

• 药理与临床 •

橙皮苷诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究

王振东¹, 巩会杰¹, 马俊文^{2*}

1. 驻马店市中心医院 消化内科, 河南 驻马店 463000

2. 宁夏医科大学总医院 胃肠外科, 宁夏 银川 750004

摘要:目的 探讨橙皮苷对胃癌 AGS 细胞的诱导凋亡作用及其相关分子机制。方法 采用 MTT 比色法检测橙皮苷对 AGS 细胞的杀伤作用; Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术检测橙皮苷对 AGS 细胞的诱导凋亡作用、活性氧水平及加入活性氧清除剂 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (NAC) 后细胞凋亡变化情况; Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关蛋白的表达。结果 MTT 比色法检测结果显示橙皮苷对 AGS 具有良好的增殖抑制作用。经橙皮苷处理后 AGS 细胞呈现细胞核固缩、细胞皱缩等凋亡现象。Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞术检测结果表明橙皮苷可以诱导 AGS 细胞发生线粒体依赖性凋亡, 增加细胞内活性氧的水平, 预处理 NAC 后, 橙皮苷的诱导凋亡作用被抑制。Western blotting 检测结果显示 p-JNK、p-p38、Bad、cleaved Caspase-3 及活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (cleave PARP) 蛋白表达水平升高, 抗凋亡蛋白磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK) 及 Bcl-2 表达水平降低, 说明橙皮苷激活了 AGS 细胞中的 MAPK 信号通路及线粒体依赖性凋亡。结论 橙皮苷对 AGS 细胞具有良好的杀伤作用, 并通过提高 AGS 细胞内活性氧水平, 进而调控 MAPK 信号通路来诱导 AGS 细胞发生线粒体依赖性凋亡。

关键词: 橙皮苷; 胃癌 AGS 细胞; 细胞凋亡; MAPK 信号通路; 活性氧

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5484-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.015

Effects of hesperidin on apoptosis of human gastric cancer AGS cells and its mechanism

Wang Zhen-dong¹, Gong Hui-jie¹, Ma Jun-wen²

1. Department of Gastroenterology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of hesperidin on apoptosis of gastric cancer AGS cells and its related molecular mechanisms. **Methods** MTT assay was used for the killing effect of hesperidin on human gastric cancer AGS cells; Annexin V-FITC/PI double staining and flow cytometry was used to detect the apoptosis induced by hesperidin on AGS cells, the level of reactive oxygen species, and the addition of NAC Post-apoptosis changes; Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related proteins and signaling pathway-related proteins. **Results** MTT assay showed that hesperidin had a good inhibiting effect on AGS cells. After treated with hesperidin, AGS cells showed apoptosis such as nuclear condensation and cell shrinkage. Annexin V-FITC/PI double staining and flow cytometry showed that hesperidin can induce mitochondrial dependent apoptosis of AGS cells and increase the level of intracellular reactive oxygen species. After pretreatment of NAC, hesperidin induced apoptosis inhibition. The results of Western blotting showed that the expression of p-JNK, p-p38, Bad, cleaved Caspase-3, and cleaved PARP increased, and the expression of anti-apoptotic proteins p-ERK and Bcl-2 decreased, which indicated that hesperidin activated the MAPK signaling pathway and mitochondria-dependent apoptosis in AGS cells. **Conclusion** Hesperidin has a good killing effect on

收稿日期: 2019-03-16

基金项目: 宁夏自然科学基金: 转录因子 OCT1 调控 ERK 信号通路对胃癌细胞增殖侵袭的影响及机制研究 (NZ16132)

作者简介: 王振东 (1984—), 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为中医药防治肝胆脾胃疾病。Tel: 15311657009

*通信作者 马俊文 (1972—), 男, 宁夏人, 回族, 学士, 副主任医师, 研究方向为胃肠道肿瘤的临床及基础研究。

Tel: 13629500198 E-mail: ffusd61@163.com

human gastric cancer AGS cells, and induces mitochondria-dependent apoptosis in AGS cells by increasing the level of reactive oxygen species in AGS cells and regulating MAPK signaling pathway.

Key words: hesperidin; human gastric cancer AGS cells; cell apoptosis; MAPK signal pathway; reactive oxygen species

胃癌是发生在胃部的恶性肿瘤,2018 年世界卫生组织在全球范围内的调查研究统计发现,全球范围内胃癌新发病例超百万例,而因胃癌去世的人数约 80 万,在恶性肿瘤发病率居第 5 位、死亡率居第 3 位,中国胃癌发病人数占全球所有胃癌新发病例的 40% 以上^[1-2]。目前在胃癌的治疗主要分为手术治疗、化学治疗和放射治疗,同时又以化学治疗为主要手段,但都存在毒副作用强和预后差的缺点^[3]。而在目前的化疗药物中,大多数经批准在临床上使用的抗癌药物是未经修饰的天然产物或半合成衍生物,天然提取物较现有的化疗药物具有药效强且毒副作用较小的优点,因此天然提取物被认为是未来癌症治疗药物的一个有前途的研究方向^[4]。

