

香叶木苷对人肝癌 HepG2 细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 基因表达的影响

崔明宇¹, 崔轶琼¹, 刘媛媛¹, 马英丽¹, 高杰²

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150080

摘要: **目的** 研究香叶木苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用, 并探讨其相关分子机制。**方法** 将 HepG2 细胞分为对照组和香叶木苷组, 香叶木苷组分别加入终质量浓度为 1、5、25 $\mu\text{g/mL}$ 的香叶木苷 DMSO 溶液, 对照组加入等体积的 DMSO。药物处理 24 h 后, 台盼蓝染色及 Live/Dead 染色检测香叶木苷对 HepG2 细胞活性的影响; CCK-8 及 EdU 染色检测香叶木苷对 HepG2 细胞增殖的影响; TUNEL 染色检测香叶木苷对 HepG2 细胞凋亡的影响; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及 Western blotting 法检测香叶木苷对 Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白水平的影响。**结果** 与对照组比较, 香叶木苷降低 HepG2 细胞活力、抑制细胞增殖, 5、25 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 促进 HepG2 细胞凋亡, 各浓度组均差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001), 且均呈剂量相关性。经 5 $\mu\text{g/mL}$ 香叶木苷处理后, HepG2 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.001$), 而促凋亡蛋白 Bax 的 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.001$), Bcl-2/Bax 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$)。**结论** 香叶木苷抑制 HepG2 细胞活力和增殖、促进凋亡, 作用机制与调控 Bcl-2/Bax 表达有关。

关键词: 香叶木苷; 细胞增殖; 细胞凋亡; Bcl-2/Bax; 肝癌; HepG2 细胞

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 11-1958-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.005

Effect of diosmin on apoptosis and protein expression of Bcl-2/Bax in HepG2 cell

CUI Mingyu¹, CUI Yiqiong¹, LIU Yuanyuan¹, MA Yingli¹, GAO Jie²

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150080, China

2. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine Harbin, Harbin 150080, China

Abstract: **Objective** To study the effects of diosmin on proliferation inhibition and apoptosis of human hepatoma HepG2 cells and to explore its molecular mechanism. **Methods** HepG2 cells were divided into control group and diosmin group. Diosmin group was added DMSO solution with the final concentration of 1, 5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, and control group was added DMSO with the same volume. After treatment for 24 h, Trypan blue staining and Live/Dead staining were performed to test the effect of diosmin on the cell viability. CCK-8 assay and EdU staining were applied to test the influence of diosmin on the proliferation of HepG2. TUNEL staining was performed to detect the effect of diosmin on apoptosis of HepG2. QRT-PCR and western blotting were applied to test the expressions of apoptotic-related proteins in each group. **Results** Compared with the control group, diosmin decreased the cell viability and inhibited the proliferation of HepG2 cells, and there were significant differences between 5 and 25 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001), and promoted the apoptosis of HepG2 cells in all concentration groups ($P < 0.01$ and 0.001), all were dose related. After 5 $\mu\text{g/mL}$ diosmin treatment, the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 mRNA in HepG2 cells decreased significantly ($P < 0.001$), while the expression of pro-apoptotic protein Bax mRNA increased significantly ($P < 0.001$). The level of Bcl-2/Bax protein decreased significantly ($P < 0.001$). **Conclusion** Diosmin could decrease cell viability and proliferation, as well as promote apoptosis of HepG2 by regulating Bcl-2/Bax pathway. These findings may represent a new idea for drug therapy of liver cancer.

Key words: diosmin; proliferation; apoptosis; Bcl-2/Bax; liver cancer; HepG2 cell

收稿日期: 2018-04-11

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(H2015044, H2015045); 国家自然科学基金项目(81274034)

第一作者: 崔明宇(1971—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药活性成分与药物动力学研究。Tel: (0451)87266902

Email: cuimingyu1971@163.com

香叶木昔(diosmin)为香叶木素-7-O-芸香苷(3',5,7-三羟基-4'-甲氧基黄酮-7-O-芸香苷),存在于蓬子菜、薄荷、半边莲等多种天然植物中^[1-4]。近年研究表明,香叶木昔具有良好的抗肿瘤活性,可诱导人表皮癌细胞与肺癌细胞的凋亡^[5-6]、抑制黑色素细胞瘤^[7]的转移等,目前尚无香叶木昔对人肝癌细胞系HepG2凋亡的作用及机制研究。本研究旨在香叶木昔对HepG2的凋亡作用,揭示其相关分子机制,发现调控HepG2凋亡的新靶点,为临床肝癌疾病的预防和治疗提供新思路。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

