

## 白藜芦醇通过影响线粒体膜电位诱导 HepG2 细胞凋亡

马晓冬<sup>1</sup>, 晏芳<sup>2</sup>, 马安德<sup>1</sup>, 王慧君<sup>3</sup> (南方医科大学<sup>1</sup>分析测试中心,<sup>2</sup>组织胚胎学教研室,<sup>3</sup>法医学教研室, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 研究白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡的机制, 探讨白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡过程中线粒体膜电位的变化。方法 采用 MTT 法测定白藜芦醇对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 通过荧光染色及流式细胞术检测细胞凋亡, 电子显微镜观察细胞超微结构的变化, 用 Rhodamine123 和 TMRE 标记细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi$ ), 并分别通过流式细胞仪和共聚焦激光扫描显微镜检测。结果 低浓度白藜芦醇( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ )对 HepG2 细胞的生长抑制作用不显著, 而高浓度白藜芦醇( $>25 \mu\text{mol/L}$ )显著地抑制 HepG2 细胞的生长, 且呈时间和浓度的依赖性( $F=18.532 P<0.05$ ); 流式细胞术分析显示, 白藜芦醇能显著诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈浓度依赖性( $P<0.05$ ); 白藜芦醇能降低 HepG2 细胞线粒体膜电位。结论 白藜芦醇抑制 HepG2 细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 白藜芦醇使 HepG2 细胞线粒体膜电位去极化, 提示线粒体膜电位去极化在白藜芦醇诱导细胞凋亡的过程中起作用。

**关键词:**白藜芦醇; 细胞凋亡; HepG2 细胞; 线粒体膜电位

中图分类号: Q591.9; R34 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0406-03

## Resveratrol induces HepG2 cell apoptosis by depolarizing mitochondrial membrane

MA Xiao-dong<sup>1</sup>, YAN Fang<sup>2</sup>, MA An-de<sup>1</sup>, WANG Hui-jun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Laboratory, <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, <sup>3</sup>Department of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of resveratrol on the proliferation, apoptosis, mitochondrial membrane potential and cell morphology of human liver cancer cell line HepG2. **Methods** The changes in HepG2 cell growth and proliferation in response to resveratrol treatment were evaluated by MTT assay, and resveratrol-induced apoptosis of HepG2 cells was investigated by flow cytometry. Inverted microscope and electron microscope were employed for observing morphological changes of the treated cells. The whole-cell mitochondrial membrane potential was measured in separate experiments using two fluorimetric probes, rhodamine123 and TMRE, respectively. HepG2 cells treated with rhodamine123 were analyzed by flow cytometry and cells treated with TMRE by confocal microscope. **Results** MTT assay showed that low concentrations of resveratrol produced no significant effect on the growth of HepG2 cells, whereas at high concentrations, resveratrol could obviously inhibit the cell growth in a time- and dose-dependent manner. Resveratrol also induced apoptosis of HepG2 cells, and after a 24-hour treatment, resveratrol caused sharp increment of the mitochondria membrane potential. **Conclusion** Resveratrol is capable of inhibiting the proliferation of HepG2 cells and inducing cell apoptosis by depolarizing mitochondrial membrane potential.

**Key words:** resveratrol; apoptosis; HepG2 cells; mitochondrial membrane potential

白藜芦醇(resveratrol, 3, 4, 5'-三羟基-反-均二苯代乙烯)于1940年首次从毛叶藜芦(*Veratrum grandiflorum*)的根部分离得到,广泛存在于虎杖、葡萄、草莓和花生等多种植物中<sup>[1]</sup>。因其具有抗血小板凝集、螯合自由基和抗氧化等作用,长期以来一直广泛用于心血管疾病的防治中。近年来的研究揭示了白藜芦醇的抗肿瘤的作用,引起人们的广泛关注,研究证明白藜芦醇可以抑制包括前列腺癌、乳腺癌、胃癌、

结肠癌、卵巢癌、子宫颈癌和白血病等肿瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>,但其具体机制尚不十分清楚,并可能因细胞类型的不同而存在差异。本研究观察了白藜芦醇对人肝癌 HepG2 细胞生长增殖和其诱导细胞凋亡的作用,探讨了线粒体膜电位在白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡过程中的变化,目的在于认识白藜芦醇诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 试剂 白藜芦醇、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、RNase、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。Rhodamine123 和 TMRE 购自 Molecular Probes 公司。DMEM 为 Gibco 产品,小牛血

