

槲皮素诱导人结肠癌细胞 HT-29 凋亡的机制研究

蒋师^a, 张兴强^b (恩施土家族苗族自治州中心医院, a.消化内科; b.放射科, 湖北 恩施 445000)

摘要:目的 探讨槲皮素在体外对人结肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响,并对其进行诱导机制进行研究。方法 体外常规培养 HT-29 细胞,随机设定对照组和高、中、低剂量(32, 16, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)槲皮素组,药物干预 24 h 后,采用 CCK-8 试剂盒检测槲皮素对 HT-29 细胞增殖的影响,倒置显微镜观察细胞形态变化,蛋白免疫印迹法检测 MKK3/6/p38 信号通路蛋白表达,并同时检测凋亡相关蛋白 Caspase 8、Caspase 3、Bax 及 Bcl-2 的表达水平。结果 槲皮素干扰 HT-29 细胞 24 h 后, CCK-8 实验发现槲皮素可明显抑制细胞的增殖;形态学观察发现细胞密度明显减小、细胞体积变小;免疫印迹实验发现槲皮素可诱导 MKK3/6 及 p38 的磷酸化,进而促进促凋亡蛋白 Caspase8、Caspase3 及 Bax 的表达,抑制了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结论 槲皮素可诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡,其作用机制可能与激活 MKK3/6/p38 信号通路有关。

关键词: 槲皮素; 人结肠癌细胞; 凋亡; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)11-1535-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.007

引用本文: 蒋师, 张兴强. 槲皮素诱导人结肠癌细胞 HT-29 凋亡的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1535-1538.

Mechanism of Apoptosis Induced by Quercetin in Human Colon Cancer HT-29 Cells

JIANG Shi^a, ZHANG Xingqiang^b (Central Hospital of En-shi Autonomous Prefecture, a.Department of Gastroenterology; b.Department of Radiology, Enshi 445000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of quercetin on the apoptosis of human colon cancer HT-29 cells *in vitro* and study the induced mechanism. **METHODS** Human colon cancer HT-29 cells were cultured *in vitro* and divided into 4 groups, including control group, high-dose quercetin group (32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), medium-dose quercetin group (16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and low-dose quercetin group (8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). After quercetin intervention for 24 h, CCK-8 kit was used to observe the effect of quercetin on HT-29 cells proliferation; alterations of HT-29 cells morphology were determined using inverted microscope; Western blot technology was used to detect the expression levels of MKK3/6, p38, p-MKK3/6, p-p38, Caspase 8, Caspase 3, Bax and Bcl-2. **RESULTS** These findings showed that quercetin could significantly inhibit the proliferation of HT-29 cells *in vitro*; HT-29 cells density significantly decreased and cells size significantly lessened after quercetin intervention for 24 h; moreover, the phosphorylation levels of MKK3/6 and p38 were significantly raised induced by quercetin, and pro-apoptotic protein (Caspase8, Caspase3, Bax) significantly up-regulated while anti-apoptotic protein (Bcl-2) significantly inhibited by quercetin. **CONCLUSION** Quercetin can induce the apoptosis of human colon cancer HT-29 cells and the mechanism may relate to the activation of MKK3/6/p38 signal pathway.

KEY WORDS: quercetin; human colon cancer cells; apoptosis; signal pathway

结直肠癌是对人类危害巨大的恶性肿瘤,其发病率逐年升高,在全球恶性肿瘤发病率中居第3位,严重威胁着人类的生命健康。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于多种植物根茎中^[1]。研究发现槲皮素药理活性较广泛,在抗氧化和抗炎过程中表现出良好的效果^[2],对多种疾病的治疗效果较明显,可用于治疗神经退行性疾病^[3]、肿瘤^[4-5]、糖尿病^[6]及肥胖症^[7]等。研究表明槲皮素可通过诱导肿瘤细胞的凋亡来治疗癌症,其中严兴耘等^[8]研究发现槲皮素可诱导人结肠癌 HT-29 细胞的凋亡,并且对其机制探讨发现槲皮素可能

