

白藜芦醇对人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡及 bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

● 田景鸣

摘要 目的:研究白藜芦醇对卵巢癌细胞株 A2780 的凋亡诱导作用,并探讨其对凋亡相关基因 Bax 和 bcl-2 表达的影响。方法:50、100 及 200 $\mu\text{mol/L}$ RES 分别作用 12~72h 后,末端 TdT 酶标记技术检测细胞凋亡;免疫组化法检测凋亡控制蛋白的表达。结果:RES 能明显诱导卵巢癌细胞 A2780 凋亡,且呈时间与剂量依赖性;随着 RES 浓度的增加,Bax 基因的表达增加而 bcl-2 的表达减少。结论:可诱导卵巢癌细胞 A2780 发生凋亡,bcl-2 蛋白的减少与 bax 蛋白表达增多可能是 RES 诱导卵巢癌细胞 A2780 凋亡的机制之一。

关键词 白藜芦醇 卵巢癌 细胞凋亡 bcl-2 Bax

白藜芦醇(resveratrol, RES)是 1940 年从毛叶藜芦中分离出来的,是一种多酚类化合物,化学名为芪三酚(3,5,4'-2trihydroxystilbene)。它是许多植物受到真菌感染、紫外线照射或病理状况下产生的一种抗毒素,70 多种天然植物中含有白藜芦醇及其苷,包括藜芦、决明、虎杖、葡萄、桑子、花生、凤梨等。研究发现白藜芦醇不仅具有调节脂质代谢、抑制血小板聚集、保护心血管等多方面的作用,而且对乳腺癌、前列腺癌和白血病等一些肿瘤细胞系的生长具有显著抑制作用^[1-4]。近年来,国内外对白藜芦醇抗肿瘤的活性及具体机制进行大量深入研究,认为是目前可与紫杉醇媲美的最有希望的抗癌成份之一。但白藜芦醇对人卵巢癌细胞株 A2780 的作用还未见报道,本研究采用 TUNEL 染色法观察了其对人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡诱导作用,并对凋亡机制做了初步研究。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 人卵巢癌细胞 A 2780 由中国医学科学院肿瘤研究所提供;白藜芦醇,溶于二甲基亚砜(DMSO),购于 Sigma 公司,配制成 100mmol/L 溶液,分装, -20℃ 储存;MTT(四甲基偶氮唑盐),购自 Clontech 公司;TUNEL 试剂盒,购自武汉博士德公司;

bcl-2 及 Bax 抗体及 SP 检测试剂盒,购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞培养 人卵巢癌细胞 A2780 传代培养,在含有 10% 小牛血清、青霉素 100U/mL 及链霉素 100U/mL 的 RPMI 1640 培养基中,37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.3 TdT 介导的脱氧尿苷酸缺口末端标记法(TUNEL 法) 经 RES 作用的 A2780 细胞爬片,按 TUNEL 法说明书操作,经固定、封闭和透化后加入 50 μL TUNEL 反应液作用 60min,经洗涤,加转换液温育 30min,再经碱性磷酸酶显色,光学显微镜下观察,计数阳性率。凋亡细胞阳性率(%)=(每视野凋亡细胞数目/每视野肿瘤细胞总数)×100%。

1.4 白藜芦醇对人卵巢癌细胞 A2780 凋亡蛋白 bcl-2 及 Bax 表达的影响 经 RES 作用 72h 后的 A2780 细胞爬片,按照 SP 法操作步骤进行。以溶媒处理的 A2780 细胞爬片作为对照。在 400 倍显微镜镜下,取每张切片中相互不重叠的 10 个视野,计数其中阳性细胞总数。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 统计软件,所有实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间比较采用 F 方差分析,两样本间比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

• 作者单位 湖北省利川市民族医院(445400)