香叶木昔(实验室自提,质量分数>98%);DMEM培养液、胎牛血清(Hyclone,美国);胰酶消化液、台盼蓝染色液C0011、CCK-8试剂盒C0038(碧云天生物技术有限公司);EdU试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司);RNA Trizol(Sigma-Aldrich,德国);TUNEL凋亡检测试剂盒(Roche,瑞士);Live/Dead试剂盒(Invitrogen,美国);荧光实时定量PCR(qRT-PCR)引物(Invitrogen,美国);SYBR Green(Roche,瑞士);Bcl-2、Bax、GAPDH抗体(Abcam,英国)。

1.2 细胞

人肝癌细胞系HepG2(购自于中国科学院细胞库)。

1.3 主要仪器

CO₂恒温培养箱(Thermo,美国);倒置显微镜(Nikon-TS100,日本);逆转录-聚合酶链反应仪(Fermentas,美国)。

2 方法

2.1 细胞培养

以含10%胎牛血清的DMEM培养液于37℃、5% CO₂培养箱中培养HepG2细胞,细胞密度达80%~90%时,加入0.25%胰酶消化液消化,消化完成后加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,并不断吹打以制成单细胞悬液,进行传代培养。

2.2 药物处理

将细胞均匀铺于6/24/96孔板中,待细胞密度达80%~90%时进行药物处理,香叶木昔组分别加入终质量浓度为1、5、25 μg/mL的香叶木昔DMSO溶液^[8],对照组加入等体积的DMSO。

2.3 台盼蓝染色细胞活性检测

取对数生长期的HepG2细胞,以3×10⁵/mL的密度、每孔100 μL接种于96孔板。培养箱中培养4 h

后,按照“2.2”项方法分组给药,每组设置6个复孔,培养24 h后收集细胞。向10 mL离心管内加入100 μL HepG2单细胞悬液和100 μL台盼蓝染色液,轻轻混匀,染色3 min。使用CountStar细胞计数仪对死亡细胞进行计数并记录,计算细胞死亡率。

细胞死亡率=死亡细胞数量/细胞总数

2.4 Live/Dead染色检测细胞活力

取对数生长期的HepG2细胞,以3×10⁵/mL的密度、每孔500 μL接种于24孔板。培养箱中培养4 h后,按照“2.2”项方法分组给药,每组设置3个复孔,培养24 h后收集细胞。按Live/Dead细胞活性试剂盒说明进行操作,弃去细胞培养板中原有培养液,加入1 mL新鲜培养液和1 mL染色剂(1 μL A液混合4 μL B液共同加入至2 mL PBS中),孵育15 min后弃去染液并用PBS冲洗。加入5 μg/mL DAPI核染液孵育细胞10 min,弃去染液并用PBS冲洗后于荧光显微镜下观察。

2.5 CCK-8细胞增殖检测

取对数生长期的HepG2细胞,以3×10⁵/mL的密度、每孔100 μL接种于96孔板。培养箱中培养4 h后,按照“2.2”项方法分组给药,每组设置6个复孔,培养24 h后收集细胞。弃去96孔板中原有培养液,在避光条件下加入100 μL无血清培养液以及20 μL CCK-8溶液,设置无细胞的副孔为空白对照组。将细胞孔板置于细胞培养箱中避光孵育2 h,酶标仪于450 nm处测吸光度(A₄₅₀)值。

2.6 EdU细胞增殖检测

取对数生长期的HepG2细胞,以3×10⁵/mL的密度、每孔500 μL接种于24孔板。培养箱中培养4 h后,按照“2.2”项方法分组给药,每组设置3个复孔。加药处理24 h后弃去原有培养液,每孔加入1 mL无血清培养液及100 μL 50 μmol/L EdU培养液孵育细胞2 h,弃去培养液并用PBS清洗细胞。加入5 μg/mL DAPI核染液孵育细胞10 min,弃去染液并用PBS冲洗后于荧光显微镜下观察。