是通过上调促凋亡蛋白 Caspase3 和 Bax 及下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 来实现的,但对其作用的信号通路未见相关报道。因此,本实验采用 CCK-8 检测、形态学观察、免疫印迹等方法,观察槲皮素干预后 HT-29 细胞的增殖情况、形态改变及信号通路蛋白的激活,探讨槲皮素影响 HT-29 细胞凋亡及其可能的作用机制。

1 材料及仪器

1.1 细胞株

人结肠癌细胞株 HT-29 购自武汉巴菲尔生物技术有限公司(从美国 ATCC 细胞库引进)。

作者简介: 蒋师,女,主管护师 Tel: 15347127849
18971878798 E-mail: 303874626@qq.com

E-mail: wuhan8888xx@126.com

*通信作者: 张兴强,男,副主任医师 Tel:

1.2 试剂及仪器

槲皮素(浙江达诺药业有限公司, 批号: 117-39-5, 纯度 $\geq 99\%$); RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均购自武汉谷歌生物有限公司; CCK-8 试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司(批号: PBT-620); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海谷歌生物有限公司, 批号: P0012S-07); TBS 粉末(武汉谷歌生物有限公司); RIPA 裂解液(批号: C1534)、一抗稀释液(批号: C154855)购自上海吉诺公司; ECL 显色液(Sigma 公司); β -actin、MKK3/6、p-MKK3/6、p38、p-p38、Caspase8、Caspase3、Bax 和 Bcl-2 一抗均购自美国 Cell Signaling Technology; 二抗羊抗兔 IgG 购自美国 LI-COR Biosciences。

单人超净台、CB15C02 细胞培养箱(北京六一仪器厂); Victor3 1420 Multilable Counter 酶标仪(美国 BD, FACS AriaIII); HD-3000 凝胶成像仪(上海上天精密仪器有限公司)。

2 方法

2.1 槲皮素储备液制备

精密称取槲皮素 10 mg 于 1.5 mL 微量管中, 加入 40 μL DMSO 后涡旋促使充分溶解, 便得到 $2.5 \times 10^5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液, 置于 -20°C 冰箱储存。

2.2 HT-29 细胞培养

HT-29 细胞采用 RPMI1640 培养基, 成分包含 10%FBS、1%A-A($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素- $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素), 置于条件为温度 37°C 、5% CO_2 浓度、90%的饱和湿度恒温箱中培养。等到细胞贴壁生长到 80%左右, 便可消化传代培养。

2.3 CCK8 试剂检测 HT-29 细胞增殖

取对数生长期的细胞, 用 0.25%胰酶消化并收集。用 RPMI1640 完全培养液重悬细胞, 调整细胞密度为每孔 1×10^5 个接种于 96 孔板, 常规条件培养 24 h。待细胞贴壁生长至 80%左右时, 将细胞分为 4 组(即空白对照组、 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素组、 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素组、 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素组), 以上 4 组细胞均设 6 个复孔。继续培养 24 h 后, 吸弃各孔中液体, 加入 10 μL CCK8 试剂, 轻轻震荡均匀后培养箱中继续孵育 1 h, 取出置于酶标仪中, 于 450 nm 处测定吸光度(OD)值, 并按下列公式计算增殖抑制率。

抑制率(%)=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

2.4 细胞形态观察

HT-29 细胞用 32, 16, $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素组处理 24 h 后, 在倒置显微镜下观察细胞形态的变化并拍照。

2.5 Western Blot 检测蛋白表达水平

取对数生长期的细胞, 用 0.25%胰酶消化并收集。用 RPMI1640 完全培养液重悬细胞, 调整细胞密度为每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板, 常规条件培养 24 h。待细胞贴壁生长至 80%左右时, 用 32, 16, $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理细胞, 继续培养 24 h 后提取蛋白。BCA 试剂检测蛋白浓度, 再加入蛋白上样缓冲液, 于 100°C 加热煮沸 10 min。每孔加入 20 μg 蛋白上样, 在 12%的 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离, 分离胶电泳时电压设置为 120 V, 浓缩胶电泳分离时电压设置为 70 V; 分离完成后在 200 mV 电流转膜 60 min; 再将 NC 膜用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h; 一抗孵育过夜后, 再二抗常温下孵育 1 h, 洗膜 3 次, 显色成像。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对 HT-29 细胞增殖的影响

