

玉竹高异黄酮抑制人肺癌细胞 A549 增殖的作用及机制

宁德利*, 刘军, 李敏, 李文静, 李莉, 张宏莲, 孙辑凯
(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**以人肺癌 A549 细胞为研究对象,探讨玉竹中提取的高异黄酮对 A549 细胞增殖的抑制作用及其作用机制。**方法:**从玉竹中提取高异黄酮,作用于肺癌细胞 A549;噻唑蓝(MTT)比色法观察高异黄酮 12.5,25,50,100 mg·L⁻¹作用于 A549 细胞 6,12,24 h 对细胞存活率的影响。通过流式细胞仪检测细胞凋亡及周期变化,并通过蛋白免疫印迹法(Western blot)分析与细胞凋亡相关半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),B 细胞淋巴瘤(白血病)-2(Bcl-2),Bcl-2 对抗杀伤性蛋白(Bak)和与细胞周期相关的磷酸化周期素依赖性激酶 2(p-Cdc 2),细胞周期蛋白依赖性激酶 2(Cdc 2)及 p38 蛋白表达。**结果:**与空白组比较,高异黄酮呈剂量和时间依赖性抑制 A549 细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$),高异黄酮对 A549 细胞处理 12 h 后,细胞周期阻滞于 G₂/M 期($P < 0.05$);与空白组比较,25,50,100 mg·L⁻¹高异黄酮可显著促进凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bak 表达,抑制 Bcl-2 表达($P < 0.01$),可显著促进细胞周期蛋白 p-Cdc 2 和 p38 表达,抑制 Cdc 2 表达($P < 0.01$)。**结论:**玉竹中提取的高异黄酮对 A549 细胞增殖具有抑制作用,能使 A549 细胞阻滞于细胞周期 G₂/M 期,其机制与线粒体介导的细胞凋亡和 p38 MAPK 通路相关。

[关键词] 高异黄酮; A549 细胞; 细胞周期; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; B 细胞淋巴瘤(白血病)-2; Bcl-2 对抗杀伤性蛋白(Bak); 细胞周期蛋白依赖性激酶 2(Cdc 2)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0174-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190174

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170628.1626.038.html>

[网络出版时间] 2017-06-28 16:26

Anti-proliferation Effect of Homoisoflavonoids Extracted from Polygonati Odorati Rhizoma on A549 Cells

NING De-li*, LIU Jun, LI Min, LI Wen-jing, LI Li, ZHANG Hong-lian, SHUN Ji-kai
(College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-proliferation effect of homoisoflavonoids extracted from Polygonati Odorati Rhizoma on human lung cancer A549 cells. **Method:** Ethanol was used as the solvent to extract homoisoflavonoids from Polygonati Odorati Rhizoma; methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to observe the proliferation inhibition rates of lung cancer A549 cells after being treated with homoisoflavonoids (12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹) for 6, 12, 24 h. Apoptotic rate and cell cycles were analyzed through flow cytometer (FCM). And Western blot analysis was used to detect the expressions of apoptosis-related (Caspase-3, the Bcl-2, Bak) and cell cycle-related (p-Cdc, Cdc 2, p38) protein. **Result:** Compared with normal group, A549 cells treated by homoisoflavonoids extracted from Polygonati Odorati Rhizoma were observed as typical apoptotic cells. The results of MTT and FCM showed that homoisoflavonoids could significantly inhibit tumor cell proliferation and induce apoptosis of A549 in a dose and time-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the cell number in G₂/M period was increased after being treated with homoisoflavonoids for 12 h ($P < 0.05$). Compared with normal group, the cells treated with 25, 50, 100 mg·L⁻¹ homoisoflavonoids, Caspase-3 and Bak

[收稿日期] 20161205(029)

[基金项目] 黑龙江省齐齐哈尔市科技攻关项目(SFGG-201414);齐齐哈尔医学院科研基金项目(QY2016B-02)

[通讯作者] *宁德利,博士,讲师,从事生物化学及蛋白质组学研究,Tel:0452-2663512,E-mail:ndl99@126.com

were up-regulated, while Bcl-2 was down-regulated significantly ($P < 0.01$); p-Cdc 2 and p38 were up-regulated, while Cdc 2 was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** Homoisoflavonoids extracted from Polygonati Odorati Rhizoma can promote the apoptosis of A549 cells and increase the proportion of cells in G_2/M . The antitumor mechanism of homoisoflavonoids is related to mitochondria-mediated apoptosis and p38 MAPK pathway.