收稿日期: 2005-10-12

基金项目: 国家自然科学基金(30300455)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30300455)

作者简介: 马晓冬(1975-),男,博士研究生,研究方向为线粒体蛋白质组学, E-mail: mxm@fimmu.com

通讯作者: 王慧君,电话: 020-61648229

清为杭州四季青公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

仪器 酶标仪(680 Bio-Red,美国),流式细胞仪(Coulter Elite, Coulter, 美国),激光扫描共聚焦显微镜(TCS SP2/AOBS Leica, 德国),透射电子显微镜(H7500, HITACHI, 日本)。

1.1.2 细胞培养与处理 人肝癌细胞系 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基于 5%CO<sub>2</sub>, 37 °C 条件下培养。白藜芦醇处理细胞的终浓度分别为 25、50、100、150、200 μmol/L, 其中各组培养液中 DMSO 的终浓度不超过 0.2%。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞生长曲线的绘制 MTT 法测量白藜芦醇对 HepG2 细胞生长的影响。收集对数期细胞, 1×10<sup>4</sup> 接种于 96 孔板, 加入不同浓度的白藜芦醇, 实验组每个浓度做 6 个平行孔, 以含 DMSO 的培养液作对照。5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 条件下分别培养 24、48 和 72 h, 去上清。每孔加入终浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 终止培养, 去上清, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡混匀, 酶标仪 490 nm 处测吸光度值。

1.2.2 细胞形态学观察分析 将细胞按 1×10<sup>4</sup>~1×10<sup>5</sup> 接种于 Petri 培养皿内, 加入终浓度为 200 μmol/L 的白藜芦醇处理细胞, 继续培养 24 h。倒置显微镜下观察细胞, 收集细胞并固定, 按常规方法制电镜切片, 透射电子显微镜观察细胞的超微结构变化。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 用不同浓度白藜芦醇处理细胞 24 h, 收集细胞, 70%冷乙醇固定 4 °C 过夜, 次日离心洗去乙醇, PBS 漂洗, RNase 消化, PI 染色, 室温孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Coulter Elite 流式分析软件计算并分析细胞凋亡率。

1.2.4 细胞内线粒体膜电位测定 采用两种荧光探针 rhodamine 123 和 TMRE 标记细胞内线粒体膜电位, 结合流式细胞仪和激光扫描共聚焦显微镜测量<sup>[5,6]</sup>。具体步骤: 用无血清培养基 DMEM(不含酚红) 轻洗细胞 3 次, 加入 1 μg/ml rhodamine123 或 250 nmol/L TMRE 负载, 37 °C 孵育, 加入 50 μmol/L 的白藜芦醇处理细胞, 对照组加入溶解白藜芦醇的 DMSO。其中负载 rhodamine123 的细胞使用流式细胞仪检测分析, 负载 TMRE 的细胞使用激光扫描共聚焦显微镜观察分析。

1.2.5 统计学分析 细胞生长抑制和诱导凋亡实验重复 3 次, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS11.0 统计软件对数据进行处理。白藜芦醇对 HepG2 细胞的生长抑制实验采用析因设计的方差分析, 白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡的实验采用方差分析(One-way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 白藜芦醇对 HepG2 细胞生长的影响

以 25、50、100、150、200 μmol/L 的白藜芦醇分别处理细胞 24、48、72 h, MTT 法测定白藜芦醇对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 结果显示: 低浓度的白藜芦醇( $\leq 25 \mu\text{mol/L}$ )对 HepG2 细胞生长抑制作用不显著, 而高浓度的白藜芦醇( $>25 \mu\text{mol/L}$ )可以抑制 HepG2 细胞生长, 且抑制率随白藜芦醇浓度的增加而增大, 同一时间点不同浓度的各组分比较均有显著性差异( $F=18.532, P<0.05$ )。

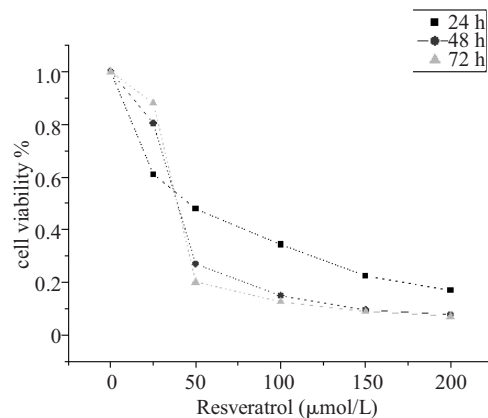


图1 白藜芦醇对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of resveratrol on proliferation of HepG2 cells

