

莲房原花青素通过线粒体介导的内源性 Caspase 途径诱导 HepG2 细胞凋亡

段玉清, 许慧, 曲文娟, 罗孝平, 赵彬, 李盼, 张海辉

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 研究莲房原花青素(LSPCs)诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制。利用 MTT 法检测 LSPCs 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用, Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞的核形态, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡水平, 彗星实验用来检测细胞 DNA 损伤, JC-1 染色用来检测线粒体膜电位, Western blotting 法检测细胞凋亡蛋白水平的表达。LSPCs 作用细胞后, 显著抑制 HepG2 细胞的增殖; 细胞凋亡征象明显, 核染色体高度凝聚, 细胞核碎裂, 核固缩, 染色质凝聚的细胞数从 3.86%增至 42.76% ($p<0.01$); 活细胞率急剧减少, 而凋亡率从 5.32%增至 67.05% ($p<0.01$); LSPCs 诱发细胞产生 DNA 损伤, 线粒体膜电位下降, 导致 Cytochrome c、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的表达量增加, Bax 蛋白的表达量上调, Bcl-2 蛋白的表达量下调, Bax/Bcl-2 的比值上升。而凋亡抑制剂 Z-VAD 能够削弱 LSPCs 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用, 显著下调细胞核聚缩, 抑制线粒体损伤及 Caspase 相关蛋白的表达量, 最终阻断 LSPCs 的致凋亡作用。由此得出结论, LSPCs 可通过线粒体介导的内源性 Caspase 途径诱导人肝癌细胞凋亡。

关键词: 原花青素; 细胞凋亡; Caspase 途径

文章编号: 1673-9078(2016)9-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.001

Procyanidins from Lotus Seedpod Induce Apoptosis in HepG2 Cells via Caspase-dependent Pathway

DUAN Yu-qing, XU Hui, QU Wen-juan, LUO Xiao-ping, ZHAO Bin, LI Pan, ZHANG Hai-hui

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The possible mechanism of apoptosis induced by procyanidins from lotus seedpod (LSPCs) in human hepatoma HepG2 cells was investigated. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed to study the inhibitory effect of LSPCs on HepG2 cell proliferation, morphological changes in apoptotic nuclei were observed via Hoechst 33258 staining, and the percentage of apoptotic cells was calculated by double-staining flow cytometry using Annexin V conjugated to fluorescein isothiocyanate and propidium iodide. DNA damage, mitochondrial membrane potential, and expression levels of apoptotic proteins were determined by comet assay, JC-1 staining, and western blot, respectively. The results indicate that after treatment with LSPCs, HepG2 cell proliferation was significantly inhibited; there were obvious signs of apoptosis, including high chromatin condensation level, nuclear fragmentation, and karyopyknosis; and the number of chromatin-condensed cells increased from 3.86% to 42.76% ($p<0.01$). The percentage of viable cells decreased significantly and the proportion of apoptotic cells increased from 5.32% to 67.05% ($p<0.01$). Treatment with LSPCs caused DNA damage, loss of mitochondrial membrane potential, an increase in the protein expression levels of cytochrome C, caspase-3, and caspase-9, in addition to upregulation of Bax protein expression and downregulation of Bcl-2 protein expression. However, the apoptosis inhibitor Z-VAD reduced the inhibitory effect of LSPCs on HepG2 cell proliferation, significantly reduced nuclear condensation, inhibited mitochondrial damage and caspase protein expression, and eventually inhibited LSPC-induced apoptosis. Thus, the results show that LSPCs trigger apoptosis in HepG2 cells *via* the mitochondria-mediated, endogenous caspase pathway.

Key words: procyanidins; cell apoptosis; caspase-dependent way

收稿日期: 2015-09-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201456, 31371734); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012287); 江苏省“六大人才高峰” (SWYY-022); 江苏省“青蓝工程”; 江苏高校优势学科建设工程项目

作者简介: 段玉清 (1973-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事药食同源植物活性成分提取分离新技术及功能活性评价研究

通讯作者: 张海辉 (1975-), 男, 副教授, 主要从事食品活性成分提取分离及功能评价研究

肝癌是全世界最常见及致命的癌症之一。每年有超过 50 万名新增病例肝癌。肝癌对放疗、化疗及免疫治疗不敏感,是一种致命的预后不良疾病。天然植物萃取类如饮食类黄酮和多酚物质等作为药物已成为预防作用^[1]。

