

芹菜素增敏 TRAIL 诱导卵巢癌 CoC1 细胞凋亡

唐爱琼¹, 刘 杰¹, 刘 飞², 曹建国², 谢婉玉¹

(1. 南华大学 第一附属医院 妇产科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南师范大学 医学院)

摘要: **目的** 研究芹菜素(API)抑制 NF- κ B 活性,增强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡的作用。**方法** 体外培养 CoC1 细胞。碘化丙啶(PI)染色流式细胞术(FCM)定量分析细胞凋亡率(亚二倍体 DNA 含量细胞百分率)。DNA 琼脂糖凝胶电泳观察细胞 DNA 梯形条带。Western blot 检测细胞蛋白的表达。**结果** API(20 μ mol/L)和 TRAIL(20 ng/mL)以及两者合用 48 h, CoC1 细胞凋亡率分别是 $8.83\% \pm 2.33\%$ 、 $8.32\% \pm 2.80\%$ 和 $69.5\% \pm 4.65\%$; API(20 μ mol/L)预孵育 4 h 后, TRAIL(20 ng/mL)处理 CoC1 细胞 44 h, 展示出典型 DNA 梯形条带图谱。API(20 μ mol/L)以时间依赖的方式降低 CoC1 细胞 I κ B α 蛋白磷酸化水平和抑制 NF- κ B(p65)蛋白表达。**结论** 亚细胞毒性浓度的 API 具有增强 TRAIL 诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡作用,其作用机制与抑制 NF- κ B 活性有关。

关键词: 卵巢癌; 芹菜素; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 细胞凋亡; NF- κ B

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)01-0037-04

Sensitization of Human Ovarian Cancer CoC1 Cells to TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand(TRAIL)-Induced Apoptosis by Apigenin

TANG Ai-Qiong, LIU Jie, LIU Fei, et al

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate whether apigenin(API) enhance the apoptosis induced by TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) via inhibiting activities of NF- κ B in human ovarian cancer CoC1 cell line. **Methods** Human ovarian cancer CoC1 cells were cultured in vitro. Apoptotic rate was determined by flow cytometry using PI fluorescence staining. The characteristic features of cell apoptosis was examined using DNA agarose gel electrophoresis. The expressions of protein were analyzed by Western blot. **Results** Flow cytometry analysis with PI staining indicated that apoptotic rates in human ovarian cancer CoC1 cells by API(20 μ mol/L) or TRAIL(20 ng/mL) or both for 48 h were $8.83\% \pm 2.33\%$, $8.32\% \pm 2.80\%$ and $69.50\% \pm 4.65\%$, respectively. The ladder band could be shown in DNA agarose gel electrophoresis by pretreated with API(20 μ mol/L) for 4 h then with TRAIL(20 ng/mL) for 44 h. Western blot analysis indicated that API inhibited expression of NF- κ B(p65) protein and reduced the phosphorylated level of I κ B α protein in CoC1 cells, in a time-dependent manner. **Conclusion** API at subtoxic concentration potentiates the induction of apoptosis by TRAIL, and is associated with inhibiting activities of NF- κ B in human ovarian cancer CoC1 cell line.

Key words: ovarian cancer; apigenin; TNF-related apoptosis-inducing ligand; apoptosis; NF- κ B

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是由 Wiley 等^[1]于 1995 年克隆的 TNF 超家族的又一

成员,通过与受体的特异性结合而诱导肿瘤细胞和恶性转化细胞凋亡,对正常细胞无毒性作用,由于其对肿瘤细胞的选择性杀伤作用,有望成为新型的抗

肿瘤制剂。但是,有研究表明 60% 的肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡不敏感^[2],而 TRAIL 与化疗药物联合应用对大多数肿瘤细胞表现出协同杀伤效应,即化疗药物能提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性^[3~5]。

