

芹菜素诱导肺癌 A549 细胞凋亡及其机制研究

刘 军¹, 阎维维², 刘文博³

1. 天津医科大学附属肿瘤医院 教育部乳腺癌防治重点实验室, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060

2. 天津市环湖医院, 天津 300060

3. 天津医科大学, 天津 300070

摘 要: 目的 研究芹菜素诱导肺癌 A549 细胞凋亡效应及其机制。方法 常规培养肺癌 A549 细胞, 分别用 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素作用于 A549 细胞; MTT 法检测 A549 细胞增殖率; Western blotting 检测聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP)、Bcl-2 的蛋白表达水平; RT-PCR 检测 bcl-2 mRNA 的表达; Annexin V/PI 双染法检测 A549 细胞凋亡率。结果 随着芹菜素浓度的增高, A549 细胞的增殖抑制率明显增高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); Western blotting 显示 PARP 的剪切带逐渐增加, Bcl-2 表达呈减少趋势; RT-PCR 结果显示 bcl-2 mRNA 转录减少; 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素对 A549 细胞凋亡率分别为 $(2.41 \pm 0.072)\%$ 、 $(10.56 \pm 0.054)\%$ 、 $(15.32 \pm 0.071)\%$ 、 $(28.98 \pm 0.012)\%$ 、 $(78.24 \pm 0.064)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 芹菜素通过抑制 Bcl-2 的表达有效地诱导肺癌 A549 细胞凋亡。

关键词: 芹菜素; 肺癌 A549 细胞; 细胞凋亡; Bcl-2; 聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1393-03

Apigenin for inducing apoptosis of lung cancer A549 cell and affecting expression of Bcl-2

LIU Jun¹, YAN Wei-wei², LIU Wen-bo³

1. Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy of the Ministry of Education, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

2. Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

3. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Key words: apigenin; lung cancer A549 cell; cell apoptosis; Bcl-2; poly ADP ribose polymerase (PARP)

目前化疗仍是肺癌的主要治疗手段, 但化疗的副作用如骨髓抑制等却限制了化疗的应用。因此, 近年来寻求中西医结合治疗来减少化疗的副作用成为研究焦点。芹菜素是从植物中提取的一种黄酮类成分, 对脑缺血再灌注损伤有保护作用^[1-2], 芹菜素能够诱导多种肿瘤细胞凋亡^[3-4]。本研究以肺癌 A549 细胞株为研究对象, 研究了芹菜素对其诱导凋亡效应及其机制。

1 材料

人肺癌 A549 细胞株由天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室提供。芹菜素 (质量分数 98.3%)、碘化丙啶 (PI) 及 RNase 购于 Sigma 公司。PARP、Bcl-2 一抗购于 CST 公司。AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞系常规培养于 RPMI 1640 培养液中, 内含 10% 胎牛血清, 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中恒温培养。

2.2 MTT 法检测肺癌 A549 细胞的增殖抑制率

常规培养 A549 细胞, 选取对数生长期细胞以 3×10^3 接种于 96 孔板。细胞贴壁后分别加入不同浓度的芹菜素 (0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$), 分别培养 24 和 48 h。每组设 4 个复孔。向每孔中加入 5 g/L 的 MTT 20 μL 继续培养 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。然后向每孔中加入 DMSO 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 15 min, 直至紫褐色沉淀完全溶解。用酶标仪测定每孔在 570 nm 波长下的吸光度 (A) 值。并计算细胞增殖抑制率。

抑制率 = (对照孔 A 值 - 加药孔 A 值) / 对照孔 A 值

2.3 Western blotting 检测 A549 细胞中凋亡相关蛋白的相对表达量

选取对数生长期 A549 细胞, 以 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中。每组分别加入 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素作用 24 h, 用裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 用蛋白浓度测定试剂盒 (BSA 法) 测定蛋白的浓度。含有等量蛋白的细胞裂解液用样品缓冲液溶解后, 行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转移至硝酸纤维素膜。5% 牛奶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min, 放入聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP)、Bcl-2 的一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤后, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:500) 室温孵育后, ECL 显色。

2.4 RT-PCR 检测 bcl-2 mRNA 表达

细胞处理同 “2.3” 项方法。收集细胞, 采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性。一步法进行 RT-PCR 扩增, 以 β -actin 作为内参。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Bcl-2 上游引物为 5'-CTTCCAGCCTGAGAGCAACC-3', 下游引物为 5'-CATCCCAGCCTCCGTTATCC-3'。 β -actin 上游引物为 5'-GATTTGGCACCACACTTTCTA-3', 下游引物为 5'-GCAGGATGGCATGAGGGAGCG-3'。RT-

PCR 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。PCR 扩增仪为 Biometra 热循环仪。产物在含溴化乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

细胞处理同 “2.3” 项方法。处理 2 h 后收集细胞, 并调整细胞数至 1×10^6 个/mL, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清。加入 100 μL 染料结合缓冲液重悬后, 加入 10 μL AnnexinV-FITC 染色, 混匀后室温避光静置 15 min, 补加 200 μL 的染料结合缓冲液和 5 μL PI 染液 (50 mg/L), 静置 5 min, 立即进行流式细胞仪分析, 实验重复 3 次。

2.6 统计学分析

实验结果使用 SPSS16.0 进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率

不同浓度芹菜素处理 A549 细胞 24 h 后, 各组的增殖抑制率呈增高趋势, 芹菜素处理 48 h 所检测的细胞增殖抑制率明显高于同浓度组 24 h 的抑制率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示, 芹菜素能够明显抑制肺癌 A549 细胞的增殖, 且具有剂量依赖性和时间依赖性。结果见表 1。