橙皮苷又称陈皮苷、橘皮苷,分子式为 $C_{28}H_{34}O_{15}$,是来源于豆科、唇形花科、蝶形花科、芸香科、柑橘属植物的一种天然的黄酮类化合物^[5]。目前研究证明橙皮苷有多种药理作用,主要包括抗衰老、抗炎、抗血液凝固、提升机体免疫力、心血管系统保护、神经保护及抗癌等作用^[6]。近年来有研究指出,橙皮苷能够通过死亡受体信号通路并调控 Bcl2/Bax 蛋白进而激活肝癌 HepG2 细胞内 Caspase-9、Caspase-8 及 Caspase-3 蛋白的表达进而诱导 HepG2 细胞发生凋亡^[7]。此外,橙皮苷能够通过调节 c-JNK 氨基末端激酶和细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路影响激活子蛋白-1 (AP-1) 和重组人 CCAAT 增强子结合蛋白 (C/EBP) 的结合,从而调控乳腺癌 MCF-7 细胞的转录水平^[8]。还有研究指出橙皮苷能够诱导肺癌细胞发生凋亡并抑制其增殖,但是对正常的肺部纤维母细胞没有呈现出细胞毒性^[9]。虽然目前橙皮苷可以通过调控多条信号通路及蛋白有效地抑制多种癌细胞的增殖并诱导癌细胞凋亡,但其对胃癌的药效和药理机制尚未见报道。本实验探究橙皮苷对人胃癌 AGS 细胞的杀伤作用、诱导凋亡作用及分子机制,以期对胃癌及其他癌症的治疗和新药开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人胃癌 AGS、MKN-28 细胞,人正常肝 L-02 细胞和肾 293T 细胞系均来自于中国科学院细胞研究所。

1.2 药品和试剂

橙皮苷 (批号 160509,质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司;5-氟尿嘧啶 (5-FU)、二甲基亚砜 (DMSO)、RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 均由美国 Gibco 公司提供;青-链霉素双抗 (PS) 及胰蛋白酶 (TE) 及磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购自于美国 Hyclone 公司;N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC),批号 HR8848-JZH,北京百奥莱博生物科技有限公司;噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Amresco 公司;JC-1 荧光探针试剂盒、AnnexinV/PI 试剂盒均购自上海碧云天公司; α -tubulin、Bad、Bcl-2、Caspase-3、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP)、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购自美国 Santa 公司;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 和 ECL 化学发光试剂均购自中国赛默飞科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

AGS、MKN-45、L-02 和 293T 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 ,饱和湿度的培养箱中培养。待细胞至对数生长期时,按照比例进行传代培养。

2.2 MTT 比色法检测橙皮苷对细胞增殖的影响

收集处于对数生长期的 AGS、MKN-28、L-02 和 293T 细胞,制成细胞密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,每孔以 100 μ L 接种至 96 孔板中并将其放置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育。培养 1 d 后用 1% FBS 的培养液饥饿 2~4 h,并同时设立阳性对照组和对照组,实验组中每孔加入 1 μ L 不同浓度 (0、3、10、30、60、100 μ mol/L) 的橙皮苷,阳性对照组用常用的化疗药物 5-FU 做同样浓度的处理,对照组中每孔加入 1 μ L DMSO,以上 3 组均设定 8 个复孔。在培养箱中处理 24 h 后,每孔加入 15 μ L 0.5% 的 MTT 溶液并继续孵育 2 h,弃去上清,每孔加入 100 μ L DMSO,震荡 10 min,调节酶联免疫检测仪于 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值,计算细胞存活率及其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。每个实验结果重复 3 次。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

2.3 Annexin V/PI 双染法检测橙皮苷对 AGS 细胞形态的影响

收集处于对数生长期且生长状态良好的 AGS 细胞制成细胞悬液, 以 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板。5% CO_2 、37 °C 培养箱培养 24 h 后, 以 20 $\mu\text{mol/L}$ 的橙皮苷处理细胞 (3、6、12、24 h), 另设 0 h 为对照组, 收集细胞后用 1 mL 细胞染色缓冲液进行重悬, 随后每组加入 5 μL Annexin V 染液和 5 μL PI 染液混匀, 冰浴孵育 30 min 后通过倒置显微镜观察 AGS 细胞的形态学变化, 并进行分析。

