

黄芩素通过激活 Caspases 和 Bcl-2 家族蛋白诱导卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡

黄 燕, 付景丽*

陆军军医大学附属新桥医院, 重庆 400037

摘要: 目的 研究黄芩素对卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡的调控作用及其可能的作用机制。方法 选取人卵巢癌细胞系 HO-8910 细胞, 经黄芩素不同浓度及不同时间处理后, 分别采用噻唑蓝 (MTT) 法测定对细胞增殖的影响; 采用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期; 采用 Western blotting 法检测 Bcl-2 家族蛋白表达情况。结果 黄芩素对 HO-8910 细胞有明显的增殖抑制作用, 呈浓度-时间依赖性。与对照组比较, 黄芩素组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。黄芩素上调 Bax/Bcl-2 值, 上调 cleaved Caspase-3 及 cleaved Caspase-9 的蛋白表达量, 呈浓度依赖性。结论 黄芩素通过激活 Caspase 和 Bcl-2 家族蛋白对卵巢癌 HO-8910 细胞发挥抗增殖及诱导凋亡活性。

关键词: 黄芩素; 卵巢癌; HO-8910 细胞; Bcl-2 家族蛋白; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2620-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.017

Baicalein induces apoptosis in human ovarian cancer HO-8910 cells by activating Caspase and Bcl-2 family proteins

HUANG Yan, FU Jing-li

Xinqiao Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract: Objective To explore the apoptotic effect of baicalein, a coumarin flavonone, on human ovarian carcinoma HO-8910 cells, as well as the mechanisms. **Methods** HO-8910 cells were treated with esculetin at a series of concentrations for different times. Expression of apoptosis related Bax/Bcl-2, and Caspases proteins in esculetin treated HO-8910 cells were detected by Western blotting. Cell growth and apoptosis were measured by MTT test and flow cytometry *in vitro*. **Results** Cell viability assay showed that esculetin had obvious anti-proliferation effects on HO-8910 cells in a dose- and time-dependent manner. Compared with control group, the group treated with esculetin showed a significant increase in apoptosis rate ($P < 0.05, P < 0.01$). The results demonstrated that esculetin up-regulated the Bax/Bcl-2 ratio and cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 expression in a dose-dependent manner. **Conclusion** In summary, baicalein exerts anti-growth and induced-apoptosis activity against ovarian cancer HO-8910 cells through activating Caspase and Bcl-2 family proteins, therefore presenting as a promising therapeutic agent for the treatment of ovarian cancer.

Key words: baicalein; ovarian cancer; HO-8910 cells; Bcl-2 family proteins; apoptosis

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中发病率和死亡率较高的 3 种类型之一^[1]。由于缺乏可靠的早期诊断方法, 卵巢癌通常被诊断为晚期, 手术切除通常是无效的。对于晚期卵巢癌患者, 铂类组合化疗是常用的, 但耐药性和严重的副作用是取得满意结果的关键障碍。开发对卵巢癌具有最低毒性且更有效的抗肿瘤药物具有重要意义^[2-3]。

水果和非淀粉类蔬菜被认为是预防多种癌症的有益因素^[4]。植物多酚调节关键细胞信号通路, 调节多种癌症炎症通路和表观遗传辅因子。这些化合

物具有潜在的化学预防作用^[5-7], 这表明多酚可能是植物中能够降低卵巢癌风险的特定成分。黄芩素是从黄芩中分离得到的天然黄酮类化合物。黄芩素因其具有抗氧化、抑制黄嘌呤氧化酶活性、抑制血小板聚集和抑制人白血病细胞生长的作用而受到广泛关注, 其已被证实可抑制多种癌细胞, 例如非小细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢癌、白血病、前列腺癌、卵巢癌和结肠癌细胞株的生长和存活^[8-10]。然而, 黄芩素对卵巢癌细胞的抑制作用机制尚不清楚。本研究探讨黄芩素对人卵巢癌 HO-8910 细胞生长和

收稿日期: 2019-01-22

作者简介: 黄 燕 (1985—), 女, 主治医师, 硕士研究生, 主要从事胚胎着床的分子机制研究。Tel: 13883904771 E-mail: 286894630@qq.com

*通信作者 付景丽 (1980—), 女, 中级技师, 硕士研究生, 主要从事生殖免疫方向的研究。Tel: (023)68763758 E-mail: jingliflu@yeah.net