细胞凋亡是细胞在胞内外信号诱导下发生的主动自杀死亡过程。外界刺激经过复杂的信号转导系统进入细胞核,活化凋亡相关基因的表达,启动凋亡程序,最终由内源性核酸酶沿核小体切断链,导致一系列凋亡表型改变和凋亡小体形成等。凋亡的启动途径分为内源性和外源性两种。内源性凋亡通路又称线粒体凋亡通路,主要是由于细胞或 DNA 损伤引起,诱导线粒体膜电位去极化,最终导致线粒体膜损伤,内容物的释放。Caspase 依赖的凋亡的执行主要是通过 Caspase 蛋白酶家族介导的级联水解活化过程完成的。关于 Caspase 凋亡信号通路在抗癌治疗中作用的研究已成为近年来的研究热点^[2,3],多种抗癌药物的作用机制都与 Caspase 信号通路的活化相关。有研究证实党参内酯 III 是通过启动线粒体介导的内源性 Caspase 凋亡信号通路来诱导人肺癌 A549 细胞凋亡^[4]。Barras D 等人研究表明多数抗癌多肽化合物借助 Bcl-2 蛋白调控 Caspase 通路,促进癌细胞凋亡^[5]。Zhang^[6]等人研究发现板栗壳原花青素可通过线粒体 ROS 诱导 HepG2 细胞凋亡,并且导致线粒体膜电位下降。另有研究报道葡萄籽原花青素抑制胰岛细胞增殖,诱导凋亡^[7]。本课题从睡莲科植物莲的成熟花托中分离出组莲房原花青素(Procyanidins from lotus seedpod, LSPCs),并明确了 LSPCs 是由儿茶素或表儿茶素以 C₄-C₈ 或 C₄-C₆ 键连接而成的 2-4 聚体所组成^[8]。本课题组之前的研究证实 LSPCs 能够诱导小鼠黑色素瘤 B16 细胞凋亡^[9]。本研究旨在探讨 LSPCs 是否以凋亡的方式诱导人肝癌 HepG2 细胞死亡以及与线粒体介导的 Caspase 内源性凋亡通路之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞(HepG2),购自于北京中科院生物化学和细胞生物学研究所。DMEM 培养基,胎牛血清,胰酶均购于 Gibco 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)购买于 Sigma 公司。Hoechst 33342、JC-1 和 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自于碧云天生物工程公司。Z-VAD 和 β -actin 抗体购买于 AMRESCO 公司。Caspase-3、Caspase-9 及 Cytochrome C 购买于 Abcam 公司。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{给药组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$$

防和治疗癌症的新途径。原花青素由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成,属于生物类黄酮。有研究表明,原花青素可通过凋亡途径抑制多种肿瘤细胞生长或诱导其死亡,且可拮抗化疗药物对正常细胞的毒性

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG2 细胞培养于含 10% 灭活新生牛血清 DMEM 培养液中,置于 37 °C, 5% CO₂ 和饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。细胞贴壁生长,每 2~3 d 传代 1 次,传代时首先倒出培养液,PBS 洗 2 次,胰酶消化后,加入新鲜的培养液吹打均匀,调整细胞至适当浓度移入新的培养瓶中,添加培养液至适量。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞活性

取对数生长期细胞,消化、计数,以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。培养 24 h 后,以终浓度为 100 μ g/mL LSPCs 处理细胞 24 h 或提前 1 h 用 20 μ mol/L Z-VAD 预先处理,再加入 100 μ g/mL LSPCs 孵育 24 h。培养结束后,去上清液,PBS 洗两次,每孔加入 100 μ L MTT (1 mg/mL),继续培养 4 h,去上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,充分振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度值,计算抑制率,公式如 1 所示:

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡

将 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后,以终浓度为 100 μ g/mL LSPCs 处理细胞 24 h,或提前 1 h 用 20 μ mol/L Z-VAD 预先处理,再加入 100 μ g/mL LSPCs 孵育 24 h。培育结束后,收集 1×10^6 个细胞,用预冷 PBS 洗 2 遍后,加入 400 μ L 结合缓冲液,轻轻混匀细胞后加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。流式细胞检测双染图中:位于左下角(LL)的细胞群为正常细胞;右下角(LR)的为早期凋亡细胞;右上角(UR)的为晚期凋亡细胞;左上角(UL)的为坏死细胞。

1.2.4 Hoechst 33342 染色检测细胞核形态

取对数生长期的 HepG2 细胞,消化、计数,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后,以终浓度为 100 μ g/mL LSPCs 处理细胞 24 h,或提前 1 h 用 20 μ mol/L Z-VAD 预先处理,再加入 100 μ g/mL LSPCs 孵育 24 h。吸去培养基,用 PBS 洗 2 遍,加入 10 μ g/mL Hoechst 33258 染液避光染色 10 min,

(1)

吸去染色液,用 PBS 洗两遍后,荧光显微镜观察核变化。每个样本选取十个视野拍摄图片,并用 Image J 软件进行细胞计数。

1.2.5 单细胞电泳检测 DNA 损伤

将 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后,以终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 处理细胞 24 h,或提前 1 h 用 20 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 预先处理,再加入 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 孵育 24 h。吸除培养液,用胰酶消化细胞,1000 g 左右离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 重悬制成约 3×10^6 个/mL 细胞悬液。琼脂糖凝胶制片,将载玻片浸入胞裂解液中,裂解 1.5 h。细胞裂解后,将载玻片置于水平电泳槽中,碱解旋 20 min,而后在 25 V 和 300 mA 条件下电泳 20 min。电泳完毕后,将载玻片取出,用 Tris-HCl (pH 7.5) 中和 15 min,然后在每片载玻片上滴加 50 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 EB 溶液,避光操作,盖上盖玻片,避光染色 20 min,即可在倒置相差荧光显微镜下观察并用 CASP 彗星图像分析软件自动分析。

