。在 570 nm 处测定吸光度, 计算蛋白含量, 并用细胞裂解液将各样品调至相同浓度。配制 5% 的浓缩胶及 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。电泳条件: 浓缩胶 80 V, 待样品前沿进入分离胶后调电压至 100 V。转膜条件: 200 mA 恒流转膜 60 min。将凝胶中的蛋白转移到 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗过夜。次日, 取出 NC 膜用 TBST 缓冲液充分振摇洗膜 3 次, 每次 10 min。加碱磷酶标记马抗小鼠 IgG 室温孵育 2 h 后, TBST 振摇洗膜 3 次, 每次 10 min。加显色液显色, Tannon 凝胶成像系统照相。扫描图像在天能 GIS 凝胶成像分析系统进行量化分析。

2.3 统计学处理

实验均重复 3 次,数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 SPSS 15.0 统计软件分析, 组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 SFN 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

实验结果如图 1 和表 1 所示, 流式细胞仪检测 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 作用于 HepG-2 细胞 48 h 后, 细胞的凋亡率分别为 $(27.42 \pm 0.43)\%$ 、 $(46.53 \pm 0.35)\%$ 、 $(58.92 \pm 0.48)\%$ 。与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.2 Western blotting 检测 p38, p-p38 蛋白的表达

10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 作用于 HepG-2 细胞 48 h 后, p-p38 蛋白表达量逐渐减少, 相对密度值如图 4-5 所示, 分别为 $(84.45 \pm 0.74)\%$ 、 $(82.37 \pm 0.39)\%$ 、 $(65.68 \pm 0.17)\%$, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时, p38 蛋白表达量并无明显变化 (见图 2-3), 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