凋亡的影响,旨在明确黄芩素对卵巢癌细胞抑制作用的机制,以期明确黄芩素的抗肿瘤作用机制以及临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芩素、甲基亚硝基脲(MNU)、青霉素、链霉素、二甲基亚砷(DMSO),质量分数均 $\geq 95\%$,均购于美国 Sigma 公司;人卵巢癌 HO-8910 细胞及人正常卵巢 IOSE80 细胞均购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购于美国 HyClone 公司;RPMI 1640 培养液购于美国 Gibco-BRL 公司;噻唑蓝(MTT)试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司;AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞浆蛋白抽提试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;抗体包括 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9,均购于美国 Cell Signaling Technology 公司;其他试剂(分析纯)购于北京试剂厂;7180 型全自动生化分析仪(日本日立公司);酶联免疫试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)。

1.2 细胞培养及增殖抑制实验

HO-8910 细胞及 IOSE80 细胞培养于补充了 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)中,所有细胞培养在含有 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的潮湿环境中。分别取 1×10^5 个/mL 对数生长期的细胞,接种于 96 孔板(200 $\mu\text{L/孔}$),细胞贴壁后每孔加入终浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的黄芩素(溶解于 DMSO),每个浓度均设 6 个复孔,同时设正常培养的细胞为对照组,分别培养 24、48、72 h,以同体积 RPMI 1640 培养液为空白组。于实验结束前 4 h 加入 MTT 试剂 20 $\mu\text{L/孔}$,继续孵育 4 h,吸掉上清,加入 DMSO 150 $\mu\text{L/孔}$,摇床上振荡 15 min,待结晶完全溶解后酶标仪上检测 570 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.3 细胞凋亡及细胞周期检测

将对数生长期 HO-8910 细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔培养板内,待细胞贴壁后分别加入黄芩素,终浓度分别为 0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$,培养 24 h 后,收集细胞,离心固定后加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光染色。筛网滤过后送流式细胞仪进行细胞凋亡及细胞周期的检测。

1.4 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达

细胞分组及处理同“1.3”项,黄芩素处理 24 h 后收集细胞,总细胞裂解物制备裂解缓冲液(50

mmol/L Tris 缓冲液、150 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L EDTA、1%体积比的 Triton X-100、1%质量体积比的脱氧胆酸钠、30 mmol/L 磷酸氢二钠、50 mmol/L 氯化钠、1 mmol/L 钒酸钠),含有新加入的蛋白酶抑制剂混合物(GenDEPOT,凯特, TX, 美国),煮沸 5 min,于 8% SDS-PAGE 上分离,并转移至硝酸纤维素膜(Millipore)上,室温下封闭 1 h,分别加入 1:1 000 稀释的兔抗人 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。以 β -actin 作为内参, TBST (Tris-HCl+聚山梨酯缓冲液)洗膜 3 次,加入 1:1 000 稀释的辣根酶标记的兔抗山羊 IgG,室温孵育 2 h,同样洗膜 3 次,ECL 发光液(青岛捷世康生物科技有限公司)显色,观察各条带深浅变化。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 黄芩素对卵巢癌细胞和正常卵巢细胞增殖的影响

20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素处理 24、48、72 h,均可显著抑制卵巢癌 HO-8910 细胞的增殖,且增殖抑制作用具有浓度和时间依赖性。同时考察了黄芩素对正常卵巢 IOSE80 细胞增殖的影响,相同条件下,黄芩素作用 48 h 对 IOSE80 细胞的增殖没有显著影响。结果见图 1。

2.2 黄芩素对卵巢癌细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,黄芩素能诱导乳腺癌 HO-8910 细胞凋亡。结果见图 2 及表 1,黄芩素处理 HO-8910 细胞 24 h 后,随着黄芩素浓度的增加,细胞凋亡率呈浓度依赖性增加。

2.3 黄芩素对卵巢癌细胞周期的影响

20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素处理 HO-8910 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞比例增加,同时 G_2/M 期与 S 期细胞比例减少。80 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素处理后,HO-8910 细胞 G_0/G_1 期细胞比例增加为 77.46%,而 G_2/M 期与 S 期细胞比例分别为 3.15%、19.39%。提示黄芩素能使卵巢癌细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,从而抑制细胞增殖。结果见表 2。