[Key words] homoisoflavonoids extracted from Polygonati Odorati Rhizoma; A549 cells; cell cycle; Caspase-3; Bcl-2; Bak; Cdc 2

玉竹最早记载于《神农本草经》中,主要用于肺胃阴伤、燥热咳嗽、内热消渴。最新研究发现,玉竹中提取的高异黄酮类化合物(homoisoflavonoids)具有抗血管生成、免疫调节和抗肿瘤作用等多种活性^[1-2]。黄酮类化合物(flavonoids)是植物的次级代谢产物,也是许多药用植物的主要活性成分。肺癌是当今世界严重危害人类生命的恶性肿瘤^[3]。其发病率在大多数国家均呈明显升高趋势,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)在肺癌中约占 85%^[4]。单一的手术治疗通常因为癌细胞的扩散而面临困境^[5]。尽管化疗适合治疗很多肺癌患者,但传统的化疗效果已达到了瓶颈,因为化疗不但能抑制肿瘤细胞增殖,同时也通过诱导细胞周期阻滞而抑制正常细胞增殖^[6]。因此,寻找高效低毒的抗肿瘤药物是肿瘤研究的重要方向之一。有研究表明黄酮类化合物具有包括抗肿瘤、清除自由基、保肝、抗病毒等作用。其中黄酮类化合物主要通过抑制细胞增殖、干预细胞信号传导和诱导细胞凋亡 3 种途径来达到抗肿瘤作用^[7-9]。截止目前,未有关于高异黄酮对人 NSCLC A549 细胞增殖有抑制作用的报道。本实验通过从玉竹中提取高异黄酮,并采用不同浓度作用于 A549 细胞,观察细胞的生长增殖、细胞周期及相关蛋白表达变化。

1 材料

1.1 细胞株 人肺癌细胞(A549)购自中国协和医科大学基础医学细胞中心,培养基 DMEM 中含 10% 胎牛血清,1% 青霉素和 1% 链霉素。培养箱中培养,以 0.25% 的胰蛋白酶消化,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 药物及试剂 玉竹药材购自黑龙江省齐齐哈尔市康盛饮片厂,经齐齐哈尔医学院李莉教授鉴定为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* 的干燥根茎。高异黄酮提取方法,玉竹药材粉碎,加 4 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,过滤,合并提取液。提取液转移至旋转蒸发仪中,浓缩,加甲醇溶解,甲醇溶解部分经硅胶柱色谱,采用石油醚、石油醚-乙酸乙酯洗脱系统梯度洗脱得到各组分。根据 HPLC 对收集

的组分分析,合并含单一成分洗脱液,经半制备液相色谱分离,得高异黄酮类化合物单体(17.84 mg)。二甲基亚砜(DMSO),噻唑蓝(MTT)(美国 Amresco 公司,批号分别为 D8372-100, M8180-250);细胞浆/细胞核蛋白抽提试剂,细胞周期与凋亡检测试剂盒(北京康为世纪科技有限公司,批号分别为 CW0199, CW2575, CW2574);磷酸化周期素依赖激酶 2(p-Cdc 2)抗体,细胞周期蛋白依赖性激酶 2(Cdc 2)抗体, p38 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 2543, 9112, 8690);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体, B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体, Bcl-2 对抗杀伤性蛋白(Bak)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab32042, ab79204, ab104124); β -肌动蛋白(β -actin),羊抗鼠二抗(北京中杉金桥公司,批号分别为 14125110, 112971)。

