

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0461

• 基础研究 •

金丝桃苷诱导人胃癌细胞MKN-45凋亡及其机制

刘海雯¹, 郭莲怡²**Hyperoside Induces Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line MKN-45 and Related Mechanism**LIU Haiwen¹, GUO Lianyi²

1. Graduate School of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China

Corresponding Author: GUO Lianyi, E-mail: angel_gly@163.com



Abstract: Objective To investigate the effects of hyperoside(Hyp) on the proliferation and apoptosis of human gastric cell line MKN-45 and its mechanism. **Methods** Gastric cells MKN-45 cultured *in vitro* were treated with various concentrations of hyperoside(0, 12.5, 25, 50, 100, 200μg/ml) for 24 and 48h. Cell proliferation was examined by MTT which could screen suitable drug concentration; cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry; NF-κB P65, caspase-3, Bcl-2 and Bax protein expressions were examined by Western blot. **Results** Hyperoside could inhibit the growth of MKN-45 cells observably, it also blocked cell cycle at G₀/G₁ stage and induced cell apoptosis. Western blot showed that hyperoside could reduce the expression of NF-κB P65, Bcl-2 protein and elevate the expression of caspase-3, Bax protein with the increase of drug concentration. **Conclusion** Hyperoside could inhibit the growth of MKN-45 cells and induce cell apoptosis. The mechanism might be related to blocking cell cycle, inhibiting NF-κB pathway, reducing the expression of NF-κB P65 and Bcl-2 protein and elevating the expression of caspase-3 and Bax protein.

Key words: Hyperoside; MKN-45 cell; Proliferation; Apoptosis

摘要: 目的 探讨金丝桃苷(hyperoside, Hyp)对人胃癌MKN-45细胞增殖及凋亡的影响及其机制。**方法** 体外培养MKN-45细胞, 对照组不加药物, 实验组分别加入不同浓度Hyp(12.5、25、50、100、200 μg/ml)作用24、48 h, MTT法检测Hyp对细胞增殖的影响并筛选适宜药物浓度; 流式细胞术检测细胞周期变化及凋亡率; Western blot法分析NF-κB P65、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白的表达情况。**结果** Hyp可明显抑制MKN-45细胞的增殖, 阻滞细胞于G₀/G₁期并促进其凋亡, Western blot结果显示, 随着药物浓度的增高, Hyp可使NF-κB P65、Bcl-2蛋白表达降低, caspase-3、Bax蛋白表达增高。**结论** 金丝桃苷可抑制MKN-45细胞增殖并诱导凋亡, 其机制可能与该药物阻断细胞周期, 抑制NF-κB通路, 下调NF-κB P65、Bcl-2蛋白, 上调caspase-3、Bax蛋白有关。

关键词: 金丝桃苷; MKN-45细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

0 引言

胃癌是一种发病率和病死率均较高的恶性肿瘤, 最近一项研究显示, 在已确诊的950 000例胃癌的新病例中, 每年有超过720 000人死亡^[1]。胃癌的治疗方式主要为手术切除及术后化疗, 但患者术后复发率和转移率较高, 化疗药物存在很多

不良反应, 因此, 新的抗癌药物的研发一直是发展趋势。

金丝桃苷(hyperoside, Hyp)属黄酮类化合物, 又名槲皮素3-O-β-半乳糖苷, 是贯叶金丝桃的主要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、抗血栓等多种生理活性^[2]。近年来国内外研究发现金丝桃苷具有抗结肠癌、肺癌、胰腺癌等肿瘤细胞的作用, 其机制是通过抑制凋亡通路来实现的^[3], 但对Hyp抗胃癌细胞的研究较少。本实验旨在探讨Hyp对胃癌MKN-45细胞株在体外增殖、凋亡的影响及其机制, 进一步探讨Hyp的抗肿瘤作用。

收稿日期: 2017-04-27; 修回日期: 2017-08-09

作者单位: 1. 121000 锦州, 锦州医科大学研究生学院; 2. 121000 锦州, 锦州医科大学附属医院第一医院消化内科

通信作者: 郭莲怡, E-mail: angel_gly@163.com

作者简介: 刘海雯(1990-)女, 硕士在读, 主要从事中药抗肿瘤及其机制的研究

1 材料与方法

1.1 实验材料

人MKN-45胃癌细胞株(上海生科院细胞资源中心)、DMEM培养液、胎牛血清(美国Gibco公司)、Hyp(南京春秋生物科技有限公司)、MTT(美国Sigma公司)、Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡试剂盒(美国BD公司)、NF- κ B P65、caspase-3、Bax、Bcl-2抗体(英国Abcam公司)。