2.7 TUNEL法检测细胞凋亡

取对数生长期的HepG2细胞,以3×10⁵/mL的密度、每孔500 μL接种于24孔板。培养箱中培养4 h后,按照“2.2”项方法分组给药,每组设置3个复孔。加药处理24 h后弃去原有培养液,应用4%多聚甲醛固定液室温固定细胞30 min,弃去固定液并清洗细胞后室温避光封闭细胞10 min[封闭液为3% H₂O₂-CH₃OH(1:9)],弃去封闭液并清洗细胞后于4℃环境中应用穿透液[0.1% Triton-0.1% 枸橼酸

钠(1:1 000)]穿透5 min,弃去穿透液并清洗细胞后,每孔加入配好的50 μ L vial 1和450 μ L vial 2混合液,37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h后去掉染液并用PBS冲洗。避光复染5 μ g/mL DAPI核染液10 min。去掉DAPI染色液后用PBS冲洗,荧光显微镜下观察,计数TUNEL阳性细胞率。

2.8 qRT-PCR法检测Bcl-2、Bax mRNA的表达

取对数生长期的HepG2细胞,以 3×10^5 /mL的密度、每孔500 μ L接种于24孔板。培养箱中培养4 h后,分为对照组和香叶木苣组,香叶木苣组分别加入终质量浓度为5 μ g/mL的香叶木苣DMSO溶液,对照组加入等体积的DMSO,每组设置3个复孔,培养24 h后收集细胞。应用Trizol试剂提取各组细胞中的总RNA,应用逆转录试剂盒将RNA逆转录合成cDNA。PCR反应体系:10 μ L SYBR Green,7 μ L蒸馏水,1 μ L上游引物,1 μ L下游引物及1 μ L逆转录产物,应用PCR扩增仪进行扩增。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C、30 s;95 $^{\circ}$ C、5 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s共40个循环;用SYBR Green检测待测基因的mRNA水平($n=3$),mRNA水平用GAPDH作内参标化,以 $\Delta\Delta C$ 法定量分析。引物序列见表1。

2.9 Western blotting检测Bcl-2、Bax的蛋白表达

取对数生长期的HepG2细胞,以 3×10^5 /mL的密度、每孔1 mL接种于24孔板。培养箱中培养4 h后,分为对照组和香叶木苣组,香叶木苣组分别加入终质量浓度为5 μ g/mL的香叶木苣DMSO溶液,对照组加入等体积的DMSO,每组设置3个复孔,培养24 h后收集细胞。提取各处理组细胞蛋白样品并以BCA试剂盒测定蛋白浓度,样品煮5 min后,进行SDS-PAGE(10%~15%)凝胶电泳,然后转移到PVDF膜。在室温下用牛奶封闭PVDF膜2 h,用Bcl-2、Bax、GAPDH一抗孵膜4 $^{\circ}$ C过夜,冲洗后用二抗室温孵育1 h。免疫印记条带用Odyssey v1.2软件测量荧光强度,用GAPDH作内参标化。

2.10 统计学处理

用ANOVA软件对所有数据进行统计学处理,数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,样本均数间的比较用 t 检验。

3 结果

3.1 香叶木苣对HepG2细胞活力的影响

台盼蓝细胞活性检测结果表明,与对照组比较,经香叶木苣处理后,HepG2细胞死亡率增加,其中5、25 μ g/mL组差异显著($P<0.05$ 、 0.01),且呈浓度相关性,结果见图1A。

Live/Dead染色结果表明,随着香叶木苣浓度的增加,HepG2中绿染的活细胞数量呈剂量相关性减少,而红染的死亡细胞数量明显增多,表明香叶木苣能够显著抑制HepG2细胞活性,结果见图1B。

3.2 香叶木苣对HepG2细胞增殖的影响

CCK-8细胞增殖检测结果表明,与对照组比较,经不同浓度香叶木苣处理后,HepG2的细胞增殖能力明显降低,且呈浓度相关性,其中5、25 μ g/mL组差异显著($P<0.05$ 、 0.001),结果见图2A。

EdU细胞增殖检测染色结果表明,随香叶木苣浓度的增加,HepG2中红染细胞即EdU阳性细胞数量逐渐减少,表明香叶木苣能够显著抑制HepG2细胞增殖能力,结果见图2B。

