

[文章编号] 1000- 4718(2006)02- 0372- 04

Genistein 下调肝癌细胞 survivin 基因表达和诱导细胞凋亡的实验研究

张继红, 梁力建, 黄洁夫

(中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨三磷酸肌醇(IP₃)和 survivin 蛋白表达变化在 genistein 诱导肝癌细胞凋亡中的作用。方法: 以肝癌 HepG2 细胞培养 72 h 为对照组, 实验各组以 60 μmol/L 的 genistein 作用于 HepG2 细胞不同时间后, 应用同位素试剂盒检测细胞 IP₃ 含量, Western blotting 分析细胞 survivin 蛋白表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果: 对照组 IP₃ 含量为(29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, survivin 蛋白与内参 β-actin 蛋白灰度和面积之积的比值 V-survivin/ V-β-actin 为 0.63 ± 0.06; 细胞凋亡率为(2.6 ± 0.1)%。Genistein 作用于肝癌 HepG2 细胞 12 h、24 h、48 h、72 h 后 IP₃ 分别为(12.0 ± 1.4) pmol/10⁶ cells、(7.5 ± 0.8) pmol/10⁶ cells、(5.6 ± 0.5) pmol/10⁶ cells、(3.3 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, 与对照组(29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells 比, P < 0.01。V-survivin/ V-β-actin 分别为 0.36 ± 0.13、0.33 ± 0.03、0.23 ± 0.04、0.18 ± 0.04, 与对照组(0.63 ± 0.06) 比, P < 0.01。细胞凋亡率分别为(2.7 ± 0.2)%、(7.4 ± 0.5)%、(20.5 ± 2.0)%、(30.7 ± 1.6)%, 与对照组(2.6 ± 0.1)% 比, P < 0.01。结论: Genistein 能减少 IP₃ 生成, 下调 survivin 基因表达, 诱导肝癌细胞凋亡。

[关键词] 癌, 肝细胞; 染料木黄酮; 存活素; 细胞凋亡

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Genistein downregulates survivin gene expression and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells

ZHANG Ji-hong, LIANG Li-jian, HUANG Jie-fu

(Division of Hepato-biliary Surgery, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] AIM: To probe into the role of 1, 4, 5- trisphosphate inositol (IP₃) and survivin protein in apoptosis of HepG2 cells induced by genistein. METHODS: HepG2 cells were treated with 60 μmol/L genistein for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h. IP₃, survivin and apoptosis rate were assayed by IP₃- [³H] Birtrak assay, Western blotting and flow cytometry, respectively. RESULTS: IP₃ in groups incubated for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h with 60 μmol/L genistein were significantly lower than that in control (P < 0.01) [(12.0 ± 1.4) pmol/10⁶ cells, (7.5 ± 0.8) pmol/10⁶ cells, (5.6 ± 0.5) pmol/10⁶ cells, (3.3 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, vs (29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells]. V-survivin/ V-β-actin, which was the gray degree multiply area of survivin/ the gray degree multiply area of β-actin in groups incubated for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h with 60 μmol/L genistein, were significantly lower than that in control (P < 0.01) [(0.36 ± 0.13, 0.33 ± 0.03, 0.23 ± 0.04, 0.18 ± 0.04), vs 0.63 ± 0.06]. The apoptosis rate in groups incubated with 60 μmol/L genistein for 24 h, 48 h and 72 h was significantly higher than that in control (P < 0.01) [(7.4% ± 0.5%, 20.5% ± 2.0%, 30.7% ± 1.6%) vs 2.6% ± 0.1%]. CONCLUSION: Genistein induces apoptosis in HepG2 cells by reducing IP₃ production and survivin protein expression.

[KEY WORDS] Carcinoma, hepatocellular; Genistein; Survivin; Apoptosis

细胞凋亡障碍在恶性肿瘤发生、发展中起关键作用, 诱导细胞凋亡可阻止转化细胞恶性生长^[1]。已有报道, 三羟异黄酮(genistein)能对多种肿瘤细胞发挥诱导凋亡的作用^[2-6]。磷酸肌醇信号通路转导能力增强, 表现为催化这一通路的生化反应关键酶

磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)激酶、磷脂酰肌醇一磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PIP)激酶活性增强和第二信使分子三磷酸肌醇(1, 4, 5- trisphosphate inositol, IP₃)和二酰基甘油(diacyl glycerol, DG)产生增加, 在恶性肿瘤的生长、繁殖、浸润和转移中