### 2.2 白藜芦醇作用下 HepG2 细胞形态学变化

200 μmol/L 的白藜芦醇处理 HepG2 细胞 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞生长状态明显较对照组差, 并且凋亡细胞的体积变小、变形, 细胞出现皱缩、变圆、脱落等现象(图 2-B)。透射电镜观察结果显示: 细胞体积缩小, 染色质浓缩, 细胞核裂解为碎块(图 2-D), 荧光显微镜下细胞核呈折叠样, 部分细胞核裂解为碎块(图 2-F)。

### 2.3 白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡

流式细胞仪检测分析显示: 白藜芦醇处理 HepG2 细胞 24 h 后, 在 50 μmol/L 浓度下, 即在二倍体峰前出现凋亡峰, 随着白藜芦醇浓度的增大, 凋亡峰分别增大。25、50、100、150、200 μmol/L 的白藜芦醇作用下 HepG2 细胞凋亡率分别为 (8.3±1.8)%、(17.2±3.2)%、(28.6±1.2)%、(46.1±2.2)%、(54.1±3.6)% 对照为(4.3±1.1)% (图 3)。

### 2.4 白藜芦醇对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

Rhodamine123 和 TMRE 的荧光信号主要集中于线粒体, 其荧光强度的变化反映了线粒体膜电位的变化。流式细胞仪分析结果显示, 细胞可分为两群, 荧光强度低的和荧光强度高的, 这表明线粒体膜电位的降低发生在部分细胞, 故该膜电位的降低以百分比来表示。HepG2 细胞经 25、50、100、150、200 μmol/L 的

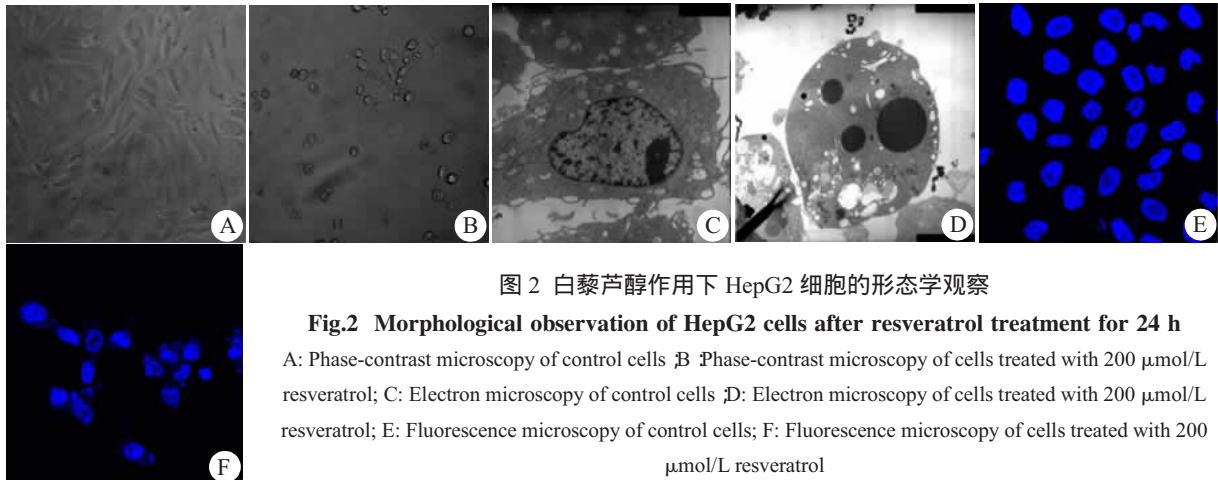


图 2 白藜芦醇作用下 HepG2 细胞的形态学观察

Fig.2 Morphological observation of HepG2 cells after resveratrol treatment for 24 h

A: Phase-contrast microscopy of control cells ;B :Phase-contrast microscopy of cells treated with 200  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol; C: Electron microscopy of control cells ;D: Electron microscopy of cells treated with 200  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol; E: Fluorescence microscopy of control cells; F: Fluorescence microscopy of cells treated with 200  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol

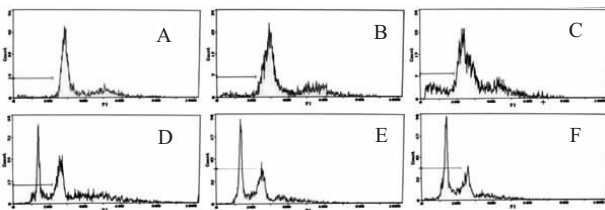


图 3 白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡的流式细胞仪分析

Fig.3 HepG2 cells exposed to resveratrol at increasing concentrations and harvested after 24-hour treatment for sub-G1 population analysis

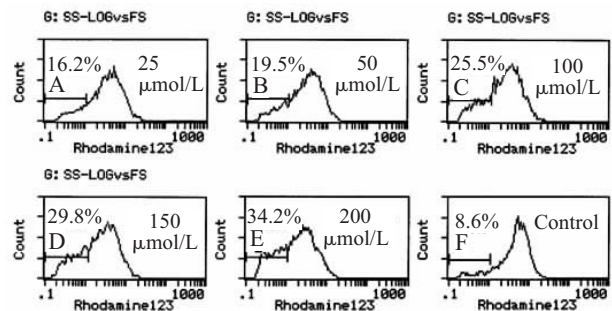
A: 0  $\mu\text{mol/L}$ ; B: 25  $\mu\text{mol/L}$ ; C: 50  $\mu\text{mol/L}$ ; D :100  $\mu\text{mol/L}$ ; E: 150  $\mu\text{mol/L}$ ; F: 200  $\mu\text{mol/L}$

白藜芦醇作用 8h 后，明显的观察到线粒体膜电位降低，分别为 16.2%、19.5%、25.5%、29.8%、34.2%，提示发生线粒体膜电位去极化（图 4），暗示白藜芦醇可能通过降低线粒体膜电位而引起细胞功能障碍。

### 3 讨论

白藜芦醇是一种多酚类化合物，具有抗炎、抗氧化、抑制血小板聚集、保护心血管、抗肿瘤等作用。近年的研究表明：白藜芦醇可以在肿瘤发生发展的各个阶段起到抑制作用，还可以通过多种不同的途径诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[7-10]</sup>。但目前对于白藜芦醇诱导肿瘤细胞凋亡的具体机制尚不很清楚。线粒体是细胞的动力工厂，具有氧化磷酸化、传递电子、贮存  $\text{Ca}^{2+}$ 、能量代谢等重要生理功能，其主要功能是为细胞提供各种功能活动所需要的能量。目前研究表明线粒体还具有其他一些重要功能，其中线粒体在细胞凋亡中的关键作用已成为研究热点<sup>[11,12]</sup>。

对细胞凋亡机制研究的一重要方面就是对线粒体重要性的认识，大量实验证实：线粒体在死亡信号的诱导下，跨膜电位 ( $\Delta\Psi_m$ ) 下降，膜通透转变孔道 (PTP) 开放是细胞凋亡的早期特征<sup>[13]</sup>。多种因素如化



Control 50  $\mu\text{mol/L}$  200  $\mu\text{mol/L}$

图 4 白藜芦醇对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.4 Effect of resveratrol on mitochondrial membrane potential measured by flow cytometry using rhodamine123 (upper two panels) and by confocal microscope using TMRE (bottom panel)

疗药物、TNF 等诱导细胞发生凋亡中，在特征性的细胞核改变之前，均能观察到线粒体跨膜电位 ( $\Delta\Psi_m$ ) 的下降，而且  $\Delta\Psi_m$  下降的细胞不可避免的发生凋亡，提示  $\Delta\Psi_m$  的下降是凋亡的一个早期特征。本研究探讨了白藜芦醇诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡及其对线粒体膜电位的影响。结果表明，在一定浓度范围内白藜芦醇能抑制 HepG2 细胞的生长增殖，并可以诱导细胞凋亡，在白藜芦醇处理后的 HepG2 细胞，其线粒体膜电位明显降低，说明白藜芦醇可以通过影响线粒体的功能而影响细胞生理活性。因此白藜芦醇可能通过使 HepG2 细胞线粒体膜电位去极化而激活线粒体介导的细胞凋亡途径，这也可能是白藜芦醇诱导 HepG2 细胞凋亡的机制之一。

(下转 413 页)



