

- [J]. 中草药, 2008, 39(1): 74-78
- [5] Chen J, Gu H Y, Lu N, *et al.* Microtubule depolymerization and phosphorylation of c-Jun 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 $\alpha$  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, 李峰. 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.* Overexpression 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>, 王剑宇<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

caspase 8, and PARP, regarded as the protein mark of apoptosis induced by TNF- $\alpha$ , were determined by Western blotting; After treating with chrysin for different times, the time course of apoptosis inhibitory protein, such as Bcl-xL, and cIAPs, xIAP, and cFLIP, were also detected using Western blotting. **Results** The cell death increasing was observed in the group with combination of chrysin and TNF- $\alpha$ , but no obvious cell death could be found in chrysin, TNF- $\alpha$  alone, and control groups. The data of sub-G1 supported this result that, with the enhancement of pretreatment dose of chrysin, the percentage of sub-G1 reached  $(27.84 \pm 0.54)\%$ . There was significant difference between the combined group and the control one  $(1.52 \pm 0.13)\%$  ( $P < 0.05$ ) and obvious dose-dependent effect could be found. But the percentages of sub-G1 in chrysin and TNF- $\alpha$  alone groups were all under 5%, and there were no significant differences compared to the control group ( $P > 0.05$ ). Chromatin condensation which was the indication of apoptosis could be observed when the cells were stained by Hoechst 33342; The proprotein of caspase 3, caspase 8, and PARP degraded, their cleavage appeared, and there were dose-dependent effects; The pair caspase inhibitor  $\alpha$ -VAD-fmk could inhibit the apoptosis of HepG2 cells which were treated with the combination of chrysin and TNF- $\alpha$ , according to the percentage of sub-G1 and the activation of caspase 3, caspase 8, and PARP; The apoptosis inhibitory protein cFLIP-L could be observed the down regulation compared to the control group in a time dependent way. Other inhibitory protein, such as Bcl-xL, xIAP did not change too much. **Conclusion** Chrysin could accelerate the apoptosis induced by TNF- $\alpha$ , the down regulation of apoptosis inhibitory protein cFLIP-L, which is regulated by NF- $\kappa$ B and augmented by TNF- $\alpha$ , and plays an important role in the acceleration of apoptosis.

**Key words:** chrysin; tumor necrosis factor (TNF); apoptosis

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是具有广泛生物功能的前炎性细胞因子。TNF- $\alpha$  与细胞膜表面受体 (TNFR1) 结合后 TRADD (TNFR1 associated death domain protein) 形成 TNFR1/TRADD 复合体, 该复合体“招募”一系列相关蛋白, 引发不同的下游信号通路: 招募 FADD (fas associated death domain protein) 激活 caspase 8 (属于 ICE/CED3 半胱氨酸蛋白酶家族), 进而活化 caspase 3, 通过级联放大反应, 诱导细胞凋亡; 另一方面招募 RIP (receptor-interacting protein) 和 TRAF2 (TNFR associated factor 2) 激活核转录因子 (NF- $\kappa$ B), NF- $\kappa$ B 通过调节系列凋亡抑制基因, 如 Bcl-xL、cIAPs、x-IAP、cFLIP<sup>[1]</sup> 表达凋亡抑制蛋白来调控细胞凋亡<sup>[2]</sup>。所以 TNF- $\alpha$  信号途径既可促进细胞存活又可诱导细胞死亡, 十分复杂。在大部分细胞, TNF- $\alpha$  与受体结合后同时活化两种途径, 在细胞死亡与细胞存活间保持平衡, 但多以 NF- $\kappa$ B 调节的各种功能为主要表现<sup>[2,3]</sup>, 所以并不会出现明显增加的肿瘤细胞死亡。发挥 TNF- $\alpha$  抗肿瘤活性、提高 TNF- $\alpha$  诱导细胞凋亡能力, 抑制或阻断 NF- $\kappa$ B 信号途径是关键<sup>[2,3]</sup>。

白杨素 (chrysin) 是黄芩、蜂蜜及蜂胶中的一种黄酮类物质, 化学名 5, 7-二羟基黄酮 (5, 7-dihydroxyflavone)。虽然分子机制尚不明确, 但近年在动物试验和体外研究中均观察到白杨素及其衍