2.4 流式细胞术检测橙皮苷对 AGS 细胞凋亡及线粒体膜电位的影响

收集处于对数生长期且生长状态良好的 AGS 细胞, 以 1×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板, 5% CO_2 、37 °C 培养箱中孵育 24 h。用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的橙皮苷分别处理细胞 3、6、12、24 h, 另设 0 h 为对照组, 收集细胞并过 PBS 清洗后, 利用碧云天 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 加入 195 μL 的 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 再加入 3 μL Annexin V-FITC 与 2 μL PI, 室温避光孵育 15 min, 每组加入 300 μL PBS, 转移至流式管后流式细胞仪检测细胞凋亡率, 实验重复 3 次。随后用 JC-1 试剂盒检测橙皮苷处理后 AGS 细胞线粒体膜电位变化情况。

2.5 Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白表达

将生长状态良好的 AGS 细胞接种于 6 孔板中 (2×10^5 /孔), 以 20 $\mu\text{mol/L}$ 的橙皮苷处理 AGS 细胞不同时间 (3、6、12、24 h), 另设 0 h 为对照组, 回收细胞至 Tube 管中, 提取蛋白, 每孔加入 100 μL 细胞裂解液处理, 在碎冰块上裂解 30 min, 每隔 10 min 敲打 1 次。4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 通过紫外分光光度计测得在 595 nm 处 A 值。12% SDS-PAGE 电泳分离, 将蛋白转至 NC 膜上后, 利用质量分数为 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min, 加入 Bcl-2、Bad、cleaved Caspase-3、cleaved PARP、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38 及 α -tubulin 一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。采用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min, 通过 Image J 图像分析软件对条带进行定量分析。

2.6 流式细胞术检测细胞内活性氧 (ROS) 水平

收集处于对数生长期的 AGS 细胞, 以 1×10^5 /

孔的密度接种至 6 孔板, 于 5% CO_2 、37 °C 培养箱中孵育 24 h。用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的橙皮苷处理细胞 3、6、12、24 h, 另设 0 h 为对照组, 收集细胞, 弃去上清后 PBS 洗涤 1 次。加 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA, 37 °C 恒温水浴锅中避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 500 μL PBS 重悬细胞, 转移至流式管后流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.7 NAC 对橙皮苷诱导 AGS 细胞凋亡的抑制作用

收集处于对数生长期的 AGS 细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种至 6 孔板, 于 5% CO_2 、37 °C 培养箱中孵育 24 h。设对照组、橙皮苷 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、NAC (5 mmol/L) 组和橙皮苷+NAC 组, 以终浓度为 5 mmol/L 的 ROS 清除剂 NAC 预处理 30 min 后, 用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的橙皮苷处理 AGS 细胞 24 h。以 PBS 洗涤 1 次, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 再加入 3 μL Annexin V-FITC 及 2 μL PI, 避光孵育 15 min, 300 μL PBS 重悬, 转移至流式管中通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。取另外一批细胞经同样处理后, 提取总蛋白, 用于 Western blotting 检测。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 橙皮苷对胃癌细胞的增殖抑制作用

MTT 实验结果表明, 随着橙皮苷浓度的增加, AGS 和 MKN-28 细胞的存活率逐渐降低, 并呈现浓度依赖性, 表明橙皮苷对 AGS 和 MKN-28 细胞具有良好的抑制增殖作用; 并与 5-FU 阳性对照组进行了相同浓度的增殖抑制对比, 结果显示 2 组具有显著性差异。进一步对 L-02 细胞和 293T 细胞做了相同浓度梯度的实验, 结果显示橙皮苷处理相比 5-FU 对正常细胞的增殖抑制作用更小 (图 1)。通过 SigmaPlot 软件计算橙皮苷抑制 AGS 和 MKN-28 细胞的 IC_{50} , 分别为 (26.85 ± 2.57) 、 (34.58 ± 3.69) $\mu\text{mol/L}$ 。由于实验中 AGS 细胞 IC_{50} 值较小, 表明 AGS 细胞对橙皮苷的敏感程度最高, 所以后续实验中以 AGS 细胞作为研究对象。

3.2 橙皮苷对 AGS 细胞凋亡的影响

结果显示, 随着橙皮苷处理细胞时间的延长, 所观察到的绿色荧光强度逐渐增强 (图 2-A、B), 说明 AGS 细胞凋亡程度在逐渐增强。处理 24 h 后, AGS 细胞的荧光强度最高, 在明场条件下能很明显的观察到细胞皱缩、细胞密度减小等凋亡形态变化。

