

芹菜素对大鼠骨肉瘤细胞凋亡及相关蛋白 Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, 细胞色素 C 的影响

程新燕*, 符翠莉

(广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**探讨芹菜素对大鼠骨肉瘤细胞凋亡及相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), Caspase-9 及细胞色素 C 的影响。**方法:**SD 大鼠 50 只, 建立大鼠骨肉瘤模型, 随机分为模型组, 顺氯铂组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 芹菜素低、中、高剂量组 ($1, 2, 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, *ig* 给药, 连续给药 30 d。模型组 *ig* 给等体积的生理盐水。末次给药 24 h 后, 切取骨肉瘤组织, 称质量。TUNEL 法原位标记凋亡的骨肉瘤细胞; 免疫组化法检测骨肉瘤组织中 Bax, Bcl-2 的蛋白表达; 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测骨肉瘤组织中 Caspase-3, Caspase-9, 细胞色素 C 的蛋白含量。**结果:**与模型组比较, 芹菜素低、中、高剂量组的骨肉瘤的质量降低, 细胞凋亡数量明显增加, 明显上调 Bax, Caspase-3, Caspase-9, 细胞色素 C 蛋白的表达, 下调 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。**结论:**芹菜素可通过上调 Bax, Caspase-3, Caspase-9, 细胞色素 C 的蛋白表达, 下调 Bcl-2 的蛋白表达, 抑制骨肉瘤细胞的增殖, 诱导骨肉瘤细胞凋亡, 从而对骨肉瘤产生治疗和抑制作用。

[关键词] 芹菜素; 骨肉瘤; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0139-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150139

Effect of Apigenin on Rat Osteosarcoma Spoptosis and Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, and Cyt-C proteins

CHENG Xin-yan*, FU Cui-li

(The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of apigenin in treatment of rats osteosarcoma apoptosis and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-3, Caspase-9 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein expressions. **Method:** Totally 50 rats were randomly divided into model group, cisplatin group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), apigenin groups ($1, 2, 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. The rat osteosarcoma model was made by operation. All groups were given drups for 30 days. Osteosarcoma was collected and weighed 24 h later after the last administration. TUNEL assay was adopted for in situ labeling of apoptosis of osteosarcoma cells. Immunohistochemistry was used to detect expressions of Bax, Bcl-2 in osteosarcoma. Caspase-3, Caspase-9 and cytochrome C (Cyt-C) expressions in osteosarcoma were tested using Western blot assay. **Result:** Compared with model group, apigenin-treated groups showed decrease in osteosarcoma weight, significant increase in the number of apoptotic cells, obvious up-regulation in Bax, Caspase-3, Caspase-9 and Cyt-C protein, and down-regulation in the expression of Bcl-2. **Conclusion:** Apigenin can increase Bax, Caspase-3, Caspase-9, the expression of Cyt-C, down-regulate the expression of Bcl-2, inhibit the proliferation of osteosarcoma cells, and induce apoptosis in osteosarcoma cells, so as to show a therapeutic and inhibitive effect on osteosarcoma.

[Key words] apigenin; osteosarcoma; apoptosis; B-cell lymphoma 2; Bcl-2 associated X protein; Caspases

[收稿日期] 20150707(014)

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(LX2014085)

[通讯作者] *程新燕, 硕士, 主管药师, 从事抗肿瘤药物研究工作, Tel: 13977184535, E-mail: chengxinyan2014@163.com

骨肉瘤是一种原发性的恶性骨肿瘤,多发病于青少年。美国癌症协会与 NIH 的研究报告显示,骨肉瘤病例在 0~24 岁的年龄段占全部恶性骨肿瘤病例中的 55%^[1]。骨肉瘤多发生在四肢长骨的干骺端,发病后死亡率很高,在发生转移的患者中 5 年生存率不足 30%^[2]。目前对骨肉瘤治疗的方式为化疗和外科手术,但治疗效果均不是很理想,所以研究对骨肉瘤有高特异性、低毒副作用的药物是国内外学者研究的热点之一。芹菜素是一种无基因毒性作用的饮食黄酮化合物,广泛分布于水果和蔬菜中。大量研究证明,芹菜素具有抑制乳腺癌、宫颈癌、肺癌、胃癌等癌细胞的增殖、诱导癌细胞凋亡的作用^[3-4]。本实验研究芹菜素对大鼠骨肉瘤细胞凋亡及相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), Caspase-9, 细胞色素 C (Cyt-C) 的影响,为其更深入研究提供科学基础数据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(桂)2011-0005。