1.2 细胞培养

将MKN-45胃癌细胞株置于含10%胎牛血清、100 μ g/ml青霉素/链霉素双抗溶液和10 μ g/ml环丙沙星的高糖DMEM培养液中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养,胰蛋白酶消化,每2~3天传代一次并观察细胞的变化。

1.3 MTT法检测Hyp对MKN-45细胞增殖的影响

取对数生长期的MKN-45细胞悬液200 μ l,分别以每孔 1×10^4 接种于96孔板中,细胞培养24 h后加入药物。实验分组: Hyp(12.5、25、50、100、200 μ g/ml)作用于MKN-45细胞,对照组为不加药物。每个剂量设5个复孔,加药后分别培养24和48 h,随后每孔加入MTT 20 μ l,放入培养箱继续培养4 h,吸弃培养液,每孔加150 μ l二甲基亚砜(DMSO),避光振荡10 min,以使结晶物充分融解,用酶标仪(490 nm)测定各孔的吸光度OD值,计算每组细胞的增殖率,并绘制折线图1。

1.4 流式细胞术检测Hyp对MKN-45细胞周期的影响

分别收集对照组及经25、50、100 μ g/ml Hyp处理48 h后的MKN-45细胞,预冷PBS洗涤细胞2次,70%冷乙醇固定过夜。取1 ml各组细胞悬液(调整其细胞浓度为 5×10^5 /ml),分别加50 mg/ml RNaseA和PI染液,37 $^{\circ}$ C温育30 min,然后上流式细胞仪进行周期分析。

1.5 流式细胞术检测Hyp对MKN-45细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞的凋亡率,分别收集对照组和经25、50、100 μ g/ml Hyp作用48 h的MKN-45细胞,调整细胞密度,按说明处理细胞: PBS洗细胞2次;收集 5×10^5 个细胞,加入500 μ l Binding Buffer重悬细胞;分别加入5 μ l Annexin V-FITC和PI室温避光染色15 min,流式细胞仪检测,分析凋亡率。

1.6 Western blot法检测NF- κ B P65、caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白水平

以浓度为25、50、100 μ g/ml的Hyp分别处理细胞48 h,胰酶消化后收集细胞($>5 \times 10^6$ /ml),置于冰上;RIPA溶液裂解蛋白,BCA蛋白定量,

转膜,TBST洗膜,5%脱脂牛奶封闭1 h后加一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST漂洗3次,每次5 min,加入二抗,摇床摇动2 h,显影及定影,使用Image-J软件,定量分析扫描图片中的电泳条带灰度值。

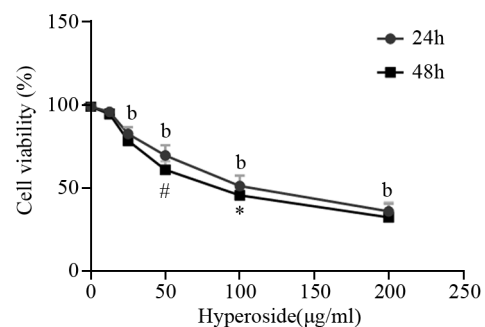
1.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析,实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度Hyp作用后对胃癌细胞MKN-45增殖的影响

作用相同时间,随着药物浓度的增加,Hyp对MKN-45细胞生长的抑制力增强。低浓度Hyp(12.5 μ g/ml)作用细胞24和48 h后,与对照组相比,差异无统计学意义($P=0.178$ 、 $P=0.135$),25、50、100、200 μ g/ml Hyp分别作用细胞24和48 h后,与对照组相比,各组间相比差异均有统计学意义($P=0.000$),见图1。



*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$, compared with the same concentration of hyperside; b: $P < 0.01$, compared with control group

图1 不同浓度Hyp作用不同时间后对MKN-45细胞增殖率的影响

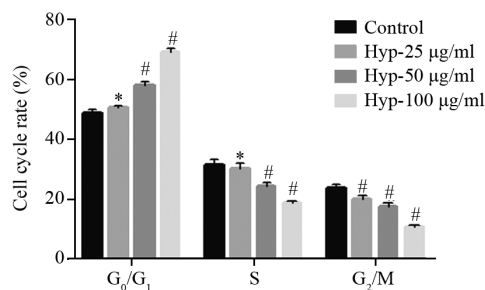
Figure1 Proliferation of gastric cancer cells MKN-45 treated with hyperside at various concentrations for 24 and 48h