[收稿日期] 2005- 11- 03 [修回日期] 2005- 12- 15

E-mail: zhjihong@hotmail.com

起重要作用^[2,3]。Survivin 基因对肿瘤细胞具有抑制凋亡和促进增殖双重作用^[7,8]。但肝癌细胞磷酸肌醇信号通路转导能力与 survivin 基因表达的关系尚不清楚。本实验旨在探讨抑制磷酸肌醇信号通路 PIP 激酶活性的 genistein 能否下调 survivin 基因表达并进而诱导肝癌细胞凋亡,为临床应用磷酸肌醇信号通路抑制剂治疗肝细胞癌提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 主要材料

肝癌 HepG2 细胞株(中山大学动物实验中心细胞库), RPMI-1640 培养基(Invitrogen 公司), 新生牛血清(Hyclone 公司), genistein(美国 Sigma 公司, 分析纯)。IP₃- [³H] Birtrak Assay 试剂盒(Amersham 公司), 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司, 机器型号 ELITE, 激光波长 488nm, 功率 15 mW), survivin 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司), β-actin 鼠抗人单克隆抗体(Neomarker 公司), 带化学发光物的抗小鼠 IgG(二抗)试剂盒(武汉博士德公司), PVDF 膜(Roche 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养 将 HepG2 细胞快速解冻, 分装入 25 cm³ 培养瓶, 加入含 10% 小牛血清、青霉素 1 × 10⁵ U/L、链霉素 100 mg/L 的 RPMI-1640 培养基, 单层培养和孵化于 5% CO₂ 和 95% 的湿润空气、温度为 37 °C 的细胞培养箱中, 每 3 d 更换培养液 1 次。待细胞覆盖培养瓶壁 80% - 90% 后给予传代培养。吸去陈旧培养基, 用 0.1 mol/L PBS 液洗涤细胞 2 次, 然后按 0.1 - 0.2 mL/cm² (瓶底面积) 的数量加入 0.25% 含 0.1 mmol/L EDTA 的胰蛋白酶, 于 37 °C 下消化, 观察细胞形态, 见细胞突起回缩、细胞形态近乎圆形时倾出胰蛋白酶, 加入带血清的培养基 3 min 中止消化。然后吸取培养基吹打培养瓶底壁, 待瓶底细胞脱落干净后, 吸出培养基加入离心管, 1 000 × g 离心 5 min, 去除上清含酶的培养基。加入新培养基, 混匀悬浮细胞后细胞计数, 分装入新培养瓶中培养。

2.2 体外实验 按上述方法传代培养至瓶底贴壁细胞长满, 将经同样传代的 HepG2 细胞制成细胞悬液, 浓度调至 2 × 10⁹/L, 分瓶后加入含 10% 小牛血清、青霉素 1 × 10⁵ U/L、链霉素 100 mg/L 的 RPMI-1640 培养基培养。当细胞生长到对数生长期时进行以下实验。

用 DMSO 溶解 genistein 配制成浓度 10 mmol/L

储存药液, -20 °C 保存, 实验时应用上述含血清的完全培养基稀释成 60 μmol/L 浓度, 每种药液中 DMSO 的终浓度为 0.8%。对照组培养基中加入含 0.8% DMSO 培养 72 h 取细胞进行相关指标检测; 实验各组培养基中加入 60 μmol/L 的 genistein, 分别培养 12 h、24 h、48 h、72 h, 取细胞进行相关指标检测。

2.3 IP₃- [³H] Birtrak Assay 检测 IP₃ 含量 按 IP₃- [³H] Birtrak Assay 试剂盒操作说明操作。细胞计数后采用高氯酸沉淀法提取 IP₃ 样品, 在反应体系中加入 100 μL 缓冲液、100 μL 标准品或样品、100 μL [³H]-IP₃ 稀释液、100 μL 结合蛋白, 旋转混合, 冰上孵育 15 min, 4 °C 下 2 000 × g 离心 10 min, 弃去上清液, 使沉淀完全干燥, 加入 1 mL 去离子水, 充分旋转混匀, 15 - 30 °C 下孵育 10 min 后再旋转混匀, 移入液闪瓶, 加入 10 mL 液闪液, 加盖混匀, 于 β-液闪计数器上进行液闪计数 4 min。按操作说明绘制标准曲线, 对照标准曲线求出各样品 IP₃ 含量。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组细胞, PBS 清洗 2 遍。用冷的 75% 的乙醇 4 °C 过夜固定细胞, 应用 PI 法检测细胞凋亡, 经仪器自带软件处理直接得出细胞的凋亡率。