大量粗样品上样,证实在此最佳吸附条件下,目的蛋白能较好的分离。此吸附条件的确定为下一步层析纯化工艺组合路线奠定了实验基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Selkirk C. Ion-exchange chromatography [ J ] Methods Mol Biol, 2004, 244(1): 25-32.
- [ 2 ] 陈枢青, 韩晓旭. 利用电泳滴定曲线选择多核苷酸磷酸化酶快速离子交换层析的最佳条件 [ J ] 中国现代应用药学杂志, 1999, 2 ( 16 ) 34-6.  
Chen SQ, Han XX. Use of electrophoretic titration curve for prediction optimal chromatographic conditions for purification of polynucleotide phosphorylase by fast ion-exchange chromatography [ J ] Chin Mod Appl Pharm, 1999, 2(16): 34-6.
- [ 3 ] 赵德明, 蔡德鸿, 张华, 等. 试管法纯化人胰岛细胞的初步研究 [ J ] 广东医学, 2004, 25( 2 ) 136-7.  
Zhao DM, Cai DH, Zhang H, et al. Preliminary study on the purification of human islet cells by tube method [ J ] Guangdong Med J, 2004, 25(2):136-7.
- [ 4 ] 李津, 俞泳霖, 董德祥. 生物制药设备和分离纯化技术 [ J ] 北京: 化学工业出版社, 2003, 232-40.
- [ 5 ] 郑大勇, 罗荣城, 蔡红兵. 基因工程抗体 anti-HBsAg Fab 原核表达体系大规模培养条件的实验研究 [ J ] 第一军医大学学报, 2005, 24( 5 ) 517-20.  
Zheng DY, Luo RC, Cai HB. Conditions for large-scale production of genetically engineered *E.coli* bearing humanized anti-HBsAg Fab [ J ] J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005, 24 (5): 517-20.
- [ 6 ] 郭尧君. 蛋白电泳实验技术 [ M ] 北京: 科学出版社. 1999: 123-57.
- [ 7 ] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南 [ M ] 北京: 科学出版社. 1998: 366-73.
- [ 8 ] Stepnowski P, Mrozik WW. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography [ J ] Science, 2005, 28(2): 149-54.
- [ 9 ] Malumquist G, Lundell N. Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides chromatography [ J ] J Chromatogr, 1992, 627(1-2): 107-24.
- [ 10 ] 浦宇, 王芝祥. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况 [ J ] 生物工程学报, 2004, 20( 6 ) 214-22.  
Pu Y, Wang ZX. Advancement of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography media application in protein chromatography [ J ] J Bioeng, 2004, 20(6): 214-22.
- [ 11 ] 李校堃, 袁辉. 药物蛋白质分离纯化技术 [ M ] 北京: 化学工业出版社, 2005: 130-1.

#### (上接 408 页)

#### 参考文献:

- [ 1 ] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies [ J ] Anticancer Res, 2004, 24(5A): 2783-40.
- [ 2 ] Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells [ J ] Blood, 1998, 92(3): 996-1002.
- [ 3 ] Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M, et al. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells [ J ] Cell Death Differ, 2000, 7(9): 834-42.
- [ 4 ] Delmas D, Rebe C, Lacour S, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells [ J ] J Biol Chem, 2003, 278(42): 41482-90.
- [ 5 ] Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpain [ J ] FASEB J, 2004, 18(12): 1395-7.
- [ 6 ] Blattner JR, He L, Lemasters JJ. Screening assays for the mitochondrial permeability transition using a fluorescence multiwell plate reader [ J ] Anal Biochem, 2001, 295(2): 220-6.
- [ 7 ] Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, et al. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells [ J ] Cancer Res, 2001, 61(12): 4731-9.
- [ 8 ] Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, et al. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2 [ J ] FASEB J, 2001, 15 (9): 1613-5.
- [ 9 ] Zheng J, Ramirez VD. Piceatannol, a stilbene phytochemical, inhibits mitochondrial F0F1-ATPase activity by targeting the F1 complex [ J ] Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(2): 499-503.
- [ 10 ] Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells [ J ] Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(3): 579-85.
- [ 11 ] Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathway [ J ] Biocell, 2005, 29(2): 149-61.
- [ 12 ] Hail N Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer [ J ] Apoptosis, 2005, 10(4): 687-705.
- [ 13 ] Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization [ J ] J Cell Sci, 2005, 118 ( 3 ): 473-83.