

槲皮素对 SMMC-7721 肝癌细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的探讨

孙佳¹,赵冬耕¹,王明艳²,赵凤鸣²,许冬青²,叶丽红^{1*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院,南京 210029; 2. 南京中医药大学基础医学院,南京 210029)

[摘要] 目的:观察槲皮素(quercetin)对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖与细胞凋亡的影响,探讨其对 SMMC-7721 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响。方法:采用 MTT 法检测槲皮素对 SMMC-7721 细胞生长的抑制,流式细胞术检测细胞周期变化,Western blot 检测槲皮素对 SMMC-7721 细胞 PI3K/AKT 信号通路凋亡相关蛋白表达的影响。结果:槲皮素抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖作用明显,且呈浓度和时间依赖性。顺铂和槲皮素 40,80,160,320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 48 h 抑制率分别为 62.19%,25.47%,27.18%,36.96%,51.28%。流式细胞术结果提示,槲皮素 80,160,320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使 SMMC-7721 肝癌细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。Western blot 凋亡相关蛋白表达检测表明,药物组 AKT 的表达受抑制,PTEN,Caspase-9 蛋白的表达率随着药物浓度的增加而增加。结论:槲皮素能诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡,其机制可能是使肝癌细胞 SMMC-7721 周期阻滞于 G₀/G₁ 期,PTEN 的过表达抑制 AKT 活化,激活 Caspase-9 从而促进细胞凋亡。

[关键词] 槲皮素; SMMC-7721 肝癌细胞; PI3K-AKT 信号通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0223-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1203.016.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:03

Influence of Quercetin on PI3K/AKT Signal Pathway
of SMMC-7721 Hepatic Cancer Cells

SUN Jia¹, ZHAO Dong-geng¹, WANG Ming-yan², ZHAO Feng-ming², XU Dong-qing², YE Li-hong^{1*}

(1. First Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of quercetin on the apoptosis of hepatic cancer cells SMMC-7721 and on PI3K/AKT signal pathways in SMMC-7721 cells. **Method:** Inhibitory effect of quercetin on SMMC-7721 cell growth was detected by MTT assay. Cell cycle changes were analyzed by flow cytometry (FCM). The Western blot test was employed for evaluating influence of quercetin on apoptosis related protein expression in PI3K/AKT signal pathways of SMMC-7721. **Result:** Quercetin inhibited cell proliferation of SMMC-7721 obviously, and in a concentration and time dependence manner. The inhibition rates of cisplatin and quercetin (40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h) were 62.19%, 25.47%, 27.18%, 36.96%, 51.28% respectively. FCM showed that 80, 160, 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of quercetin could arrest SMMC-7721 cells in G₀/G₁ phase. Western blot showed that apoptosis related protein expression testing showed that the expression of AKT inhibited in the drug groups, and the protein expression of PTEN, caspase-9 increased with the drug concentration. **Conclusion:** Quercetin can induce apoptosis of SMMC-7721 cell, its mechanism could be related to hepatic cancer cells SMMC-7721 arrested in G₀/G₁ phase, the inhibition of AKT activation by PTEN gene over-expression, and the promotion of apoptosis by caspase-9 activation.

[收稿日期] 20120227(201)

[基金项目] 南京中医药大学基础研究与重点培育专项基金项目[10XJC03]

[第一作者] 孙佳,05 级中医学七年制,从事肿瘤内科疾病研究, E-mail:sunjia19870520@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 叶丽红,博士,副教授,副主任医师,从事中医内科常见病多发病尤其是恶性肿瘤的教学与临床工作, Tel:13805151622, E-mail:cocolihongye@126.com

[Key words] quercetin; hepatic carcinoma cell lines SMMC-7721; PI3K/AKT signal pathway; apoptosis