1.2.6 JC-1 染色检测线粒体膜电位

取对数生长期的 HepG2 细胞,消化和计数,以每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中培育 24 h 后,以终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 处理细胞 24 h,或提前 1 h 用 20 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 预先处理,再加入 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 孵育 24 h。培养结束后,吸去培养基,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ JC-1 染料,37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 30 min, PBS 洗两次。荧光酶标仪在激发光波长 488 nm,发射光波长 525/590 nm 检测荧光强度,并用荧光显微镜观察拍照。

1.2.7 Western Blot 免疫印记法

将 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后,以终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 处理细胞 24 h,或提前 1 h 用 20 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 预先处理,再加入 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 孵育 24 h。裂解液裂解,13000 r/min 离心 20 min,取上清用 Bradford 试剂盒检测总蛋白浓度;煮沸;得到的总蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳,然后转膜至 PVDF 膜上,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜后分别孵育 Caspase-3、Caspase-9、Cytochrome c 及 Bax、Bcl-2 的单克隆一抗,洗膜后,孵育辣根过氧化物酶标记的二抗;最后用 ECL 显色化学曝光机曝光。

1.2.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理。实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$, $p<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 莲房原花青素对人肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用

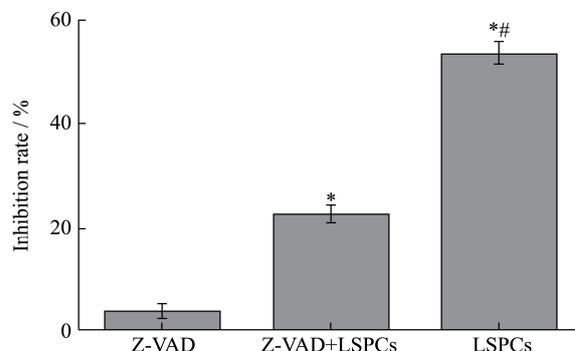


图1 经 Z-VAD 预处理减弱 LSPCs 对 HepG2 细胞生长的抑制作用
Fig.1 Reduction of the inhibitory effect of LSPCs on HepG2 cell growth by Z-VAD pretreatment

注: *与正常对照组相比有显著性差异($p<0.05$); #与 Z-VAD+LSPCs 组相比有显著性差异($p<0.05$),下同。

课题组之前工作已经证实 LSPCs 对 HepG2 细胞的增殖具有显著的抑制作用,且其抑制作用存在时间和浓度依赖关系。本文旨在探明凋亡抑制剂 Z-VAD 对 LSPCs 抑制细胞增殖的影响。如图 1 所示,单独 Z-VAD 组的抑制率为(3.53 \pm 0.16%)。当 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 处理 HepG2 细胞 24 h 后,细胞抑制率最高达到(53.24 \pm 1.43%),经 Z-VAD 预处理后,抑制率为(28.79 \pm 1.38%),比单独 LSPCs 组降低了 24.45%,结果表明 Z-VAD 能够削弱 LSPCs 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用。

2.2 Hoechst 33258 染色观察 LSPCs 对 HepG2

细胞核形态的影响

凋亡的细胞会出现细胞核固缩,染色质凝聚成凋亡小体。Hoechst 33258 是可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,用于观察核的变化情况,检测细胞凋亡。由图 2a、b 和 d 可知,在荧光显微镜下,正常对照组及单独 Z-VAD 组细胞核完整,核固缩,染色质凝聚的细胞数分别为(3.86 \pm 0.26%)和(3.45 \pm 0.52%)。当 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 作用于 HepG2 细胞 24 h 后,凋亡征象非常明显,大量细胞胞体缩小,胞质浓缩,核染色体高度凝聚、边缘化,细胞核碎裂呈碎片状(图 2d),核固缩,染色质凝聚的细胞数达到最高(42.76 \pm 1.96%)。当使用 Z-VAD 预处理 HepG2 细胞后,经 Hoechst33258 染色的核聚缩细胞数减少,与单独 LSPCs 相比,核固缩,染色质凝聚的细胞数减少到(20.12 \pm 1.15%) (图 2c)。结