1.2 仪器及试剂 芹菜素(陕西慧科植物开发有限公司, 批号 AP20150305), 大鼠骨肉瘤细胞系 UMR106(中科院上海生化与细胞学研究室上海细胞库); 兔抗鼠 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊 IgG 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体(武汉博士德公司)。

1.3 仪器 170-3940 型半干电转仪(美国 Bio-Rad 公司), 6000i 型低温高速离心机(德国 Heraeus 公司), GQ75 型常温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司), DW-40L92 型 -40 °C 低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠骨肉瘤模型建立^[5] 用 10% 胎牛血清 1640 培养液稀释大鼠骨肉瘤细胞系 UMR106 密度至 1 × 10⁶ 个/mL 于 25 mL 培养瓶内, 经过 0.2% 胰蛋白酶消化, 传代繁殖后, 用 1640 培养液将对数生长的大鼠骨肉瘤细胞系 UMR106 稀释为 5 × 10⁶ 个/mL。ip 3% 戊巴比妥钠 (30 mg · kg⁻¹) 麻醉大鼠后, 在大鼠的后肢股骨远端的骨髓腔中注射 0.2 mL 大鼠骨肉瘤细胞系 UMR106。

2.2 给药及给药方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 模型组, 顺氯氨铂组 (10 mg ·

kg⁻¹), 芹菜素低、中、高剂量组 (1, 2, 4 mg · kg⁻¹), ig 给药, 连续 30 d。

2.3 指标观察 末次给药 24 h 后分别处死各组大鼠, 切取大鼠骨肉瘤组织, 称定质量。TUNEL 法原位标记凋亡的骨肉瘤细胞; 免疫组化法检测骨肉瘤组织中 Bax, Bcl-2 的蛋白表达; 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测骨肉瘤组织中 Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 的蛋白含量。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学数据分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠骨肉瘤质量的影响 与模型组比较, 顺氯氨铂组、芹菜素给药组骨肉瘤的质量有所下降 ($P < 0.05$), 其中顺氯氨铂与芹菜素 4 mg · kg⁻¹ 组骨肉瘤的质量下降最多。见表 1。

表 1 芹菜素对大鼠骨肉瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	肉瘤质量/g
模型	-	1.29 ± 0.26
顺氯氨铂	10	0.57 ± 0.15 ¹⁾
芹菜素	1	0.96 ± 0.18 ^{1,2)}
	2	0.74 ± 0.21 ^{1,2)}
	4	0.62 ± 0.25 ^{1,2)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与顺氯氨铂组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 对大鼠骨肉瘤组织中细胞凋亡表达的影响 与模型组比较, 顺氯氨铂组、芹菜素给药治疗组骨肉瘤细胞凋亡数量明显增多, 差异有明显的统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 1。

表 2 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中细胞凋亡的表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	阳性率/%
模型	-	12.8 ± 2.8
顺氯氨铂	10	82.9 ± 13.5 ¹⁾
芹菜素	1	23.4 ± 7.6 ²⁾
	2	53.6 ± 19.1 ^{1,2)}
	4	68.7 ± 23.7 ^{1,2)}

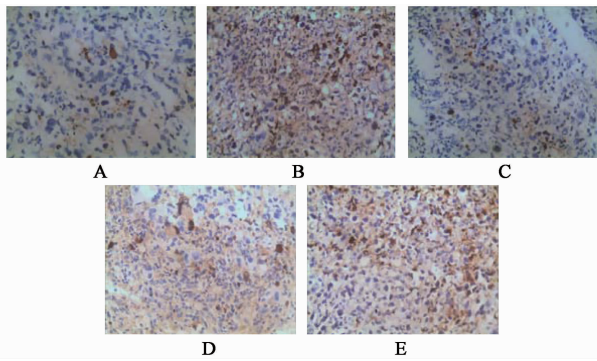


图 1 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中细胞凋亡的表达影响 (TUNEL, $\times 400$)
A. 模型组; B. 顺氯氨铂 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; C. 芹菜素 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 芹菜素 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 芹菜素 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 (图 2~4 同)

Fig. 1 Effects of apigenin on apoptosis in rat osteosarcoma (TUNEL, $\times 400$)