1.3 仪器 ZMD Micromass 型质谱仪(德国 Microm 公司);Volian INVOA 500 型核磁共振波谱仪(TMS 内标), E2695 型高效液相色谱仪, 600 型半制备高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);制备色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (9.4 mm × 250 mm, 5 μ m, 美国安捷伦科技有限公司);MCV-13161FT 型超净台(日本 Sanyo 公司);5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);AJ37097 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);Eclipse TI-S 型荧光显微镜(日本 Nikon 公司);PowerPac™ Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);AlphaImager™ 型凝胶图像分析系统(美国 Alpha 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法观察细胞增殖 取对数生长期的 A549 细胞制成 1.0×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板中,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 贴壁后, DMSO 为溶剂组,高异黄酮药物组各加入质量浓度为 12.5, 25, 50, 100 mg · L⁻¹ 的单体溶液 0.08 mL,培养 6, 12, 24 h 后,每孔加入新鲜配制的 5 g · L⁻¹ MTT 0.02 mL, 37 °C 细胞培养箱中继续培养 4 h。吸弃孔内上清液,加入 DMSO 0.15 mL,在微孔板上充分振荡混匀 10 min,用酶标仪在 570 nm 波长

处测定各孔吸光度 A , 各浓度组均设 3 个平行孔, 独立重复 3 次实验, 绘制量效曲线。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{溶剂组}}) \times 100\%$$

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 收集处于对数生长期的 A549 细胞, 分别加入 12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高异黄酮, 96 孔板分别培养 6, 12, 24 h 后收集细胞, 用 PBS 洗细胞 2 次, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取 1×10^6 个细胞, 加入 Binding Buffer 0.06 mL 重悬, 加入 FITC 0.005 mL 混匀后, 再加入 Propidium Iodide 0.005 mL 混匀, 室温下避光反应 15 min, 细胞结合 FITC 和 PI 后, 其结果采用 CellQuest 软件用流式细胞仪 (FACS Calibur, BD Biosciences) 进行分析。

2.3 流式细胞术测定细胞周期 6 孔板培养 A549 细胞, 5×10^5 个/孔。细胞贴壁后, 空白组和高异黄酮组 (终质量浓度为 12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 48 h, 用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞悬液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 加入 70% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 独立重复 3 次实验。检测时用 PBS 洗涤细胞 2 次, PI 避光染色 20 min。置于流式细胞仪分析。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 按照上述 2.3 项方法取培养 48 h 后 A549 细胞进行 Western blot 检测, 参照 Bloom 等^[10] 实验方法并加以改进。收集的细胞加入裂解液, 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取上清, 即总蛋白, 采用蛋白定量试剂盒定量。取总蛋白 50 μg 进行 12% SDS-PAGE 分离, 蛋白电转移至硝酸纤维素膜上, 印迹膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加 Caspase-3, Bcl-2, Bak, p-Cdc2, Cdc2, P38 凋亡和细胞周期相关蛋白一抗 (1:1 000), 以 β -actin 为内参。室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 二抗室温孵育 1 h, ECL 试剂发光及显影, 应用 Gel-Pro4 软件进行半定量分析, 计算相对表达量。

2.5 统计方法 数据统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 高异黄酮单体鉴定 经半制备液相自玉竹中提取的高异黄酮化合物经 ESI-MS/MS, $^1\text{H-NMR}$ 与 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱鉴定, 其中 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz), δ : 7.16 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 4.30 (1H, m, H-2a), 4.15 (1H, m, H-2b), 3.13 (1H, m, H-9a), 2.84 (1H, m, H-3), 2.72 (1H, m, H-9b), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃),

3.73 (3H, s, 8-OCH₃), 1.98 (3H, s, 6-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ : 199.42 (C-4), 159.93 (C-4'), 159.23 (C-5), 158.61 (C-7), 152.90 (C-8a), 131.38 (C-1'), 131.12 (C-2', 6'), 129.14 (C-8), 115.00 (C-3', 5'), 105.26 (C-6), 102.28 (C-4a), 70.38 (C-2), 61.50 (8-OCH₃), 55.61 (4'-OCH₃), 48.10 (C-3), 33.10 (C-9), 7.16 (6-CH₃), 鉴定为 3-(4'-羟基苯甲基)-5,7-二羟基-6,8-二甲基-苯丙二氢吡喃-4-酮 ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_6$)。见图 1。