果表明凋亡抑制剂 Z-VAD 能显著下调 LSPCs 引起的 HepG2 细胞核聚缩作用。

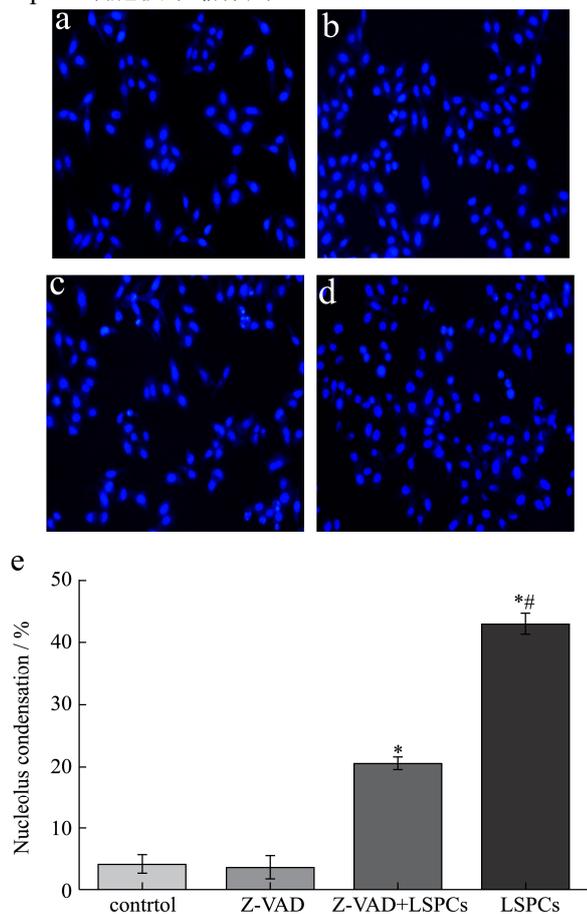


图 2 LSPCs 作用 24 h Hoechst 33342 荧光染色结果

Fig.2 Detection of LSPC-induced (24 h) apoptosis in HepG2 cells by Hoechst 33342 staining

注: a, 空白对照组; b, Z-VAD 组; c, Z-VAD+LSPCs 组; d, LSPCs 组, 下同。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双染色检测 HepG2 细胞凋亡和坏死

表 1 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡结果

Table 1 LSPC-induced apoptosis in HepG2 cells detected by Annexin V-FITC/PI double-stain flow cytometry

HepG2	Control	Z-VAD	Z-VAD+LSPCs	LSPCs
LL/%	93.73±1.72	92.02±1.08	79.84±0.07*	32.12±0.09**
UL/%	0.95±0.19	3.54±1.19*	4.01±1.21*	0.84±0.21
UR/%	1.30±0.06	0.97±0.06	4.87±0.10*	18.97±0.10**
LR/%	4.02±0.13	3.47±0.05	11.28±0.01	48.08±0.18**

注: *与正常对照组相比有显著性差异($p < 0.05$); **与正常对照组相比有显著性差异($p < 0.01$)。

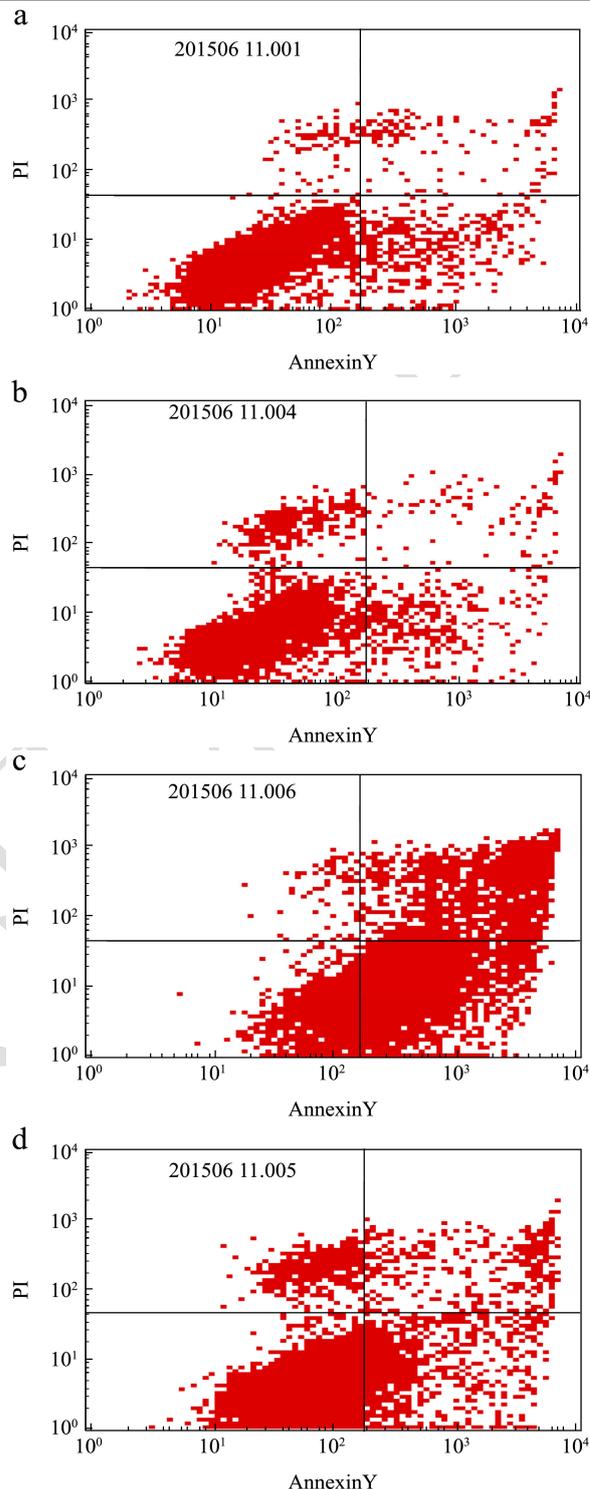


图 3 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡

Fig.3 LSPC-induced apoptosis in HepG2 cells detected by Annexin V-FITC/PI double-stain flow cytometry