生物具有一定的肿瘤预防<sup>[4]</sup> 和抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[5-10]</sup>。近期在白杨素抗炎作用研究中发现: 白杨素在拮抗脂多糖 (LPS) 刺激的炎症反应时抑制了 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[9,10]</sup>。如果将白杨素以小剂量甚至食用量与 TNF- $\alpha$  联合应用, 发挥白杨素抑制 NF- $\kappa$ B 途径的作用, 表现 TNF- $\alpha$  促进凋亡的作用, 则既能保持白杨素天然优势, 又可有效增强 TNF- $\alpha$  抗肿瘤活性, 为中西医结合防治肿瘤开拓新的思路。本研究拟在细胞和分子水平, 探讨白杨素能否辅助提高 TNF- $\alpha$  诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的能力, 并对其机制进行初步探讨。

## 1 材料

1.1 药物与试剂: 白杨素、荧光染料碘化丙啶 (PI)、二甲基亚砜 (DMSO) 和 RNase A 购于 Sigma 公司; 人重组 TNF- $\alpha$  购于 R&D 公司 (溶于 1% 牛血清白蛋白, 配成 100  $\mu$ g/mL 的储存液待用); 全半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 抑制剂  $\alpha$ -VAD-fmk 购于 Bio Mol 公司; 抗 caspase 3 抗体购于 Calbiochem 公司; 抗 Bcl-xL 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司; 抗 x-IAP、抗 cIAP2 和抗 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体购于 BD 公司 (San Diego, CA); 抗 cIAP1 和抗 tubulin 抗体购于 Santa Cruz 生物技术公司 (Santa Cruz, CA); 抗 cFLIP 抗体购于 Alexis, 抗 caspase 8 抗体购于 Pharmingen 公司; SDS-PAGE、PVDF 膜购于

Bio-Rad; 化学显色试剂购于 Thermo Scientific。

1.2 主要仪器: 奥林巴斯荧光倒置相差显微镜, 流式细胞仪, FACS 公司, Kodak Image Station 440CF。

## 2 方法

2.1 细胞及培养条件: 人肝癌细胞 HepG2 来源于美国 ATCC, 细胞培养基 DMEM 购自 Sigma 公司, 10% 新生小牛血清 (FBS) 和青、链霉素, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下进行单层培养、传代, 取指数生长期细胞进行实验。

2.2 样品制备及细胞处理: 白杨素以 DMSO 配制为 20 mmol/L 储备液, 使用时再以培养基稀释为应用液, 以 10、20、40 μmol/L 单独或提前 2 h 预处理后联合 TNF-α (10 ng/mL) 处理 HepG2, 根据检测需要收获细胞。

2.3 细胞形态学观察: 根据设计剂量以白杨素 (10、20、40 μmol/L) 单独或联合 TNF-α (5、10、20 ng/mL) 处理细胞 24 h 后, 于普通倒置显微镜下进行观察, 根据形态改变筛选白杨素和 TNF-α 单独作用不出现明显的细胞死亡, 而联合使用后细胞数量明显减少、死亡细胞明显增加的联合剂量组; 在试验观察终点以 Hoechst 33342 荧光染料 (50 μg/mL) 对细胞染色, 荧光倒置显微镜下初步分析细胞死亡类型, 获得定性资料并作为以下机制研究的基础。

2.4 流式细胞术检测: 收集经不同处理的试验组和未做任何处理组 HepG2 细胞, 离心 (1 000 r/min, 10 min), 弃上清, 冷 PBS (pH 7.0~7.4) 漂洗 2 次, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 以去除细胞碎片, 加 0.5 mL PBS 充分吹打, 细胞数调整在  $1 \times 10^5$ /L, 直接加入 0.5 mL 冰冷的 70% 乙醇中, 4 °C 冰箱保存 (可保存 1~2 周)。将制备好的单细胞悬液固定液弃去 (1 000 r/min, 10 min), 冷 PBS 漂洗 2 次 (10 000 r/min, 5 min), 调整细胞为  $1 \times 10^5$ /L, 加入 PI 染液 1.0 mL (0.1% Triton X-100, RNase A 0.2 mg/mL, PI 20 μg/mL), 置于 4 °C 冰箱, 染色 30 min 后, 流式细胞仪进行分析, 数据由 Cell Quest 软件收集、贮存和分析, 获得 subG<sub>1</sub> 细胞死亡的定量资料。

