

槲皮素对人肺腺癌NCI-H1395细胞凋亡的影响

李林*,王迪进,万轲,徐国辉*(江西省肿瘤医院,南昌 330029)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4786-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.11

摘要 目的:研究槲皮素对人肺腺癌NCI-H1395细胞凋亡的影响。方法:采用CCK-8法检测0~200 μmol/L槲皮素作用12、24、48 h对NCI-H1395细胞增殖的影响;应用Hochest33258染色法和流式细胞仪检测0、20、50、100 μmol/L槲皮素作用24 h对NCI-H1395细胞凋亡的影响;检测100 μmol/L槲皮素对经半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8(Caspase-8)、Caspase-9、Caspase-3抑制剂处理后NCI-H1395细胞凋亡的影响。结果:槲皮素可抑制NCI-H1395细胞的增殖,且与浓度和时间呈正相关。20、50、100 μmol/L槲皮素可诱导NCI-H1395细胞凋亡,凋亡率分别为(18.6±4.1)%、(39.1±4.5)%、(58.2±3.5)%。抑制Caspase-8、Caspase-3激活可明显降低槲皮素对细胞的抑制作用($P<0.05$)。结论:槲皮素可抑制NCI-H1395细胞增殖,诱导其凋亡,其作用可能与凋亡外源通路Caspase-8和Caspase-3的激活有关。

关键词 槲皮素;人肺腺癌NCI-H1395细胞;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

Effects of Quercetin on Human Lung Cancer NCI-H1395 Cell Apoptosis

LI Lin, WANG Di-jin, WAN Ke, XU Guo-hui (Jiangxi Provincial Tumor Hospital, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of quercetin on human lung cancer NCI-H1395 cell apoptosis. METHODS: CCK-8 was used to detect the effects of 0-200 μmol/L quercetin on human lung cancer NCI-H1395 cell proliferation after treated for 12, 24 and 48 h. Hochest33258 staining and flow cytometry were used to detect the effects of 0, 20, 50, 100 μmol/L quercetin on NCI-H1395 cell apoptosis after treated for 24 h. The effects of 100 μmol/L quercetin on NCI-H1395 cell apoptosis was investigated after treated with Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3 inhibitor. RESULTS: Quercetin could inhibit NCI-H1395 cell proliferation in dose and time-dependent manner. 20, 50, 100 μmol/L quercetin could induce the apoptosis of NCI-H1395 cell, and apoptotic rates were (18.6±4.1)%, (39.1±4.5)% and (58.2±3.5)%. Caspase-8 and Caspase-3 activation inhibition could obviously weaken the inhibitory effects of quercetin on cell ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Quercetin can inhibit NCI-H1395 cell proliferation and induce cell apoptosis, which is related to the external way of cell apoptosis through activating Caspase-8 and Caspase-3.

KEYWORDS Quercetin; Human lung cancer NCI-H1395 cell; Cell apoptosis; Caspase

槲皮素(1,3',4',5,7-五羟基黄酮)是一种黄酮类化合物,广泛存在于自然界各种植物的花、叶和果实之中^[1]。槲皮素具有很好的生物学活性,如抗炎、抗过敏、抗病毒、抗氧化、降血压等^[2]。近年来,有研究发现槲皮素对膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞的增殖有明显的抑制作用^[3-5]。

据报道,肺癌是目前全球发病率、病死率最高的恶性肿瘤之一,而我国肺癌的发病率处于逐年上升的态势。其中非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)占有肺癌的80%左右^[6]。由于早期肺癌缺乏特异性症状,65%~70%的NSCLC患者确诊时已处于晚期,失去手术治疗的机会。目前临床上对于晚期肺癌的治疗,一般采取多学科综合治疗,而化疗仍是最重要手段之一。本实验旨在研究槲皮素对人肺腺癌NCI-H1395细胞增殖、凋亡以及凋亡通路中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)活性变化的影响,为进一步探索槲皮素诱导

肿瘤细胞凋亡的分子机制以及推进槲皮素的临床应用提供试验基础。

1 材料

1.1 仪器

SpectraMax全自动酶标仪(美国Molecular Devices公司); Gallios流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司); BX41-32P02-FLB3荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