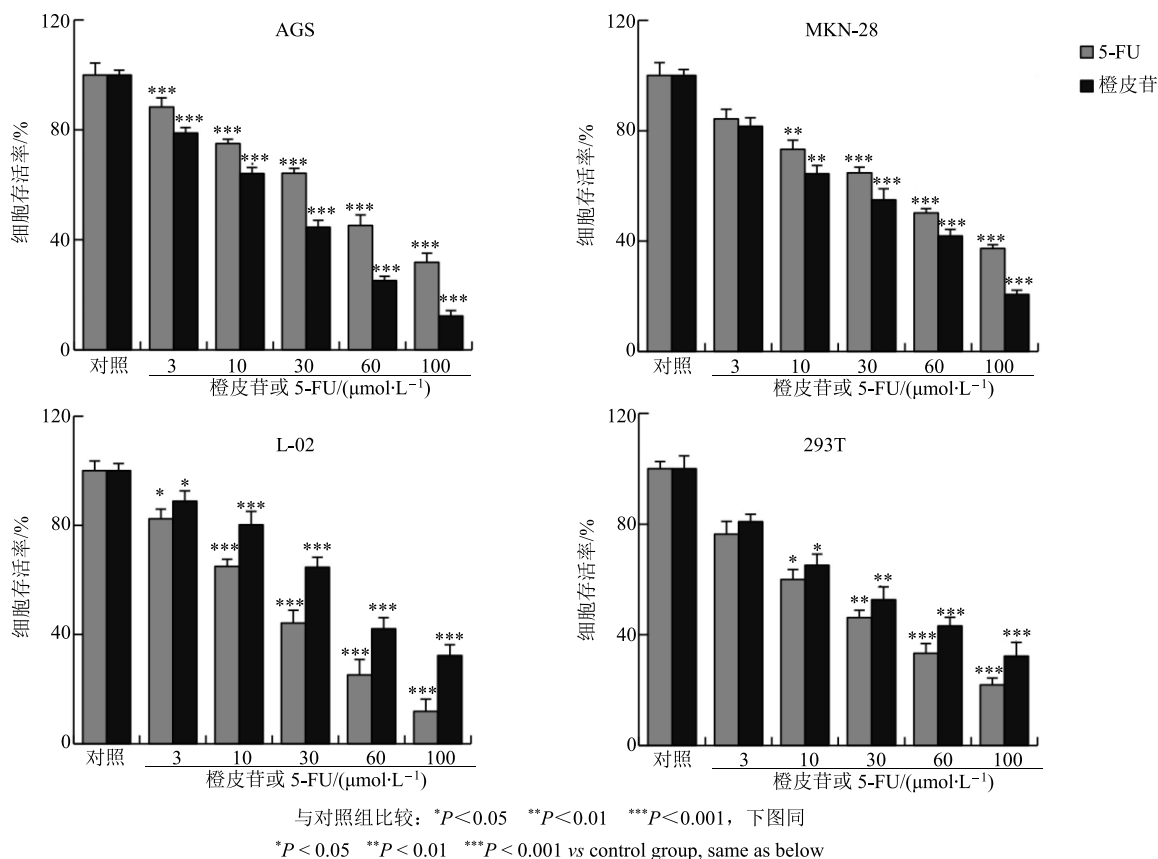


图 1 橙皮苷对 2 种胃癌细胞和 2 种正常细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of hesperidin on viabilities of AGS, NCI-H23, L-02, and 293T cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

随后利用流式细胞术检测相同处理后凋亡细胞的数量,从图 2-C 中可以看出随着橙皮苷处理时间的不断延长,细胞凋亡数量逐渐增加,当处理时间为 24 h 时,细胞凋亡水平达到最高。3、6、12、24 h 坏死和凋亡晚期细胞百分率分别为 $(19.37 \pm 2.14)\%$ 、 $(22.34 \pm 3.24)\%$ 、 $(25.63 \pm 2.87)\%$ 和 $(40.29 \pm 4.54)\%$,与对照组比较差异显著。线粒体膜电位的变化(图 2-D)结果表明,随着处理时间的增加,右上象限的细胞数量逐渐降低,而右下象限的细胞数量逐渐升高,说明线粒体膜电位逐渐降低,细胞发生线粒体依赖性凋亡。进一步从分子水平通过 Western blotting 检测凋亡蛋白的表达量变化情况,发现随着橙皮苷处理的时间不断延长,促凋亡蛋白 Bad、cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 表达水平升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平降低(图 2-E)。综合以上实验结果可以判定,橙皮苷能够诱导人胃癌 AGS 发生细胞凋亡。

