

白藜芦醇对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad, p-Bad, Caspase-3 的影响

景晓平, 程伟伟, 何丽*

(上海市儿童医院, 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040)

[摘要] **目的:**探讨白藜芦醇(resveratrol, Res)对人胃癌细胞 MGC803 细胞凋亡因子及其磷酸化的影响,研究白藜芦醇抗胃癌的作用机制。**方法:**采用 0, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res 处理 MGC803 细胞后,采用台盼蓝法测定 MGC803 细胞生长抑制率;流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率;免疫组化法检测促凋亡蛋白(Bad),含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)蛋白表达;蛋白质印迹法(Western blot)检测 Bad,磷酸化 Bcl-x1/Bcl-2 相关死亡启动子(p-Bad),Caspase-3 蛋白的表达。**结果:**随着浓度增加 Res 抑制胃癌 MGC803 细胞生长作用明显增强($P < 0.01$);Res(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能明显下调 MGC803 细胞中 Bad, p-Bad 蛋白表达,同时可上调 Caspase-3 蛋白表达。**结论:**Res 可以诱导 MGC803 细胞凋亡,其凋亡与浓度、时间有一定的依赖性;Res 诱导 MGC803 细胞凋亡可能与其下调 Bad, p-Bad 蛋白和上调 Caspase-3 蛋白表达有关。

[关键词] 白藜芦醇; MGC803 细胞; 凋亡; 促凋亡蛋白; 磷酸化促凋亡蛋白; 含半胱氨酸的积氨酸蛋白水解酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0147-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050147

Effect of Resveratrol on Expression of Bad, p-Bad and Caspase-3 Protein in MGC803 Cells

JING Xiao-ping, CHENG Wei-wei, HE Li*

(Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of resveratrol (Res) on MGC803 cells apoptosis and study its mechanism of inhibiting gastric cancer. **Method:** After MGC803 cells were treated with 0, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res, inhibition rate of MGC803 cells growth was detected by trypan blue assay. Apoptosis rate was detected by flow cytometry (FCM). Expressions of Bad and Caspase-3 protein in MGC803 cells were measured by immunohistochemistry method. Expressions of Bad, p-Bad, Caspase-3 protein were detected by Western blot. **Result:** Res inhibited the growth of MGC803 cells in time-and concentration-dependent manner ($P < 0.01$). Res (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) can significantly down-regulate the protein expressions of Bad, p-Bad and up-regulate the protein expression of Caspase-3 in MGC803 cells. **Conclusion:** Res can induce apoptosis of MGC803 cells in time-and concentration-dependent manner, and the mechanism may be associated with down-regulating protein expressions of Bad, p-Bad and up-regulating protein expressions of Caspase-3.

[Key words] resveratrol; MGC803 cells; apoptosis; Bad protein; p-Bad protein; Caspase-3 protein

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一。我国胃癌死亡率
率占恶性肿瘤死亡率的 23.2%,为欧美国家的

4.2~8.0倍,患者就诊时大多已经发生侵袭转移,因
而手术、化疗、放疗疗效差,5年生存率低^[1]。传统

[收稿日期] 20150913(007)

[基金项目] 上海市自然科学基金项目(13ZR1434300)

[第一作者] 景晓平,博士,主治医师,从事中医药治疗小儿呼吸系统及消化系统疾病研究, Tel:021-62474880, E-mail: xiaopingjdoctor@126.com