抗癌扶正方 (Recipe of Antiliver Cancer, ALC) 是根据周仲瑛教授在临床治疗肝癌的常用药物配伍,选用漏芦 10 g,泽漆 10 g,当归 10 g 等药物组成。前期动物模型研究表明,对 HAC 移植性肝癌小鼠模型具有良好的抗癌作用,可以加速肝癌细胞坏死^[1]。体外人肝癌细胞 SMMC-7721 实验显示,ALC 能够抑制细胞活性,其可能的机制在于下调凋亡抑制基因 Bcl-2, p⁵³ 的表达,促进细胞凋亡的产生^[2-3]。槲皮素 (quercetin) 是泽漆单体成分之一,在实验研究中,其对胃癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、大肠癌等多种人肿瘤细胞均有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。PI3K/AKT 信号通路为细胞内信号传导途径,目前发现与乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤相关,该通路调节肿瘤细胞的增殖和存活,其活性异常与细胞恶性转化、迁移、黏附、肿瘤血管形成及肿瘤外基质的降解等相关,近年来备受瞩目^[4]。因此,对 PI3K/AKT 信号通路中关键基因、蛋白的深入研究显得很必要,有望将来应用于肿瘤的临床治疗中。槲皮素对肝癌细胞 SMMC-7721 在 PI3K/AKT 信号通路方面的作用机制探讨较少,本实验研究槲皮素对肝癌细胞 SMMC-7721 生长抑制率及对 PI3K/AKT 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及其培养 人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国科学院上海细胞研究所。将细胞接种于 25 mL 塑料培养瓶,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (FCS), 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养,隔天换培养液,待细胞单层铺满培养瓶后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,1 ~ 2 min 后,待镜下细胞圆缩,细胞间出现较多裂隙时,即加入 10% 小牛血清的 DMEM 培养液终止消化,并用尖吸管吹打成单个细胞悬液,按 1:2 加培养液分瓶,传代。

1.2 药物 槲皮素 (quercetin): 纯度 98%, 南京泽朗医药科技有限公司提供,批号 ZL1106010。顺铂 (Cisplatin, 简称 DDP), 南京制药有限公司。

1.3 试剂 DMEM 培养基 (Hyclone 公司), 小牛血清 (Gibco, USA), 0.25% 的胰蛋白酶 (Merck, USA), Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒 (南京凯基生物公司), 噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 及所有抗体均为 Cell Signaling Technology 公司产品。

1.4 噻唑蓝还原法 (MMT 法) 检测槲皮素对肝癌细

胞增殖的影响 在无菌条件下,取对数生长期的人肝癌细胞 SMMC-7721,按细胞培养方法,将细胞调整为 1 × 10⁴/mL,接种于 96 孔培养板,每孔加 200 μL 10% FCS,置 37 ℃, 5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养过夜,待其贴壁后,吸弃上清液,每组设 6 个复孔,对照组、顺铂组、槲皮素各组加入不同浓度的药物,每孔各加 20 μL,余用 10% FCS 补足至 200 μL。使诸药物终质量浓度 DDP 为 4 mg · L⁻¹,槲皮素为 40, 80, 160, 320 μmol · L⁻¹。加药后继续培养 24 h, 48 h 后,每孔加入 20 μL (5 g · L⁻¹) 的 MTT,继续培养 4 h 后,弃去上清,各孔加入 150 μL 的 DMSO,轻轻振荡约 10 min 使其溶解,酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度 (A),经计算得细胞生长抑制率 (IR)。

$$IR = (A_{\text{正常组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{正常组}} \times 100\%$$

1.5 流式细胞仪检测细胞周期 以 80, 160, 320 μmol · L⁻¹ 的槲皮素处理 SMMC-7721 细胞 48 h 后,收集细胞制成单细胞悬液,0.01 mol · L⁻¹ PBS 洗涤 2 次,70% 冰乙醇固定过夜,PI 染色,流式细胞仪检测,分析细胞周期,以正常组为对照组。

1.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 将人肝癌细胞 SMMC-7721 按 1 × 10⁴/瓶接种于 25 mL 培养瓶中,培养过夜待其贴壁后,分别加入 4 mL DMEM 培养液和 1 mL 各组药液;对照组加入 5 mL 的 DMEM 培养液,继续孵育培养 48 h 后,提取各组细胞的总蛋白,并用 BCA 法测定蛋白浓度,加热变性后 -20 ℃ 保存。取各组细胞的总蛋白 70 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF,封闭液封闭滤膜 4 h,按 0.1 mL · cm⁻² 的量加入封闭液和适量一抗 Caspase-9 (1:500), P-AKT (ser473), PTEN (1:1 000), 摇床摇荡孵育 (4 ℃, 过夜)。PBST 漂洗滤膜 4 次,每次 10 min。将膜与 HRP 结合的二抗 (辣根过氧化物酶标记羊抗兔,二抗用封闭液稀释) (1:5 000) 室温下摇荡孵育 2 h,用 PBST 充分洗膜,漂洗 4 次,每次 10 min。按 0.1 mL · cm⁻² 显影液计算用量,将显影液加于硝酸纤维素膜 (nitrocellulose, NC 膜) 上,室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好,暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 射线胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带。

