

· 基础研究 ·

槲皮素对肺腺癌细胞株A549细胞中凋亡相关因子caspase-3表达的影响

闻春生 应斌武 张永刚 张杰 范红

【摘要】 背景和目的 探讨槲皮素是否有诱导肺肿瘤细胞的凋亡作用,以及对肺腺癌细胞系A549细胞中重要凋亡相关因子caspase-3表达的影响。方法 采用RT-PCR与 Western Blot技术检测在槲皮素不同时间、不同浓度作用A549细胞后的caspase-3mRNA和蛋白表达的变化。结果 槲皮素作用A549细胞后, A549细胞的caspase-3 mRNA和蛋白表达水平逐渐增高,在12小时时达到了高峰,呈现出一定的时间和浓度依赖性。结论 槲皮素诱导A549细胞凋亡可能通过诱导caspase-3的表达而起作用。

【关键词】 槲皮素 肺肿瘤 caspase-3 凋亡

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.02.002

Effect of quercetin on the expression and growth of caspase-3 in lung adenocarcinoma cancer cell line A549

WEN Chunsheng*, YING Binwu[△], ZHANG Yonggang[△], ZHANG Jie[△], FAN Hong*[△]

*Department of Respiratory Medicine, [△]Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China.

Corresponding author: fanhongfan@yahoo.com

【Abstract】 Background and objective To study the influence of Quercetin in the expression of caspase-3 in Lung Adenocarcinoma Cancer cell line A549. **Methods** The mRNA expression of caspase-3 in A549 Cells was detected by RT-PCR, and the protein expression was detected by Western blot. **Results** The mRNA and protein expressions of caspase-3 was enhanced by Quercetin in dose- and time-dependent manners. **Conclusion** The enhancement effects of Quercetin on caspase-3 in A549 cells may provide promising therapy of tumor.

【Key words】 Quercetin Lung neoplasms Caspase-3 Apoptosis

This work is supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (to FAN Hong) (No.30470761) and Post-doctoral Science Foundation of China (No.2005038268).

槲皮素(Quercetin)是一种具有多种生物活性的天然黄酮类化合物,存在于水果,蔬菜以及中草药等多种植物中。近来研究发现其具有广泛的清除氧自由基,抗炎,调节免疫等功能^[1]。

体外研究发现,槲皮素可以抑制白血病细胞,喉癌细胞,胃癌细胞,结肠癌细胞等肿瘤细胞的生长,并且诱导肿瘤细胞凋亡^[2-6],其潜在的抗肿瘤活性逐渐成为人们研究的重点。

凋亡^[7],又称程序性死亡,是一种由基因控制的细胞的自主性死亡过程,对机体内环境的稳定起着重要作用。迄今为止,凋亡的具体机制尚不完全清楚。已有研究发现,凋亡可能与肿瘤,自身免疫性疾病等有密切关系。细胞凋亡功能受抑制,将会导致肿瘤的产生,而凋

亡功能亢进,则导致组织损伤。因而探讨细胞凋亡的分子生物学机制与调节对肿瘤的防治有着深远的影响。细胞的凋亡是各种凋亡相关因子相互影响的结果。现已普遍认为^[8]细胞的凋亡是半胱氨酸蛋白酶(caspases)级联反应的结果。caspase-3位于该级联反应的下游,被传统认为是凋亡真正的执行者,故caspase-3可作为检测细胞凋亡的一个很好的指标。

本研究主要通过使用槲皮素作用于肺腺癌细胞株A549细胞,观察槲皮素对A549细胞凋亡通路中半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)表达的影响,以此来探讨槲皮素潜在的诱导肿瘤细胞的凋亡的活性,进而讨论其抗肿瘤活性。

本研究受国家自然科学基金(No.30470761)和中国博士后科学基金(No.2005038268)资助

作者单位: 610041 成都,四川大学华西医院呼吸内科(闻春生,范红),实验医学科(应斌武,张永刚,张杰,范红)(通讯作者:范红, E-mail: fanhongfan@yahoo.com)

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人肺腺癌细胞株A549购自四川大学华西医院肿瘤研究所; RIPA-1640培养基购自Gibco; TRIzol Reagent购自Invitrogen ; 两步法RT-PCR试剂盒购自TaKaRa (大连宝生物); BCA蛋白定量试剂盒购自PIERCE; Bcl-2、 β -actin等抗体购自Santa Cruz公司; 槲皮素购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 A549细胞常规培养于含10%新生牛血清的RPMI-1640培养液中(青霉素100 u/mL,链霉素100 u/mL), 置于37 °C, 5 %二氧化碳培养箱中培养, 隔日传代, 取处于对数生长期细胞实验。分为正常对照组(control)和槲皮素处理组(槲皮素按干预剂量分为: 0 μ mol/L, 10 μ mol/L, 30 μ mol/L, 50 μ mol/L分为四组, 按干预时间0 h, 6 h, 12 h, 24 h分为四组)。