表 1 芹菜素对肺癌 A549 细胞的增殖抑制作用
Table 1 Inhibition of apigenin on lung cancer A549 cell proliferation

组别	$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
对照	—	1.74 ± 0.064	—	1.26 ± 0.052	—
芹菜素	10	1.51 ± 0.075	13.22	$0.98 \pm 0.086^*$	22.42
	20	$1.32 \pm 0.017^*$	24.14	$0.86 \pm 0.035^{**}$	31.75
	40	$1.07 \pm 0.047^{**}$	38.15	$0.42 \pm 0.039^{**}$	66.67^{Δ}
	80	$0.43 \pm 0.053^{**}$	75.29	$0.20 \pm 0.049^{**}$	84.12^{Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与同浓度 24 h 比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 24 h of same concentration

3.2 Western blotting 检测 PARP 及 Bcl-2 的表达

PARP 的剪切能反映细胞凋亡的多少。芹菜素能够使 PARP 的剪切增加, 而凋亡调节蛋白 Bcl-2 的量却逐渐减少。结果见图 1。

3.3 RT-PCR 检测 bcl-2 mRNA 的转录水平

芹菜素处理肺癌 A549 细胞 24 h 后, 随着浓度的增高, bcl-2 的转录水平逐渐降低, 提示芹菜素能够在转录前水平调控凋亡调节基因 bcl-2 的表达。结果见图 2。

3.4 Annexin V/PI 双染法流式细胞仪检测凋亡率

通过流式细胞仪检测, 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素组细胞凋亡率分别为 (2.41 ± 0.072) %、(10.56 ± 0.054) %、(15.32 ± 0.071) %、(28.98 ± 0.012) %、(78.24 ± 0.064) %, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。提示芹菜素对 A549 细胞的凋亡诱导效应具有剂量依赖性。

4 讨论

肺癌目前位于全世界癌症死因的第 1 位。化疗

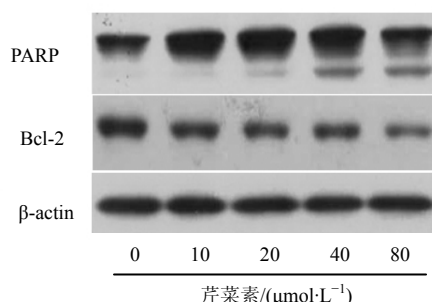


图 1 芹菜素作用后 A549 细胞 PARP 和 Bcl-2 的表达

Fig. 1 Expression of PARP and Bcl-2 in A549 cells after apigenin treatment

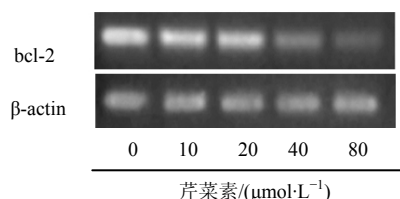


图 2 芹菜素作用后 A549 细胞 bcl-2 mRNA 的转录水平

Fig. 2 Transcription level of bcl-2 in A549 cells after apigenin treatment

仍是肺癌治疗的主要手段，但化疗会抑制骨髓造血系统，使白细胞及血小板下降，近年来联合中医药治疗减少化疗副作用成为研究焦点。芹菜素是一种天然黄酮类化合物，具有阻滞细胞周期^[5]、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤侵袭和转移^[6]等多方面抗肿瘤活性，不良反应较小。笔者发现，芹菜素能够通过抑制 Bcl-2 的表达，有效诱导肺癌 A549 细胞凋亡。

Bcl-2 基因是一种原癌基因，可以增强细胞对 DNA 损伤因子的抵抗性，抑制多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡。研究表明，Bcl-2 参与线粒体上离子通道的形成，过度表达的 Bcl-2 能够抑制线粒体上离子通道的开放，减少细胞色素 C 的释放，从而抑制凋亡。此外，在去除生长因子所诱发的凋亡中，活性氧 (ROS) 损伤是导致细胞死亡的主要原因^[7]。而 Bcl-2 的过表达可减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成，减少由 ROS 所引起的凋亡。芹菜素能够在转录前和转录后水平抑制 Bcl-2 的表达，可

能为芹菜素诱导肺癌 A549 细胞凋亡机制。

芹菜素作为一种植物提取的活性成分，能够抑制肺癌 A549 的增殖，由于其不良反应小，且与某些化疗药联合具有协同效应^[8]，因此，芹菜素有可能作为一种新型的辅助化疗药物，应用于肺癌的中西医结合治疗。

参考文献

- [1] 牛文泽, 李雪梅, 王 果, 等. 芹菜素对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑内 caveolin-1 表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1658-1662.
- [2] 韩书珍, 范海玲, 任素伟, 等. 芹菜素对急性局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠半暗区内小胶质细胞的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 312-317.
- [3] Choi E J, Kim G H. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 44: 260-265.
- [4] Kaur P, Shukla S, Gupta S. Plant flavonoid apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 2210-2217.
- [5] Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6: 1102-1114.
- [6] Hu X W, Meng D, Fang J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 2369-2376.
- [7] Shin G C, Kim C, Lee J M, et al. Apigenin-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species and activation of ERK1/2 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 182: 29-36.
- [8] Choi E J, Kim G H. 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through induction of apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22: 1533-1537.