槲皮素(美国Sigma公司,纯度:≥99.5%); RPMI1640培养基(美国Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青生物制品公司); 胰酶(美国Invitrogen公司); CCK-8试剂盒(碧云天生物技术研究所); Hochest33258染色试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒和Z-DEVD-FMK(Caspase-3抑制剂)、Z-IETD-FMK(Caspase-8抑制剂)和Z-LEHD-FMK(Caspase-9抑制剂)均购自美国Biovision公司。

1.3 细胞株

人肺腺癌NCI-H1395细胞来源于中国科学院上海细胞生

* 主治医师。研究方向:肺癌诊断及治疗。电话:0791-88314746

通信作者:主治医师。研究方向:癌症的综合治疗。E-mail: xuguohuinc@sina.com.cn

物学研究所细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

NCI-H1395细胞按常规培养于RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素)中,培养条件为37℃、5%CO₂、恒温、恒湿。

2.2 细胞增殖抑制率的检测

取对数生长期NCI-H1395细胞,0.25%胰酶消化后,分别以100 μl(细胞数为5×10⁵ ml⁻¹)接种于96孔板中。将96孔板置于培养箱中培养,24 h后弃去各孔上清液,分别加入不同浓度的槲皮素,使其终浓度分别为0(空白对照)、10、20、50、100、200 μmol/L,每个浓度4个平行孔。于培养箱中分别培养12、24、48 h后,弃培养液,每孔加100 μl新培养液(含10% CCK-8),于培养箱中继续培养30 min。用全自动酶标仪于450 nm波长处测定光密度(OD),OD值越大,细胞活力越大;并计算细胞增殖抑制率=(1-试验孔OD值/空白对照孔OD值)×100%。

2.3 细胞凋亡的检测

2.3.1 Hoechst33258染色法 取以0(空白对照)、20、50、100 μmol/L槲皮素培养24 h的NCI-H1395细胞,弃培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,加入5 μmol/L的Hoechst33258染色液避光染色10 min,再用PBS清洗3遍,置于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.3.2 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)染色法 取以0(空白对照)、20、50、100 μmol/L槲皮素培养24 h的NCI-H1395细胞,弃培养液,PBS清洗3遍,胰酶消化细胞后,将细胞重悬,避光加入5 μl FITC室温孵育5 min,加入10 μl的PI溶液,避光孵育15 min,然后取出细胞过滤,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.4 Caspase抑制剂对细胞增殖的影响

取对数生长期的NCI-H1395细胞,胰酶消化后,分别以100 μl(细胞数为5×10⁵ ml⁻¹)接种于96孔板中,培养24 h后,分别加入Z-DEVD-FMK、Z-IETD-FMK、Z-LEHD-FMK试剂预处理3 h,弃培养液,再加入100 μmol/L的槲皮素,依次记为B、C、D组;另以仅加入100 μmol/L槲皮素的细胞为对照,记为A组,每组4个平行孔,培养24 h。全自动酶标仪检测细胞活力,计算增殖抑制率。

2.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 11.5统计软件。选择方差分析进行方差齐性检验,多组均数间两两比较采用Student-newman-keuls法,若方差不齐采用秩和检验。组内两两比较采用独立样本t检验进行方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对细胞增殖的影响

与空白对照比较,10、20、50、100、200 μmol/L槲皮素作用后细胞活力均降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与作用12 h比较,作用24、48 h后细胞活力均降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明槲皮素对NCI-H1395细胞增殖的抑制作用具有浓度和时间依赖性,呈正相关。槲皮素对细胞增殖的影响见图1。

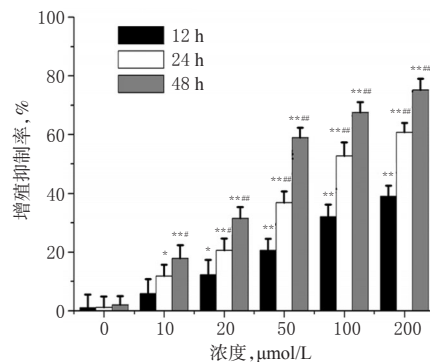


图1 槲皮素对细胞增殖的影响

注:与0 μmol/L比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与12 h比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Fig 1 Effects of quercetin on cell proliferation

Note: vs. 0 μmol/L, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. 12 h, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 槲皮素对细胞凋亡的影响