2 结果

2.1 RES 对人卵巢癌细胞 A2780 凋亡的影响 各浓度白藜芦醇作用 24h 后,光学显微镜下可见部分

A2780 细胞胞体收缩,核固缩,呈现特异性紫蓝色,即判断为凋亡细胞。不同浓度白藜芦醇与不同时间组之间均有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 RES 对人卵巢癌细胞 A2780 凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	12h/%	24h/%	48h/%	72h/%
空白	0.32 ± 0.13	0.38 ± 0.12	0.33 ± 0.08	0.37 ± 0.15
50μmol/L	3.45 ± 1.46 *	6.37 ± 2.66 *	21.57 ± 8.21 *	31.87 ± 11.96 *
100μmol/L	8.67 ± 2.54 *	13.72 ± 4.23 *	25.24 ± 9.56 *	37.29 ± 14.23 *
200μmol/L	13.57 ± 5.83 *	21.28 ± 7.28 *	34.11 ± 12.68 *	46.82 ± 18.25 *

注:与空白组比较: * $P<0.05$

2.2 白藜芦醇对人卵巢癌细胞 A2780 凋亡蛋白 bcl-2 及 Bax 表达的影响 空白组 bcl-2 表达阳性细胞数为 40.97 ± 10.42,RES 各组 bcl-2 阳性细胞数与空白组比较明显较少($P<0.05$),并且具有剂量依

赖性($P<0.05$)。空白组 Bax 表达阳性细胞数为 15.87 ± 4.26,RES 各组 bcl-2 阳性细胞数与空白组比较明显增多($P<0.05$),并且具有剂量依赖性($P<0.05$)。见表 2。

表 2 白藜芦醇对人卵巢癌细胞 A2780 凋亡蛋白 bcl-2 及 Bax 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	bcl-2 阳性细胞数	Bax 阳性细胞数
空白	-	40.97 ± 10.42	15.87 ± 4.26
RES	50μmol/L	33.74 ± 8.25 *	37.36 ± 10.73 *
RES	100μmol/L	21.95 ± 8.57 * *	45.65 ± 11.46 * *
RES	200μmol/L	12.64 ± 3.59 * *	52.84 ± 13.74 * *

注:与空白组比较: * $P<0.05$; * * $P<0.01$

3 讨论

白藜芦醇属于酚羟基萘类化合物,广泛地存在于种子植物中,具有多样的生物活性,如抗炎、抗氧化、抗血小板聚集及化学防癌作用。目前认为,白藜芦醇主要是通过抑制细胞色素酶、诱导解毒酶、抑制环氧酶、抑制蛋白激酶、拮抗雌激素受体、促进肿瘤细胞分化和凋亡等途径达到抗肿瘤的作用^[5]。已有研究证实,白藜芦醇作为化学预防剂在肿瘤的启动、促进及发展 3 个阶段都具有抗肿瘤功效^[6,7]:①通过抗氧化、抗突变、抑制自由基、诱导二相药代酶等作用发挥抗起始活性;②通过抗炎、抑制环氧酶和过氧化氢酶的活性而在癌的促进阶段起抑制作用;③通过诱导人早幼粒白血病细胞的分化,诱导癌细胞的凋亡而抑制癌的发展。

本研究通过 TUNEL 法凋亡实验结果证实了 RES 诱导人卵巢癌细胞株 A2780 细胞凋亡效应。白藜芦醇处理 12、24、48、72h 后,细胞凋亡数随着时间的延长而明显增加,进一步证实诱导细胞凋亡是白藜芦醇