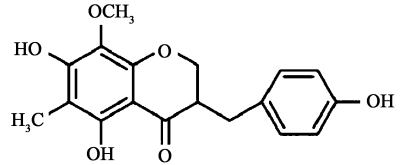


图 1 高异黄酮结构式

Fig.1 Chemical structure of homoisoflavonoid

3.2 高异黄酮对 A549 细胞存活率的影响 高异黄酮对 A549 细胞的存活率具有抑制作用, 且随着剂量的增加和时间的延长, 抑制作用更加明显。与空白组比较, 12, 24 h 时, 高异黄酮 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 6, 12, 24 h 时, 高异黄酮 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 高异黄酮对肺癌 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

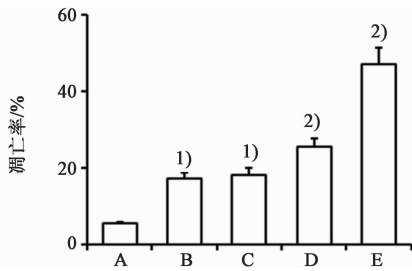
Table 1 Effect of homoisoflavonoids on cell proliferation rate of lung cancer A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6 h	12 h	24 h
空白	-	99.04 \pm 4.47	123.15 \pm 9.50	114.18 \pm 15.21
DMSO	-	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
高异黄酮	12.5	98.80 \pm 0.57	93.54 \pm 26.32	94.15 \pm 21.33
	25	71.70 \pm 0.05	67.47 \pm 22.90 ¹⁾	67.14 \pm 25.07 ¹⁾
	50	53.66 \pm 4.94 ²⁾	38.11 \pm 5.94 ²⁾	39.27 \pm 27.99 ²⁾
	100	22.86 \pm 4.84 ²⁾	11.78 \pm 5.61 ²⁾	7.51 \pm 1.22 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.3 高异黄酮对 A549 细胞凋亡的影响 高异黄酮 12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 A549 细胞 12 h 后, 凋亡率分别 17.22%, 18.23%, 25.53%, 47.12%, 均较空白组 (5.44%) 明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。

3.4 高异黄酮对 A549 细胞周期的影响 与空白组比较, 高异黄酮 12.5, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 G₂/M 期细胞增多, 且随着浓度的增加逐渐增多 ($P < 0.01$); S 期细胞比例逐渐下降 ($P < 0.05$)。见表 2。



A. 空白组; B ~ E. 高异黄酮 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3, 4 同)

图 2 高异黄酮对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of homoisoflavonoids on cell apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 高异黄酮对 A549 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白	-	55.39 ± 2.37	43.99 ± 1.50	1.07 ± 1.11
高异黄酮	12.5	57.89 ± 2.57	36.39 ± 2.09	7.34 ± 1.31 ¹⁾
	25	53.48 ± 3.05	36.92 ± 1.98	10.13 ± 2.07 ¹⁾
	50	48.54 ± 2.97	27.73 ± 1.71 ¹⁾	12.75 ± 1.89 ²⁾
	100	54.52 ± 2.86	26.21 ± 1.42 ¹⁾	17.76 ± 1.43 ²⁾

3.5 高异黄酮对 A549 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bcl-2, Bak 蛋白表达的影响 A549 细胞经不同浓度的高异黄酮处理 48 h 后, 与空白组比较, 高异黄酮 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 组 Caspase-3, Bak 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); Bcl-2 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 3。

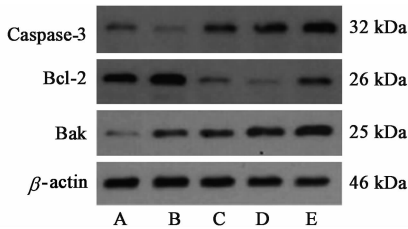


图 3 A549 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bcl-2, Bak 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of homoisoflavonoids on Caspase-3, Bcl-2, Bak protein expression of A549 cells

3.6 高异黄酮对 A549 细胞周期相关蛋白 p-Cdc2, Cdc2, p38 表达的影响 高异黄酮处理 A549 细胞 48 h 后, 与空白组比较, 高异黄酮 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 组 p-Cdc2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$), Cdc2 水平受到显著抑制 ($P < 0.01$)。此外, 高异黄酮 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹ 作用 A549 细胞后 p38 水平明显高于空白组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4, 表 4。