3.3 对大鼠骨肉瘤组织中 Bax, Bcl-2 蛋白表达影响 与模型组比较, 顺氯氨铂组、芹菜素给药治疗组骨肉瘤组织中 Bax 蛋白表达明显上升, Bcl-2 蛋白表达下降, 差异有明显的统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 2, 3。

表 3 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中 Bax, Bcl-2 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of apigenin on Bax, Bcl-2 protein expression in rat osteosarcoma ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Bax	Bcl-2
模型	-	0.07 \pm 0.02	0.63 \pm 0.23
顺氯氨铂	10	0.75 \pm 0.14 ¹⁾	0.29 \pm 0.09 ¹⁾
芹菜素	1	0.34 \pm 0.08 ^{1,2)}	0.51 \pm 0.21 ^{1,2)}
	2	0.58 \pm 0.19 ^{1,2)}	0.46 \pm 0.17 ^{1,2)}
	4	0.71 \pm 0.24 ^{1,2)}	0.37 \pm 0.14 ^{1,2)}

表 4 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中 Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of apigenin on Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C protein expression in rats osteosarcoma ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Caspase-3	Caspase-9	Cyt-C
模型	-	0.43 \pm 0.18	0.58 \pm 0.22	0.26 \pm 0.08
顺氯氨铂	10	0.65 \pm 0.24 ¹⁾	0.69 \pm 0.25 ¹⁾	0.57 \pm 0.12 ¹⁾
芹菜素	1	0.46 \pm 0.19 ²⁾	0.62 \pm 0.10 ¹⁾	0.34 \pm 0.09 ²⁾
	2	0.64 \pm 0.14 ^{1,2)}	0.68 \pm 0.09 ¹⁾	0.41 \pm 0.15 ^{1,2)}
	4	0.96 \pm 0.16 ¹⁾	0.75 \pm 0.08 ^{1,2)}	0.52 \pm 0.18 ¹⁾

4 讨论

骨肉瘤为骨恶性肿瘤, 由间质细胞系发展, 从软骨阶段之间或间接迅速形成肿瘤骨样组织和骨组织。在患恶性肿瘤的儿童和青少年中, 骨肉瘤是死亡率很高的疾病, 但早期发现和及时治疗已经从很

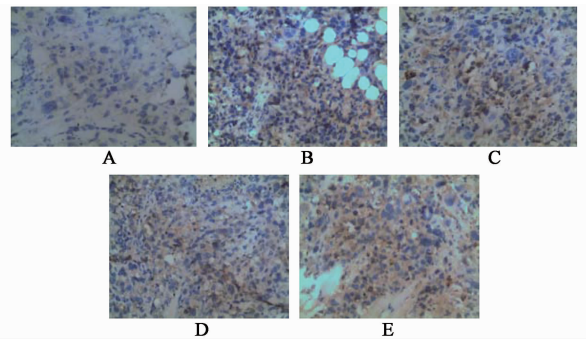


图 2 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中 Bax 蛋白表达影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of apigenin on Bax protein expression in rat osteosarcoma (IHC, $\times 400$)

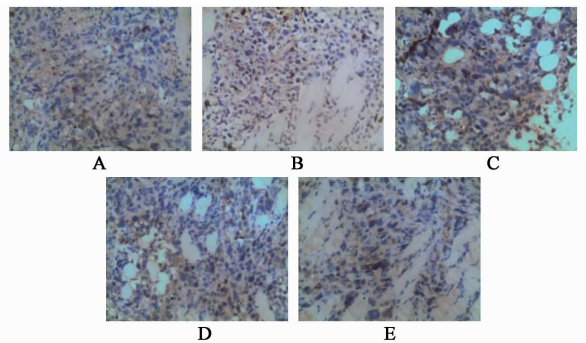


图 3 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effects of apigenin on Bcl-2 protein expression in rat osteosarcoma (IHC, $\times 400$)

3.4 对大鼠骨肉瘤组织中 Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 蛋白表达的影响 与模型组比较, 顺氯氨铂组、芹菜素给药治疗组骨肉瘤组织中的 Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 的蛋白水平均上升, 差异有明显的统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 4。

大程度上提高了该病的生存率。目前治疗骨肉瘤的方法为化学、放射性或外科手术治疗^[6]。近年来随着化疗药物的发展, 骨肉瘤患者的生存质量已有一定的改善, 但骨肉瘤发生转移的患者中 5 年生存率不足 30%。而且现临床使用的甲氨蝶呤、顺氯氨