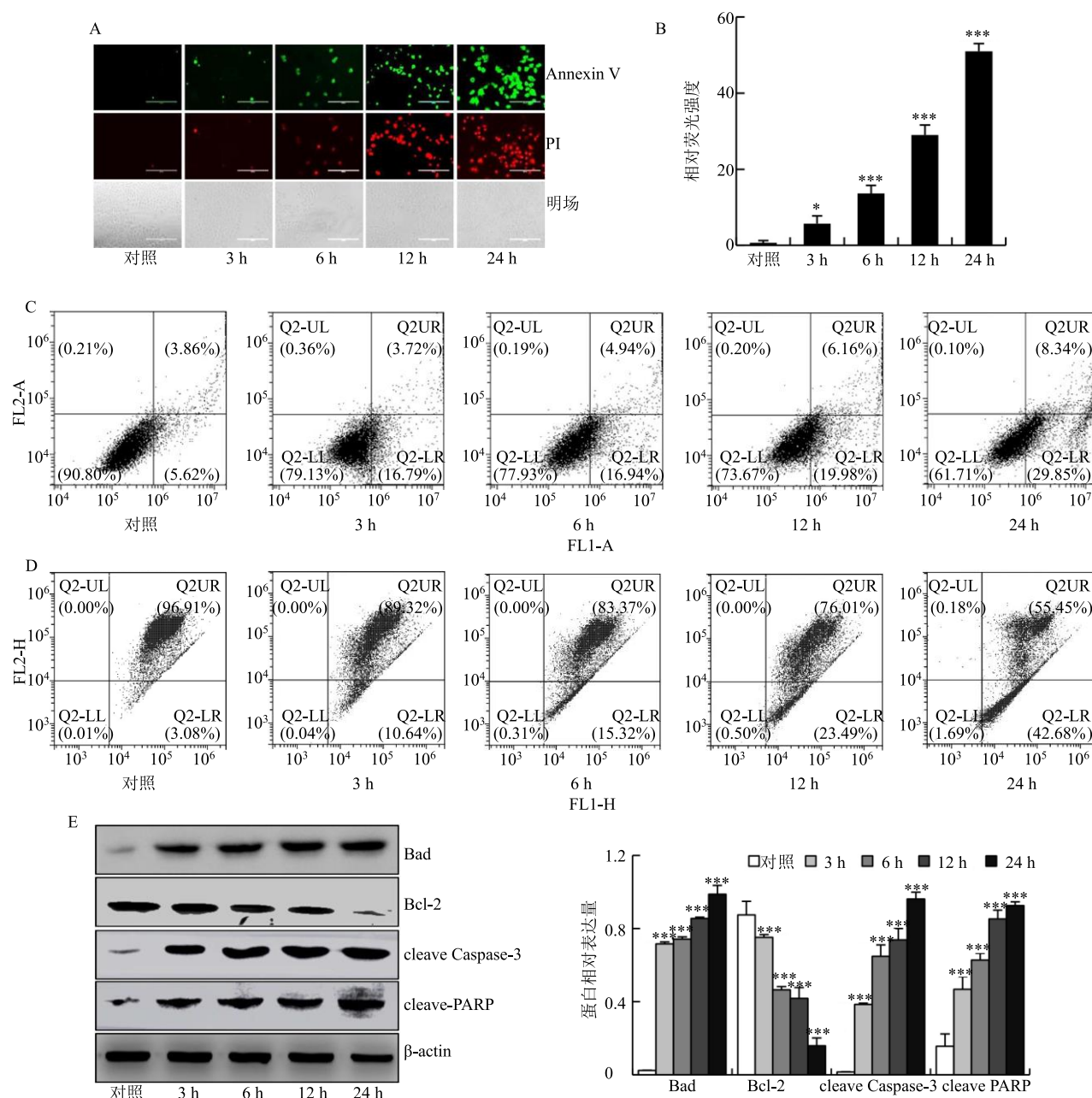
3.3 橙皮苷对 AGS 细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白表达的影响

从图 3 中可以看出,与对照组比较,随着橙皮

苷处理时间的不断增加,促凋亡蛋白 p-JNK 和 p-p38 表达水平逐渐升高,抗凋亡蛋白 p-ERK 表达水平逐渐降低,表明橙皮苷通过调控 MAPK 信号通路诱导 AGS 细胞发生凋亡,进而对 AGS 细胞发挥良好的杀伤作用(图 3)。

3.4 橙皮苷对 AGS 细胞内 ROS 水平的影响

为了探究橙皮苷诱导 AGS 细胞发生凋亡是否与细胞内 ROS 水平有关,以橙皮苷处理 AGS 细胞不同时间(3、6、12、24 h)后,加入 DCFH-DA 荧光探针,并通过流式细胞术检测细胞内 ROS 水平变化情况。从图 4-A、B 中可以看出,随着橙皮苷处理时间的不断增加,峰图向右侧移动,说明 AGS 细胞内 ROS 水平逐渐升高,并呈现时间依赖性。同时,加入 ROS 清除剂 NAC 后,对细胞凋亡数量进行检测,从图 4-C、D 看出,与 NAC 单独处理组比较,橙皮苷与 NAC 共同处理组的细胞凋亡率显著降低。这表明橙皮苷通过上调细胞内 ROS 水平诱导 AGS 细胞发生凋亡。Western blotting 法检测 MAPK 通路相关蛋白及凋亡相关蛋白的表达,结果显示(图 4-C)橙皮苷单独处理组的细胞中 p-p38、p-JNK 和



A-Annexin V-FITC/PI 双染 ($\times 200$) B-A 图的定量分析 C-流式细胞术检测细胞凋亡情况 D-JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位变化情况 E-Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白的表达量变化情况 F-E 图细胞凋亡蛋白的定量分析