3.3 香叶木苣对HepG2细胞凋亡的影响

TUNEL染色结果表明,与对照组比较,加入不同浓度香叶木苣处理后,HepG2中TUNEL阳性细胞,即绿染细胞数量呈剂量相关性增多,表明凋亡细胞数量不断增加,即香叶木苣能够显著促进HepG2细胞凋亡,各浓度组均差异显著($P<0.01$ 、 0.001),结果见图3。

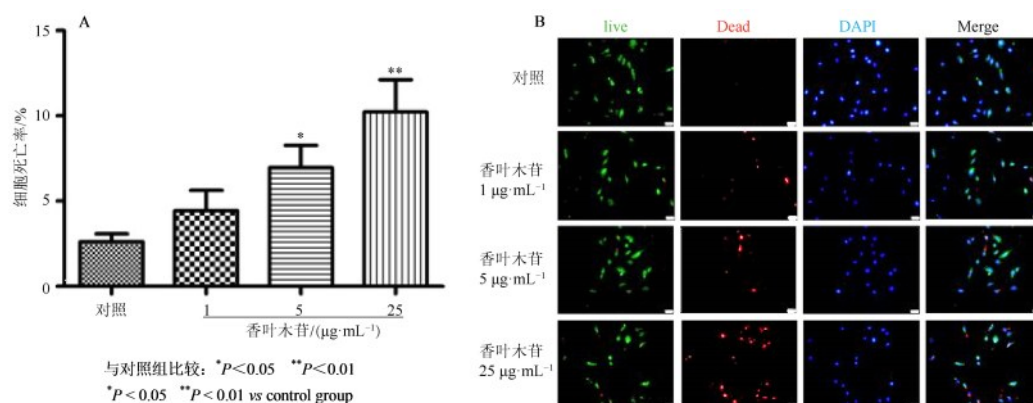
3.4 香叶木苣对HepG2细胞Bcl-2、Bax表达的影响

qRT-PCR结果显示,与对照组比较,经5 μ g/mL香叶木苣处理后,HepG2细胞中促凋亡蛋白Bax的mRNA水平显著升高($P<0.001$),而抗凋亡蛋白Bcl-2的mRNA水平显著降低($P<0.001$),结果见图4A。Western blotting结果表明,与对照组比较,经5 μ g/mL香叶木苣处理后,HepG2细胞中Bax的蛋白水平显著升高,而Bcl-2的蛋白表达显著降低,Bcl-2/Bax水平显著降低($P<0.001$),结果见图4B。结果表明,香叶木苣能够通过调控Bcl-2/Bax通路促进HepG2的细胞凋亡。

表1 Real-time PCR引物序列

Table 1 Real-time PCR primer sequences

基因	正向引物(3'-5')	反向引物(3'-5')
Bcl-2	ACAACCTGACTGACCCTTCG	TCATGATGTCCGTGGTCAAT
Bax	CAGCCGCTTCACCTACAGC	TTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGAC	CCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG

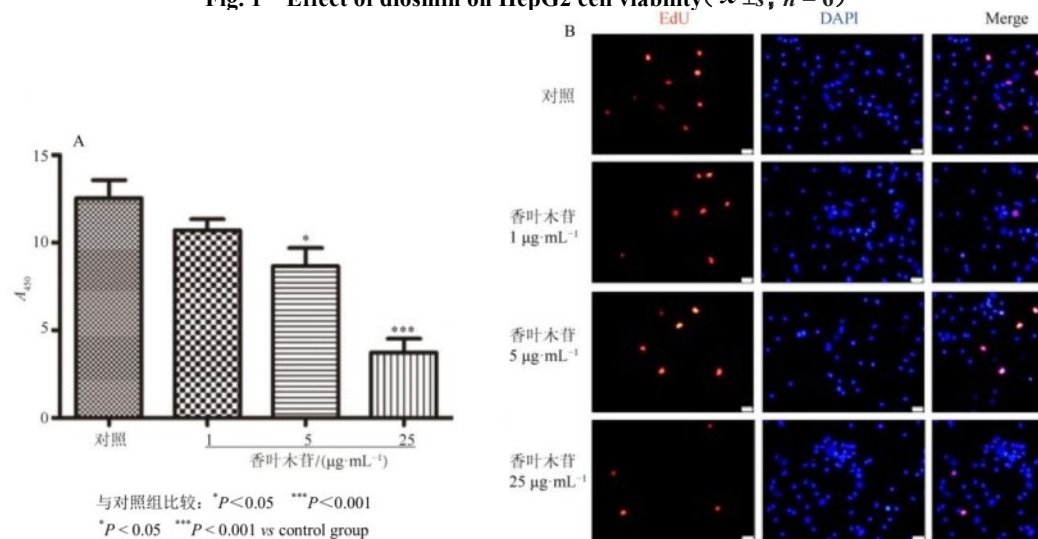


A: 台盼蓝细胞活性检测; B: Live/Dead 染色。

A: Trypan blue cell activity assay; B: Live/Dead staining.

图1 香叶木苷对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of diosmin on HepG2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

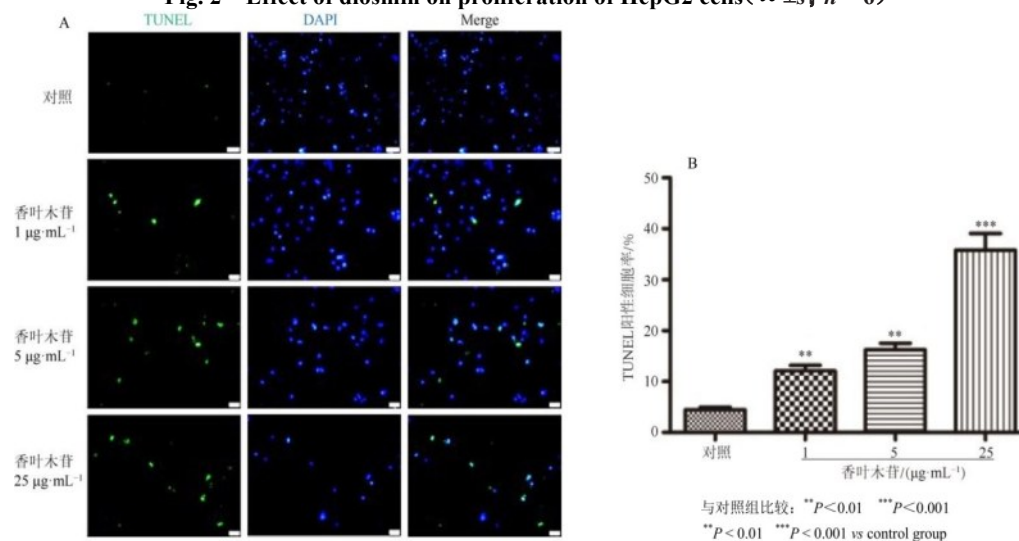


A: CCK-8 细胞增殖检测; B: EdU 细胞增殖检测。

A: CCK-8 cell proliferation assay; B: EdU cell proliferation assay.

图2 香叶木苷对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of diosmin on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

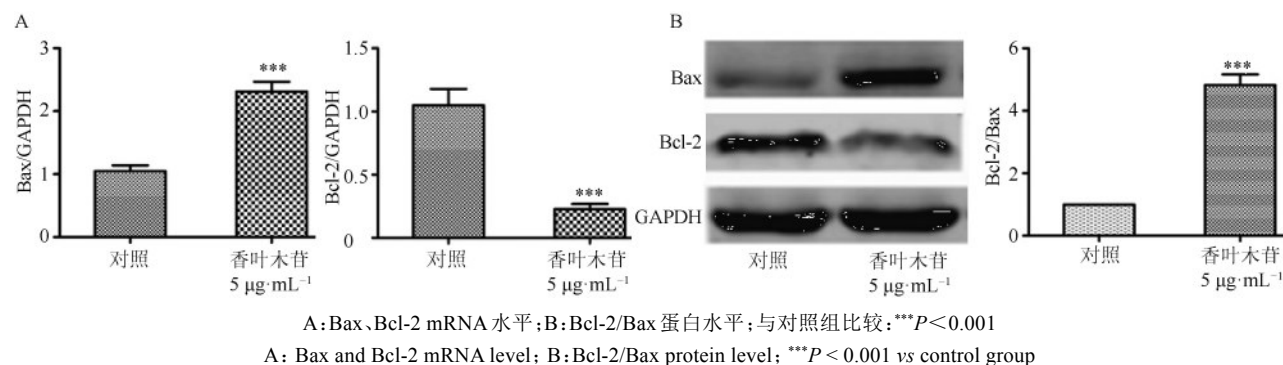


A: TUNEL 染色检测细胞凋亡; B: TUNEL 染色阳性细胞率。

A: TUNEL staining was used to detect apoptosis; B: TUNEL staining positive cell rate.