$8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 槲皮素对人结肠癌 HT-29 细胞有明显的抑制作用, 随着槲皮素浓度的增高, 对 HT-29 细胞的抑制率也升高, 呈剂量依赖性, 结果见图 1。

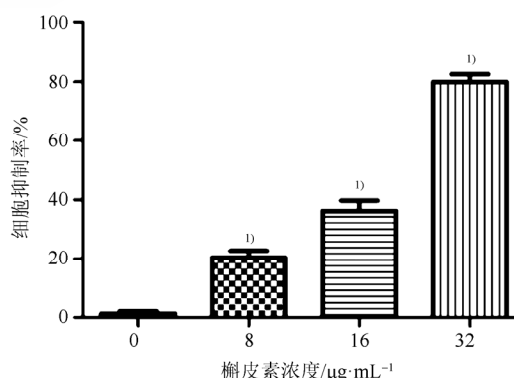


图 1 槲皮素对 HT-29 细胞增殖的抑制作用($n=6$)
与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 The inhibitory effect of quercetin on the proliferation of HT-29 cells ($n=6$)
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$.

3.2 槲皮素对 HT-29 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察 4 组细胞形态发现, 空白对照组 HT-29 细胞胞质均匀, 核仁清晰, 细胞饱

满, 状态良好, 呈梭形。随着槲皮素浓度增加, 可见细胞形态发生明显的变化, 并且细胞数量显著减少, 细胞逐渐变圆, 体积变小, 折光性减弱, 到高浓度药物处理组时细胞悬浮、脱落而死亡。实验结果表明, 槲皮素能够促进 HT-29 细胞的凋亡, 并随药物浓度的增加而增强, 呈现剂量依赖性, 结果见图 2。

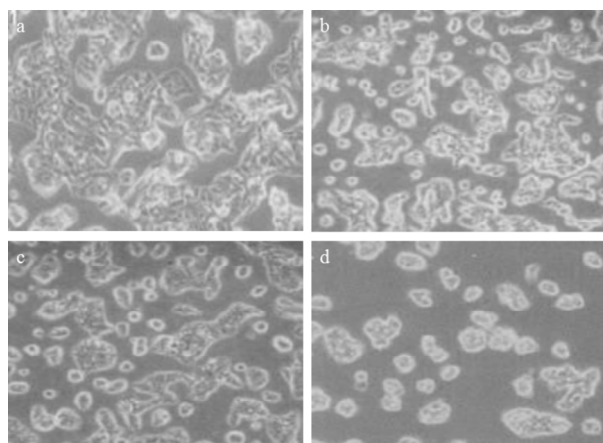


图 2 槲皮素对 HT-29 细胞形态的影响(100×)
a-空白对照组; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组。

Fig. 2 The influence of quercetin on the HT-29 cells morphology(100×)

a-control group; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group.

3.3 荧光显微镜检测 HT-29 细胞凋亡情况

荧光显微镜观察了槲皮素对 HT-29 细胞凋亡的影响, 结果见图 3。结果表明, 槲皮素可以明显促使 HT-29 细胞凋亡的发生, 并且随着药物浓度的升高, 细胞凋亡率也显著上升。

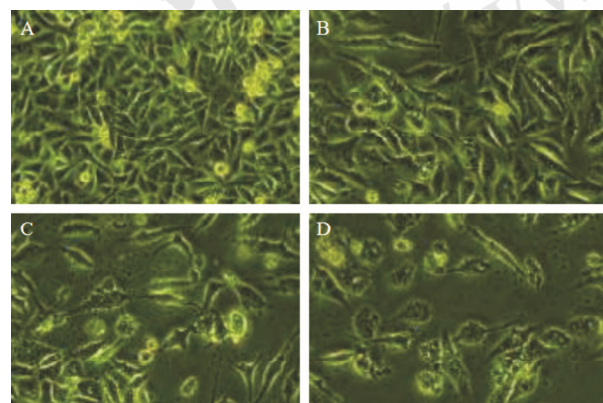


图 3 光学显微镜下观察 HT-29 细胞凋亡(100×)
A-空白对照组; B-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; C-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; D-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组。

Fig. 3 The changes of HT-29 cell morphological by light microscope detection (100×)

A-control group; B-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; C-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; D-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group.