2.2 不同浓度Hyp对细胞周期的影响

不同浓度的Hyp作用于胃癌MKN-45细胞48 h后,随着药物浓度的增加,G₀/G₁期比率明显增加,S和G₂/M期明显减少,与对照组相比,差异有统计学意义,见图2。

2.3 Hyp诱导MKN-45细胞的凋亡

不同浓度的Hyp作用MKN-45细胞48 h后,其凋亡率随着药物浓度的增加而增加。100 μ g/ml Hyp作用48 h后,细胞凋亡率由对照组的(4.63 ± 0.65)%升高至(35.23 ± 0.58)%,差异有统计学意义($P=0.000$)。由此可见,Hyp可诱导MKN-45细胞的凋亡,并且呈剂量依赖性,见图3。



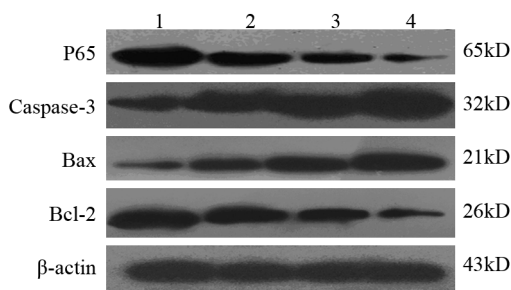
*: $P < 0.05$, compared with control group; #: $P < 0.01$, compared with control group; $n = 5$

图2 48 h后不同浓度Hyp对MKN-45细胞周期分布的影响

Figure2 Cell cycle of gastric cancer cells MKN-45 treated with hyperoside at various concentrations after 48h *in vitro*

2.4 不同浓度Hyp作用MKN-45细胞48 h后对NF- κ B P65、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

用25 μ g/ml Hyp处理MKN-45细胞48 h后, 通过Western blot法检测相关蛋白表达。Caspase-3 ($P = 0.000$)、Bax ($P = 0.006$)表达明显上升, NF- κ B P65 ($P = 0.026$)、Bcl-2 ($P = 0.013$)表达量降低, 随着药物浓度的增加差异越显著, 见图4。



1: control group; 2: Hyp (25 μ g/ml) group; 3: Hyp (50 μ g/ml) group; 4: Hyp (100 μ g/ml) group

图4 48 h后不同浓度Hyp对NF- κ B P65、caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

Figure4 Expressions of NF- κ B P65, caspase-3, Bax and Bcl-2 protein treated with hyperoside at various concentrations after 48h

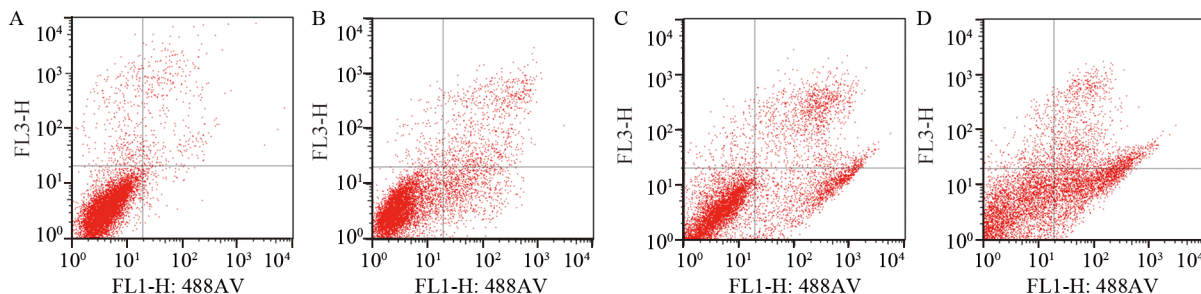
3 讨论

在我国, 胃癌的发病率日益增长, 现有抗癌药

物存在不良反应大及耐药性等问题, 新药的研发一直是热点, 而我国传统中药的抗癌研究已成为重点之一^[4]。近年来, 有研究表明黄酮类中药金丝桃苷在抗肿瘤方面有较好疗效, 但因研究较少, 对于一些肿瘤并未涉及且治疗机制仍需进一步研究。

