

莱菔硫烷诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡与 Fas/FasL 途径的相关性研究

季宇彬^{1,2*}, 张志坚^{1,2}, 邹翔^{1,2}

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. 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 研究莱菔硫烷对人肝癌 HepG2 细胞 Fas、FasL、Bid 蛋白表达的影响, 探讨其诱导 HepG2 细胞凋亡过程中 Fas/FasL 途径的作用。方法 Caspase-8 试剂盒检测莱菔硫烷对 HepG2 细胞 Caspase-8 活性的影响; 流式细胞仪检测莱菔硫烷对 HepG2 细胞中 Fas、FasL、Bid 蛋白表达的影响。结果 莱菔硫烷 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 HepG2 细胞 48 h, 可显著升高 HepG2 细胞 Caspase-8 活性 ($P < 0.01$); 可使 HepG2 细胞 Fas、FasL 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.01$); 莱菔硫烷 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可显著提高 Bid 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 上述作用均呈剂量相关性。结论 激活 Fas/FasL 途径可能是莱菔硫烷诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的重要机制之一。

关键词: 莱菔硫烷; 人肝癌细胞 HepG2; 细胞凋亡; Fas/FasL 途径; 抗肿瘤

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2489-03

Correlation between sulforaphane-induced human liver cancer HepG2 cell apoptosis and Fas/FasL pathway

Ji Yu-bin^{1,2}, Zhang Zhi-jian^{1,2}, Zou Xiang^{1,2}

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

2. Engineering Research Center of Natural Antitumor Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To study the effect of sulforaphane on Fas, FasL, and Bid protein expression in HepG2 cells, and to explore the effect of Fas/FasL pathway on sulforaphane-induced apoptosis in HepG2 cells. **Methods** The effect of sulforaphane on Caspase-8 activity in HepG2 cells was detected by Caspase-8 Activity Assay Kit. Flow cytometer was used to analysis of Fas, FasL, and Bid protein expression in HepG2 cells. **Results** After treated by sulforaphane for 48 h, the Caspase-8 activity was effectively increased ($P < 0.01$). At the doses of 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$, the effect of sulforaphane could significantly increase the Fas and FasL protein expression in HepG2 cells in a dose dependent manner, while at the doses of 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$, sulforaphane could increase the Bid protein expression. **Conclusion** Activating the Fas/FasL pathway may be one of the role mechanism of sulforaphane inducing the apoptosis of HepG2 cells.

Key words: sulforaphane; human liver cancer HepG2 cells; apoptosis; Fas/FasL pathway; antitumor

肿瘤的发生、发展是一个多因素、多阶段、长期相互作用的过程, 而细胞凋亡对于维持细胞增殖和死亡的平衡、机体的发育和生命平衡具有非常重要的意义。一旦众多有害因素起作用, 便会破坏细胞凋亡的调控过程, 引起肿瘤的发生和发展, 因此细胞凋亡与肿瘤关系密切。莱菔硫烷为十字花科植物中含有一种异硫氰酸盐类成分, 在西兰花 *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck 中的量最高^[1], 是蔬菜中防癌和抗癌效果最好的天然活性物质之一^[2], 尤其对肺

癌^[3]、乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、结肠癌^[6]、前列腺癌^[7]、肝癌^[8]等有很好的防治作用。有研究显示, 莱菔硫烷通过诱导肿瘤细胞凋亡在肿瘤发生的多个阶段发挥抗肿瘤作用, 可通过线粒体信号转导途径诱导 HepG2 细胞凋亡^[9], 是一种潜在的抗癌药物^[10]。本实验主要研究莱菔硫烷对 HepG2 细胞 Fas、FasL、Bid 蛋白表达的影响, 以探讨死亡受体通路是否参与了莱菔硫烷诱导的 HepG2 细胞凋亡的过程, 为其进一步开发成为抗肿瘤药物提供理论依据。

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300284); 黑龙江省自然科学基金重大项目 (ZJY03-04; D200802)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为抗肿瘤药物。Tel/Fax: (0451)84866922 E-mail: jyb@hrbcu.edu.cn