芹菜素 (apigenin, API) 的化学结构为 5,7,4'-三羟基黄酮,其分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$,相对分子质量为 270。有研究发现 API (20 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$) 抑制人卵巢癌细胞系 CAOV3 细胞的生长,可能是通过阻滞 CAOV3 细胞周期在 G2/M 期、诱导细胞凋亡从而抑制细胞的增殖^[6]。最近,Horinaka 等^[7]报道芹菜素通过上调 DR5 增强 TRAIL 诱导人白血病细胞、人前列腺癌细胞和人结肠癌细胞凋亡。此外, Lee 等^[8]发现芹菜素通过抑制 Akt 和 NF- κ B 的活性增强化疗药物吉西他滨诱导胰腺癌细胞凋亡。因此,本文研究亚细胞毒浓度的芹菜素是否抑制 IkB α 蛋白磷酸化,抑制 NF- κ B 活性,从而促进 TRAIL 诱导 CoC1 细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 试剂

芹菜素 (apigenin, API) 由美国 Sigma 公司出品;重组人可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 由英国 PeproTech 公司生产;碘化丙啶 (PI) 由美国英杰生物技术公司出品;DNA Ladder 检测凋亡试剂盒购于北京博大泰克生物基因技术有限公司;鼠抗人 NF- κ B (p65) 单克隆抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品;鼠抗人 phospho-IkB α 单克隆抗体美国 Cell Signaling 公司出品;鼠抗人 β -actin 抗体美国 Sigma 公司出品。

1.2 细胞培养

人卵巢癌 CoC1 细胞购于中国典型培养物保藏中心 (中国武汉市),用含 10% 小牛血清的 RPMI - 1640 培养基,加 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 流式细胞术分析

取对数生长期的卵巢癌 CoC1 细胞,分别加入含标示终浓度受试物和药品的完全培养基作用 48 h;0.1% DMSO 作为溶媒对照。收集细胞,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 75% 乙醇固定 24 h 后,经碘化丙啶 (PI) 染色,用流式细胞仪测定细胞 DNA 含量。以上实验重复 2 次。

1.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳

取对数生长期 CoC1 细胞,分别加入含标示终浓度受试物和药品的完全培养基作用 48 h;0.1% DMSO 作为溶媒对照。收集细胞,按北京博大泰克生物基因技术有限公司凋亡细胞 DNA ladder 检测试剂盒说明书步骤分别提取 DNA,提取的 DNA 样品 5 μL 与 6 $\times$ Buffer 1 μL 混匀后,加到 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,最后在 AlphaimagerTM 2200 凝胶图像分析系统观察并摄影。以上实验重复 2 次。

1.6 Western Blot 分析

20 $\mu\text{mol/L}$ API 按照标示时间处理 CoC1 细胞,收集细胞,用裂解液 (0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-Cl (pH 7.6), 0.001 mol/L EDTA (pH 8.0), 1 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin, 100 $\mu\text{g/mL}$ PMSF) 裂解细胞,提取的蛋白样品 (25 μg 总蛋白/泳道) 加入等容积的上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 10% SDS-PAGE 电泳 (100 mA 3 h) 后转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 2 h, 1:1 000 分别加入 NF- κ B、phospho-IkB α 和 β -actin 一抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; TBST 洗涤,加入辣根过氧化物酶连接的山羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h 后, TBST 洗膜,用增强型化学发光剂显影, X 线胶片结果扫描及用图像分析软件 (AlphaimagerTM 2200) 分析,以处理组灰度面积的乘积/内参照 (β -actin) 灰度面积的乘积反映相对蛋白表达丰度或蛋白磷酸化水平,以溶媒组或 0 h 为 1.00。以上实验重复 2 次。

1.7 统计学处理

实验数据录入 Spss 15.0 统计软件,建立数据库,各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One Way ANOVA 行方差分析。 $P < 0.05$ 为统计学意义显著标准。

2 结 果

2.1 芹菜素、TRAIL 及两者合用对人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡率的影响

API (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 TRAIL (20 ng/mL) 以及两者合用的 CoC1 细胞凋亡率 (亚二倍体 DNA 含量细胞百分率) 分别是 8.83% $\pm$ 2.33%、8.32% $\pm$ 2.80% 和 69.50% $\pm$ 4.65%。两者合用的细胞凋亡率是 API (20 $\mu\text{mol/L}$) 与 TRAIL (20 ng/mL) 单独使用的凋亡率之和的 4.05 倍 (图 1)。提示:亚细胞毒性浓度的 API 能够有效促进 TRAIL 导致人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡。