1.2.2 RT-PCR 检测caspase-3的mRNA表达的变化 引物: caspase-3上游: 5'-GGTGTGATGATGACATGGCG-3'; 下游: 5'-GTACCCTCTGCAGCATGAGAGTAG-3', 扩增片段为 419 bp。 β -actin上游: 5'-TGGAGAAATCTGGCACCAC-3'; 下游: 5'-GAGGCGTACAGGGATAGCAC-3', 扩增片段为 190 bp。

按RT-PCR 试剂盒说明操作:反转录: 10 μ L体系, 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min。

PCR 反应条件: 首先94 °C 2 min 1次循环、接着94 °C 30 s, 50-60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35次循环(caspase-3退火温度60 °C, β -actin退火温度56 °C)。扩增产物用3%琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统分析电泳结果, 目的条带与同时扩增的 β -actin条带灰度比值进行比较。

1.2.3 Western blot法检测槲皮素作用A549后caspase-3蛋白表达的变化 RIPA裂解液冰浴中裂解细胞, 收集蛋白, BCA法蛋白定量, -80 °C保存。上样量30 μ g, SDS-PAGE电泳(5%积层胶、10%分离胶), PVDF膜4°C电转, 加鼠单抗caspase-3(1:300), 4 °C过夜, HRP标记的二抗(1:10000) 室温2 h, ECL显色, 暗室X 线胶片曝光。图像扫描后用Bio-Rad 图像分析系统对条带进行平均灰度值的测定。

2 结果

2.2 槲皮素对A549细胞caspase-3蛋白水平表达的影响 槲皮素刺激A549细胞, 在6 h、12 h、24 h模型组caspase-3 蛋白的表达水平明显升高, 与空白组对比具有显著的差异 ($P < 0.01$, 每次试验各重复3次), 并且随着时间延长表达渐增(图3)。分别用10, 30, 50 μ M的槲皮素刺激A549细胞12 h, 与空白组对比, 在10, 30, 50 μ M组caspase-3蛋白的表达随着浓度的增高而逐渐升

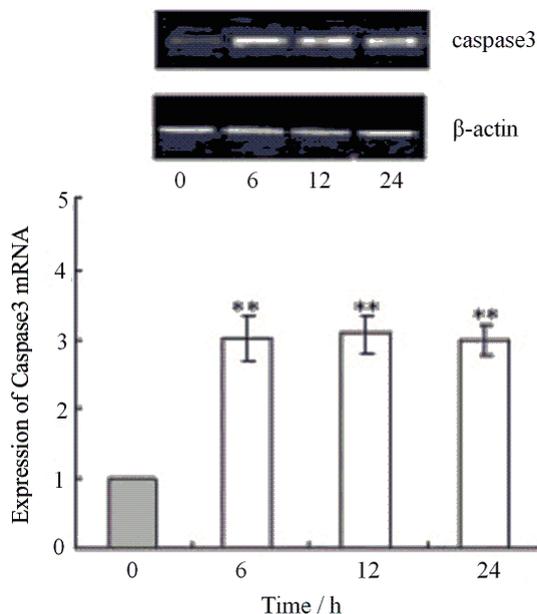


图 1 槲皮素在不同时间点对caspase3 mRNA的变化影响
Fig 1 Effects of caspase3 mRNA expression induced by quercetin in different time ** $P < 0.01$

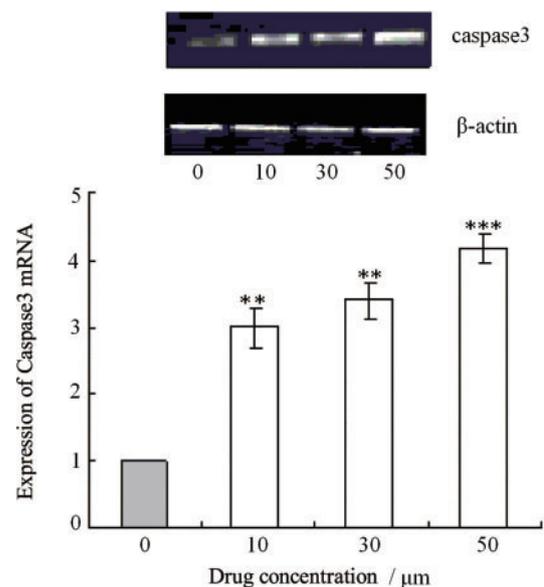


图 2 不同浓度的槲皮素对caspase3 mRNA的变化影响
Fig 2 Effects of various concentrations of quercetin on caspase3 mRNA expression ** $P < 0.01$