2.4 黄芩素对 HO-8910 细胞中 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

为了进一步研究黄芩素诱导细胞凋亡的可能机制,检测了 Bcl-2、Bax、Pro-Caspase-3/9、cleaved

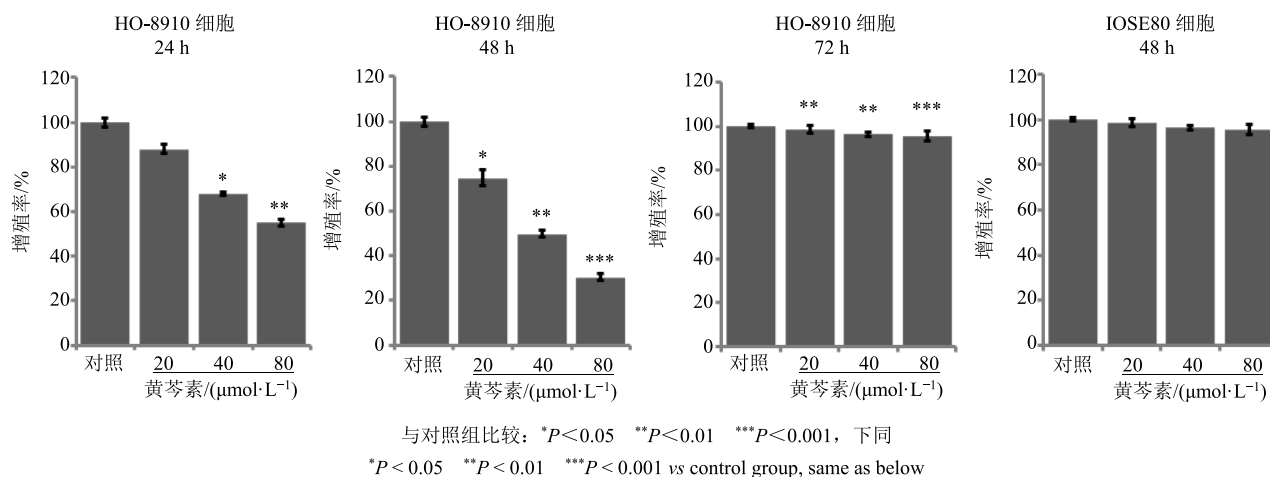
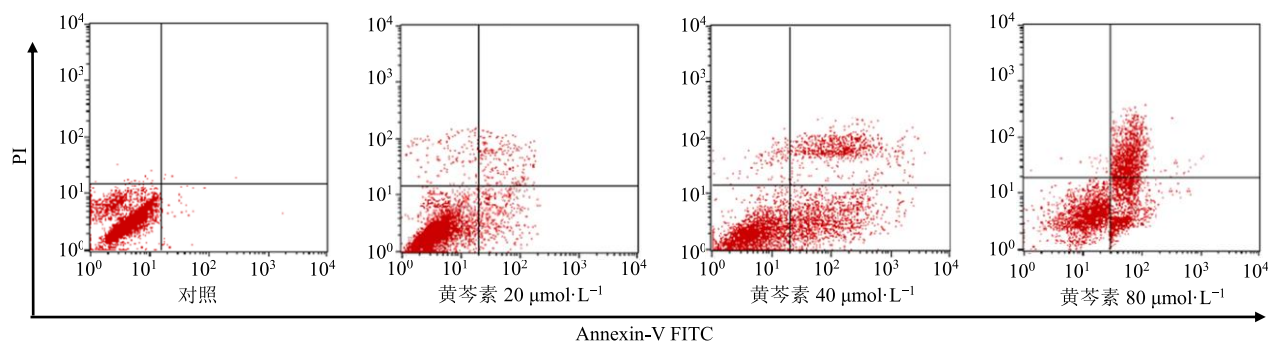
图 1 黄芩素对卵巢癌 HO-8910 细胞和正常卵巢 IOSE80 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 1 Effects of baicalein on proliferation of HO-8910 and IOSE80 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 2 黄芩素对卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of baicalein on apoptosis of HO-8910 cells

表 1 各组 HO-8910 细胞的凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Apoptotic rate of HO-8910 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%
对照	—	1.60 ± 0.12
黄芩素	20	9.70 ± 1.56*
	40	32.30 ± 4.70**
	80	56.20 ± 3.65**