图3 香叶木苷对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of diosmin on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A: Bax、Bcl-2 mRNA 水平; B: Bcl-2/Bax 蛋白水平; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

A: Bax and Bcl-2 mRNA level; B: Bcl-2/Bax protein level; *** $P < 0.001$ vs control group

图4 香叶木苷对 HepG2 细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of Diosmin on expression of Bcl-2 and Bax in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

香叶木苷作为静脉治疗药物已在临床应用多年,并获得了良好的治疗效果。近年来的药理研究证明,其具有降糖^[9]、降压^[10]、保护心肌^[11]、抗癌等多方面的生物活性,随着癌症高发性的不断增强,香叶木苷的抗癌活性亦日渐成为研究的热点。Dung 等^[8]研究表明,香叶木苷可通过 p53 抑癌基因的激活和对 PI3K-Akt-MDM2 信号通路的抑制作用抑制 HA22T 肝癌细胞的增殖。Martínez Conesa C 等^[7]研究发现香叶木苷对黑色素细胞瘤的转移具有显著抑制作用。

Bcl-2、Bax 是细胞线粒体凋亡通路的重要组成成员,二者协同引起线粒体膜通透性改变,使跨膜电位消失,并释放细胞色素 C,细胞色素 C 可与凋亡蛋白酶活化因子形成多聚复合体(Apaf-1),再通过 Apaf-1 氨基端的 Caspase 募集结构域募集胞质中的 Caspase-9 前体,启动 Caspase 级联反应,激活下游 Caspase-3 和 Caspase-7,完成其相应底物的剪切,引起细胞凋亡^[12]。

为进一步探究香叶木苷的抗癌活性,本研究通过体外实验考察了香叶木苷对 HepG2 细胞活力、增殖的影响及促凋亡的作用机制。结果表明,香叶木苷可剂量相关性地抑制 HepG2 的细胞活力和增殖能力,同时促进其凋亡。使 HepG2 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达均降低,而促凋亡蛋白 Bax 的 mRNA 和蛋白表达均升高。

本研究结果表明,香叶木苷能够通过调控 Bcl-2/Bax 比例,促进线粒体细胞凋亡通路的发生,引起 HepG2 细胞凋亡。

参考文献

- [1] 马英丽, 卢卫红, 于晓敏, 等. 蓬子菜的化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1464-1466.
- [2] 徐晶晶, 徐超, 刘斌. 不同采收期薄荷中 4 个黄酮苷的

含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2077-2081.

- [3] 姜艳艳, 石任兵, 刘斌, 等. 半边莲中黄酮类化学成分研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 59-61.
- [4] 董坤, 寇韩旭, 宁馨, 等. 蓬子菜中香叶木苷抗急性血瘀作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 207-210.
- [5] Buddhan R, Manoharan S. Diosmin reduces cell viability of A431 skin cancer cells through apoptotic induction [J]. Cancer Res Ther, 2017, 13(3): 471-476.
- [6] Lewinska A, Adameczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, et al. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity [J]. Toxicol Lett, 2017, 265: 117-130.
- [7] Martínez Conesa C, Vicente Ortega V, Yáñezgascón M J, et al. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(17): 6791-6797.
- [8] Dung T D, Day C H, Binh T V, et al. PP2A mediates diosmin p53 activation to block HA22T cell proliferation and tumor growth in xenografted nude mice through PI3K-Akt-MDM2 signaling suppression [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(5): 1802-1810.
- [9] Srinivasan S, Pari L. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats [J]. Chem Biol Interact, 2012, 195(1): 43-51.
- [10] Silambarasan T, Raja B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 679(1-3): 81-89.
- [11] Queenthly S S, John B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 718 (1-3): 213-218.
- [12] 梁凯, 曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展 [J]. 生物医学工程与临床, 2014, 18(5): 501-505.