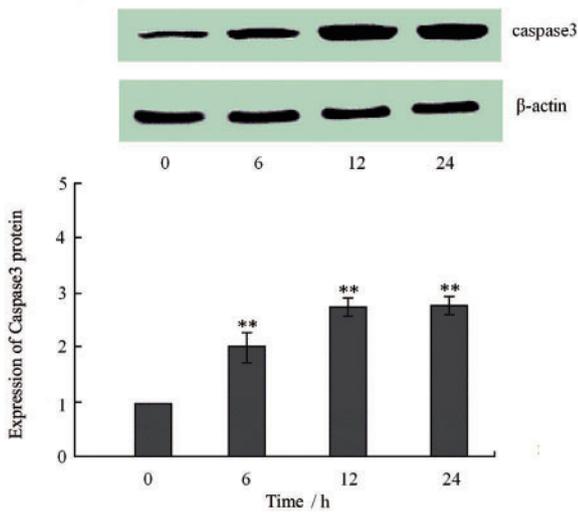


图 3 槲皮素在不同时间点对caspase3 蛋白质水平的变化影响
Fig 3 Effects of caspase3 protein expression induced by quercetin in different time ** $P<0.01$

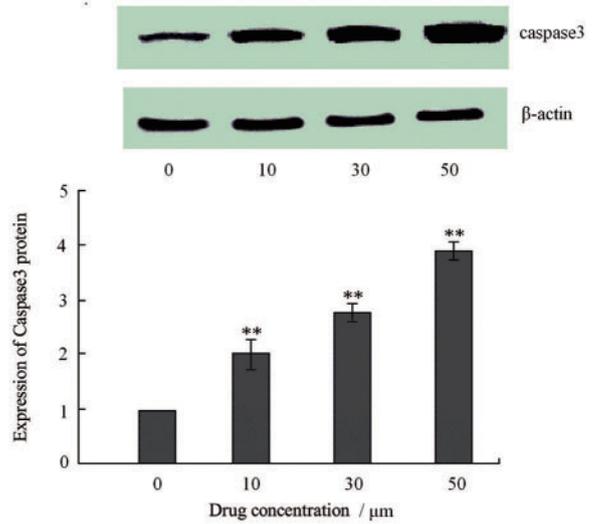


图 4 不同浓度的槲皮素对caspase3 蛋白质水平的变化影响
Fig 4 Effects of various concentrations of quercetin on caspase protein expression ** $P<0.01$

高,与空白组对比具有显著的差异($P<0.01$) (图4)。

3 讨论

肺癌,这个在20世纪初比较少见的疾病,随着人们生活的发展,其发病率和死亡率均在逐年增加。根据WHO的公布资料显示,肺癌在许多发达国家,已成为最常见的恶性肿瘤之一,列男性常见恶性肿瘤的第一位,肺癌已经成为恶性肿瘤死亡的最常见原因。因此,研究肺癌的防治有着重要的实际意义。近年来,天然黄酮类化合物的具有的生物活性愈来愈受人们的重视。槲皮素是其中的重要一种,广泛存在于各种植物中,有着多种生物活性,已有研究发现^[9],槲皮素具有去痰止咳平喘,抗炎,抗过敏,解痉,强心,降血压,降血脂,抗血小板聚集,抗心律失常、扩张冠脉,抗氧化,抗肿瘤等广泛的药理作用。此外还发现槲皮素能显著抑制人卵巢癌细胞、人乳腺癌细胞、人肝癌细胞、人结肠癌细胞、人前列腺癌细胞、人宫颈癌细胞、人白血病细胞、人淋巴瘤细胞、人黑色素瘤细胞^[10]等的生长,并且诱导细胞的凋亡,但槲皮素对肺腺癌A549细胞caspase-3 表达的影响,国内未见报道。

肿瘤的形成和发展是细胞增殖和凋亡失衡造成的。凋亡是细胞的自发性死亡,与多种因素有关。经典的细胞凋亡途径分为细胞外凋亡途径和细胞内途径。在细胞外途径中^[11],死亡信号依赖于死亡配体与受体的结合,然后与信号传导分子结合,与caspase-8相连接,形成死亡诱导信号复合物,进而激活caspase-8,

caspase-8直接作用caspase-3,使caspase-3激活,从而诱导凋亡。细胞内途径又称线粒体途径^[12]。当凋亡刺激因子引起细胞色素C从线粒体释放到胞浆时,与胞浆中的凋亡蛋白激活因子1羧基端的WD 重复序列结合,形成多聚复合物,多聚复合物结合胞质中的caspase-9前体,形成巨大复合物,导致caspase-9前体活化成为caspase-9,后者再活化下游的caspase-3,被活化的caspase-3 再发生级联反应,最终导致细胞凋亡。caspase-3处于细胞凋亡的下游,它的表达增高,提示细胞凋亡增加,表达下降,细胞凋亡受抑制。因而,许多研究将caspase-3作为衡量凋亡的重要指标。