20、50、100 μmol/L的槲皮素作用于细胞24 h,细胞核出现不同程度的固缩、染色质聚集、边缘化等典型的细胞凋亡核形态学改变,浓度越高核固缩越明显;其凋亡率分别为(18.6 ± 4.1)%、(39.1 ± 4.5)%和(58.2 ± 3.5)%,表明槲皮素浓度越高,细胞凋亡率越大。与空白对照(0 μmol/L)比较,各浓度槲皮素作用后细胞的凋亡率均增加($P < 0.01$)。不同浓度槲皮素作用后细胞凋亡的显微镜图见图2,散点图见图3,统计结果见图4。

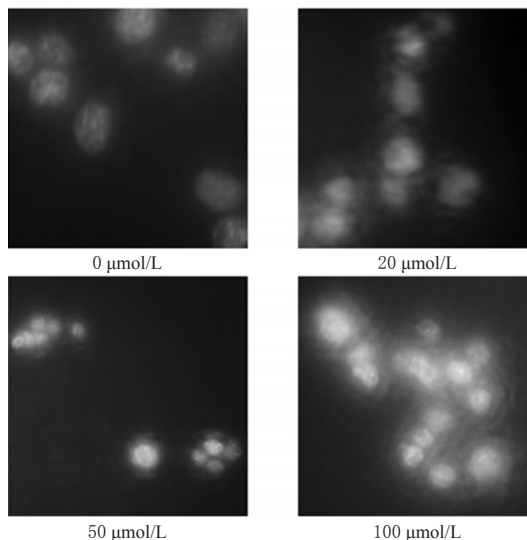


图2 不同浓度槲皮素作用后细胞凋亡的显微镜图(×200)

Fig 2 Microgram of cell apoptosis after treated with different concentrations of quercetin (×200)

3.3 Caspase抑制剂对细胞增殖的影响

与A组比较,B、C组细胞的增殖抑制率明显降低($P < 0.05$),分别为(41.6 ± 2.9)%和(43.6 ± 3.4)%,其他差异无统计学意义。各组细胞的增殖情况见图5。

4 讨论

细胞凋亡是通过调控细胞内基因及其产物而发生的一种程序性细胞死亡过程,与肿瘤的发生发展密切相关^[7-9]。目前常规的细胞凋亡检测技术包括细胞核染色技术、流式细胞术

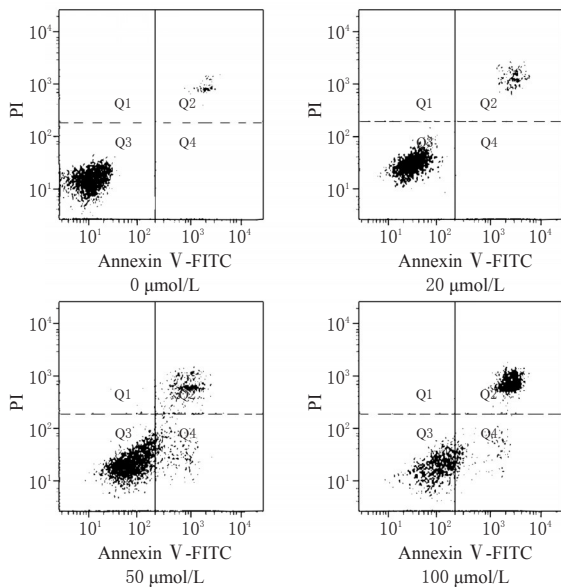


图3 不同浓度槲皮素作用后细胞凋亡的散点图

Q1. PI 阳性细胞; Q2. FITC/PI 双阳性细胞; Q3. FITC/PI 双阴性细胞; Q4. FITC 阳性细胞

Fig 3 Scatter diagram of cell apoptosis after treated with different doses of quercetin

Q1. PI positive cell; Q2. FITC/PI double-positive cell; Q3. FITC/PI double-negative cell; Q4. FITC positive cell

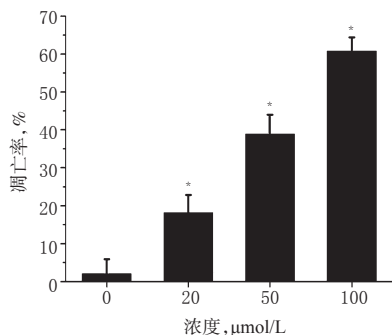


图4 不同浓度槲皮素作用后细胞凋亡的统计结果

注:与0 μmol/L比较, * $P < 0.01$

Fig 4 Statistical result of cell apoptosis after treated with different doses of quercetin