目前, 探讨肿瘤细胞凋亡是药物研究的趋势, 细胞凋亡不同于细胞坏死, 是一种基因调控下细胞自主的有序死亡过程, 在维持内环境中发挥了重要作用。细胞凋亡的失调与肿瘤的发生、发展及退化密切相关。诱导细胞凋亡, 已成为阻止癌细胞生长和发展的有效途径之一^[5]。阻滞细胞周期是抑制肿瘤生长的重要原因之一, 细胞周期的正常运转受到多个调控点的作用, 若药物可作用于某调控点, 阻滞细胞周期, 可使细胞终止分裂。孙时华等^[6]研究发现, 胃癌细胞BGC-823经一定浓度金丝桃苷作用后, 细胞在G₀/G₁期被阻滞, 从而抑制细胞增殖, 细胞凋亡率也由对照组的3.66%增至53.48%; Zhang等^[7]研究显示, 经一定浓度金丝桃苷处理后的骨肉瘤细胞, 增殖率下降, 并在G₀/G₁期出现停滞, 且发生明显的凋亡现象。本研究发现, 不同浓度金丝桃苷处理胃癌MKN-45细胞后, 随着药物浓度的增加, G₀/G₁期细胞百分率不断增加, 使癌细胞停滞于G₀/G₁期, 从而达到抗肿瘤的目的。

Bcl-2家族是迄今为止研究最多的凋亡基因组之一, 它在滤泡性淋巴瘤的癌基因中首次被提出, 并已被证明可抑制细胞凋亡^[8]。Bcl-2家族蛋白分为抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x_L和促凋亡蛋白Bax、Bak。Bcl-2基因是细胞凋亡的重要负调控因子, 一方面它通过抑制细胞凋亡延长肿瘤细胞存活时间, 另一方面, Bax可加速死亡信号传递。尽管Bcl-2家族如何精确地调控细胞凋亡尚不明确, 但大量研究表明, Bcl-2可通过调节ER和线粒体之间Ca²⁺的平衡, 抑制Cyt-c从线粒体释放, 从而抑制细胞凋亡^[9]。Bcl-2家族蛋白的表达已在人类多种恶性肿瘤中被报道, 有研究显示Bcl-2家族蛋白的表达可预测胃癌患者的预后^[10]; 近期Boukes等^[11]发现, 在体内外实验中, 金丝桃苷均可以通过抑制Bcl-2家族基



A: control group; B: Hyp (25 μ g/ml) group; C: Hyp (50 μ g/ml) group; D: Hyp (100 μ g/ml) group

图3 48 h后不同浓度Hyp组对细胞凋亡率的影响

Figure3 Apoptosis of gastric cancer cells MKN-45 treated with hyperoside at various concentrations after 48h *in vitro*

因来抑制胰腺癌的增殖并促进其凋亡, 本研究结果显示, 胃癌细胞MKN-45经一定浓度金丝桃苷处理后, Bcl-2家族蛋白的表达发生变化, 促凋亡蛋白Bax表达增加, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低, 最终诱导其凋亡, 验证了金丝桃苷的抗肿瘤作用。

核因子 κ B (NF- κ B) 是一种具有多种功能的转录因子, 对多种肿瘤的发展至关重要。NF- κ B参与癌细胞转化的很多过程, 在诱发基因抗凋亡、血管生成、癌细胞的转移和扩散中均扮演着重要的作用^[12]。通过磷酸化触发I κ B的降解, 使游离的NF- κ B进入细胞核暴露其核识别位点, 从而促进NF- κ B调控基因的转录, 减少相关蛋白的表达。凋亡过程受到多个通路和基因调控, 最后多条通路可共同激活caspase-3, 因此, caspase-3的检测是提供细胞凋亡的有利证据。caspase-3作为蛋白酶级联过程中的中心节点, NF- κ B也能直接抑制caspase-3的活化, 从而抑制caspase-3下游一系列的反应, 最终抑制肿瘤细胞凋亡^[13]。目前, 大量文献已阐明, 阻断NF- κ B通路可抑制胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡, 如姜黄素^[14]、槲皮素^[15]和厚朴酚^[16]等抑制相关癌细胞的凋亡均可通过抑制NF- κ B信号通路来实现。近几年, Liu等^[17]研究显示, 金丝桃苷可通过抑制NF- κ B通路, 上调caspase-3促进胰腺癌细胞A的凋亡。Li等^[18]发现, 金丝桃苷通过抑制NF- κ B通路, 抑制胰腺癌细胞PANC-1和BxPC-3的增殖, 并促进其凋亡。多年前, 王维等^[19]研究表明, 胃癌患者中NF- κ B P65蛋白的表达明显高于健康者, 随着胃癌恶性程度的增加, P65蛋白的表达明显增加, 因此P65蛋白的分析在胃癌的研究中有重要意义。本研究的细胞凋亡结果显示, 金丝桃苷可能通过阻断NF- κ B通路, 抑制NF- κ B P65蛋白的表达, 上调caspase-3, 促进细胞凋亡有关, 但具体阻断NF- κ B信号通路的方式还需进一步研究。