[通讯作者] *何丽,博士,副主任医师,从事中医药治疗呼吸系统疾病研究, Tel:021-62475130, E-mail: heli29@126.com

中医药在治疗胃癌中具有低毒,减毒增效,提高生存率的重要作用。白藜芦醇为传统中医药虎杖、藜芦、山葡萄皮等天然植物中提取出来的多酚化合物^[2-3],近年研究显示白藜芦醇对大肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、白血病、皮肤癌等多种肿瘤细胞的生长均具有显著的抑制作用^[4]。但对白藜芦醇抑制肿瘤细胞生长机制的观点不尽相同。有研究表明促凋亡蛋白(Bad)及其含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)与肿瘤细胞凋亡密切相关^[5-6]。本实验通过多种方法探讨白藜芦醇(Res)影响人胃癌细胞 MGC803 凋亡及其机制,为其应用于胃癌的临床治疗提供一些新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 MGC803 购于中国科学院上海细胞研究所。Res(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 R5010,纯度 $\geq 99\%$)用二甲基亚砜(DMSO)溶解并配制成 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存;RPMI 1640 培养液(美国 Life Technologies,批号 11875168)。噻唑蓝(MTT,美国 Promega 生物有限公司,批号 G4100),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 HB0205);兔抗人 Bad,磷酸化 Bad(p-Bad),Caspase-3, β -actin 单克隆抗体,二抗 HRP 均购自美国 CST 生物有限公司,批号分别为 9239,5284,9665S,7075,4970S。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及台盼蓝染色 将人胃癌 MGC803 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养,收集对数生长期细胞。除去细胞培养基后,将 MGC803 细胞用磷酸缓冲液(PBS)漂洗 2 次,加入新鲜培养液;空白组不处理,Res 组均加入终浓度 50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h。孵育结束后细胞用台盼蓝染色并计数,测定细胞活力。

1.2.2 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率 细胞培养同 1.2.1,收集 Res(50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组和空白(等体积培养液)组细胞,70% 预冷乙醇溶液固定过夜, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 30 min 后,用 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)蛋白染色细胞后,进行 FCM 分析,并使用软件进行数据分析。

1.2.3 免疫组化检测 Bad,Caspase-3 蛋白表达 细胞培养方法同 1.2.1,细胞培养 24 h 后,采用免疫组化对细胞进行处理,二氨基联苯胺(DAB)显色。细胞质中棕黄色至棕褐色颗粒为蛋白阳性表达。

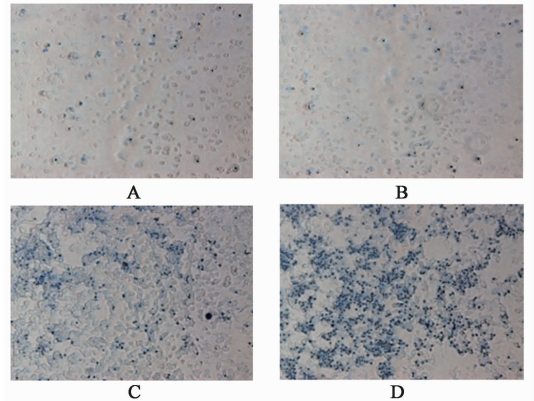
1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测 Bad,

p-Bad,Caspase-3 蛋白表达 收集细胞裂解产物, $4\text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000\times g$ 离心 15 min,提取上清即为总蛋白。经电泳,转印,封闭,加入抗 Bad(1:1 000),p-Bad(1:300),Caspase-3(1:500)和抗 β -actin(1:500), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;二抗室温孵育 2 h。化学发光反应室温孵育 1 h 后扫描,进行图像分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件包分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,细胞凋亡率比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 Res 对 MGC803 细胞活力的影响 与空白组比较,随着 Res 浓度(50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的增高,药物对细胞的杀伤作用增强,死亡细胞增多,蓝染程度逐渐加深。见图 1。



A. 空白组;B~D. Res(50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组(图 3 同)

图 1 Res 对 MGC803 细胞活力的影响(台盼蓝, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Res on MGC803 cells viability (Trypan blue, $\times 100$)

2.2 Res 诱导 MGC803 细胞凋亡 MGC803 细胞空白组 24 h 可发生少量凋亡;Res(50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组凋亡率明显高于空白组($P<0.01$)。见图 2。

2.3 Res 对 MGC803 细胞中 Bad 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较,Res(50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后,MGC803 细胞 Bad,Caspase-3 蛋白表达明显降低($P<0.01$),Caspase-3 蛋白表达明显升高($P<0.01$)。见图 3。