3.4 槲皮素对 MKK3/6/p38 信号通路的影响

通过免疫印迹技术检测 MKK3/6/p38 信号通路蛋白发现, 槲皮素可以促进 p-MKK3/6 和 p-p38 蛋白的表达水平上调, 并随着药物浓度的增加 MKK3/6 和 p38 磷酸化水平随之增强, 与空白对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$), 结果见图 4。

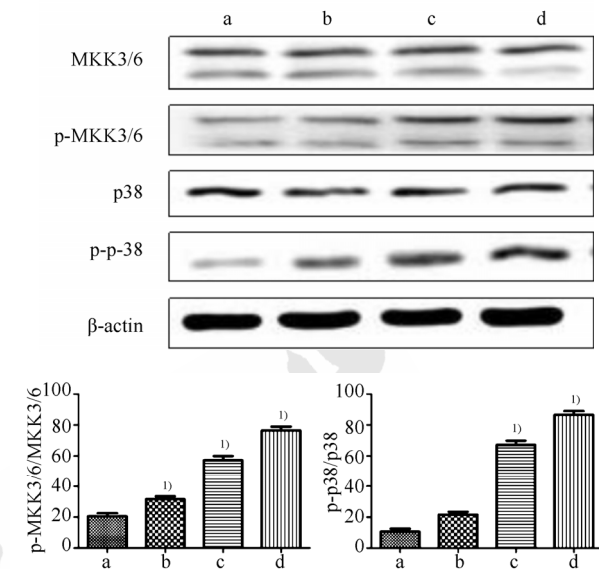


图 4 槲皮素对 MKK3/6 及 p38 磷酸化的影响

a-空白对照组; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 The effect of quercetin on the phosphorylation levels of MKK3/6 and p38

a-control group; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.5 槲皮素对凋亡蛋白表达的影响

免疫印迹技术对凋亡蛋白表达水平检测结果见图 5。槲皮素可以促进促凋亡蛋白 Caspase8、Caspase3 和 Bax 的表达上调, 并随药物浓度升高而显著增强; 而槲皮素则可以抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 并随药物浓度升高而显著降低, 表现出药物浓度依赖性。

4 讨论

肿瘤生长是由于细胞的增殖和凋亡失衡所引起的, 槲皮素可通过调节结肠癌细胞中与细胞生长、分化和凋亡相关基因和蛋白的表达, 从而调节肿瘤的发生与发展。Bcl-2 和 Bax 共同调节细胞的凋亡过程, 其中 Bax 是促凋亡基因, Bcl-2 为抗凋亡基因。Caspase3 是最早出现变化的一类蛋白水解酶, 是介导细胞凋亡的重要调节因子, 并且它表现出促凋亡的效应。研究发现 Bax/Bcl-2 比例失衡时, 便可促进 Caspase3 的表达, 起到促进肿

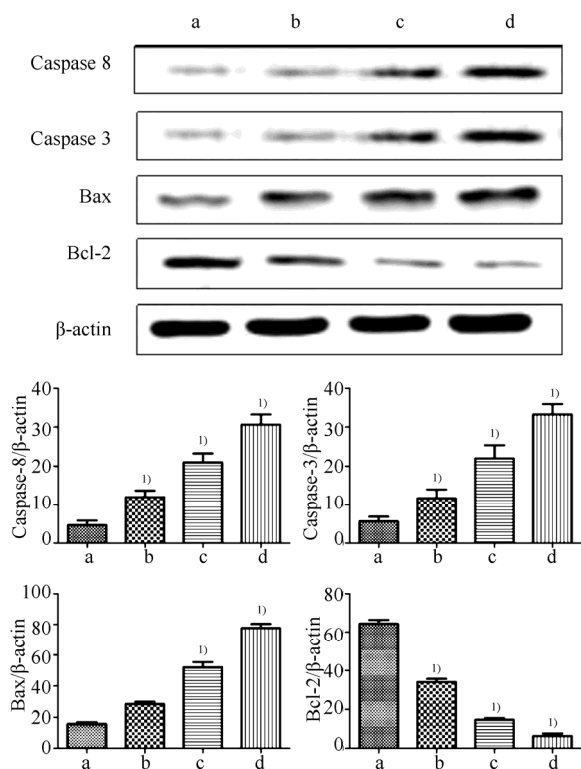


图5 槲皮素对凋亡蛋白表达的影响

a-空白对照组; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槲皮素处理组; 与空白对照组比较, $^{1)}P<0.01$ 。

Fig. 5 The effect of quercetin on the expression of apoptosis protein

a-control group; b-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; c-16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; d-32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quercetin group; compared with control group, $^{1)}P<0.01$.