2.5 Western blotting 分析蛋白表达: 收集经不同处理的试验组和未做任何处理组 HepG2 细胞, 以蛋白裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L NaF 和 protease inhibitor cocktail (Roche)] 提取蛋白质, 定量后 SDS-

PAGE 分离。转膜后先后与 1% 脱脂奶粉、一抗、过氧化物酶偶联的二抗孵育, 化学发光试剂曝光, 用 Kodak 图像分析系统对 PARP、caspase 8、caspase 3、cFLIP、cIAP1、cIAP2、x-IAP、Bcl-xL 进行比较分析, 实验重复 3 次。

2.6 统计学处理: 采用 SPSS 11.0 统计分析软件, 组间两两比较采用 one-way ANOVA 方法进行分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

3.1 白杨素对 TNF-α 诱导 HepG2 细胞死亡的影响

3.1.1 形态学观察: 结果见图 1。以白杨素 (10、20、40 μmol/L) 单独或联合 TNF-α (5、10、20、40 ng/mL) 处理 HepG2 细胞, 在普通倒置显微镜下观察细胞形态变化和死亡情况, 初步筛选 TNF-α 单独作用不出现明显细胞死亡的最大剂量 10 ng/mL 作为以下各试验中 TNF-α 的使用剂量。各种质量浓度白杨素预处理 2 h 后联合 TNF-α 共同处理 24 h 后, 观察到白杨素 40 μmol/L 联合 10 ng/mL TNF-α 组 HepG2 细胞死亡数量明显增加, 而对照组、白杨素和 TNF-α 单独作用组没有明显的细胞死亡现象。

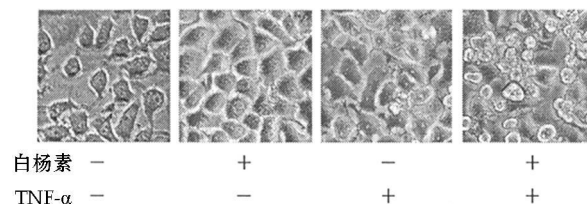


图 1 形态学观察白杨素预处理对 TNF-α 诱导的 HepG2 细胞死亡的影响

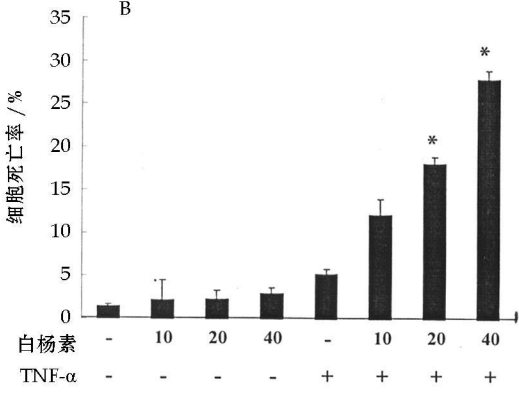
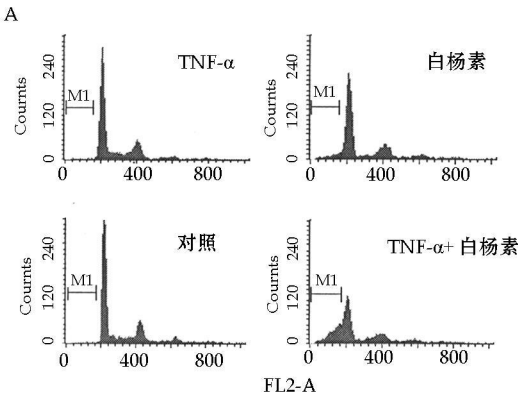
Fig. 1 Influence of chrysin pretreatment on HepG2 cell death induced by TNF-α