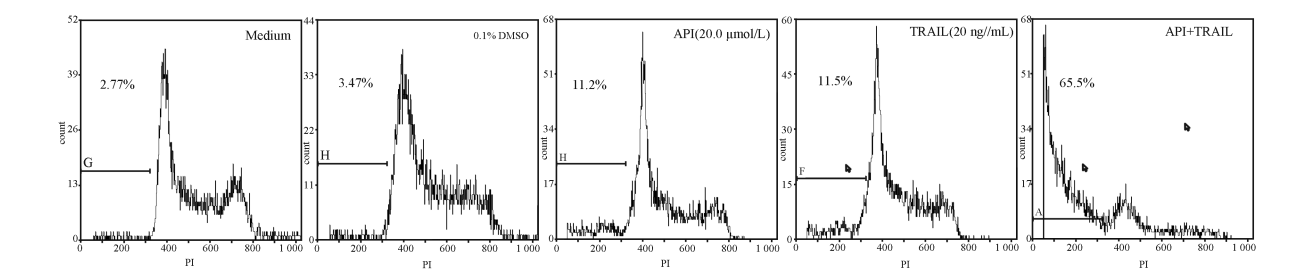


图1 亚细胞毒性浓度的芹菜素、TRAIL 及两者合用对人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡率的影响(FCM 分析)

2.2 芹菜素、TRAIL 及两者合用对人卵巢癌 CoC1 细胞 DNA 梯形条带的影响

单独应用芹菜素 20 μmol/L 或 TRAIL 20 ng/mL 作用人卵巢癌 CoC1 细胞 48 h, 未见典型 DNA 梯形条带; 然而, 20 μmol/L 的芹菜素预孵育 4 h, 再加入 20 ng/mL 的 TRAIL 处理 44 h, 展示出典型 DNA 梯形条带图谱(图 2); Caspase-3 抑制剂 zDEVD-fmk(20 μmol/L) 能够使芹菜素 20 μmol/L 和 TRAIL 20 ng/mL 合用诱导的 CoC1 细胞 DNA 梯形条带消失。进一步证实: 亚细胞毒性浓度的芹菜素具有显著增强 TRAIL 诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡作用, 并呈 Caspase-3 活化依赖性。

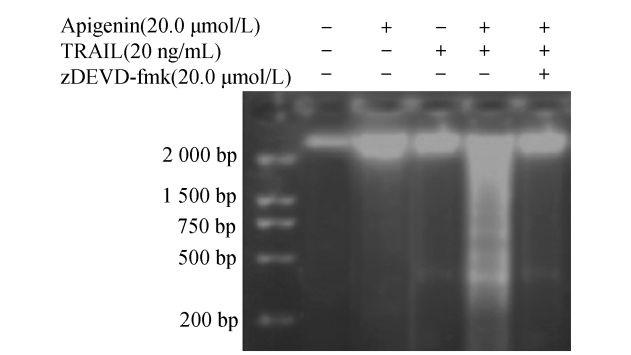


图2 亚细胞毒性浓度的芹菜素、TRAIL 及两者合用对人卵巢癌 CoC1 细胞 DNA 梯形条带的影响

2.3 芹菜素对人卵巢癌 CoC1 细胞 IκBα 蛋白磷酸化的影响

为探讨亚细胞毒性浓度的芹菜素敏化 TRAIL 诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡作用的机制, 用 Western Blot 分析芹菜素对人卵巢癌 CoC1 细胞 IκBα 蛋白磷酸化水平的影响。结果表明: 芹菜素以时间依赖的方式下降 CoC1 细胞 IκBα 蛋白磷酸化水平(图 3)。