Caspase-3/9 的蛋白表达。Western blotting 结果显示, 经过 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素处理 24 h 后, HO-8910 细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达量显著升高, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著降低; 此外, 与对照组相比, Pro-Caspase-3、Pro-Caspase-9 表达显著降低, cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达增加 (图 3)。这些结果表明, 黄芩素上调 Bax/Bcl-2 值, 并且 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 的表达呈浓度依赖性。

表 2 黄芩素对卵巢癌 HO-8910 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effect of baicalein on cell cycle of HO-8910 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞周期/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	43.42 ± 0.39	38.46 ± 0.45	18.12 ± 0.26
黄芩素	20	55.40 ± 1.87	32.24 ± 0.83	12.36 ± 0.55*
	40	68.36 ± 3.01*	27.31 ± 0.94*	5.33 ± 0.45**
	80	77.46 ± 2.33**	19.39 ± 0.54**	3.15 ± 0.33**

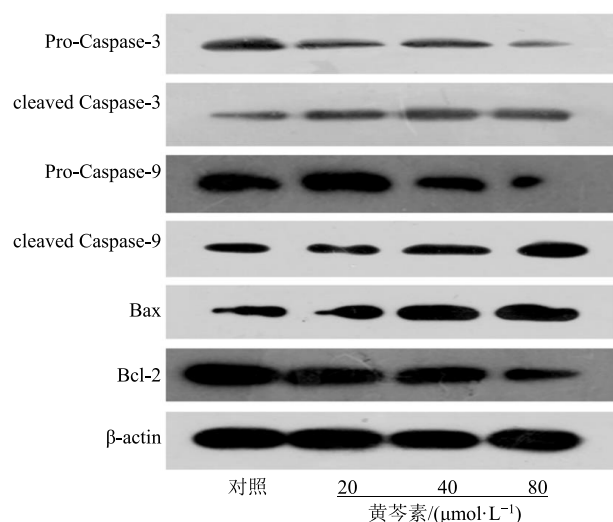


图 3 黄芩素对卵巢癌 HO-8910 细胞中细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of baicalein on expression of apoptotic-related proteins in HO-8910 cells

3 讨论

卵巢癌是女性癌症死亡的第 4 大原因，大多数病例在疾病的晚期被诊断，因此导致低生存率^[11]。关于卵巢癌的许多问题仍然没有答案，尤其是原发性和复发性疾病的最佳治疗方法。近年来，人们非常重视从天然来源中发现对人类有用的新型抗癌药物，迫切需要开发新的药物来治疗卵巢癌^[12]。中药已被证明是具有多种药物活性的新型药物的主要来源^[13]。天然产物为许多疾病提供了丰富的药物来源，包括癌症。许多多酚化合物已被证实具有潜在的癌症靶向治疗的潜力^[14]。

多酚存在于许多食物和饮料中，包括水果、蔬菜、茶和葡萄酒。相关研究表明这些化合物与卵巢癌风险之间的关联^[15]。多酚类物质对卵巢癌的潜在抗癌作用和分子机制尚不清楚，但一些多酚，包括槲皮素、白藜芦醇和姜黄素，是细胞信号通路的潜在调节剂^[16-17]。黄芩素是中药黄芩中含有的天然多酚^[18]，本研究采用黄芩素干扰卵巢癌 HO-8910 细胞株的体外生长。结果表明，黄芩素对 HO-8910 细胞的增殖抑制作用呈浓度-时间依赖性，同时，黄芩素组细胞凋亡率与对照组比较有统计学意义。

细胞凋亡是发育过程中的重要调节程序，维持体内平衡和消除受损细胞。一般来说，凋亡途径包括通过死亡受体（外在）或线粒体（内在）途径的信号^[19]。凋亡的内在途径受 Bcl-2 家族蛋白的调控。