2.4 Res 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad,p-Bad,Caspase-3 蛋白表达的影响 随着 Res(50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度的增高,Bad,p-Bad 蛋白表达显著下调($P<0.05$, $P<0.01$),Caspase-3 蛋白表达显著上调($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 4。

与空白组比较,随着 Res(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用时间延长,Bad,p-Bad 蛋白表达显著下调($P<0.05$, $P<0.01$),Caspase-3 蛋白表达显著上调($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 5。

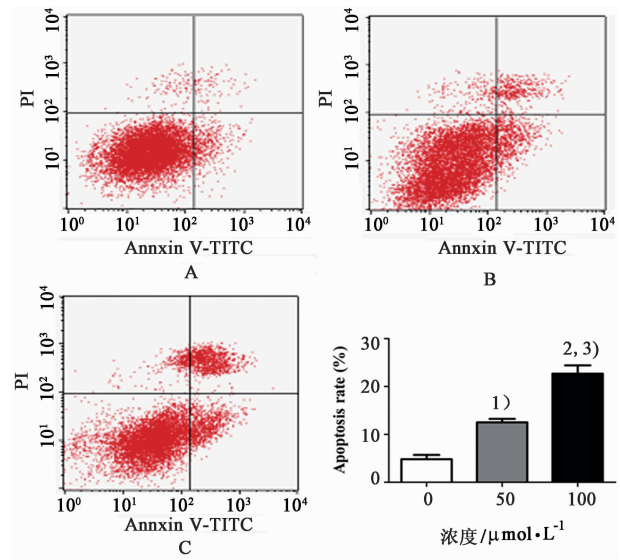


图 2 Res 对 MGC803 细胞凋亡的影响 (FCM)
A. 空白组; B ~ C. Res (50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Res (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较³⁾ $P < 0.05$

图 2 Res 对 MGC803 细胞凋亡的影响 (FCM)

Fig. 2 Apoptosis of Res on MGC803 cells (FCM)

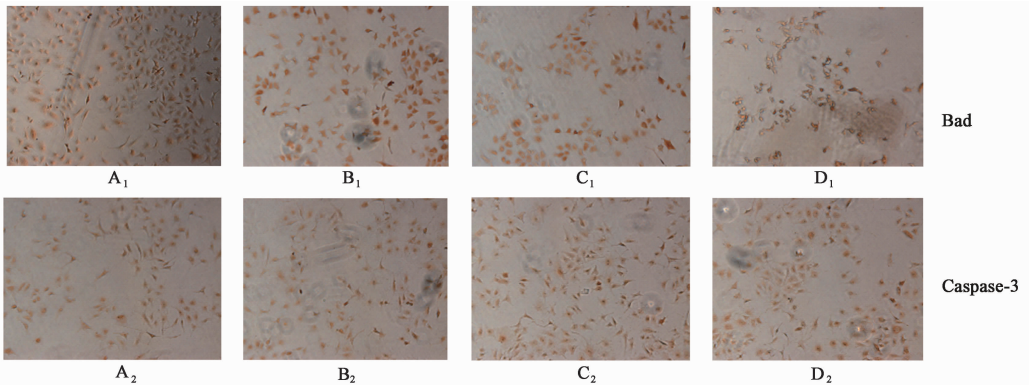


图 3 Res 对 MGC803 细胞 Bad 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of Res on Bad and Caspase-3 protein expressions in MGC803 cells (IHC, $\times 100$)

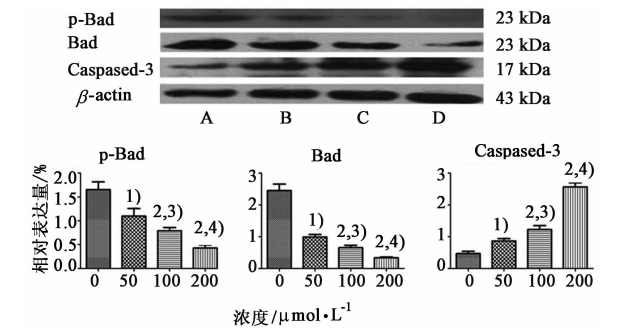


图 4 Res 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad, p-Bad, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A. 空白组; B ~ D. Res (50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Res (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