AnnexinV-FITC/PI 双标记法是用 FITC 标记了的 Annexin V 作为探针, 来检测细胞早期凋亡的发生。而 PI 是一种核酸染料, 不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜, 但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红, 用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。将 Annexin V 与 PI 联合使

用时,可以将凋亡细胞、坏死细胞与正常细胞区分开。通过 Annexin V-FITC/PI 双染可以充分鉴定 LSPCs 诱导 HepG2 细胞的死亡方式。从图 3a 和 d 可看出,相比于空白组,当 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LSPCs 作用于 HepG2 细胞 24 h 后,活细胞率急剧下降,从 $93.73\pm 1.72\%$ (空白对照组) 降至 $(32.12\pm 0.09\%, p<0.01)$, 而细胞的凋亡比例则显著上升,从 $5.32\pm 0.13\%$ (空白对照组) 增至 $(67.05\pm 0.19\%, p<0.01)$, 坏死率则无明显差异。结果表明 LSPCs 主要诱导 HepG2 细胞以凋亡为主,坏死为辅的方式死亡。如图 3c, 当使用 Z-VAD 预处理后,早期凋亡率和晚期凋亡率比单独 LSPCs 组总共减少了 50.90%, 坏死率则从 0.84 ± 0.21 (单独 LSPCs 组) 增加到 $(4.01\pm 1.21, p<0.05)$ 。结果表明凋亡抑制剂 Z-VAD 能够明显削弱 LSPCs 诱导 HepG2 细胞的凋亡作用,且 Z-VAD 能够增强细胞以坏死方式死亡。

2.4 LSPCs 诱导 HepG2 细胞 DNA 损伤

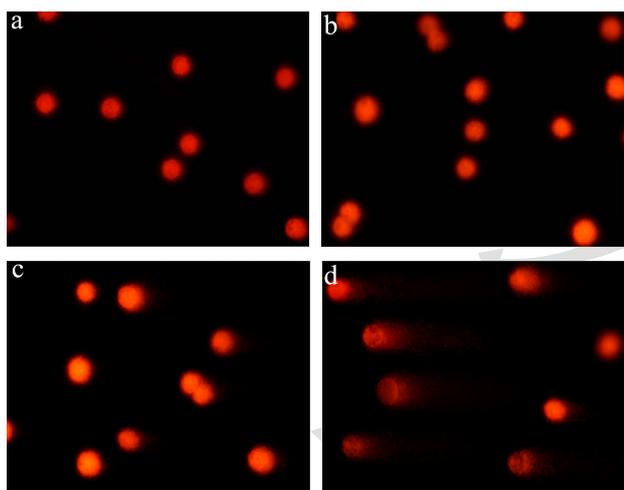


图 4 LSPCs 对 HepG2 细胞 DNA 损伤作用 ($\times 400$)

Fig.4 HepG2 cell DNA damage in LSPC-treated HepG2 cells ($\times 400$)

表 2 LSPCs 对 HepG2 细胞 DNA 损伤作用

Table 2 HepG2 cell DNA damage in LSPC-treated HepG2 cells

Group	Tail length/ μm	Tail DNA/%	Tail Moment/ μm
control	39.2 ± 3.63	3.90 ± 1.52	3.12 ± 1.70
Z-VAD	42.2 ± 7.82	4.08 ± 2.23	3.02 ± 0.85
Z-VAD+LSPCs	$70.4\pm 7.57^{**}$	$20.52\pm 8.55^{**}$	$38.85\pm 5.34^{**}$
LSPCs	$161.6\pm 6.58^{**}$	$56.34\pm 6.91^{**}$	$96.37\pm 7.86^{**}$

彗星试验已被用于检测各种化合物对 HepG2 细胞的基因毒性,能够快速量化的 DNA 电泳迁移程度^[10]。彗星试验能够确定 DNA 损伤端点,包括嵌入单个细胞在显微镜幻灯片上琼脂糖和测量核 DNA 电泳迁移的程度。由图 4a 可见,对照组在电泳图上仅出现荧光团,没有拖尾现象。而图 4d 中, LSPCs 作用细胞

后,在荧光团后面出现较长的拖尾现象。Tail DNA%、Tail Moment 均明显高于对照组,差异具有统计学意义 ($p<0.01$), 表明 LSPCs 能够诱导 HepG2 细胞 DNA 损伤。经 Z-VAD 预处理后, LSPCs 引起的 DNA 拖尾现象得到改善, DNA 损伤明显减少。结果表明 Z-VAD 能够部分阻断 LSPCs 造成的 DNA 损伤。