1.7 统计学处理 采用 SPASS 17.0 统计分析软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用 槲皮素

对肝癌细胞 SMMC-7721 的生长有明显的抑制作用,呈现时间依赖性和浓度依赖性。见表 1。

表 1 槲皮素对肝癌细胞 SMMC-7721 生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	终浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h	
		A_{490}	IR/%	A_{490}	IR/%
对照	—	0.524 ± 0.054	—	1.332 ± 0.032	—
顺铂	4	0.377 ± 0.025 ¹⁾	28.06	0.508 ± 0.022 ¹⁾	62.19
槲皮素	40	0.437 ± 0.026 ¹⁾	16.62	0.956 ± 0.052 ^{1,2)}	25.47
	80	0.427 ± 0.046 ¹⁾	18.62	0.944 ± 0.067 ^{1,2)}	27.18
	160	0.370 ± 0.062 ¹⁾	29.49	0.815 ± 0.052 ^{1,2)}	36.96
	320	0.425 ± 0.018 ^{1,2)}	18.88	0.608 ± 0.036 ^{1,2)}	51.28

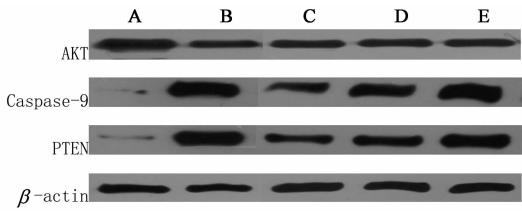
注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与顺铂组比较²⁾ $P < 0.05$;顺铂的剂量单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 对 SMMC-7721 细胞周期的影响 槲皮素作用细胞 48 h 后,与对照组相比,80,160,320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 槲皮素可使肝癌细胞 SMMC-7721 周期阻滞于 G_0/G_1 期。见表 2。

表 2 槲皮素对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞周期的影响 %

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	—	35.50	40.70	23.79
槲皮素	80	49.41	35.35	15.24
	160	44.26	41.64	14.64
	320	55.08	27.75	17.17

2.3 对凋亡相关蛋白表达的影响 槲皮素作用 48 h 后,经 Western blot 检测分析表明,药物组 AKT 的表达明显受到抑制,PTEN, Caspase-9 蛋白的表达率随着药物浓度的增加而增加。见图 1。



A. 对照组;B. 顺铂 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. 槲皮素 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; D. 槲皮素 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;E. 槲皮素 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1 槲皮素对凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

细胞凋亡是指为维持内环境稳定由基因控制的机体正常细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发的死亡过程。细胞凋亡过程的启动和进行受到精确调控,各种凋亡信号通过信号传导通路传至细胞内,激活靶分子而产生细胞效应,引发细胞凋亡。

PTEN-PI3K/AKT 信号转导通路参与细胞凋亡。PTEN 是一种新的抑癌基因,其最重要的底物是磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸(PIP3),PIP3 为磷脂酰肌

醇-3 激酶(PI3K)的产物并介导 AKT 的活化,PTEN 则使 PIP3 脱磷酸,以维持 PIP3 的低水平,从而下调 PI3K/AKT 通路^[5]。活化的 AKT 是细胞存活因子,能降低凋亡因子与增加抗凋亡蛋白的活性^[6]。PTEN 与 PI3K 协调作用,使细胞内 PIP3 的浓度处于适当水平,保持 AKT 适中的活性。PTEN 的丢失使细胞内 PIP3 积聚,PTEN-PI3K/AKT 信号转导通路失衡,AKT 持续活化,从而使细胞抗凋亡。PTEN 的过表达则可抑制 AKT 活化从而促进细胞凋亡,因此转染 PTEN 可诱导凋亡^[7]。

PI3K/AKT 信号通路是受多因素调节的,其负反馈主要由类脂磷酸酶 PTEN 和 SHIP2 调节,它们分别从 PIP3 的 3' 和 5' 去除磷酸而将其转变成 PI(4,5)P2 和 PI(3,4)P2 而降解,从而阻断 AKT 及下游效应分子的有效活化^[8]。因此,提高磷酸酶 PTEN 或 SHIP2 的活性能够消除 PI3K/AKT 信号通路的抗细胞凋亡作用^[9]。

Caspase 是一类半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶,参与凋亡的启动和执行过程,在凋亡发生发展过程中起着关键性作用。Caspase-9 前体能与 Apaf-1 等蛋白结合而自我激活,从而启动胱天蛋白酶级联反应。若细胞中 Caspase-9 前体的 Ser196 位点突变,则促进其蛋白酶活性,产生促凋亡作用,则发生凋亡^[10]。