综上所述, 体外培养MKN-45胃癌细胞株接受金丝桃苷这种来自黄酮类化合物的传统中药治疗, 肿瘤细胞被抑制并促进其凋亡, 机制可能与其抑制NF- κ B通路及调控Bcl-2家族蛋白表达, 下调NF- κ B P65及Bcl-2蛋白, 上调caspase-3及Bax蛋白有关。此研究说明金丝桃苷可能成为前景很好的预防及治疗胃癌的药物, 未来的研究应该确定金丝桃在体内诱导分化胃癌细胞的活性, 这还需进行进一步动物实验及临床研究来验证, 本研究仍存在不足, 具体抗肿瘤机制需不断探索, 为临床应用提供新的治疗方案。

参考文献:

- [1] Katona BW, Rustgi AK. Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3(2): 211-7.
- [2] Yang B, Yang Q, Yang X, *et al.* Hyperoside protects human

- primary melanocytes against H₂O₂-induced oxidative damage[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4613-9.
- [3] 代培培, 陈剑群. 金丝桃苷抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(11): 1979-81. [Dai PP, Chen JQ. Research progress of anti-tumor effects and immunomodulatory effects of hyperoside[J]. Yi Xue Zong Shu, 2014, 20(11): 1979-81.]
- [4] Zhang YS, Shen Q, Li J. Traditional Chinese medicine targeting apoptotic mechanisms for esophageal cancer therapy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(3): 295-302.
- [5] Misra A, Rai S, Misra D. Functional role of apoptosis in oral diseases: An update[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2016, 20(3): 491-6.
- [6] 孙时华, 姜荣华, 祝海燕, 等. 金丝桃苷体外抗胃癌作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(9): 979-83. [Sun SH, Jiang RH, Zhu HY, *et al.* Hyperoside anti gastric cancer in vitro and its mechanism[J]. Zhongguo Lin Chuang Yao Li Xue Yu Zhi Liao Xue, 2014, 19(9): 979-83.]
- [7] Zhang N, Ying MD, Wu YP, *et al.* Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e98973.
- [8] Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death[J]. Blood, 1992, 80(4): 879-86.
- [9] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, *et al.* From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(4): 273-84.
- [10] Cheng H, Wang X, Li T, *et al.* Bcl-2 expression and patient survival in gastric cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 389.
- [11] Boukes GJ, van de Venter M. The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 617-26.
- [12] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. Cell, 1986, 46(55): 705-16.
- [13] Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, *et al.* Nuclear factor-kappaB and I κ B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis[J]. Cancer, 2004, 101(10): 2351-62.
- [14] Dai C, Li B, Zhou Y, *et al.* Curcumin attenuates quercetin-induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathway in human hepatocyte L02 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 95: 52-63.
- [15] Lee DH, Nam YJ, Lee CS. Quercetin-3-O-(2"-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside attenuates cholesterol oxidation product-induced apoptosis by suppressing NF- κ B-mediated cell death process in differentiated PC12 cells[J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2015, 388(8): 869-81.
- [16] Ou HC, Chou FP, Sheu WH, *et al.* Protective effects of magnolol against oxidized LDL-induced apoptosis in endothelial cells[J]. Arch Toxicol, 2007, 81(6): 421-32.
- [17] Liu YH, Liu GH, Mei JJ, *et al.* The preventive effects of hyperoside on lung cancer *in vitro* by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through Caspase-3 and P53 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 381-91.
- [18] Li Y, Wang Y, Li L, *et al.* Hyperoside induces apoptosis and inhibits growth in pancreatic cancer via Bcl-2 family and NF- κ B signaling pathway both *in vitro* and *in vivo*[J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 7345-55.
- [19] 王维, 罗和生, 余保平. 人胃癌及癌前病变中NF-KappaB和c-myc蛋白的表达与意义[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(4): 285-7. [Wang W, Luo HS, Yu BP Expression of NF-KappaB and c-myc protein in gastric carcinogenesis[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2002, 29(4): 285-7.]

[编辑: 刘红武; 校对: 黄国玲]