2.4 芹菜素对人卵巢癌 CoC1 细胞 NF-κB (p65) 蛋白表达的影响

Western Blot 分析芹菜素对 CoC1 细胞 NF-κB (p65) 蛋白表达的影响。结果发现: 芹菜素以时间依赖

的方式下调 CoC1 细胞 NF-κB(p65) 蛋白表达(图 4)。

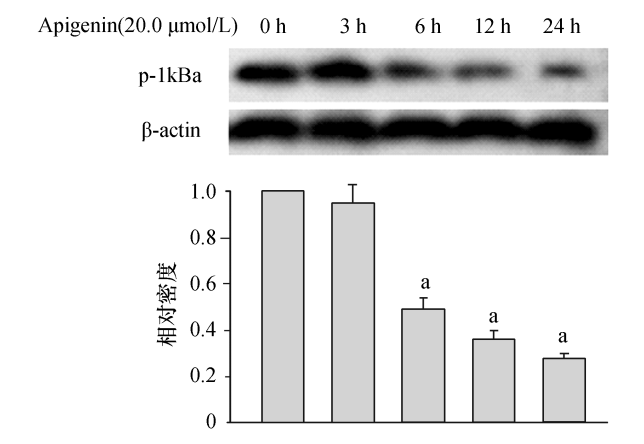


图3 芹菜素不同作用时间对 CoC1 细胞 IκBα 蛋白磷酸化水平的影响($n=3$)
与 0 h 组比较, a: $P<0.05$

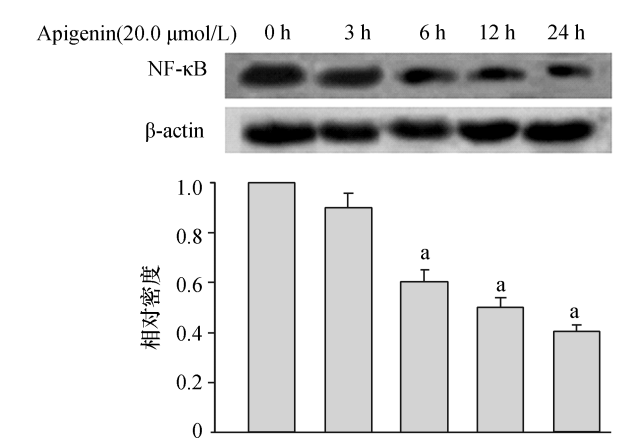


图4 芹菜素不同作用时间对人卵巢癌 CoC1 细胞 NF-κB (p65) 蛋白表达的影响($n=3$)
与 0 h 组比较, a: $P<0.05$

3 讨 论

卵巢癌生长隐秘、迅速, 早期即可在腹腔内种植

扩散,因此,卵巢癌在确诊时 70% ~ 80% 已为晚期^[9],而且,卵巢癌化疗中产生的耐药性及药物毒副作用导致疗效不理想,卵巢癌 5 年生存率低^[10]。因此,研究改善卵巢癌治疗效果的新方案和策略具有重要科学意义和临床应用价值。TRAIL 是 TNF 家族新成员。TRAIL 的 C 末端胞外的死亡结构域与 FasL 和 TNF- α 有较高的同源性,它们有相似的受体识别和触发机制,能与靶细胞表面的特异性受体结合,诱导靶细胞凋亡。但是由于 FasL 和 TNF- α 的非选择性杀伤细胞作用和其毒副作用限制了它们的临床应用,而 TRAIL 能选择性诱导肿瘤细胞凋亡,为卵巢癌的治疗提供了新思路。

芹菜素是一种大量存在于水果和蔬菜中常见饮食黄酮类化合物,被认为具有抗癌的潜在价值^[11~14]。本文的实验研究结果发现亚细胞毒性浓度的 API 具有显著增强 TRAIL 诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡作用。尽管其作用的选择性和体内增敏作用有待进一步研究,但是,本文的结果提供了饮食黄酮芹菜素与 TRAIL 合用有可能增强以 TRAIL 为基础的卵巢癌临床治疗效果的线索。