图 4 Res 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad, p-Bad, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Res on Bad, p-Bad and Caspase-3 protein expressions in MGC803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

细胞凋亡受阻现象存在于多种肿瘤中,包括凋亡相关基因突变,细胞凋亡信号通路受阻,细胞死亡性丢失减少而异常增殖增加,进而发生失控性增生^[7]。因此诱导肿瘤细胞凋亡是其治疗新的靶点之一^[8]。从传统中医药中寻找能够诱导细胞凋亡作用的药物或其提取的化合物及单体,是目前国内外肿瘤治疗药物研发的热点^[4]。Jayatilake 等^[9]报道了白藜芦醇的抗肿瘤作用后,迄今已发现 Res 能够通过多种途径抑制肿瘤细胞的发生和发展。Bad 属 Bcl-2 家族成员,其活性形式即未磷酸化 Bad 与其家族成员结合形成同源二聚体,使线粒体通透性提高,细胞色素 C 释放, Caspases 连锁反应激活,细胞发生凋亡^[5]。p-Bad 与分子伴侣蛋白 14-3-3 结合并在细胞质内发挥作用,从而使 Bad 与 Bcl-2 家族成员的关系发生变化,抑制细胞凋亡, Bad 的磷酸化后可以作为 Bad 功能转化开关, Bad 在线粒体

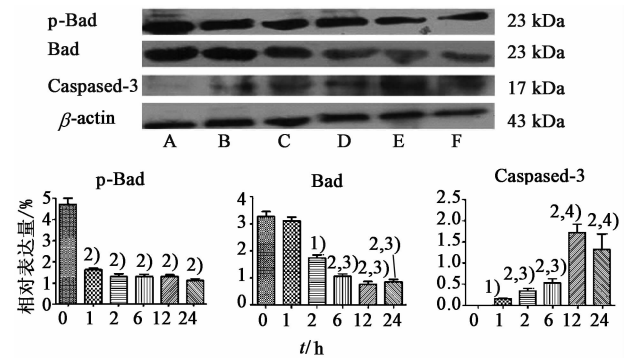


图 5 各时间点 Res (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad, p-Bad, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A. 空白组; B ~ F. Res 作用 1, 2, 6, 12, 24 h。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Res 作用 1 h 比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

图 5 各时间点 Res (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad, p-Bad, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Res on Bad, p-Bad and Caspase-3 protein expressions in each time point in MGC803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

凋亡途径之间的中心地位使其可能成为生物学治疗的靶点^[10]。Caspase 在细胞凋亡中起到非常重要的作用,Caspase-3 是 Caspase 家族成员之一,激活 Caspase-3 可以引起下游的凋亡级联反应,继而促使细胞发生不可逆的凋亡,因此,Caspase-3 也被称为“死亡蛋白酶”,如存在细胞凋亡信号,在多种蛋白水解酶的作用下可以裂解细胞质中 Caspase-3 酶原,而使其激活^[11-13]。Caspase-3 为凋亡关键酶,它的活化预示细胞凋亡执行阶段^[14]。既往研究 Bad,p-Bad 与 Caspase-3 与胃癌的发生关系密切^[6,15]。