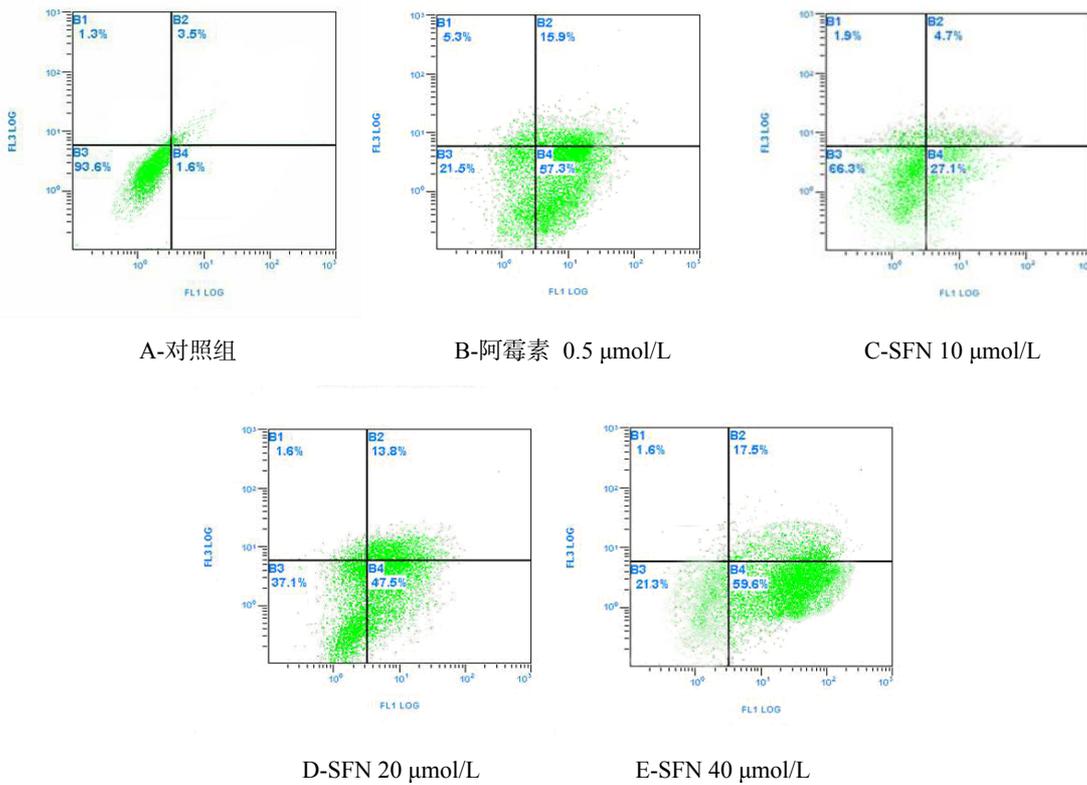


图 1 SFN 对 HepG-2 细胞的凋亡作用

Fig. 1 Effect of SFN on cell apoptosis of HepG-2 cells

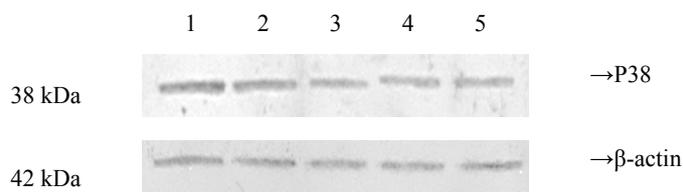
表 1 SFN 对 HepG-2 细胞凋亡率的影响 ($n = 3$)

Table 1. Apoptosis rate of HepG-2 after 48 h treatment by SFN ($n = 3$)

分组	剂量 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率 / %
对照组	0	1.60 ± 0.06
阿霉素组	0.5	$57.15 \pm 0.55^{**}$
SFN 组	10	$27.42 \pm 0.43^{**}$
	20	$46.53 \pm 0.35^{**}$
	40	$58.92 \pm 0.48^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group



带1-阿霉素组 0.5 μmol/L; 带2-对照组; 带3-SFN 10 μmol/L; 带4-SFN 20 μmol/L; 带5-SFN 40 μmol/L
Lane 1-ADR 0.5 μmol/L; Lane 2-Control group; Lane 3-SFN 10 μmol/L; Lane 4-SFN 20 μmol/L; Lane 5-SFN 40 μmol/L

图 2 SFN 作用于 HepG-2 后 p38 蛋白的表达

Fig.2 Effect of SFN on p38 protein expression in HepG-2 cells

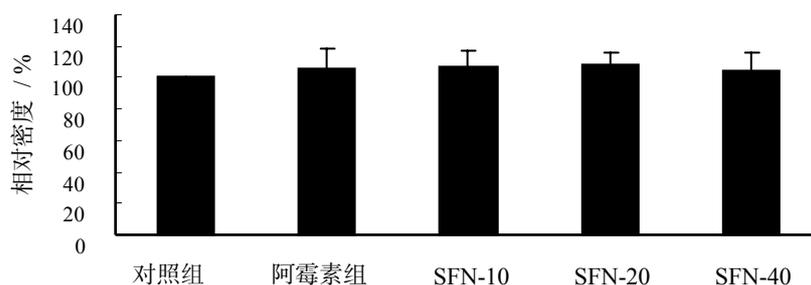
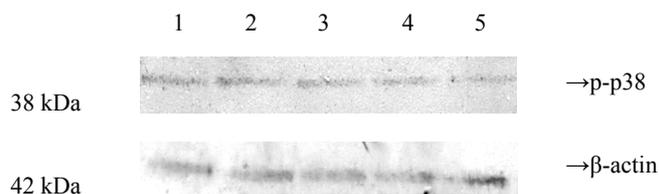


图 3 SFN 作用于 HepG-2 细胞后 p38 蛋白表达的相对密度

Fig.3 Effect of SFN on relative density of p38 protein expression in HepG-2 cells



带1-阿霉素组 0.5 μmol/L; 带2-对照组; 带3-SFN 10 μmol/L; 带4-SFN 20 μmol/L; 带5-SFN 40 μmol/L
Lane 1-ADR 0.5 μmol/L; Lane 2-Control group; Lane 3-SFN 10 μmol/L; Lane 4-SFN 20 μmol/L; Lane 5-SFN 40 μmol/L