本实验研究了槲皮素对A549细胞凋亡通路中凋亡相关因子caspase-3表达的影响,结果表明,槲皮素能够诱导caspase-3的mRNA和蛋白表达的升高,并且具有剂量和时间依赖性,提示槲皮素可以通过诱导caspase-3的表达而诱导A549细胞凋亡,槲皮素可以通过诱导细胞凋亡而达到抗肺癌的作用,当然其确切抗肺癌机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Yue Y, Liu JJ, Song CW, et al. Inhibitory effects of Quercetin on lipopolysaccharide-induced activation of neutrophil. Immunol J, 2005, 21(4): 296-299. [岳扬, 刘佳佳, 宋传旺, 等. 槲皮素对LPS 诱导中性粒细胞活性化效应的抑制作用. 免疫学杂志, 2005, 21(4): 296-299.]
- 2 Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, et al. Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by

- inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(9): 2591-2599.
- 3 Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int*, 2007, 31(10): 1245-1250.
 - 4 Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S, et al. Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 682-686.
 - 5 Suolinna EM, Lang DR, Racker E. Quercetin, an artificial regulator of the high aerobic glycolysis of tumor cells. *Natl Cancer Inst*, 1974, 53(5): 1515-1519.
 - 6 Avila MA, Velasco JA, Cansado J, et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*, 1994, 54(9): 2424-2428.
 - 7 Lu XH, Zhong XY. Caspases and apoptosis. *Jinan Univ(Med Ed)*, 2000, 21(6): 121-124. [卢晓晔, 钟雪云. Caspases 与细胞凋亡. 暨南大学学报(医学版), 2000, 21(6): 121-124.]
 - 8 Zhang XT, Song TB. Research of Caspase-3 and apoptosis. *Med Recapitul*, 2002, 8(11): 621-623. [张晓田, 宋天保. Caspase-3 与细胞凋亡的研究. 医学综述, 2002, 8(11): 621-623.]
 - 9 Wang YF, Wang XH, Zhu YT. Advancement of Reserches in quercetin. *Nat Product Res Devel*, 2003, 15(2): 171-173. [王艳芳, 王新华, 朱宇同. 槲皮素药理作用研究进展. 天然产物研究与开发, 2003, 15(2): 171-173.]
 - 10 Kong LQ, Wu K. Advancement of Reserches in effect of quercetin on resistances tumor. *SiChuan Med J*, 1999, 20(1): 52-54. [孔令泉, 吴凯. 槲皮素抗肿瘤作用的研究进展. 四川医学, 1999, 20(1): 52-54.]
 - 11 Wang Y, Sun LG, Xia CH. Caspase-mediated Fas apoptosis pathway. *World Chinese Journal of Digestology*, 2006, 14(36): 3439-3442. [王玉, 孙黎光, 夏春辉. Caspase介导的Fas凋亡途径. 世界华人消化杂志, 2006, 14(36): 3439-3442.]
 - 12 Jin LF, Chen TY. Proteinum Family of Bcl-2 gene and apoptosis. *Med Recapitul*, 2005, 11(5): 446-447. [金琳芳, 陈同钰. Bcl-2基因蛋白家族与细胞凋亡. 医学综述, 2005, 11(5): 446-447.]

(收稿: 2007-07-11 修回: 2008-01-24)
(本文编辑 李博)

· 启事 ·

部分肺癌临床科研机构网址

中国抗癌协会	美国肿瘤研究协会
Chinese Anti-cancer Association	American Association for Cancer Research
http://www.caca.org.cn/	http://www.aacr.org/
中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会	欧洲医学肿瘤学会
Chinese Society of Clinical Oncology	European Society for Medical Oncology
http://www.cSCO.org.cn/	http://www.esmo.org/
国际抗癌联盟	肺癌联盟
International Union Against Cancer	Lung Cancer Alliance
http://www.uicc.org/	http://www.alcase.org/
美国国立癌症研究院	欧洲癌症组织/大会
National Cancer Institute	European Cancer Organisation
http://www.cancer.gov/	http://www.ecco-org.eu/
美国癌症学会	肺癌在线
American Cancer Society	Lung Cancer Online
http://www.cancer.org/	http://www.lungcanceronline.org/
美国临床肿瘤学会	美国国家综合癌症网
American Society of Clinical Oncology	National Comprehensive Cancer Network
http://www.lungca.asco.org/	http://www.nccn.org/