1 材料

1.1 药品与试剂

莱菔硫烷, 质量分数为 98.3%, 美国 Alexis 公司, 批号 L23736; 阿霉素, 规格 10 mg, 美国 Pfizer 公司, 批号 9QL0141; 二甲基亚砷 (DMSO)、胰蛋白酶, 美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基干粉, 美国 Gibco 公司; Caspase-8 活性检测试剂盒、FITC 标记山羊抗兔二抗, 碧云天生物技术研究所; 兔抗人 Fas、FasL, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗人 Bid, 北京博奥森生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA), 杭州四季青生物工程公司; 多聚甲醛, 北京化学试剂公司。

1.2 仪器

DL—CJ—1N 医用型超净工作台 (北京东联哈尔仪器公司), CO—150 型 CO₂ 培养箱 (美国 NBS 公司), Adventurer 万分之一电子天平 (Ohaus 公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), GILSON 移液器 (法国 Gilson 公司), 96 孔培养板 (Orange Scientific); Wellscan MK3 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), EPICS-XL 型流式细胞仪、高速低温离心机 (美国 Beckman-Coulter 公司)。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞株, 由哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心传代保种。

2 方法

2.1 细胞培养及给药

人肝癌细胞株 HepG2 常规方法复苏后, 置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂、相对湿度 95% 条件下置培养箱培养, 每 2~3 天用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期细胞, 设莱菔硫烷 (终浓度分别为 10、20、40 μmol/L) 给药组、阿霉素 (终浓度为 0.5 μmol/L) 阳性对照组、阴性对照组 (加相同体积的 RPMI 1640 培养液), 给药后继续培养 48 h, 收集细胞。

2.2 对 HepG2 细胞 Caspase-8 活性的影响

取“2.1”项下经过药物处理的 HepG2 细胞, 于 4 °C、600×g 离心 5 min, 弃上清后 PBS 洗涤 1 次。每 2×10⁶ 细胞加入 100 μL 裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min, 于 4 °C、16 000~20 000×g 离心 10~15 min。将上清液移至冰浴预冷的离心管中, 取 Caspase-8 活性检测试剂盒中检测缓冲液 70 μL, 加入待测样品 20 μL, 加入 10 μL Ac-IETD-pNA 后混匀, 37 °C 孵育过夜, 测定 405 nm 处吸光度 (A₄₀₅) 值。

2.3 对 HepG2 细胞 Fas、FasL 和 Bid 蛋白表达的影响

取“2.1”项下经过药物处理的细胞至离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 透化细胞 10 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入含 5% BSA 的 PBS 封闭 30 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入适当稀释的一抗室温孵育 2 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入适当稀释的荧光标记二抗, 室温避光孵育 1 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 将细胞重悬于流式管中, 300 目尼龙网滤过, 流式细胞仪检测 Fas、FasL 和 Bid 蛋白的表达。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行数据处理, 数据统计采用方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 HepG2 细胞 Caspase-8 活性的影响

与阴性对照组比较, 莱菔硫烷 10、20、40 μmol/L 作用 HepG2 细胞 48 h 后, 细胞 Caspase-8 活性均显著升高 ($P < 0.01$), 并呈一定剂量相关性。见表 1。

表 1 莱菔硫烷对 HepG2 细胞 Caspase-8 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of sulforaphane on Caspase-8 activity of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / (μmol·L ⁻¹)	A ₄₀₅	Caspase-8 活性/%
对照	—	0.049 ± 0.004	—
莱菔硫烷	10	0.137 ± 0.004**	182.56
	20	0.155 ± 0.007**	218.25
	40	0.167 ± 0.005**	246.81
阿霉素	0.5	0.088 ± 0.003**	81.68

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

3.2 对 HepG2 细胞 Fas 和 FasL 蛋白表达的影响

莱菔硫烷 10、20、40 μmol/L 作用 HepG2 细胞 48 h 后, Fas、FasL 蛋白表达增加, 并呈现一定的浓度相关性, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 对 HepG2 细胞 Bid 蛋白表达的影响

莱菔硫烷 10、20、40 μmol/L 作用 HepG2 细胞 48 h 后, Bid 蛋白表达增加, 且呈一定的浓度相关性, 20、40 μmol/L 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 莱菔硫烷对 HepG2 细胞 Fas、FasL、Bid 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effects of sulforaphane on protein expression of Fas, FasL, and Bid in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fas/%	FasL/%	Bid/%
对照	—	37.10 \pm 1.04	47.93 \pm 1.34	30.70 \pm 1.18
莱菔硫烷	10	44.90 \pm 1.67**	70.30 \pm 0.46**	32.77 \pm 0.40
	20	76.47 \pm 0.87**	82.40 \pm 0.70**	73.73 \pm 0.71**
	40	95.60 \pm 0.46**	83.30 \pm 1.06**	90.50 \pm 0.10**
阿霉素	0.5	95.07 \pm 0.40**	93.97 \pm 0.50**	79.57 \pm 0.23**