A-Annexin V-FITC/PI double staining ($\times 200$) B-The quantitative analysis of A C-Apoptotic radios were detected by flow cytometry D-Mitochondrial membrane potential changes were detected by JC-1 E-The expression levels of apoptosis-related proteins detected by Western blotting F-The quantitative analysis of the expression levels of apoptosis-related proteins detected by Western blotting

图 2 橙皮苷对 AGS 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of hesperidin on apoptotic of AGS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

cleaved Caspase-3 蛋白表达水平与对照组比较明显升高, p-ERK 和 p-STAT3 蛋白质表达水平则明显降低。但是橙皮苷和 NAC 共同处理组细胞中 p-p38、p-JNK 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平与橙皮苷单独处理组比较显著降低,同时 p-ERK 蛋白的表达水平显著

升高。以上结果表明,橙皮苷可以通过调控胃癌 AGS 细胞内 ROS 的表达水平上升来激活 MAPK 信号通路,从而诱导胃癌 AGS 细胞发生细胞凋亡。

4 讨论

近年来,随着对胃癌研究的进一步深入,越来越

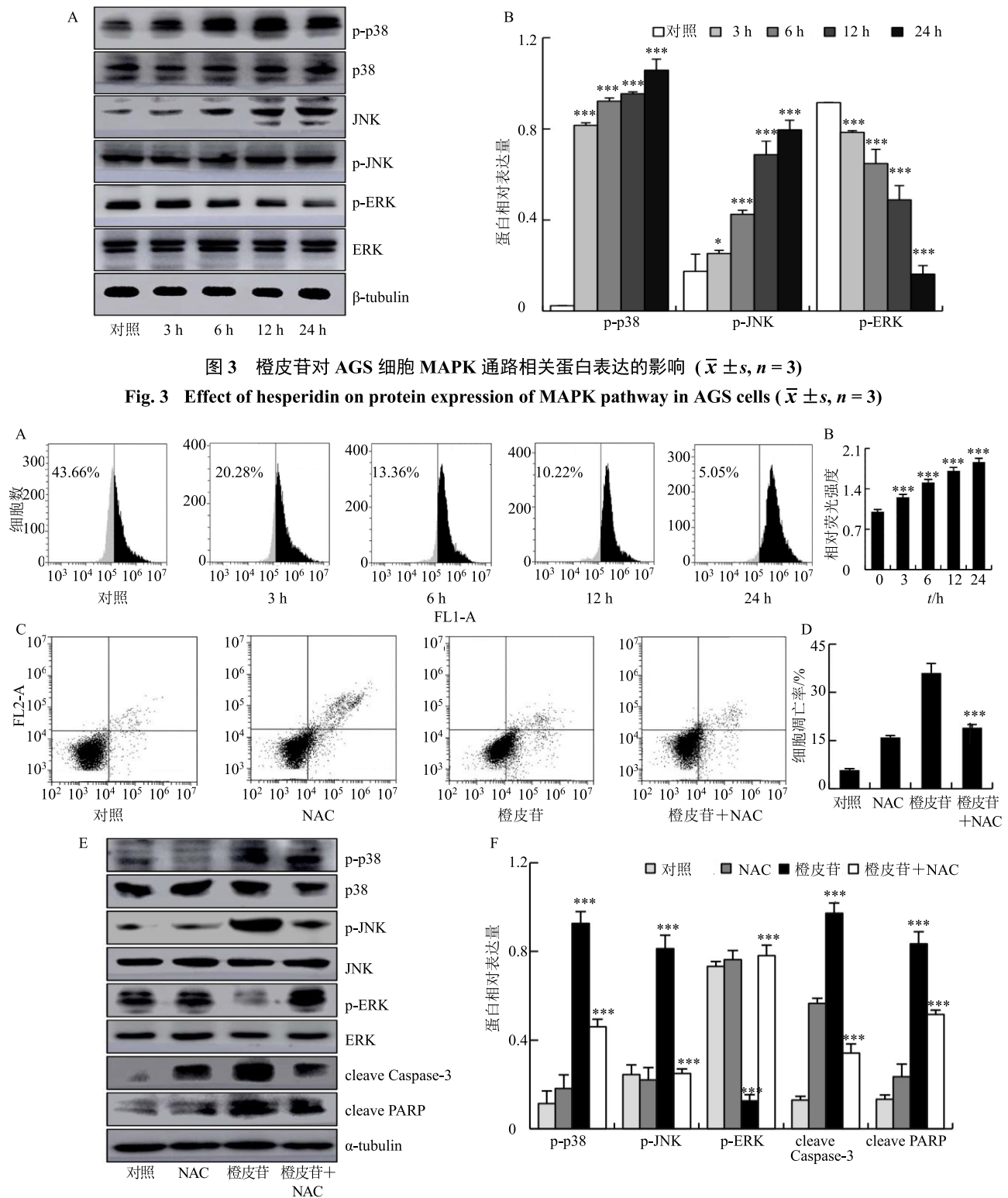


图 3 橙皮苷对 AGS 细胞 MAPK 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A-流式细胞术检测细胞内 ROS 水平 B-A 图的定量分析 C-NAC、橙皮苷、橙皮苷+NAC 对 AGS 细胞凋亡的影响 D-C 图的定量分析 E-Western blotting 检测上游相关蛋白表达水平 F-E 图细胞凋亡蛋白的定量分析