杀伤人卵巢癌细胞 A2780 细胞的作用机制之一。因此,探讨白藜芦醇诱导人卵巢癌细胞株 A2780 细胞凋亡的分子机制具有重要意义。

细胞凋亡是细胞在其生长、发育过程中发生的一种复杂的生理和病理过程,对机体的正常发育和生长起着极其重要的作用。细胞凋亡受细胞内一系列基因的网络式精细调控,在细胞凋亡的调控因素中,bcl-2 家族基因倍受瞩目,其中 bcl-2 基因是原癌基因,其突出作用是抑制细胞凋亡,bcl-2 蛋白广泛存在于细胞的线粒体膜、细胞膜内表面、内质网、核膜等处。而 Bax 是 bcl-2 的同源基因,它的过表达可拮抗 bcl-2 的保护效应使细胞趋于凋亡^[8,9]。Bax 一方面能和 bcl-2 形成异源二聚体抑制凋亡,另一方面其自身还能形成同源二聚体诱导凋亡。有研究表明^[10],与 Bax 分离的 bcl-2 失去了抗凋亡能力,说明 bcl-2 与 Bax 的结合是 bcl-2 发挥作用的前提。而当 Bax 在细胞内超表达,并形成同源二聚体时,细胞对死亡信号的反应增强。所以 bcl-2 与 Bax 的比例,是决定细胞接受致病信号刺激后成活与否的关键因素。比

例增高细胞不易发生凋亡,而比例降低则导致细胞凋亡。本实验采用免疫组化法观察了白藜芦醇对人卵巢癌细胞株 A2780 细胞凋亡控制蛋白 bcl-2 与 Bax 的表达,结果表明 RESZ 作用于细胞后,bax 蛋白表达随着药物浓度的增加而增加,而 bcl-2 基因正好相反,其表达随着药物浓度的增加而减少,两者的比值(bax/bcl-2)与凋亡率呈现一定的正相关性,表明 RES 诱导 A2780 细胞凋亡与抑制 bcl-2 基因表达并且激活 bax 基因表达有关,其确切机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. Clin Cancer Res, 2001; 7(5):1466-1473.
- [2] Hsieh TC, Burfeind P, Laud K, et al. Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials [J]. Int J Oncol, 1999; 15(2):245-252.
- [3] Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, et al. Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorec-

tal tumor cells [J]. Int J Mol Med, 2002; 10(2):193-199.

[4] Park JW, Choi YJ, Jang MA, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells [J]. Cancer Lett, 2001; 163(1):43-49.

[5] 傅蓓蓓,杜冰,朱振勤,等.白藜芦醇抗肿瘤机制研究进展[J].国外医学肿瘤学分册,2003,30(5):357-360.

[6] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997; 275(10):218-220.

[7] 付招娣,曹玉,王凯凤,等.白藜芦醇对癌的化学预防作用[J].癌症,2004,23(8):869-873.

[8] Cory S, Adams JM. Killing cancer cells by flipping the bcl2/bax switch [J]. Cancer Cell, 2005, 8(1):5-6.

[9] Chan SL, Yu VC. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signaling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(3):119-128.

[10] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. Bcl-2, bcl-X1 sequester BH3 domain-only molecules preventing bax and bax-mediated mitochondrial apoptosis [J]. Mol Cell, 2001, 8(3):705-711.

欢迎订阅 2011 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中医药信息研究所主办的国家级专业性学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法等,以内容新颖、及时准确为特色,是中医药界朋友获取信息、把握机遇、寻求合作的桥梁与捷径。

本刊为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64058131 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn

欢迎订阅 2011 年《中医药管理杂志》

《中医药管理杂志》是国家中医药管理局主管、中华中医药学会主办关于中医药管理的学术性期刊。欢迎广大中医药医疗、教育、研究、企业等各界人士投稿和订阅。

本刊为月刊,每期 96 页,国内外公开发行,国内统一刊号:CN 11-3070/R,国际刊号:ISSN 1007-9203。

订阅方法:(1)邮局订阅:本刊国内邮发代号:80-585,国外发行代号:M7765,(2)直接向杂志社订阅。

本刊每月 28 日出刊,全年 240 元。

邮局汇款:北京市朝阳区樱花园东街甲 4 号,《中医药管理杂志》社(收),邮编:100029

银行汇款:开户行:北京工商银行北新桥支行,户名:《中医药管理杂志》社,账号:0200004309089112865。

电话:010-62005172 62005170 传真:62005168 网址: <http://zyyg.Chinajournal.net.cn> E-mail:zyyg@

chinajournal.net.cn。