4 讨论

由于细胞凋亡失衡是肿瘤形成与发展的重要原因,因此诱导肿瘤细胞凋亡是消除肿瘤细胞的一个有效途径。细胞凋亡是一个多基因参与的复杂调控过程,主要有外源性和内源性两个调节途径,其中涉及线粒体、内质网、死亡受体以及近年来发现的丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等多条细胞信号转导通路相关因子的调节。莱菔硫烷除具有突出的化学预防作用外^[11],还有较强的抗肿瘤作用,其抗肿瘤作用贯穿于肿瘤发生、发展的各个阶段,其机制主要与阻滞细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡以及抑制肿瘤转移等有关,是一种潜在的肿瘤治疗药物。

以往研究结果表明,莱菔硫烷对人肝癌 HepG2 细胞具有较强的抑制作用,其通过下调 bcl-2 基因表达、上调 bax 基因表达,而诱导线粒体通透性转变孔道的开放,促进线粒体内细胞色素 C 向胞浆释放,再通过下游一系列级联反应最终完成经由线粒体途径诱导细胞凋亡的过程。本实验结果表明,莱菔硫烷作用 HepG2 细胞 48 h 后,细胞内 Fas、FasL 的表达均升高,且呈一定剂量相关性,Caspase-8 活性也显著增强,因此推断莱菔硫烷可能通过上调 Fas、FasL 蛋白表达,激活 Caspase-8,并直接激活下游效应因子 Caspase-3,引起 HepG2 细胞凋亡。此外,莱菔硫烷还可升高 HepG2 细胞内 Bid 的表达水平,说明其在激活 Fas/FasL 途径诱导 HepG2 细胞凋亡过程中,还可能通过活化的 Caspase-8 切割 Bid,使 Bid 片断 tBid 与 Bcl-2 蛋白结合而抑制其抗凋亡活性,进而间接激活线粒体凋亡途径而引起 HepG2 细胞凋亡。结果表明,激活 Fas/FasL 途径可能是莱菔硫烷诱导 HepG2 细胞凋亡的重要机制之一。

参考文献

- [1] 夏薇,赵秀娟,吴坤,等.北方12种蔬菜中莱菔硫烷含量的测定[J].疾病控制杂志,2005,9(3):209-211.
- [2] 李雷,邹翔,季宇彬.十字花科植物中异硫氰酸盐的性质及活性研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2007,23(4):385-399.
- [3] Jin C Y, Moon D O, Lee J D, et al. Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis through down-regulation of ERK and Akt in lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(5): 1058-1066.
- [4] Fowke J H, Chung F L, Jin F, et al. Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 3980-3986.
- [5] 徐华.莱菔硫烷对人胃癌SGC7901细胞增殖及凋亡影响的实验研究[D].苏州:苏州大学,2009.
- [6] 王敏,李延青,钟宁,等.莱菔子素诱导结肠癌Caco-2细胞株葡萄糖醛酸转移酶1A的表达及其机制[J].中华医学杂志,2005,85(12):819-824.
- [7] Xiao D, Powolny A A, Antosiewicz J, et al. Cellular responses to cancer chemopreventive agent D, L-sulforaphane in human prostate cancer cells are initiated by mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(7): 1729-1738.
- [8] 孙胜男,邹翔,高鹏,等.莱菔硫烷诱导人肝癌HepG-2细胞凋亡的p38MAPK途径研究[J].药物评价研究,2009,32(1):29-33.
- [9] 季宇彬,高鹏,邹翔,等.莱菔硫烷通过线粒体诱导HepG-2细胞凋亡[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2009,25(6):641-644.
- [10] Gingras D, Gendron M, Boivin D, et al. Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from *Brassica* vegetables [J]. *Cancer Lett*, 2004, 203(1): 35-43.
- [11] Juge N, Mithen R F, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9): 1105-1127.