A-The intracellular ROS levels were determined by flow cytometry B-The quantitative analysis of A C-The Apoptotic effect of AGS cells treated with NAC, hesperidin and CT + NAC D-The quantitative analysis of C E-The expression levels of upstream-related proteins determined by Western blotting F-The quantitative analysis of the expression levels of signal pathway and apoptosis related proteins detected by Western blotting

图 4 橙皮苷对 AGS 细胞内 ROS 的水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of hesperidin on level of ROS in AGS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

越多的研究学者认为细胞凋亡在肿瘤发生和发展的过程中扮演着重要角色,将诱导癌细胞发生凋亡列为有前景的癌症治疗方向之一^[10-11]。ROS 是人体内代谢的正常产物,在调节细胞信号通路和体内平衡过程中发挥重要的作用,有研究表明,细胞凋亡受到细胞内 ROS 水平及其相关信号通路的调控,因此调节细胞内 ROS 水平可以使细胞的稳态的变化进而调节细胞凋亡的进程^[12]。橙皮苷属于二氢黄酮类衍生物,具有多种生理活性,能够诱导肝癌、乳腺癌和肺癌等多种癌细胞发生凋亡,但其对胃癌细胞的作用尚不明确。本研究结果表明,随着橙皮苷处理浓度的不断升高,AGS 细胞存活率明显降低,说明橙皮苷对 AGS 细胞具有明显的增殖抑制作用,呈剂量依赖性,且抑制效果较常用的阳性对照药物 5-FU 更强。为了验证橙皮苷是否是通过诱导 AGS 细胞发生凋亡进而抑制其增殖,通过 Annexin V-FITC/PI 双染和流式细胞术检测橙皮苷对 AGS 细胞的诱导凋亡能力,结果表明橙皮苷处理后 AGS 细胞生长受到抑制,细胞体积逐渐缩小,细胞形态逐渐由圆型变皱缩,出现类似凋亡的形态。在荧光显微镜下发现随着橙皮苷处理时间的不断增加细胞形态发生不规则变化并出现凋亡小体,细胞荧光强度逐渐增强,凋亡细胞数量逐渐增多。流式细胞术检测细胞凋亡的结果也显示出橙皮苷能够以时间梯度来诱导 AGS 细胞发生凋亡。

细胞凋亡可以分为线粒体依赖性途径和线粒体非依赖性途径,其中线粒体依赖性凋亡受 Bcl-2 蛋白家族的调节,Bad 和 Bcl-2 蛋白之间的平衡影响着 Caspase-3 蛋白的活化,活化后的 Caspase-3 会进一步剪切下游的 PARP 蛋白,使 PARP 失去其酶活力最终导致线粒体途径的细胞凋亡^[13-14]。本实验中进一步利用 JC-1 荧光探针^[15-16]对橙皮苷处理后的细胞进行检测,随着处理时间的延长,细胞绿/红比率上升,细胞的线粒体膜电位降低,细胞发生线粒体依赖性凋亡。随后检测了相关凋亡蛋白的表达量,结果表明橙皮苷可以上调 Bad、cleaved Caspase-3、cleaved PARP 蛋白的表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达。以上结果表明,橙皮苷可以诱导 AGS 细胞发生线粒体依赖性凋亡。

MAPK 是一类蛋白激酶,主要包括 ERK、JNK 和 p38 3 个亚族,调控着细胞的生长、分化和凋亡等多项生命进程^[17]。有研究指出,P38 和 JNK 的磷酸化能够可以上调 cleaved Caspase-3 和 cleaved

PARP 的表达,诱导胃癌细胞发生凋亡^[18];而 ERK 也可以调节 Bcl-2 蛋白家族的多个成员诱导来激活线粒体依赖性凋亡^[19],都表明 MAPK 信号通路在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要的角色。为了验证橙皮苷是否通过调控以上通路诱导 AGS 细胞发生凋亡,利用 Western blotting 实验对上游相关蛋白表达情况进行检测,发现橙皮苷可以上调 p-JNK、p-p38 蛋白的表达,下调 p-ERK 蛋白的表达。以上结果表明,橙皮苷可以通过调控 MAPK 信号通路诱导 AGS 细胞发生凋亡。