2.5 Western blotting 方法测定 survivin 蛋白表达 取各时组细胞, SDS 匀浆、离心, 上清液煮沸 5 min。上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将凝胶完整取下, 于转移缓冲液中转膜。取出 PVDF 膜, 封闭, 加入一抗 survivin 鼠抗人单克隆抗体, 以 β-actin 单克隆抗体为内参, 4 °C 轻摇过夜。洗去 PVDF 膜上未结合的抗体, 加入二抗(抗小鼠 IgG) 室温下共同孵育 2 h 后, 采用化学发光试剂显色, 电子计算机图像分析仪成像并进行半定量分析。

3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件进行统计学分析, 方差齐性者采用方差分析法进行分析, 方差不齐者进行秩变换后具备方差齐性, 然后进行方差分析。

结 果

1 IP₃ 含量变化

如图 1 所示, 对照组 IP₃ 含量为 (29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, 用药后 12 h、24 h、48 h、72 h 组 IP₃ 分别为 (12.0 ± 1.4) pmol/10⁶ cells、(7.5 ± 0.8) pmol/10⁶ cells、(5.6 ± 0.5) pmol/10⁶ cells、(3.3 ± 0.6) pmol/10⁶ cells。加药后各时相 IP₃ 均显著低于对照组 (29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, $P < 0.01$ 。

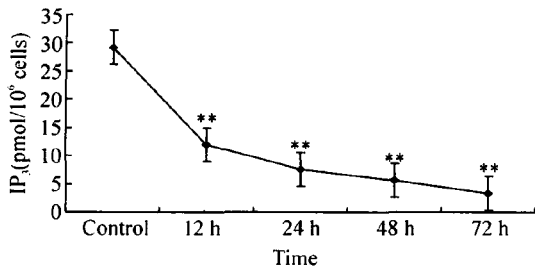


Fig 1 IP₃ content of HepG2 cells treated with 60 μmol/L genistein in various time point [(29.2 ± 0.6) pmol/10⁶ cells, (12.0 ± 1.4) pmol/10⁶ cells, (7.5 ± 0.8) pmol/10⁶ cells, (5.6 ± 0.5) pmol/10⁶ cells, (3.3 ± 0.6) pmol/10⁶ cells]. $\bar{x} \pm s$, n = 3. ** P < 0.01 vs control.

图1 Genistein 作用于 HepG2 细胞不同时间的 IP₃ 含量

2 Survivin 基因表达

如图 2 所示, 从左向右, control, 加药 12 h、24 h、48 h、72 h, survivin 表达减少具有时间依赖性。经过与内参 β-actin 的灰度与面积之积 (V-survivin/V-β-actin) 对比, 进行半定量分析, 可见对照组 V-survivin/V-β-actin 为 0.63 ± 0.06, 加药 12 h、24 h、48 h、72 h 分别为 0.36 ± 0.13、0.33 ± 0.03、0.23 ± 0.04、0.18 ± 0.04。加药 12 h 后各时相组 survivin 表达显著低于对照组 (P < 0.01)。