2.5 LSPCs 诱导 HepG2 细胞线粒体膜电位下降

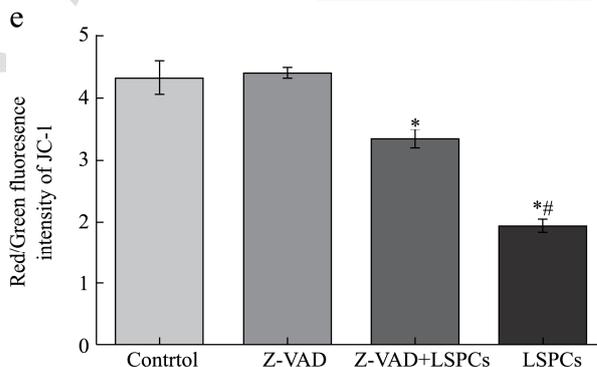
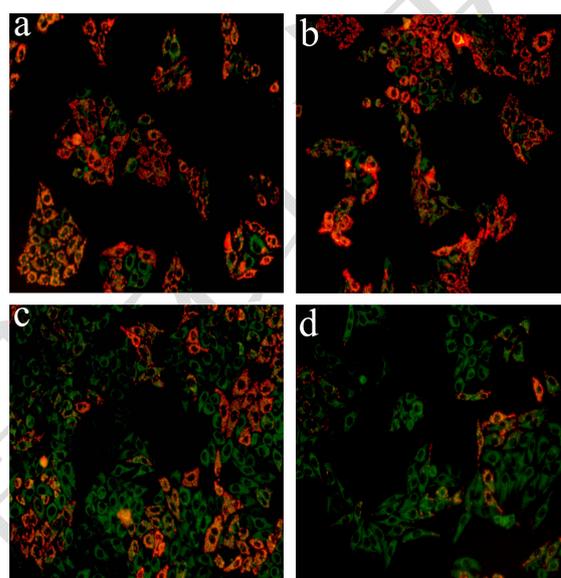


图 5 LSPCs 诱导 HepG2 细胞线粒体膜电位降低

Fig.5 Decrease in mitochondrial membrane potential of LSPC-treated HepG2 cells

线粒体的结构、功能与细胞凋亡密切相关。正常线粒体膜电位的形成是保持线粒体功能所必需的。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡线粒体通路的早期特征表现。如图 5a 和 d 所示, 与对照组相比, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LSPCs 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 绿色荧光强度增大, 红色荧光强度减弱, 线粒体膜电位下降的量是空白对照组的 0.44 倍 ($p<0.05$), 结果表明, LSPCs 对 HepG2 细胞的线粒体膜造成了损伤。然而, 当给予 Z-VAD 阻断之后, 与单独 LSPCs 组相比, 线粒体膜电位减少的趋势

被抑制, 红/绿色荧光强度下降, 线粒体膜荧光强度上升的量是单独LSPCs组的1.74倍($p < 0.05$)。结果表明Z-VAD能够抑制LSPCs造成的线粒体损伤。

2.6 Western blot 法测 Caspase-3、Caspase-9 以及 Cytochrome c 的表达量

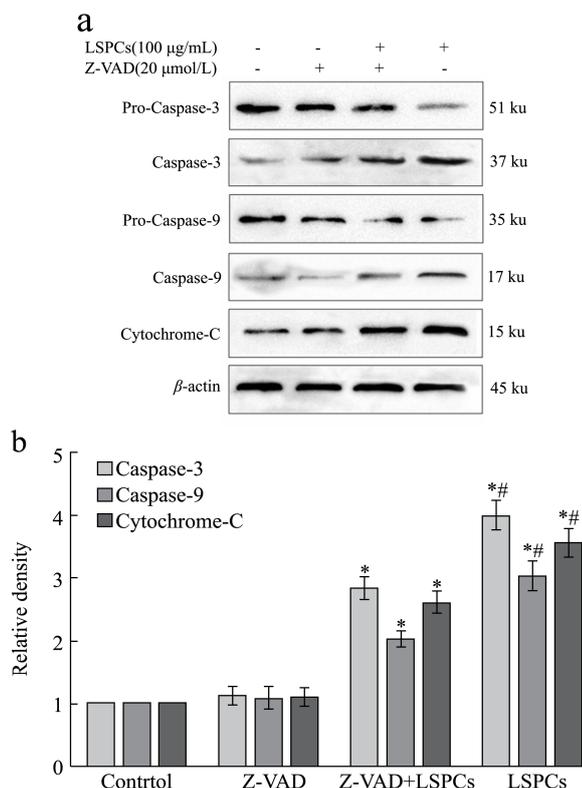


图6 Western blot法检测LSPCs作用后Caspase-3、Caspase-9和Cytochrome c蛋白的表达量

Fig.6 Expression levels of caspase-3, caspase-9, and cytochrome c in LSPC-treated HepG2 cells measured by western blot