表 3 高异黄酮对 A549 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bcl-2, Bak 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of homoisoflavonoids on Caspase-3, Bcl-2, Bak protein expression of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Caspase-3 /β-actin	Bcl-2 /β-actin	Bak /β-actin
空白	-	0.12 ± 0.37	1.01 ± 0.55	0.11 ± 0.59
高异黄酮	12.5	0.12 ± 0.87	1.02 ± 1.26	0.19 ± 0.83 ¹⁾
	25	0.68 ± 0.93 ²⁾	0.16 ± 0.13 ²⁾	0.26 ± 0.91 ¹⁾
	50	0.83 ± 1.03 ²⁾	0.12 ± 0.72 ²⁾	0.88 ± 0.48 ²⁾
	100	1.01 ± 0.83 ²⁾	0.18 ± 0.21 ²⁾	0.98 ± 0.79 ²⁾

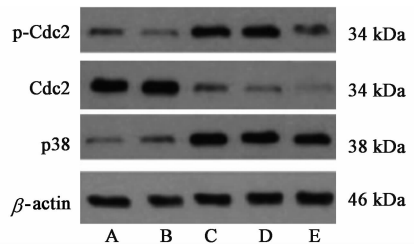


图 4 A549 细胞周期相关蛋白 p-Cdc2, Cdc2, p38 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of homoisoflavonoids on p-Cdc2, Cdc2, p38 protein expression of A549 cells

表 4 高异黄酮对 A549 细胞周期相关蛋白 p-Cdc2, Cdc2, p38 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of homoisoflavonoids on p-Cdc2, Cdc2, p38 protein expression in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	p-Cdc2 /β-actin	Cdc2 /β-actin	p38 /β-actin
空白	-	0.21 ± 1.21	1.02 ± 0.76	0.23 ± 0.41
高异黄酮	12.5	0.26 ± 0.56	1.02 ± 0.29	0.31 ± 0.23 ¹⁾
	25	0.95 ± 0.81 ²⁾	0.47 ± 0.78 ²⁾	1.07 ± 0.69 ²⁾
	50	0.98 ± 0.43 ²⁾	0.24 ± 1.02 ²⁾	1.01 ± 0.97 ²⁾
	100	0.95 ± 0.63 ²⁾	0.12 ± 0.85 ²⁾	1.05 ± 0.72 ²⁾

4 讨论

抗癌药物多具有细胞毒性, 可通过诱导敏感细胞凋亡而导致细胞死亡^[11]。主要通过两个细胞通路引起细胞凋亡。分别是死亡受体介导通路和线粒体凋亡通路^[12-13]。死亡受体介导通路是死亡受体与配体的结合, 例如 Fas 和交联抗体导致受体三聚。Fas 主要是通过衔接蛋白 (Fas-associating protein with death domain, FADD) 与细胞质区的受体蛋白之间的相互作用, 从而激活 Caspase-3 及其下游的 Caspase 家族成员, 最终诱导细胞凋亡^[14-15]。Caspase-3 处于凋亡过程的下游, 是细胞凋亡过程中的主要效应因子。通常情况下, 细胞质中 Caspase-3