Lee 等^[8]发现吉西他滨与芹菜素联用在胰腺癌细胞 (MiaPaCa 和 AsPC-1) 中抗肿瘤作用增强,可能是通过抑制 NF- κ B 的活性及诱导细胞凋亡发挥作用的。Trauzold 等^[15]研究发现一组对 TRAIL 耐药的胰腺癌细胞存在 NF- κ B 的组成性激活,抑制 NF- κ B 能恢复细胞对 TRAIL 的敏感性。提示:NF- κ B 可保护胰腺癌细胞免受 TRAIL 介导的凋亡。本文采用免疫印迹检测芹菜素对 CoC1 细胞磷酸化 I κ B α 和 NF- κ B 活性片断 NF- κ B (p65) 表达的影响。结果发现:芹菜素以时间依赖的方式下降 CoC1 细胞 I κ B α 蛋白磷酸化水平和下调 CoC1 细胞 NF- κ B (p65) 蛋白表达。本实验结果支持文献^[12]的结论,即芹菜素增敏 TRAIL 诱导细胞凋亡作用可能与抑制 I κ B α 的磷酸化和 NF- κ B 活性相关,这些结果为调节肿瘤细胞 NF- κ B 活性作为增敏 TRAIL 治疗作用的策略增添了实验依据。

恶性肿瘤通常表现出细胞增殖和生长失控及凋亡减少,在肿瘤治疗中抑制癌细胞的增殖和生长只能减缓恶性肿瘤的进展。许多研究显示肿瘤的耐药产生与凋亡受抑有关。TRAIL 具有广谱、高效、特异的诱导肿瘤细胞凋亡效应,为卵巢癌治疗提供了一种新的治疗策略,特别是本文实验研究证实无基因毒性的饮食黄酮芹菜素通过抑制 I κ B α 的磷酸化和 NF- κ B 活性,增敏 TRAIL 诱导 CoC1 细胞凋亡作用,具有潜在的临床应用价值,值得深入进行体内抗肿瘤

作用和临床试验研究。

参考文献:

- [1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3: 673-682.
- [2] Ganten TM, Haas TL, Sykora J, et al. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (Suppl 1): S86-S96.
- [3] Singh TR, Shankar S, Chen X, et al. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo[J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (17): 5390-5400.
- [4] Cuello M, Etenberg SA, Nau MM, et al. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 81 (3): 380-390.
- [5] Seo SB, Hur JG, Kim MJ, et al. TRAIL sensitize MDR cells to MDR-related drugs by down-regulation of P-glycoprotein through inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3 β pathway and activation of caspases[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 199.
- [6] 杜俊瑶, 辛彦. 芹菜素抑制人卵巢癌 CAOV3 细胞增殖的研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2007, 23 (5): 374-375.
- [7] Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, et al. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5 (4): 945-951.
- [8] Lee SH, Ryu JK, Lee KY, et al. Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer[J]. *Cancer Letts*, 2008, 259 (1): 39-49.
- [9] Gronlund B. Progressive epithelial ovarian carcinoma Prognostic factors and clinical management[J]. *Dan Med Bull*, 2006, 53 (3): 232-257.
- [10] Chan YM, Ng TY, Ngan HY, et al. Quality of life in women treated with neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer: a prospective longitudinal study[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 88 (1): 9-16.
- [11] Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, et al. Apigenin inhibits HGF promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and β 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 226 (2): 178-191.

(下转第 80 页)

(上接第 40 页)

- [12] Golkar L, Salabat MR, Ujiki MB, et al. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation via down-regulation of hypoxia inducible factor - 1 α (HIF - 1 α) and the glucose transporter (GLUT - 1) [J]. J Surg Res, 2007, 137 (2) : 191-192.
- [13] Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention [J]. Pharm Res, 2010, 27 (6) : 962-978.
- [14] Ali S, Singh NN, Yildirim H, et al. Requirement for nu-

clear factor kappa B signalling in the interleukin - 1 - induced expression of the CCAAT/enhancer binding protein-delta gene in hepatocytes [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42 (1) : 113-119.

- [15] Trauzold A, Wermann H, Arlt A, et al. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells [J]. Oncogene, 2001, 20 : 4258-4269.

(此文编辑 朱雯霞)