Note: vs. 0 μmol/L, * $P < 0.01$

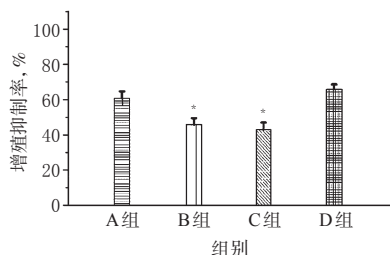


图5 各组细胞的增殖情况

注:与A组比较, * $P < 0.05$

Fig 5 Proliferation of cells in each group

Note: vs. group A, * $P < 0.05$

50、100 μmol/L 的槲皮素处理细胞 24 h, 细胞核染色后发现细胞核出现不同程度的固缩、染色质聚集、边缘化等典型的细胞凋亡核形态学改变; 流式细胞术凋亡定量分析也发现, 20、50、100 μmol/L 的槲皮素处理细胞 24 h 后细胞凋亡率分别为 $(18.6 \pm 4.1)\%$ 、 $(39.1 \pm 4.5)\%$ 和 $(58.2 \pm 3.5)\%$, 并呈现浓度依赖性。以上结果均可证实槲皮素可诱导 NCI-H1395 细胞凋亡。

Caspase 家族蛋白存在于细胞浆中, 是凋亡级联传导通路中的重要成员, 在凋亡启动和执行过程中起关键作用^[10]。按不同 Caspase 家族成员分子结构和激活顺序, 可以将其分为细胞凋亡的起始分子 (Caspase-8、Caspase-9) 和效应分子 (Caspase-3)。其中 Caspase-3 是细胞凋亡信号通路的汇集点, 活化的 Caspase-3 进一步激活内源性核酸内切酶, 从而导致凋亡发生; 而 Caspase-8 是凋亡外源通路的起始分子^[11]。本试验结果发现, 100 μmol/L 槲皮素处理 Caspase-8 和 Caspase-3 抑制的细胞 24 h 后的细胞活力明显高于 100 μmol/L 槲皮素处理 Caspase-8 和 Caspase-3 未抑制的细胞 24 h 后的细胞活力, 由此可以推测, 槲皮素可能通过先激活 Caspase-8, 继而再激活 Caspase-3 来诱导细胞凋亡。

参考文献

- [1] 赵蕾, 赵雪梅, 马朋, 等. 槲皮素抗肿瘤作用的研究新进展[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(3): 78.
- [2] 史桂兰, 黄琳, 卿海燕, 等. 槲皮素对人肝癌 SMMC-7721 细胞生长抑制及诱导凋亡作用[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(1): 17.
- [3] 周阿成, 金黑鹰, 张春霞, 等. 槲皮素对结肠癌作用及其机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(9): 936.
- [4] 侯钰佩, 郭阿丽, 翟广玉, 等. 槲皮素对多种肿瘤细胞增殖的抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2012, 47(3): 333.
- [5] 罗辉燕, 冯冬冬, 于伟娜, 等. 槲皮素对结直肠癌细胞 SW480 增殖与 Bcl-2、C-myc 表达的影响[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 987.
- [6] 孔建民, 屠波, 刘阿秋, 等. 放疗联合唑来膦酸治疗非小细胞肺癌骨转移的疗效分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(1): 66.
- [7] 张杰, 吕蔡, 张平安, 等. 槲皮素抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(8): 436.
- [8] 令狐丹丹, 陈春花. 程序性细胞死亡分子 5 (PDCD5) 在细胞凋亡中的作用及应用前景[J]. 解剖科学进展, 2013, 19(6): 571.
- [9] 樊玉祥, 何文婷, 李沫函, 等. 三种不同方法检测 β-咔啉类生物碱所致的人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(6): 541.
- [10] 吴云飞, 郑维银, 李焰. Caspase-3 在血管内皮细胞凋亡中的作用研究进展[J]. 西南军医, 2013, 15(4): 408.
- [11] 朱国萍, 程阳, 廖军, 等. 细胞凋亡中的 Caspase 家族[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 147.

(收稿日期: 2015-08-28 修回日期: 2015-10-13)

(编辑: 邹丽娟)

进行细胞凋亡率的定量分析等方法^[9]。本实验结果显示, 20、