无活性,一旦 Caspase-3 激活,其介导的信号传递途径导致细胞凋亡不可逆转^[16-17]。线粒体凋亡通路主要是细胞色素 C (cytochrome C) 从线粒体释放到细胞质中,而这一过程是由线粒体与 Bcl-2 家族蛋白相互作用引发的。研究证明,Bcl-2 和 Bcl-X1 的过表达能抑制线粒体向细胞质内释放促凋亡蛋白细胞色素 C,从而抑制 Caspase 级联反应和凋亡^[18-21]。Bak 基因是 Bcl-2 家族促凋亡基因中的一员,由多个结构域组成。当 Bak 通过转基因过表达时,生长因子缺失加剧,从而引起肿瘤细胞凋亡,如小鼠淋巴瘤^[22]、肺癌^[23]和乳腺癌细胞^[24]。当 Bak 基因被敲除后,导致细胞产生多重耐药性^[25]。另有研究证明,Bak 在线粒体膜内作为通道蛋白^[26-27],可以改变线粒体的通透性及早期的线粒体干扰,从而释放出如细胞色素 C 和其他细胞凋亡诱导蛋白,引起 Caspase 级联反应和细胞凋亡^[27]。本实验结果显示,经高异黄酮处理的 A549 细胞中 Bcl-2、Bak 和 Caspase-3 蛋白呈现了不同的丰度表达,表明肺癌细胞凋亡受到了诱导与抑制分子表达平衡的制约。随着 Bcl-2 蛋白水平的降低和 Bak 蛋白表达的升高,增加了线粒体外膜的通透性。致使线粒体向细胞质内释放促凋亡蛋白细胞色素 C,激活 Caspase-3 蛋白,引起 Caspase 级联反应,促进细胞死亡。

Cdc2 蛋白作为裂殖酵母 Cdc2 基因编码的蛋白,是细胞进入有丝分裂的一个关键调节因子。细胞周期蛋白 cyclin B1 和 Cdc2 形成 MPF (mitosis promoting factor) 复合体,调控细胞 G₂/M 期的过渡。cyclin B1 在细胞周期从 G₂ 期进入 M 期发挥着重要作用。当 Cdc2 蛋白去磷酸化并进入细胞核后,cyclin B1 与其相结合来调控细胞进入有丝分裂阶段。在细胞周期过程中,Cdc2 蛋白水平保持稳定,而过多的活性氧基因 (ROS) 则能抑制 Cdc2 的表达。而 cyclin B1 在细胞的 G₁ 开始表达,S 期呈现上调表达,在 G₂/M 过渡期达到高峰^[28-31]。p38 是有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族中的重要成员,可被多种应激刺激 (H₂O₂, 热休克, 缺氧, 紫外线, 放射线等), 炎性因子及 LPS 和 G⁺ 细菌细胞壁成分而激活^[32], 从而影响细胞的转录、蛋白合成和细胞表面受体表达等生物效应。p38 MAPK 通路是目前在哺乳动物细胞中已发现的 4 条重要 MAPK 通路之一^[33]。p38 又参与不同类型的细胞的分化,如脂肪细胞,成红细胞,成肌细胞^[34],激活的 p38 可能导致体细胞有丝分裂滞留在周期纺锤体组装检查点^[35]。而 p38 蛋白水平被药物提高后可能引起

ROS 水平的升高^[31],过多的 ROS 生成会导致氧化应激、细胞功能丧失,细胞周期阻滞和细胞凋亡^[36]。本实验结果显示,在 A549 细胞内,高异黄酮提高了 Cdc2 的磷酸化水平,抑制了 Cdc2 蛋白表达水平,从而降低了 cyclin B1 和 Cdc2 形成 MPF 复合体的可能性。另一方面,p38 蛋白的表达水平升高,可能引起了 ROS 增加,而降低了 Cdc2 的水平。由于 MPF 复合体难以形成,从而使细胞分裂阻滞在 G₂/M 期。

本实验发现高异黄酮能明显抑制细胞的增殖,诱导 A549 细胞凋亡,可明显将 A549 细胞阻滞于 G₂/M 期,且呈时间-剂量依赖性。表明高异黄酮对 A549 细胞的生长增殖具有抑制作用。为研制开发肿瘤天然中药成分提供理论与实验依据,同时为黄酮类药物的综合利用提供有益资料。

[参考文献]