图 4 SFN 作用于 HepG-2 后 p-p38 蛋白的表达

Fig.4 Effect of SFN on p-p38 protein expression in HepG-2 cells

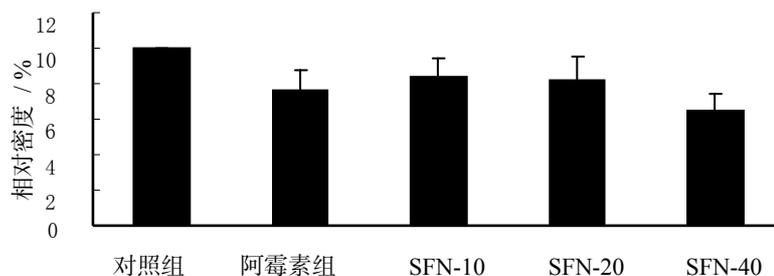


图 5 SFN 作用于 HepG-2 细胞后 p-p38 蛋白表达的相对密度

Fig.5 Effect of SFN on relative density of p-p38 protein expression in HepG-2 cells

3 讨论

SFN 是已经被证实具有防癌抗癌活性的异硫

代氰酸盐衍生物之一。研究表明, 异硫代氰酸盐衍生物可通过升高 HepG-2 细胞内钙离子浓度来诱

导其凋亡^[5], 还可通过增加 HepG-2 细胞内活性氧的产生, 引起线粒体膜电位下降而引起细胞凋亡^[6]。细胞凋亡是细胞自我保护的一个复杂的过程, 可被多种信号调控, 而这些信号之间多为相互影响。本研究旨在前期实验的基础上, 阐明 SFN 诱导 HepG-2 细胞凋亡的作用及 p38MAPK 通路在 SFN 诱导 HepG-2 细胞凋亡过程中的作用。

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是真核细胞内重要的信号转导通路, 可将多种胞外刺激传递至细胞内, 参与细胞生长、发育、分裂等多种过程^[7]。p38MAPK 是 MAPK 家族中的重要成员, 可被多种刺激所激活。研究表明, p38MAPK 通路的激活与细胞凋亡密切相关,

可通过增强 c-myc 表达、磷酸化 p53、增强 TNF- α 表达来介导细胞凋亡, 还可以参与 Fas/ FasL 介导的凋亡。同时, p38MAPK 诱导细胞凋亡可通过凋亡执行通路中心 Caspases 家族来实现, Caspases 可阻断对 p38 的激活, 从而导致细胞凋亡^[8]。我们前期研究发现, SFN 可使 HepG-2 细胞内的 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性升高。而本实验研究发现, SFN 可诱导 HepG-2 细胞凋亡, 同时可上调 HepG-2 细胞内 p-p38 蛋白的表达, 而对 p38 的表达无明显影响, 表明 SFN 诱导的 HepG-2 细胞凋亡可能与其阻断 p38MAPK 途径有关。

参考文献:

- [1] Hu R, Hebbar V, Kim B R, et al. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310 (1): 263-271.
- [2] Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane [J]. *Cancer Lett*. 2008, 269 (2): 291-304.
- [3] Mandal C, Dutta A, Mallick A, et al. Withaferin A induces apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in leukemic cells of lymphoid and myeloid origin through mitochondrial death cascade[J]. *Apoptosis*, 2008, 13 (12): 1450-1464.
- [4] Moosavi M A, Yazdanparast R, Lotfi A. ERK1/2 inactivation and p-38 MAPK-dependent caspase activation during guanosine5'-triphosphate-mediated terminal erythroid differentiation of K562 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39 (9): 1685-1697.
- [5] 季宇彬, 武晓丹, 邹翔. 西兰花中葡萄糖异硫氰酸盐诱导 HepG-2 细胞凋亡[J]. *中国天然药物*, 2007, 5(4): 293-296.
- [6] 季宇彬, 池文杰, 邹翔. 西兰花中异硫氰酸盐诱导人肝癌细胞 HepG-2 凋亡作用及其机制的研究[J]. *中国中药杂志*. 2007, 32 (7): 612-615.
- [7] Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway[J]. *Cell Signal*, 2006, 18 (6): 753-760.
- [8] Liu S I, Huang C C, Huang C J, et al. Thimerosal induced apoptosis in human SCM1 gastric cancer cells: activation of p38 MAP kinase and caspase-3 pathways without involvement of $[Ca^{2+}]$ elevation[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100 (1): 109-117.