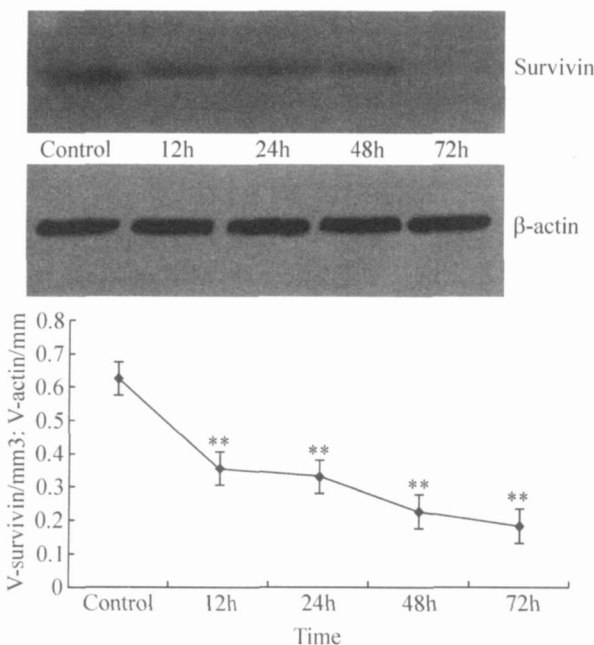


Fig 2 Change of survivin protein in HepG2 cells treated with 60 μmol/L genistein at various time point (0.63 ± 0.06, 0.36 ± 0.13, 0.33 ± 0.03, 0.23 ± 0.04, 0.18 ± 0.04). $\bar{x} \pm s$, n = 3. ** P < 0.01 vs control).

图2 Genistein 作用于 HepG2 细胞不同时间的 survivin 蛋白表达

3 细胞凋亡

如图 3 4 所示, 随着 genistein 作用时间延长, 细胞凋亡率逐渐增加。对照组细胞凋亡率 (2.6 ± 0.1)%, 用药后 12 h、24 h、48 h、72 h 组细胞凋亡率分别为 (2.7 ± 0.2)%, (7.4 ± 0.5)%, (20.5 ± 2.0)%, (30.7 ± 1.6)%。加药 12 h 前细胞凋亡率与对照组无显著差异, 但加药 24 h 后各时相细胞凋亡率均显著高于对照组 (P < 0.01)。

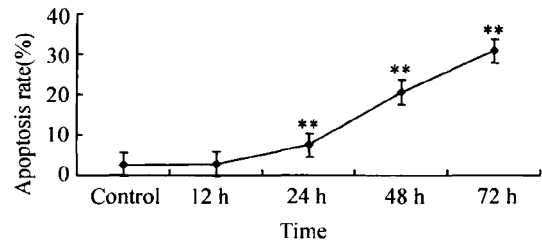


Fig 3 Apoptosis rate of HepG2 cells treated with 60 μmol/L genistein increasing in a time-dependent manner (2.6% ± 0.1%, 2.7% ± 0.2%, 7.4% ± 0.5%, 20.5% ± 2.0%, 30.7% ± 1.6%). $\bar{x} \pm s$, n = 3. ** P < 0.01 vs control).

图3 Genistein 作用于 HepG2 细胞不同时间的细胞凋亡率

讨 论

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 的成员之一, 存在于大多数癌组织中, 而在正常肝组织中几乎不存在^[7], 其基因位于染色体 17q25, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 含有 142 个氨基酸, 其分子中有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列分子 (baculovirus inhibition apoptosis protein repeat, BIR), 无羧基末端环指结构, 但在羧基末端有一个由 40 个氨基酸组成的 α 螺旋结构, 具有抑制细胞凋亡和促进细胞增殖双重作用。BIR 结构中的丝、苏氨酸和半胱氨酸残基与 caspase-9 结合并抑制其活性, 进而抑制细胞凋亡的终末效应分子 caspase-3 和 caspase-7 的活性, 阻断细胞凋亡的线粒体通路, 抑制细胞凋亡; 通过 α 螺旋结构与细胞分裂有关的微管结合, 促进细胞增殖^[9]。反义 survivin 重组质粒、RNA 干扰、细胞蛋白激酶抑制因子等各种下调 survivin 基因表达的方法均可诱导肿瘤细胞凋亡, 并能增强肿瘤细胞对放、化疗的敏感性^[9]。本实验表明, 随着 genistein 对肝癌细胞作用时间的延长, survivin 蛋白表达逐渐下降, 细胞凋亡率逐渐增加, 提示 genistein 可下调 survivin 基因表达, 诱导细胞凋亡, 有望应用于临床肝细胞癌的辅助治疗, 增强抗癌作用。

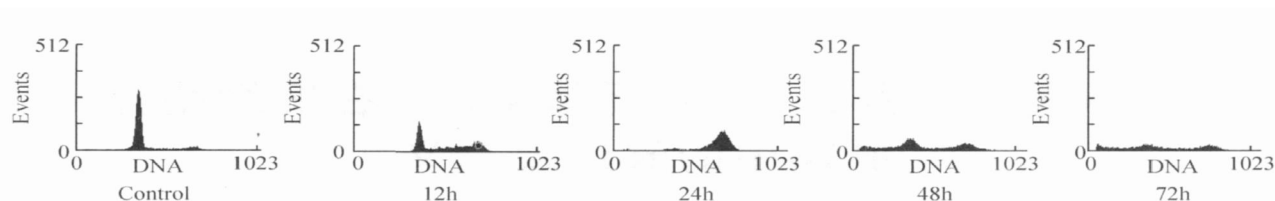


Fig 4 Apoptosis of HepG2 cells treated with genistein (apoptosis cells of HepG2 cells increase in a time- dependent manner).