Caspase 家族是一些存在于细胞质中具备相似结构的蛋白酶, 这些蛋白酶活性位点均包含半胱氨酸残基, 能特异性的切割靶蛋白天冬氨酸残基后的肽键。Caspase 家族蛋白负责有选择性的切割某些蛋白质, 从而造成细胞凋亡。如图 6b 所示, 与对照组相比, 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs 处理 HepG2 细胞 24 h 后, Caspase-9、Caspase-3、Cytochrome c 蛋白表达量显著增强, 分别是对照组的 3.97 倍($p < 0.01$)、3.01 倍($p < 0.01$)和 3.54 倍($p < 0.01$)。而经 Caspase 抑制剂 Z-VAD 预处理后, Caspase-3、Caspase-9 和 Cytochrome c 蛋白表达的增加量均有所下降, 分别是单独 LSPCs 组的 0.7 倍、0.66 倍和 0.72 倍。结果表明 LSPCs 能够显著诱导 HepG2 细胞凋亡的发生, 其可能机制是 LSPCs 导致 HepG2 细胞线粒体膜电位下降, 破坏了线粒体膜的完整性, 促使 Cytochrome c 从线粒体中释放, 激活 Caspase-9

和 Caspase-3 介导的线粒体凋亡通路, 而 Caspase 抑制剂 Z-VAD 能够有效的抑制 LSPCs 造成的细胞凋亡。

2.7 Western blot法测Bax/Bcl-2的比值

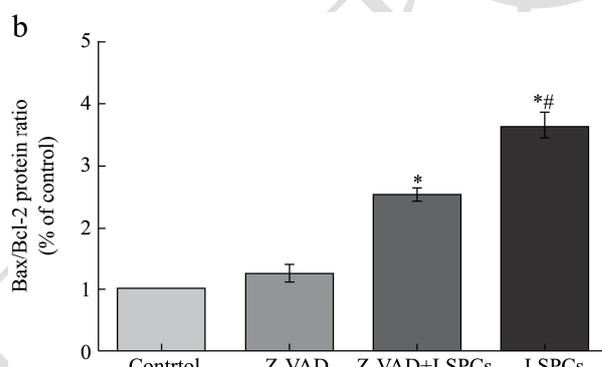
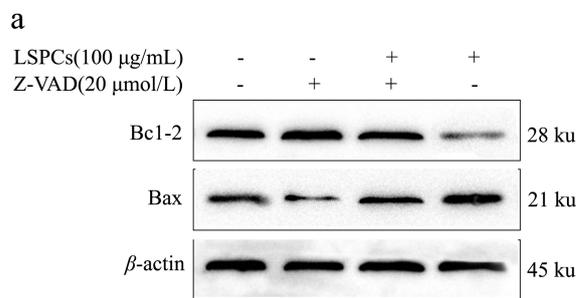


图7 Western blot 法检测 LSPCs 作用后 Bax/Bcl-2 蛋白表达量

Fig. 7 Bax and Bcl-2 protein expression and Bax/Bcl-2 ratio after LSPC treatment measured by western blot

Bcl-2家族蛋白是细胞凋亡的重要的调节因子, 促进凋亡的蛋白Bax与抑制凋亡的蛋白Bcl-2是与线粒体途径相关的蛋白, 两者的比值(Bax/Bcl-2)被称为“凋亡开关”, 对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义。结果如图7a, 与空白对照组相比, 100 $\mu\text{g/mL}$ LSPCs处理 HepG2细胞24 h后, Bax蛋白上调, Bcl蛋白下调, Bax/Bcl-2的比值比空白组的3.6倍($p < 0.01$)。结果表明 LSPCs诱导细胞凋亡, 相应的凋亡蛋白随着发生变化。与单独LSPCs组相比, Z-VAD预处理组的Bax蛋白下调, Bcl蛋白上调, Bax/Bcl-2的比值的增加受到了抑制, 是单独LSPCs组的0.7倍($p < 0.01$)。此结果表明Z-VAD能阻断LSPCs引发的细胞凋亡。这表明LSPCs是通过调节凋亡相关蛋白的表达量, 诱导肝癌细胞凋亡。

3 结论

3.1 本实验发现 LSPCs 对人肝癌 HepG2 细胞增殖有显著抑制作用, 并且通过激活线粒体介导的内源性 Caspase 途径诱导细胞凋亡, 具体表现为染色质固缩、凋亡小体形成等。LSPCs 诱导细胞的死亡方式以凋亡为主, 坏死为辅。而凋亡抑制剂 Z-VAD 在明显削弱 LSPCs 诱导 HepG2 细胞的凋亡作用的同时, 增强了细