ROS 水平直接关系到细胞中的内环境稳态的平衡,当细胞内 ROS 水平升高时,线粒体的通透性发生改变,基质肿胀,外膜破裂,导致细胞凋亡信号分子释放。此外,ROS 还调节细胞内多条信号通路,如核转录因子- κ B (NF- κ B)、信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 和 MAPK 等,进而表现出调控细胞生长、分化、凋亡和侵袭等生物学效应^[17,20]。本实验通过流式细胞术检测细胞内 ROS 水平,发现随着橙皮苷处理时间的不断增加,AGS 细胞内 ROS 水平不断升高。同时,橙皮苷与 NAC 共同处理细胞后,细胞凋亡程度明显低于橙皮苷单独处理组,橙皮苷的诱导凋亡能力被抑制,这表明橙皮苷可以通过上调细胞内 ROS 的水平,诱导 AGS 细胞发生凋亡。为了验证 MAPK 信号通路的激活是否是由 ROS 调控的,进一步在分子水平上检测了 MAPK 相关蛋白和凋亡相关的表达量变化情况,从实验结果中可以看出 ROS 清除剂 NAC 显著逆转了 MAPK 信号通路的激活和凋亡蛋白的变化,因此可以判定,橙皮苷通过调控 ROS 水平来调控 AGS 细胞凋亡。

本研究初步阐明了橙皮苷对 AGS 细胞具有良好的杀伤作用,并证明了橙皮苷通过提高 AGS 细胞内 ROS 水平,进而调控 MAPK 信号通路来诱导 AGS 细胞发生线粒体依赖性凋亡,这为胃癌及其他癌症的治疗与新药开发提供了新思路。

参考文献

- [1] Song Z, Wu Y, Yang J, *et al.* Gastric cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention [J]. *Cancer Epid Biomarker Prev*, 2014, 23(5): 700-713.
- [2] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52-58.
- [3] Strong V E, Wu A W, Selby L V, *et al.* Differences in gastric cancer survival between the U. S. and China [J]. *J Surg Oncol*, 2015, 112(1): 31-37.
- [4] 黎军和,熊建萍. 胃癌分子靶向治疗研究新进展 [J].

- 中国肿瘤临床, 2015, 42(23): 1118-1123.
- [5] Xia R, Sheng X, Xu X, *et al.* Hesperidin induces apoptosis and G₀/G₁ arrest in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 464-472.
 - [6] 夏荣木, 陆红玲. 橙皮苷抗肿瘤活性研究进展 [J]. 重庆医学, 2018, 47(21): 2846-2849.
 - [7] Wang Y, Yu H, Zhang J, *et al.* Hesperidin inhibits HeLa cell proliferation through apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress pathways and cell cycle arrest [J]. *BMC Cancer*, 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1706-y.
 - [8] 张恒, 饶坤林, 向韩. 橙皮苷药理活性研究进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1097-1100.
 - [9] Zhao J, Li Y, Gao J, *et al.* Hesperidin inhibits ovarian cancer cell viability through endoplasmic reticulum stress signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5569-5574.
 - [10] Matsuura K, Canfield K, Feng W, *et al.* Metabolic regulation of apoptosis in cancer [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.06.006.
 - [11] 杨明明, 李娟. 细胞凋亡与癌症的治疗问题 [J]. 国外医学: 老年医学分册, 1998, 21(6): 271-273.
 - [12] Goldar S, Khaniani M S, Derakhshan S M, *et al.* Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2129-2144.
 - [13] 任小双, 张兰, 张燕宁, 等. 喜树碱诱导甜菜夜蛾细胞凋亡线粒体途径的 MPTP 依赖性 [J]. 昆虫学报, 2017, 60(10): 1105-1113.
 - [14] Diwanji N, Bergmann A. An unexpected friend-ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.004.
 - [15] 官福新, 周露露, 张宸豪, 等. JC-1 单染法检测 CCCP 对上皮细胞线粒体膜电位的影响 [J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(5): 324-326.
 - [16] 王珊, 李宁, 于力方, 等. 流式细胞术检测细胞凋亡比较研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2005, 12(3): 168-170.
 - [17] Zhu H, Gao Y, Zhu S, *et al.* Klotho improves cardiac function by suppressing reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis by modulating MAPKs/Nrf2 signaling in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Med Sci Monit*, 2017, doi: 10.12659/MSM.907449.
 - [18] Du X, Shi Z, Peng Z, *et al.* Acetoacetate induces hepatocytes apoptosis by the ROS-mediated MAPKs pathway in ketotic cows [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232, doi: 10.1002/jcp.25773.
 - [19] 邹少娜, 林敏, 王化修, 等. p38MAPK 在 EGCG 诱导人胃癌 MGC803 细胞凋亡中的作用 [J]. 肿瘤, 2008, 28(9): 763-766.
 - [20] Zhu J, Yu W, Liu B, *et al.* Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3113.