图4 Genistein 作用于 HepG2 细胞不同时间的细胞凋亡图

Genistein 是具有多种生物学作用的黄酮类物质, 具有抑制酪氨酸酶和 DNA 拓扑异构酶活性、抗氧化活性、抗血管生成、抑制细胞增殖、诱导细胞分化及凋亡等多种抑癌机制而在不同肿瘤细胞中发挥抗癌作用^[2-6]。但其诱导细胞凋亡的具体机制至今尚未完全阐明。磷酸肌醇信号通路转导能力增强在肿瘤的发生发展中起关键作用^[2,3]。Genistein 是磷酸肌醇信号通路抑制剂, 体外实验证实, genistein 可降低这些肿瘤细胞 PIP 激酶活性, 导致 IP₃ 产生下降, 细胞生长停滞于 G₂/M 期, 表现为增殖能力下降、停止甚至引起细胞死亡^[2-4]。本实验表明, genistein 可以减少肝癌 HepG2 细胞 IP₃ 生成, 下调细胞 survivin 蛋白表达, 随着 genistein 对肝癌细胞作用时间的延长, IP₃ 下降与 survivin 蛋白表达呈一致性下降, 细胞凋亡率逐渐增加, 提示 genistein 诱导细胞凋亡的机制之一可能是通过抑制磷酸肌醇通路信号转导能力, 进而下调 survivin 蛋白而实现的。

由于 IP₃ 增加通过引起细胞内储钙释放, 导致细胞内 Ca²⁺ 浓度增加而起作用^[10]。Ca²⁺ 是细胞内信使和细胞活动的调节者, 它可选择性地调节细胞信号通路、细胞增殖、骨架重排和基因表达, 对细胞存活与凋亡起重要作用^[11]。因此, genistein 抑制磷酸肌醇通路信号转导, 降低肝癌细胞 IP₃ 的生成, 可能通过引起细胞内 Ca²⁺ 浓度降低而下调 survivin 基因表达, 进而促进细胞凋亡。本研究表明了肝癌细胞磷酸肌醇信号通路转导能力与细胞凋亡之间存在一定的内在联系, 从蛋白质水平为肝细胞癌的治疗研究提供了新的发展方向。

[参 考 文 献]

[1] Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. Modulation of anti-apoptosis cell signaling pathways in non-small cell lung cancer: the role of NF- κ B[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*,

2004, 16(1): 28-39.

- [2] Weber G, Shen F, Prajda N, et al. Increased signal transduction activity and down-regulation in human cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(6A): 3271-3282.
- [3] Singhal RL, Look KY, Yeh YA, et al. Coordinated increase in activities of the signal transduction enzymes PI kinase and PIP kinase in human cancer cells [J]. *Life Sci*, 1994, 55(19): 1487-1492.
- [4] Li Y, Sarkar FH. Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells [J]. *J Nutr*, 2002, 132(12): 3623-3631.
- [5] Choi YH, Lee WH, Park KY, et al. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G₂/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(2): 164-173.
- [6] Zhou HB, Chen JJ, Wang WX, et al. Apoptosis of human primary gastric carcinoma cells induced by genistein [J]. *World of Gastroenterol*, 2004, 10(12): 1822-1825.
- [7] Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 95(9): 1938-1945.
- [8] 范钰, 郑树, 赵刚. RAR β 基因转染对胃癌细胞株 MKN-45 凋亡和存活素及半胱氨酸酶的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(12): 2396-2400.
- [9] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(2): 360-372.
- [10] Mozhayeva GN, Naumov AP, Kuryshev YA. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate activates two types of Ca²⁺-permeable channels in human carcinoma cells [J]. *FEBS Lett*, 1990, 277(1, 2): 233-234.
- [11] Rodland KD, Wersto RP, Hobson SH, et al. Thapsigargin-induced gene expression in nonexcitable cells is dependent on calcium influx [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(3): 281-291.