3.1.2 流式细胞术检测 subG<sub>1</sub> 改变: 以不同浓度白杨素 (10、20、40 μmol/L) 单独或联合 TNF-α 10 ng/mL 处理 HepG2 细胞, 于 24 h 收获细胞, 流式细胞术检测在 DNA 的 G<sub>1</sub> 峰前的亚二倍体峰 (subG<sub>1</sub> 峰)。白杨素 (40 μmol/L) 预处理 2 h 后 TNF-α (10 ng/mL) 处理 24 h 后 HepG2 细胞 subG<sub>1</sub> 明显增高, 而对照组、白杨素和 TNF-α 单独处理组则没有明显改变 (图 2A)。同时对 subG<sub>1</sub> 峰进行定量分析表明, 白杨素与 TNF-α 联合处理组随着白杨素浓度增加, subG<sub>1</sub> 峰比例显著增加, 有明显的剂量反应关系; 当白杨素达到 40 μmol/L 时, TNF-α 诱导的 HepG2 细胞 subG<sub>1</sub> 峰比例已达到 (27.84 ± 0.54)%, 而对照组仅为 (1.52 ± 0.13)%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 2B)。

3 2 白杨素增强 TNF-α 诱导的 HepG2 细胞死亡为细胞凋亡

3 2 1 白杨素联合 TNF-α 处理 HepG2 细胞后细胞形态的改变: 凋亡中晚期染色质在局部区域凝集, 固缩, 继而核碎裂出现凋亡小体。在 Hoechst 染色下, 细胞核或者凋亡小体内的 DNA 会呈现蓝色的致密浓染或者碎块状致密浓染, 白杨素 40 μmol/L

预处理 2 h 后联合 TNF-α 10 ng/mL 共同处理 24 h 后, 可见联合处理组浓染的凋亡细胞明显增加, 而对照组和单独的白杨素、TNF-α 组未见明显改变 (图 3 A)。计数 200 个细胞中的凋亡细胞数, 计算凋亡细胞率, 联合处理组的细胞凋亡率达 (55.50 ± 4.50) %, 对照组为 (3.00 ± 1.32) %, 差异有统计意义 (图 3 B)。

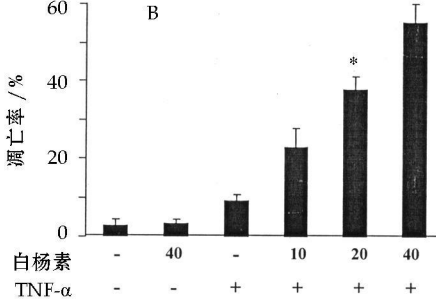
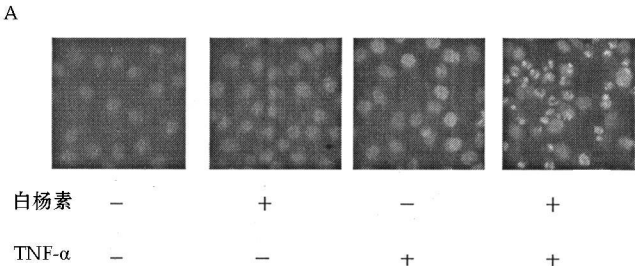


与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 2 流式细胞术检测 sub G1 结果

Fig. 2 Results of sub G1 detected by flow cytometry



与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 3 Hoechst 33342 染色后荧光显微镜下观察白杨素预处理对 TNF-α 诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 3 After staining by Hoechst 33342 influences of chrysin pretreatment on apoptosis of HepG2 induced by TNF-α

3 2 2 白杨素联合 TNF-α 处理 HepG2 细胞对凋亡标志蛋白的影响: 对 caspase 3、caspase 8 和 PARP 原蛋白及其裂解产物进行 Western blotting 检测分析, TNF-α (10 ng/mL) 固定剂量下, 可观察到随着预处理白杨素剂量 (10、20、40 μmol/L) 的增加, PARP (116 000)、caspase 8 (57 000) 和 caspase 3 (30 000) 原蛋白逐渐减少, 而相应的降解产物 PARP (87 000)、caspase 8 (43 000、41 000、17 000) 明显增加, 并有一定的剂量依赖性。Caspase 3 的降解产物难于观察, tubulin 作为内参。对照组和单独的白杨素、TNF-α 组未见明显改变 (图 4)。