瘤细胞发生凋亡的作用^[9]。本实验结果发现槲皮素可提高人结肠癌细胞中 Caspase3 的表达和 Bax/Bcl-2 比例, 从而诱导 HT-29 细胞的凋亡。与 Yang 等^[10-11]的研究结果一致: 槲皮素可以诱导 Bcl-2、Bcl-x 表达下调, 促进促凋亡蛋白 Caspase3 和 Bax 的表达上调, 进而增强肺癌细胞 NCI-H209 和前列腺癌细胞 PC-3 的凋亡。

p38MAPK 信号通路的活化可以激活一系列的生化反应, 包括细胞周期的调控、免疫反应、细胞骨架识别、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤发生等。p38MAPK 途径与其信号传导通路途径共同参与了细胞凋亡过程^[12]。而槲皮素是否通过 p38MAPK 信号通路的活化来激活结肠癌细胞凋亡过程, 并未见相关报道。因此, 本实验检测了 MKK3/6/p38 信号通路相关蛋白的表达变化, 探讨了槲皮素影响凋亡蛋白表达变化的作用机制。结果发现槲皮素可以明显促进 MKK3/6 和 p38 蛋白

的磷酸化, 激活 p38MAPK 途径促进结肠癌细胞凋亡的发生。然而, 槲皮素作用 MKK3/6/p38 通路的上游蛋白并未可知, 笔者将进一步研究槲皮素可能直接作用的靶标蛋白。总之, 槲皮素可以通过 MKK3/6/p38 通路诱导促凋亡蛋白表达、抑制抗凋亡蛋白表达, 进一步诱导人结肠癌细胞的凋亡。

REFERENCES

- [1] ADEDARA I A, SUBAIR T I, EGO V C. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 263(12): 88-98.
- [2] ROSLAN J, GIRIBABU N, KARIM K. Quercetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86(21): 570-582.
- [3] SUGANTTY N, DEVI K P, NABAVI S F. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: focusing on the mechanisms of actions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84(12): 892-908.
- [4] LUO C L, LIU Y Q, WANG P. The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via JAK2 suppression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82(4): 595-605.
- [5] KE C H, ZHU X S, ZHU J, et al. Research progress on mechanism of action of quercetin in breast cancer prevention [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2016, 36(16): 1420-1422.
- [6] MOSAWY S, JACKSON D E, WOODMAN O L. The flavonols quercetin and 3', 4'-dihydroxyflavonol reduce platelet function and delay thrombus formation in a model of type 1 diabetes [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2014, 11(3): 174-181.
- [7] NABAVI S F, RUSSO G L, DAGLIA M. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat [J]. *Food Chem*, 2015, 179(16): 305-310.
- [8] YAN X Y, PENG J H, ZHANG H X, et al. Effects of quercetin on proliferation and cell cycle of colon carcinoma cell line HT-29 [J]. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2006, 14(11): 1071-1076.
- [9] YIN L H, YU H, PENG J Y. Molecular mechanism and intervention of Chinese medicine of carbon tetrachloride induced liver injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2015, 32(9): 1147-1155.
- [10] YANG J H, HSIA T C, KUO H M. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(2): 296-304.
- [11] YANG F, JIANG X, SONG L. Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1602-1610.
- [12] ARNOLD C P, MERRYMAN M S, HARRIS-ARNOLD A. Pathogenic shifts in endogenous microbiota impede tissue regeneration via distinct activation of TAK1/MKK/p38 [J]. *Elife*, 2016, 21(5): 793-798.

收稿日期: 2017-06-03

(本文责编: 曹粤锋)