台盼蓝是一种水溶性染料,无法进入活细胞,当细胞死亡时,细胞膜通透性增加,才可以进入细胞内,使细胞呈现为蓝色。研究发现随着 Res 浓度增高,蓝染细胞增多,药物对细胞的杀伤作用增强,死亡细胞增多,说明 Res 对 MGC803 细胞有较强的抑制作用。FCM 检测 MGC803 细胞凋亡率,随着 Res 浓度增高,MGC803 细胞凋亡率显著增高,需要说明的是当 Res 浓度达到 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MGC803 细胞凋亡过高而无法检测凋亡率。Bad 磷酸化在肿瘤细胞内高表达,从而促进肿瘤细胞生长增殖,抑制肿瘤细胞的凋亡^[16]。本实验结果表明,随着 Res 浓度增高,Bad,p-Bad 蛋白表达显著下调,说明 Res 可以降低 Bad,p-Bad 蛋白表达,从而促进 MGC803 细胞凋亡,抑制胃癌细胞生长。研究发现 Caspase-3 在慢性萎缩性胃炎伴肠化及胃癌组织中呈低表达,提示其表达降低与胃癌的发生有关^[17]。本实验发现随着 Res 浓度增高,Caspase-3 蛋白表达显著上调,从而促进 MGC803 细胞凋亡,也证明随着 Res 浓度增高,Caspase-3 蛋白表达显著上调。同时研究发现随着 Res 作用时间延长,Bad,p-Bad 蛋白表达显著下调,Caspase-3 蛋白表达显著上调。Res 对 MGC803 细胞细胞活力,凋亡率,Bad,p-Bad,Caspase-3 蛋白表达的影响均呈剂量与时间依赖关系。

总之,Res 可在体外抑制 MGC803 细胞增长并诱导其凋亡,起到抗肿瘤作用。Res 对 MGC803 细胞凋亡因子 Bad,p-Bad 有显著的下调作用,同时可以上调 Caspase-3 蛋白的表达,这为系统研究 Res 的抗胃癌作用机制奠定了基础。

【参考文献】

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5) : E359-E386.
[2] Raederstorff D, Kunz I, Schwager J. Resveratrol, from experimental data to nutritional evidence: the emergence

of a new food ingredient [J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1290(8) : 136-141.
[3] Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol [J]. Bioi Pharm Bull, 2012, 35(3) : 273-279.
[4] Ji Q, Liu X, Fu X, et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated wnt/b-catenin signal pathway [J]. PloS One, 2013, 8(11) : e78700.
[5] 王玉萍, 曾宪旭, 邵斌, 等. BAD、P-BAD 及 P-AKT 蛋白在乳腺癌癌变过程中的表达及意义 [J]. 山东医药, 2007, 47(5) : 63-65.
[6] 谢琼, 卢月月, 易宏锋. Caspase-3 和 P53 在胃癌中的表达及临床意义 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2014, 23(11) : 1287-1289.
[7] Burz C, Befindan Neagoe I, Balacescu O, et al. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets [J]. Acta Oncol, 2009, 48(6) : 811-821.
[8] Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7) : 501-507.
[9] Jayatilake G S, Jayasuriya H, Lee E S, et al. Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum* [J]. J Nat Prod, 1993, 56(10) : 1805-1810.
[10] 关剑, 李柏林, 宋敏, 等. 乳腺浸润性导管癌组织学分级与 BAD, P-BAD 及 P-ERK 蛋白的表达 [J]. 肿瘤, 2006, 26(3) : 267-270.
[11] Visconti R, D'Adamo L. Functional cloning of genes regulating apoptosis in neuronal cells [J]. Methods Mol Biol, 2007, 399 : 125-131.
[12] Kuribayashi K, Mayes P A, Ei-Deiry W S. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7) : 763-765.
[13] Lockshin R A. Programmed cell death: history and future of a concept [J]. J Soc Biol, 2005, 199(3) : 169-173.
[14] 艾春雨, 江晓菁, 马虹, 等. Akt 抑制剂 LY294002 对兔缺血再灌注损伤脊髓 Caspase-3 表达的影响 [J]. 广东医学, 2015, 36(9) : 1338-1340.
[15] 董伟, 魏志, 孙自勤, 等. 凋亡蛋白 Bad 与 Noxa 在胃癌中表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 26(7) : 636-640.
[16] Ou Yang F, Wang G, Guo W, et al. AKT signalling and mitochondrial pathways are involved in mushroom polysaccharide-induced apoptosis and G1 or S phase arrest in human hepatoma cells [J]. Food Chem, 2013, 138(4) : 2130-2139.
[17] 杨彬, 赵瑛, 王丽华, 等. Livin、Caspase-3 蛋白在不同胃病组织中的表达及其临床意义 [J]. 肿瘤药学, 2015, 5(1) : 27-32.

【责任编辑 张丰丰】