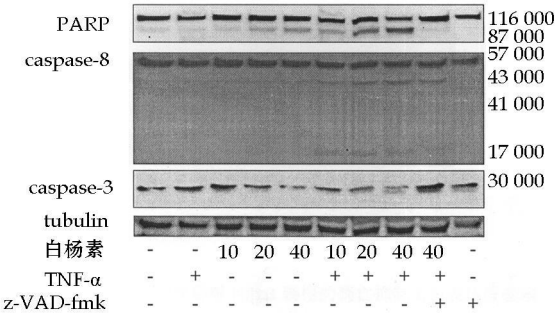
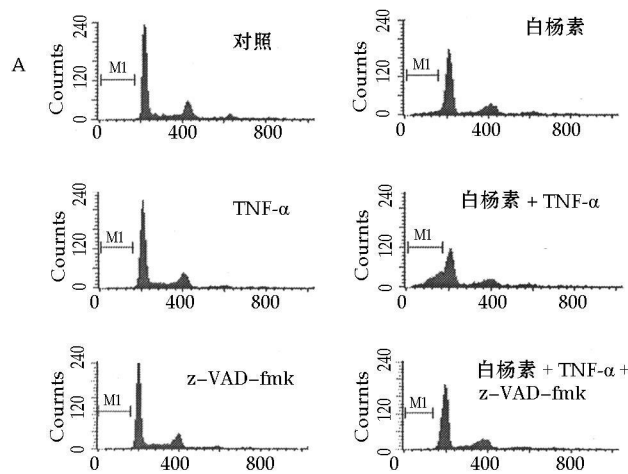


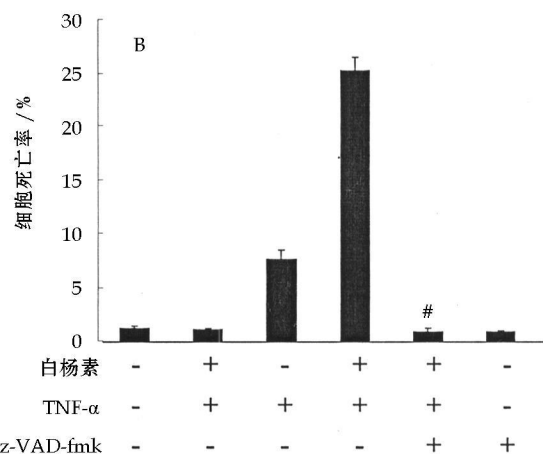
图 4 联合白杨素和 TNF-α 处理 HepG2 细胞对凋亡标志蛋白的影响

Fig. 4 Effects of combination of chrysin and TNF-α on protein marks of apoptosis in HepG2 cells

3.2.3 caspase 抑制剂  $\alpha$ -VAD-fmk 对白杨素联合 TNF- $\alpha$  诱导的 HepG2 细胞凋亡的影响: 作为全 caspase 酶的抑制剂  $\alpha$ -VAD-fmk 能阻止包括 caspase-3、caspase-8 在内的所有 caspase 家族的活化裂解, 从而阻断凋亡的信号途径, 抑制凋亡。 $\alpha$ -VAD-fmk (50  $\mu$ mol/L) 预处理 30 min 可观察到白杨素 (40  $\mu$ mol/L) 联合 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 处理引起的细胞凋亡明显受到抑制, sub-G1 峰显著降低 (图 5-A), 使用  $\alpha$ -VAD-fmk 后联合处理组的 sub-G1 峰比例有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 5-B); Western blotting 检测 PARP、caspase-8 和 caspase-3 原蛋白不再降解, PARP、caspase-8 没有裂解产物的出现 (图 4)。



3.3 白杨素联合 TNF- $\alpha$  处理 HepG2 细胞对凋亡抑制蛋白表达的影响: 以白杨素 (40  $\mu$ mol/L) 预处理细胞 2 h 后联合 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 再分别处理细胞 6、12、18、24 h 后分别收集细胞, 提取蛋白, Western blotting 检测 NF- $\kappa$ B 调节的系列凋亡抑制蛋白: Bcl-xL、cIAPs、xIAP、cFLIP 的表达变化情况。在 TNF- $\alpha$  单独处理组各种凋亡抑制蛋白在各个时间点均出现明显的表达量增加; 而白杨素预处理后, TNF- $\alpha$  引起的凋亡抑制蛋白 cFLIP-1 和 cIAP2 的高表达明显受到抑制, 联合处理时间越长下调作用越明显, 并有可重复性。Bcl-xL、xIAP 等其他凋亡抑制蛋白没有明显的改变 (图 6)。