Bcl-2 家族的促凋亡（Bax、BID、BAK 或 BAD）和抗凋亡（Bcl-xL、Bcl-2、BCLW 或 Mcl1）蛋白之间的平衡控制线粒体凋亡途径^[20]。许多抗癌药物通过靶向 Bcl-2 家族蛋白诱导细胞凋亡，Bax/Bcl-2 值在细胞凋亡中起着关键作用^[21]。Caspases 家族是凋亡的参与者，其中 Caspase-3 和 Caspase-9 是关键点^[22]。Caspase-9 和 Caspase-3 在内源性通路中的顺序激活导致多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）切割，导致细胞凋亡，因此在许多细胞凋亡过程中起作用，并在细胞凋亡的启动和执行中起着关键作用^[23]。本研究检测了黄芩素对 Bax、Bcl-2 和 Caspase 蛋白表达的影响，发现黄芩素增加 Bax、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 的表达，降低 Bcl-2、Pro-Caspase-3 和 Pro-Caspase-9 的表达，从而导致细胞凋亡。这可能是黄芩素诱导 HO-8910 细胞凋亡的分子机制之一。综上所述，黄芩素可抑制卵巢癌细胞增殖并诱导细胞凋亡，其诱导细胞凋亡机制可能是上调 Bax 蛋白表达并下调 Bcl-2 蛋白表达，但其确抗肿瘤作用及机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] Vetter M H, Hays J L. Use of targeted therapeutics in epithelial ovarian cancer: A review of current literature and future directions [J]. *Clin Ther*, 2018, 40(3): 361-371.
- [2] Caracciolo G, Palchetti S, Digiacomo L, et al. Human biomolecular corona of liposomal doxorubicin: The overlooked factor in anticancer drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(27): 22951-22962.
- [3] Liu X, Wei L, Zhao B, et al. Low expression of KCNN3 may affect drug resistance in ovarian cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1377-1386.
- [4] Vuong Q V, Hirun S, Phillips P A, et al. Fruit-derived phenolic compounds and pancreatic cancer: Perspectives from Australian native fruits [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(2): 227-242.
- [5] Suwanamornlert P, Sangchote S, Chinsirikul W, et al. Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit *in vitro* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 271(1): 8-14.
- [6] Zhang J, Chen D, Han D M, et al. Tannic acid mediated induction of apoptosis in human glioma Hs 683 cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6845-6850.
- [7] Metere A, Giacomelli L. Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24): 5850-5858.

- [8] Su M Q, Zhou Y R, Rao X, *et al.* Baicalein induces the apoptosis of HCT116 human colon cancer cells via the upregulation of DEPP/Gadd45a and activation of MAPKs [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 750-760.
- [9] Yu X, Cao Y, Tang L, *et al.* Baicalein inhibits breast cancer growth via activating a novel isoform of the long noncoding RNA PAX8-AS1-N [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6842-6856.
- [10] Su G, Chen H, Sun X. Baicalein suppresses non small cell lung cancer cell proliferation, invasion and Notch signaling pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(1): 13-18.
- [11] Lazzari R, Ronchi S, Gandini S, *et al.* Stereotactic body radiation therapy for oligometastatic ovarian cancer: A step toward a drug holiday [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 101(3): 650-660.
- [12] Aqil F, Jeyabalan J, Agrawal A K, *et al.* Exosomal delivery of berry anthocyanidins for the management of ovarian cancer [J]. *Food Funct*, 2017, 8(11): 4100-4107.
- [13] Tao W, Luo X, Cui B, *et al.* Practice of traditional Chinese medicine for psycho-behavioral intervention improves quality of life in cancer patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37): 39725-39739.
- [14] Wang Z, Qi F, Cui Y, *et al.* An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3): 220-239.
- [15] Liu Y, Tong L, Luo Y, *et al.* Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 6162-6172.
- [16] 张黎媛. 白藜芦醇及其代谢产物与类似物抗癌转移作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4346-4352.
- [17] 姜程曦, 吴亮, 吴洁, 等. 姜黄素类似物抑制 ERK/JNK 以及 NF- κ B 信号通路发挥抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2871-2876.
- [18] 余展鹏, 宋方茗, 蔡琰, 等. 黄芩素对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 879-884.
- [19] Qin G, Li P, Xue Z. Triptolide induces protective autophagy and apoptosis in human cervical cancer cells by downregulating Akt/mTOR activation [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3929-3934.
- [20] Li J, Li H, Li Q, *et al.* Repaglinide inhibits cyclosporine A-induced renal tubular toxicity by affecting apoptosis and Bax and Bcl-2 expression [J]. *Turk J Med Sci*, 2018, 48(4): 880-885.
- [21] Chen C, Liu T S, Zhao S C, *et al.* XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(5): 4587-4593.
- [22] Zhang K, Ge Z, Fu L, *et al.* Qilin pills alleviate oligoasthenospermia by inhibiting Bax-caspase-9 apoptosis pathway in the testes of model rats [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(31): 21770-21782.
- [23] Iwai N, Yasui K, Tomie A, *et al.* Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1): 237-245.