本研究应用不同浓度槲皮素作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞,应用 MTT 法检测细胞增殖能力的结果表明,槲皮素对肝癌细胞 SMMC-7721 生长有明显的抑制作用,且细胞抑制率具有浓度和时间依赖性。流式细胞术分析细胞周期表明,槲皮素作用于 SMMC-7721 细胞 48 h 后, G_0/G_1 细胞比率增加,而 S 期细胞比率减少,说明细胞被阻滞于 G_0/G_1 期,即应用槲皮素后,阻止 SMMC-7721 细胞由 G_0/G_1 期向

二紫胶囊对生精障碍大鼠凋亡调控基因的影响

李 晖*
(河南省中医院,郑州 450002)

[摘要] 目的:观察二紫胶囊对生精障碍大鼠凋亡调控基因的影响。方法:将 40 只健康雄性大鼠分为模型组、对照组、二紫胶囊高、低剂量组,以环磷酰胺注射液 40 mg·kg⁻¹,ip 制造大鼠生精障碍模型,分别 ig 生理盐水、二紫胶囊浸膏(4.8,2.4 g·kg⁻¹),连续 60 d,用 TUNEL 法检测大鼠睾丸生精细胞凋亡,免疫组化法测定 Bax 和 Bcl-2 蛋白在大鼠睾丸组织中的表达。结果:与模型组相比较,二紫胶囊高、低剂量组生精细胞凋亡指数明显下调[(7.16±1.47)%, (13.83±2.40)% vs(20.50±2.17)%], Bax 蛋白表达明显下调[(16.01±2.02), (26.67±1.79) vs(9.94±1.14)](P<0.01), Bcl-2 蛋白表达明显上调[(40.12±3.06), (22.87±2.94) vs(16.26±1.03)](P<0.01)。结论:二紫胶囊能通过下调 Bax 和上调 Bcl-2 表达,减少生精细胞凋亡的发生。

[关键词] 二紫胶囊; 生精障碍; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0226-03

Effect of Erzi Capsule on Apoptosis Genes in Rat with Spermatogenic Failure

LI Hui*
(Henan Provincial Hospital of Traditinoal Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[收稿日期] 20120426(316)
[通讯作者] *李晖,主治医师,硕士,从事中医生殖医学研究,Tel:0371-60979825,E-mail:Leehui.2005@yahoo.com.cn

S 期和 G₂/M 期移行。关于其作用机制,经槲皮素处理 48 h 后的肝癌 SMMC-7721 细胞,抑癌基因 PTEN 的表达随着浓度的增高逐渐增多,使 PIP3 的水平逐渐降低,从而下调 PI3K/AKT 通路,增强凋亡因子与降低抗凋亡蛋白的活性,促进了肝癌细胞的凋亡。随着药物浓度的增高,引发了一系列级联反应,激活了 Caspase-9,进一步促进了 SMMC-7721 细胞凋亡进程。

综上所述,槲皮素通过 PI3K/AKT 信号通路的表达可能是诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的机制之一。

[参考文献]

[1] 叶丽红,赵冬耕,俞晶华,等. 抗癌扶正方对 HAC 移植性肝癌的抑制作用及形态影响[J]. 中医药信息, 2010,27(1):52.

[2] 叶丽红,皮文霞,程海波,等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 Bcl-2 基因表达的调控作用[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(4):372.

[3] 叶丽红,皮文霞,程海波,等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 p53 基因表达的调控作用[J]. 辽宁

中医杂志,2010,37(11):2215.

[4] 孙晓杰,黄常志. PI3K-Akt 信号通路 with 肿瘤[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(3):306.

[5] Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate [J]. J Biol Chem,1998,273(22):13375.

[6] Mayo L D, Donner D B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor oncoprotein network[J]. Trends Biochem Sci, 2002,27(9):462.

[7] 陈培,张钦宪. PTEN-PI3K/AKT 细胞信号转导通路 with 肿瘤[J]. 癌变·畸变·突变,2010,22(6):484.

[8] Sharrard R M, Norman J M. Regulation of protein kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate-derived cell lines[J]. Cell Signal,2007,19(1):129.

[9] 黄秀兰,崔国辉,周克元. PI3K-Akt 信号通路 with 肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. 癌症,2008,27(3):331.

[10] 吴日平,黄昌明. PI3K-Akt 信号通路 with 肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述,2009,15(10):1501.

[责任编辑 何伟]