与白杨素联合 TNF- $\alpha$  组比较: #  $P < 0.05$

#  $P < 0.05$  vs combination of chrysin and TNF- $\alpha$  group

图 5 全 caspase 酶抑制剂  $\alpha$ -VAD-fmk 对白杨素联合 TNF- $\alpha$  诱导的 HepG2 细胞死亡的影响

Fig. 5 Influences of pancaspase inhibitor,  $\alpha$ -VAD-fmk, on apoptosis of HepG2 cells induced by combination of chrysin and TNF- $\alpha$

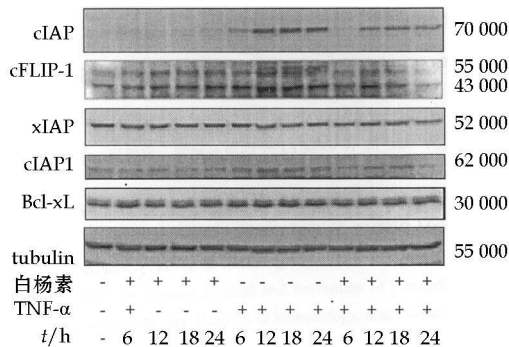


图 6 白杨素预处理后对 NF- $\kappa$ B 调控的凋亡抑制蛋白表达影响

Fig. 6 Influences of chrysin pretreatment on expression of anti-apoptotic protein regulated by NF- $\kappa$ B

#### 4 讨论

肝脏肿瘤是常见的恶性肿瘤, 各种形式的化疗在肝癌的綜合治疗中都有广泛应用, 但全身化疗的

疗效并不理想, 不良反应大, 单药有效率  $< 20\%$ ; 原发性肝癌先天性高表达多药耐药基因, 对化疗不敏感, 所以目前对肝癌的化疗多提倡联合用药。本研究选择肝癌细胞 HepG2 为研究对象, 探讨中药活性成分白杨素是否能够提高 TNF- $\alpha$  诱导 HepG2 细胞凋亡的能力, 辅助提高 TNF- $\alpha$  抗肿瘤作用, 并初步分析其分子机制, 希望为肝肿瘤的联合化疗提供新思路。

黄酮是一种天然多酚类物质, 广泛分布于水果、蔬菜等植物中。近年研究已发现槲皮素、茶多酚、木犀草素<sup>[11-12]</sup> 等多种黄酮类物质具有化疗增敏作用, 在抗肿瘤药的临床研究中, 可作为一种潜在的辅助治疗药<sup>[13]</sup>。食物中的天然成分用于肿瘤辅助治疗, 既传承了祖国医学食疗的理念, 又因来源丰富、安全健康、应用方便等优势成为发掘新的化疗增敏剂的

理想来源。本研究明显观察到白杨素可增加 TNF- $\alpha$  诱导的 HepG2 细胞死亡数量, 流式细胞术分析可见 40  $\mu\text{mol/L}$  白杨素处理后联合 TNF- $\alpha$  组, subG1 峰可达到 (27.84  $\pm$  0.54)%, 而对照组仅为 (1.52  $\pm$  0.13)%, 并有明显的剂量效应关系; 而单独的白杨素和 TNF- $\alpha$  并未引起 HepG2 细胞死亡数量增加。有研究认为 TNF- $\alpha$  引起的细胞死亡根据细胞种类的不同可以是凋亡也可以是坏死<sup>[14]</sup>, 而流式细胞术检测的 subG1 峰所代表的细胞死亡既可以是凋亡又可以是坏死<sup>[15]</sup>, 所以为明确白杨素联合 TNF- $\alpha$  诱导的细胞死亡的性质, 首先以荧光染色识别凋亡细胞标志性的核固缩浓染, 获得 HepG2 细胞凋亡的初步的形态学证据, 然后用 Western blotting 技术在分子水平进一步寻找支持。Western blotting 蛋白分析 caspase-3 活化降解, PARP 原蛋白减少出现裂解产物, 这一结果证明白杨素增强的 TNF- $\alpha$  诱导的细胞死亡是 caspase 依赖的细胞凋亡; 对 caspase-8 的 Western blotting 分析结果可观察到明显的 caspase-8 蛋白活化降解, 裂解产物增加, 由此判断调节这一细胞凋亡的主要信号途径是 TNF- $\alpha$  激活的死亡受体途径, 即 caspase-8 启动的外源受体凋亡途径。本研究在细胞和分子水平证明了白杨素可以有效提高 TNF- $\alpha$  诱导肝肿瘤细胞凋亡的能力, 证明了其作为化疗增敏剂的价值。