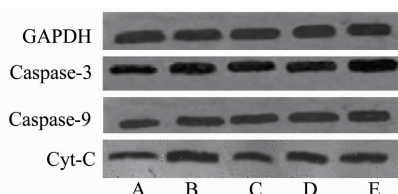


图 4 芹菜素对大鼠骨肉瘤组织中 Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of apigenin on Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C protein expression in rats osteosarcoma

铂、阿霉素等化疗药物,均有使患者的免疫力下降,白细胞数降低等副作,多耐药产生等缺点^[7]。

芹菜素是一种天然源性的黄酮类化合物,广泛分布于蔬菜和水果中,芹菜的含量最高。目前,芹菜素已可以人工合成^[8]。芹菜素具有抗肿瘤、扩张血管、抗氧化、调节血压血脂等作用^[9]。特别在抗肿瘤上能抑制癌细胞的增殖和转移、干扰癌细胞的信号转导、诱导癌细胞凋亡^[3-4]。实验结果表明,顺氯氨铂组、各芹菜素治疗组的骨肉瘤的质量均比模型组轻,凋亡细胞明显比模型组多,推测芹菜素可抑制骨肉瘤细胞的增殖,促进骨肉瘤细胞的凋亡。

细胞凋亡主要受细胞内的凋亡蛋白的调控,凋亡调节蛋白分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类^[10]。Bax 是与 Bcl-2 同源的相关蛋白,Bax 属于促凋亡蛋白,Bcl-2 属于抑制细胞凋亡的抗凋亡蛋白。Bax 与 Bcl-2 蛋白水平高低与凋亡调控直接相关。Cyt-C 是呼吸链中的一个基本成分,在氧化还原和能量代谢中起着重要的作用,同时 Cyt-C 是线粒体启动凋亡程序的关键物质^[11]。Bax 蛋白作为线粒体膜上离子通道的组成成分,上调 Bax 的含量可使 Cyt-C 可穿过线粒体膜,从而激活参与细胞凋亡的起始的 Caspase-9,并进一步激活参与细胞凋亡执行 Caspase-3 蛋白,导致细胞凋亡^[12]。下调 Bcl-2 的含量,可阻止其干扰 Cyt-C 的释放,从而激活上游凋亡蛋白的 Caspase 蛋白酶的活性,促进细胞的凋亡^[13]。实验结果表明,芹菜素可上调骨肉瘤内 Bax, Caspase-3, Caspase-9, Cyt-C 的蛋白水平,下调 Bcl-2 的蛋白表达,表明芹菜素可使骨肉瘤细胞内细胞

凋亡水平升高,抑制抗凋亡因子,达到对骨肉瘤的治疗效果。

[参考文献]

- [1] Mirabello L, Troisi R J, Savage S A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. *Cancer*, 2009, 115(7): 1531-1543.
- [2] Broadhead M L, Clark J C, Choong P F, et al. Making gene therapy for osteosarcoma a reality[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10: 477-480.
- [3] Jin X Y, Ren C S. Effect and mechanism of apigenin on VEGF expression in human breast cancer cells[J]. *Chin J Oncol*, 2007, 29(7): 495-499.
- [4] Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review)[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(1): 233-245.
- [5] 孔佑正,李世德. 番茄红素对骨肉瘤大鼠后肢移植瘤及移植瘤细胞凋亡的影响[J]. *蛇志*, 2011, 23(1): 4-8.
- [6] 牛晓辉,徐海荣. 骨肉瘤的化疗[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(2): 81-85.
- [7] 汪新媛,田京. 骨肉瘤化疗研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2010, 31(3): 159-161.
- [8] 陈平,韩俊杰,刘涛,等. 水溶性芹菜素的合成[J]. *食品科学*, 2009, 30(18): 67-69.
- [9] Rossoni G, Grande S, Galli C, et al. Wild artichoke prevents the age-associated loss of vasomotor function[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(26): 10291-10296.
- [10] 史婷婷,白建平,梁月琴,等. 芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5): 666-671.
- [11] 吴兰芳,杨爱珍,刘和,等. 线粒体调控细胞凋亡的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(8): 63-68.
- [12] Schon E A, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction[J]. *Clin Invest (S0210-573X)*, 2003, 111(3): 303-312.
- [13] Voutsadakis I A. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma[J]. *Acta Oncol*, 2000, 39(2): 151-156.

[责任编辑 周冰冰]