胞以坏死的方式死亡。LSPCs 诱导 HepG2 细胞 DNA 链断裂, 单细胞凝胶电泳试验结果表现为细胞 Tail DNA%和彗星状拖尾尾长显著增加, 表明 LSPCs 对 HepG2 细胞 DNA 有损伤作用。Z-VAD 预处理后, 细胞彗星状拖尾显著缩短, 尾部 DNA 百分率明显降低, 结果表明 Z-VAD 能够预防 LSPCs 导致的 DNA 损伤。LSPCs 处理细胞后, Bax 蛋白上调, Bcl 蛋白下调, Bax/Bcl-2 的比值上升, 当加入 Z-VAD 之后, Bax/Bcl-2 表达量上升的趋势被抑制。实验结果表明通过调节线粒体蛋白的表达发挥诱导肝癌细胞凋亡的作用。

3.2 天然活性成分在诱导肿瘤细胞凋亡时常伴随着氧化应激, DNA 损伤, 线粒体膜电位下降等现象。线粒体凋亡通路主要由 Bcl-2 蛋白家族调控, 线粒体的功能算上主要包括线粒体膜电位的下降, 膜通透性的改变。Bax 是 Bcl-2 家族的核心成员, 主要负责调控细胞存活与凋亡之间的平衡, 有研究证明在外界刺激下, Bax 蛋白在线立体周围可形成挂聚糖, 增加线粒体外膜的通透性, 在整个凋亡途径中起到关键作用^[11]。Caspase 的激活可使细胞发生不可逆的凋亡。Caspase 家族成员以无活性的酶原形式存在于细胞内, Caspase 活化途径有线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路。Caspase-9 是线粒体通路的关键蛋白, 它的活化对整个内源性凋亡通路的激活尤为重要。细胞色素 C 从线粒体释放后, 正常情况下, 细胞的线粒体膜电位保持在平衡状态, 只有当线粒体膜受到损伤时, 造成线粒体呼吸链受损, 抑制 ATP 合成, 细胞色素 C 从线粒体释放后, 会与凋亡蛋白酶活化因子 1(Apaf-1) 结合, 在脱氧三磷酸腺苷存在的情况下, 激活 Apaf-1。活化的 Apaf-1 结合在 Caspase-9 酶原而将之切割和活化, 活化的 Caspase-9 切割 Caspase-3 酶原并产生活化的 Caspase-3 四聚体, 最终引起细胞凋亡^[12]。

3.3 本实验研究发现 LSPCs 可导致 HepG2 细胞 DNA 损伤明显, 诱导 Bcl-2 蛋白家族中促调往蛋白 Bax 的表达, 同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平降低, 最终激活的 Bax 和 Bad 蛋白积聚于线粒体的外膜, 通过开放电压通道或直接建立孔道等方式增加线粒体膜电位通透性, 膜电位下降, 使线粒体内外膜之间的细胞色素 C 等凋亡因子大量释放, 从而引起 Caspase 的级联反映。但 LSPCs 导致细胞 DNA 损伤及线粒体膜电位下降的机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] 王威, 陈景红, 王新宁, 等. 葡萄籽原花青素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及自噬性死亡[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2011, 32(2): 181-187

WANG Wei, CHEN Jing-hong, WANG Xin-ning, et al. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and autophagic cell death in human hepatoma HepG2 cells [J]. Journal of Jinan University: Natural Science & Medicine Edition, 2011, 32(2): 181-187

[2] Qi X. Oridonin nanosuspension was more effective than free oridonin on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in the human pancreatic cancer PANC-1 cell line [J]. International Journal of Nanomedicine, 2012, 7(9): 1793-1804

[3] Liu X, Zhang B, Guo Y, et al. Down-regulation of AP-4 inhibits proliferation, induces cell cycle arrest and promotes apoptosis in human gastric cancer cells [J]. Plos One, 2012, 7(5):410-410

[4] Tae-Hee K, Ji-Young B, Min-Ho K, et al. Atractylenolide III, a sesquiterpenoid, induces apoptosis in human lung carcinoma A549 cells via mitochondria-mediated death pathway [J]. Food & Chemical Toxicology, 2011, 49(2):514-519

[5] Barras D, Widmann C. Promises of apoptosis-inducing peptides in cancer therapeutics [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 12(8):1153-1165

[6] Zhang H, Ke J, Shao T, et al. Cytotoxic effects of procyanidins from *Castanea mollissima* Bl. shell on human hepatoma G2 cells in vitro [J]. Food & Chemical Toxicology, 2013, 64(2):166-176

[7] Cedó L, Castell-Auví A, Pallarès V, et al. Grape seed procyanidin extract modulates proliferation and apoptosis of pancreatic beta-cells [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 524-530

[8] Ling Z Q, Xie B J, Yang E L. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(7): 2441-2445

[9] Duan Y, Zhang H, Xu F, et al. Inhibition effect of procyanidins from lotus seedpod on mouse B16 melanoma *in vivo* and *in vitro* [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1):84-91

[10] Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Mihalis I Panayiotidis, et al. DNA damage and autophagy [J]. Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011, 711(1-2): 158-66

[11] Kaori I, Keizo T, Miho A, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis [J]. Science, 2008, 320(5876): 661-664

[12] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore

and its role in cell death [J]. Biochemical Journal, 1999,

341(pt 2): 233-249

现代食品科技