如前所述白杨素可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性发挥抗炎作用<sup>[9-10]</sup>; 促进凋亡作用研究中也发现白杨素可下调 NF- $\kappa$ B 调控的凋亡抑制基因 Bcl-2 和 xIAP 的表达; 这些均提示白杨素可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控肿瘤细胞凋亡等生物学功能。而 TNF- $\alpha$  激活 NF- $\kappa$ B 促进炎症反应、促进凋亡抑制蛋白表达是其产生不良反应, 影响抗肿瘤疗效的主要原因。为了明确白杨素对 TNF- $\alpha$  化疗增敏作用是否也是通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性实现的, 对 NF- $\kappa$ B 调节的凋亡抑制蛋白进行了分析, 发现 TNF- $\alpha$  引起 cFLIP-L 和 cIAP2 为主的凋亡抑制蛋白增加, 而在白杨素预处理后明显的随时间延长升高的凋亡抑制蛋白 cFLIP-L 和 cIAP2 表达减少。cIAP2 在 TNF- $\alpha$  诱导凋亡中的作用尚不清楚, 研究认为 TNF- $\alpha$  与受体结合后, cIAP2 与 cIAP1 共同促进 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[16]</sup>, 但本研究仅观察到 cIAP1 的轻微改变, 所以在白杨素促进 TNF- $\alpha$  诱导的 HepG2 凋亡过程中 cIAP2 发挥的作用仍需深入的研究。而 cFLIP 则被认为是 caspase-8 的抑制剂, 它包括 cFLIP-L 和 cFLIP-s, 均为 caspase-8 的结构类似物, 与

caspase-8 竞争结合 TRADD, 抑制细胞凋亡<sup>[3,17]</sup>。白杨素预处理细胞后, 可抑制 TNF- $\alpha$  引起的 cFLIP-L 高表达, 使更多的 caspase-8 结合到 TNF-R1/TRADD/FADD 死亡复合体上, 促进肿瘤细胞凋亡。Bcl-xL、xIAP 主要是影响内源线粒体凋亡途径的凋亡抑制蛋白<sup>[3]</sup>, 在本研究中并未观察到明显的变化, 也和前面的结果相一致, 即白杨素联合 TNF- $\alpha$  诱导的 HepG2 细胞凋亡是通过 caspase-8 启动的外源死亡受体信号途径实现的。所以通过本研究发现白杨素可以增强 TNF- $\alpha$  诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的能力, 抑制 NF- $\kappa$ B 活性下调凋亡抑制蛋白 cFLIP-L 的表达是其重要的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] Lee C H, Jeon Y T, Kim S H, *et al.* NF- $\kappa$ B as a potential molecular target for cancer therapy [J]. *Biofactors*, 2007, 29(1): 19-35.
- [2] Heyninck K, Beyaert R. Crosstalk between NF- $\kappa$ B activating and apoptosis inducing proteins of the TNF receptor complex [J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2001, 4(5): 259-265.
- [3] Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with proapoptotic receptor agonists [J]. *Nat Rev*, 2008, 7(12): 1001-1012.
- [4] Miyamoto S, Kohno H, Suzuki R, *et al.* Preventive effects of chrysin on the development of azoxymethane induced colonic aberrant crypt foci in rats [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(5): 1169-1173.
- [5] Romier B, Van De Walle J, During A, *et al.* Modulation of signalling nuclear factor kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells [J]. *Br J Nutr*, 2008, 100(3): 542-551.
- [6] Zhang Q, Zhao X H, Wang Z J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(6): 2042-2053.
- [7] Zhang T, Chen X, Qu L, *et al.* Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(23): 6097-6105.
- [8] Weng M S, Ho Y S, Lin J K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21 Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(12): 1815-1827.
- [9] Woo K J, Jeong Y J, Park J W, *et al.* Chrysin induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(4): 1215-1222.
- [10] Ai X H, Zheng X, Tang X Q, *et al.* Induction of apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 cell line by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(28): 3824-3828.
- [11] Shi R, Huang Q, Zhu X, *et al.* Luteolin sensitizes the anti-cancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase mediated p53 phosphorylation and stabilization [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4): 1338-1347.
- [12] Shen H M, Tergaonkar V. NF- $\kappa$ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 348-363.
- [13] 朱荣鑫, 张赛龙, 金永生. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(1): 5-10.
- [14] Denecker G, Vercaemmer D, Sleemans M, *et al.* Death receptor