- [1] Rafi M M, Vastano B C. Identification of a structure specific Bcl-2 phosphorylating homoisoflavone molecule from Vietnamese coriander (*Polygonatum odoratum*) that induces apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in breast cancer cell lines [J]. Food Chem, 2007, 104 (1): 332-340.
- [2] WANG D, LI D, ZHU W, et al. A new C-methylated homoisoflavanone and triterpenoid from the rhizomes of *Polygonatum odoratum* [J]. Nat Prod Res, 2009, 23 (6): 580-589.
- [3] Kohler B A, Ward E, McCarthy B J, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103 (9): 714-736.
- [4] Cho W C. Application of proteomics in non-small-cell lung cancer [J]. Expert Rev Proteomics, 2016, 13 (1): 1-4.
- [5] Owonikoko T K, Ragin C C, Belani C P, et al. Lung cancer in elderly patients: an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database [J]. J Clin Oncol, 2007, 25 (35): 5570-5577.
- [6] Pfister D G, Johnson D H, Azzoli C G, et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003 [J]. J Clin Oncol, 2004, 22 (2): 330-353.
- [7] Musonda C A, Chipman J K. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells [J]. Carcinogenesis, 1998, 19 (9): 1583-1589.
- [8] Walker E H, Pacokd M E, Persic O, et al. Structural determinants of Phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmanin, LY 294002, quercetin, myricetin and staurosporine [J]. Molecular Cell, 2000, 6 (4):

- 909-919.
- [9] Rafi M M, Rosen R T, Vassil A, et al. Modulation of Bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(4) : 2653-2658.
- [10] Bloom J, Cross F R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2) : 149-160.
- [11] Fisher D E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold [J]. *Cell*, 1994, 78(4) : 539-542.
- [12] Kaufmann S H, Earnshwa W C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256(1) : 42-49.
- [13] YANG J, LIU X X, FAN H, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis *via* attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10) : e0140551.
- [14] Medena J P, Scaffidi C, Kischkel F C, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC) [J]. *Eur Med Biol Org*, 1997, 16(10) : 2794-2804.
- [15] Cho H M, SUN W. Control of mitochondrial dynamics by Fas-induced caspase-8 activation in hippocampal neurons [J]. *Exp Neurobiol*, 2015, 24(3) : 219-225.
- [16] ZHANG Y, Goodyer C, Blanc A L. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjection with active Caspase-3, -6, -7 and -8 [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22) : 8384-8389.
- [17] Cryns V, YUAN J. Protease to die for [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(11) : 1551-1570.
- [18] Solange D, Martinou J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(9) : 369-377.
- [19] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. Bcl-2 family members and the mitochondrial in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15) : 1899-1911.
- [20] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during poptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15(1) : 269-290.
- [21] Salvesen G, Dixit V. Caspase activation: the induced proximity model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1) : 10964-10967.
- [22] Grabow S, Delbridge A R, Valente L J, et al. MCL-1 but not Bcl-Xl is critical for the development and sustained expansion of thymic lymphoma in p53-deficient mice [J]. *Blood*, 2014, 124(26) : 3939-3946.
- [23] LI R, Moudgil T, Ross H J, et al. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(3) : 292-303.
- [24] Matissek K J, Okal A, Mossalam M, et al. Delivery of a monomeric p53 subdomain with mitochondrial targeting signals from pro-apoptotic Bak or Bax [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(9) : 2503-2515.
- [25] Janssen K, Horn S, Niemann M T, et al. Inhibition of the ER Ca²⁺ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 24) : 4481-4491.
- [26] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3) : 929-935.
- [27] Wood D E, Newcomb E W. Cleavage of Bax enhances its cell death function [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256(2) : 375-382.
- [28] Poon R Y C. Cell cycle control [J]. *Encycl Can*, 2002, 17(6) : 393-403.
- [29] LI J, Meyer A N, Donoghue D J. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2) : 502-507.
- [30] Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B [J]. *EMBO J*, 1994, 13(16) : 3772-3781.
- [31] KANG N, JIAN J F, CAO S J, et al. Physalin A induces G₂/M phase cell cycle arrest in human nonsmall cell lung cancer cells; involvement of the p38 MAPK/ROS pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 415(1/2) : 145-155.
- [32] Bodero A J, YE R, Lees-Miller S P. UV-light induces p38 MAPK dependent phosphorylation of Bcl10 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(4) : 923-926.
- [33] Maosong Q, Elaine A. Elion. MAP kinase pathways [J]. *J Cell Science*, 2005, 118(16) : 3569-3572.
- [34] Nebreda A R, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(6) : 257-260.
- [35] Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest [J]. *Science*, 1998, 280(5363) : 599-602.
- [36] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2001, 11(4) : 173-186.