- tor induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8: 829-840.
- [15] Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, *et al*. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis [J]. *Hum Cell*, 1998, 11: 3-12
- [16] Mahoney D J, Cheung H M, Mrad R L, *et al*. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$  mediated NF- $\kappa$ B activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (33): 11778-11783
- [17] Krueger A, Schmitz I, Baumann S, *et al*. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 20633-20640

## 黄芪总苷对地塞米松和 $\beta$ 淀粉样蛋白联合诱导大鼠海马神经元损伤的影响

吴庆四<sup>1</sup>, 刘东梅<sup>2</sup>, 徐东芳<sup>1</sup>, 姚余有<sup>1\*</sup>, 李卫平<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学 检验医学系, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽医科大学 药理学教研室, 安徽 合肥 230032)

**摘要:**目的 探讨黄芪总苷 (astragalosides) 对地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 与 $\beta$ 淀粉样蛋白 (Amyloid  $\beta$ -peptide protein, A $\beta$ ) 联合诱导大鼠海马神经元损伤的影响。方法 通过检测海马神经元细胞活性, 探讨黄芪总苷能否抑制 A $\beta$  和 DEX 引起海马神经元活力下降; 通过检测海马神经元胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), 探讨黄芪总苷是否通过降低  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  抑制海马神经元凋亡; 通过检测 P-tau Thr231 蛋白水平, 进一步探讨黄芪总苷抗 A $\beta$  和 DEX 引起的海马神经毒性机制。结果 黄芪总苷 (10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对体外 DEX (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 引起胎鼠海马神经元的损伤有保护作用 ( $P < 0.01$ ); 黄芪总苷能明显降低 DEX (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 升高的海马神经元  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、P-tau 蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。结论 黄芪总苷对 A $\beta$  和 DEX 诱导的大鼠海马神经元损伤有一定的保护作用。

**关键词:** 黄芪总苷;  $\beta$ -淀粉样蛋白; 地塞米松; 海马神经元

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1834-05

## Neuroprotective effects of astragalosides against amyloid $\beta$ protein and DEX-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons

WU Qing-si<sup>1</sup>, LIU Dong-mei<sup>2</sup>, XU Dong-fang<sup>1</sup>, YAO Yu-you<sup>1</sup>, LI Wei-ping<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of astragaloside (AST) on the injury induced by amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) plus Dexamethasone (DEX) in rat hippocampal neurons. **Methods** *In vitro*, the effects of AST on hippocampal neurons cell death with A $\beta$  plus DEX were detected by MTT assay and intracellular calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ); The effects of AST on phospho-tau (P-tau) protein were analyzed to explore the mechanisms responsible for DEX enhanced A $\beta$ -induced cell death in hippocampal neurons. **Results** AST (10, 20, and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) could protect hippocampal neurons against DEX (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) plus A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )-induced hippocampal neuronal injury of fetal rat *in vitro* ( $P < 0.01$ ). AST could inhibit the increased levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and P-tau protein level induced by DEX (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) plus A $\beta_{25-35}$  (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** AST could protect hippocampal neuron against synergistic neurotoxicity of A $\beta$  and DEX.

**Key words:** astragalosides (AST); amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ); Dexamethasone (DEX); hippocampal neurons

随着世界人口的老龄化, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 已成为引起人类死亡的

第四大疾病。AD 主要病理特征是选择性的突触和神经元损伤、神经纤维缠绕、胶质细胞激活和老年

①收稿日期: 2010-03-12

基金项目: 安徽省高校省学术带头人科学研究资助项目 (2005hzb18); 安徽省教育厅高等学校优秀青年人才基金资助项目 (2009SQZR050)

作者简介: 吴庆四 (1977-), 男, 安徽省淮南市人, 讲师, 硕士, 主要从事神经药理学的研究。

Tel: (0551) 3869174 E-mail: qswu1977@163.com

\* 通讯作者 姚余有 Tel: (0551) 3869174 E-mail: yaoanqi71@yahoo.com