· 实验研究 ·

植酸通过线粒体途径诱导人肝癌细胞凋亡*

刘敏[1], 孟显峰[2], 宋扬[1], 杨富国[1]

摘　要: 目的　探讨植酸(IP_6)如何通过线粒体途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 为研究 IP_6 的抗肿瘤作用提供理论依据。**方法**　应用 Hoechst 33258 荧光染色法和流式细胞仪 Annexin-FITC/PI 双染法观察不同浓度 IP_6 作用 HepG2 细胞后的凋亡情况; 流式细胞仪检测 IP_6 作用 $HepG_2$ 细胞后线粒体膜电位($\Delta\Psi m$)的变化; RT-PCR 法检测 HepG2 细胞内 caspase-3mRNA 的表达变化; Western blot 法检测 IP_6 作用 HepG2 细胞后 Cyt-c 的表达变化。**结果**　荧光显微镜下可观察到 IP_6 作用后细胞出现明显的凋亡形态; 与对照组相比, IP_6 可升高细胞凋亡率($F = 342.15$, $q = 2.9 \sim 28.53$, $P < 0.05$), 且随着浓度增加, 凋亡率逐渐升高($P < 0.05$); IP_6 可降低线粒体膜电位($F = 14802.610$, $q = 101.531 \sim 209.237$, $P < 0.05$), 且随着浓度增加, 膜电位逐渐降低($P < 0.05$); IP_6 可增加 caspase - 3 mRNA 的表达($F = 30.474$, $q = 3.406 \sim 9.103$, $P < 0.05$), 且随着浓度增加, 表达逐渐增加($P < 0.05$); IP_6 可上调细胞色素 C(Cyt-c)的表达($F = 87.194$, $q = 5.246 \sim 15.218$, $P < 0.05$), 且随着浓度增加, 表达逐渐上调($P < 0.05$)。**结论**　IP_6 可通过降低线粒体膜电位, 上调细胞色素 C 水平, 激活 caspase-3 途径, 促进人肝癌 HepG2 细胞发生凋亡。

关键词: 植酸; HepG2 细胞; 凋亡; 线粒体; caspase-3; 细胞色素 C
中图分类号: R 735.7　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2014)10-1285-04　DOI: 10.11847/zgggws2014-30-10-16

Effects of phytic acid on apoptosis of human heptoma cell line HepG2 induced through mitochondrial pathway

LIU Min*, MENG Xian-feng, SONG Yang, et al(* *Institute of Nutrition and Food, College of Public Health, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province* 266021, China)

Abstract: Objective　To investigate how phytic acid(inositol hexaphosphate[IP_6]) induces apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 through mitochondrial pathway. **Methods**　Hoechst 33258 method and flow cytometry analysis were used to detect cell apoptosis. Flow cytometry analysis was also designed to investigate the status of mitochondrial membrane potential. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was adopted to detect the expression of caspase-3 mRNA. Western blot was used to detect the expression of cytochrome c(Cyt-c) protein. **Results**　The apoptotic morphological changes in the cells exposed to IP_6 were observed. Compared with the control group, IP_6 increased the rate of cell apoptosis($F = 342.15$, $q = 2.9 - 28.53$; $P < 0.05$) and the rate increased gradually with the increment of IP_6 ($P < 0.05$); IP_6 decreased mitochondrial membrane potential($F = 14\ 802.610$, $q = 101.531 - 209.237$; $P < 0.05$) and the mitochondrial membrane potential decreased gradually with the increment of IP_6($P < 0.05$); IP_6 increased the expression of caspase-3($F = 30.474$, $q = 3.406 - 9.103$; $P < 0.05$) and the expression was increased gradually with the increment of IP_6($P < 0.05$); IP_6 increased the expression of Cyt-c($F = 87.194$, $q = 5.246 - 15.218$; $P < 0.05$) and the expression was increased gradually with the increment of IP_6($P < 0.05$). **Conclusion**　Phytic acid could induce apoptosis *in vitro* by decreasing mitochondrial membrane potential and increasing caspase-3 and Cyt-c.

Key words: phytic acid; HepG2 cell; apoptosis; mitochondria; caspase-3; Cyt-c

植酸又名肌醇六磷酸(inositol hexaphosphate, IP_6), 是植物体内重要的含磷化合物, 在谷类、豆类和种子中含量较多[1]。研究表明, IP_6 具有广谱的抗肿瘤活性, 其对造血细胞系[2]、宫颈癌细胞系[3]、大肠癌 HT-29 细胞系[4]等多种肿瘤细胞系的生长具有抑制作用。研究证明, IP_6 对肝癌细胞生长的半数抑制浓度较低, 较小剂量下即可产生较强的生长抑制作用[5]。目前国内外对 IP_6 抗肝癌的作用虽有所认识, 但对其作用机制尚不十分清楚。本实验将不同浓度的 IP_6 体外作用于人肝癌细胞系 HepG2, 观察 IP_6 对肝癌细胞凋亡的影响, 并探讨 caspase-3 及 Cyt-c 参与的线粒体通路在凋亡过程中的作用, 为 IP_6 抗癌药物的开发与应用提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞系　人肝癌细胞系 HepG2 购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心。

* **基金项目**: 山东省博士基金(2007BS03042)
作者单位: 1. 青岛大学公共卫生学院营养与食品研究所, 山东 青岛 266021; 2. 潍坊市疾病预防控制中心疾控科
作者简介: 刘敏(1987 -), 女, 山东滨州人, 硕士在读, 研究方向: 营养与疾病。
通讯作者: 宋扬, E-mail: qdsongyang@126.com
数字出版日期: 2014 - 9 - 1 15:43
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140901.1543.020.html

1.1.2　主要试剂　IP_6 粉剂(美国 Sigma 公司);改良杜氏伊格尔高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)及胎牛血清(美国 GIBCO 公司);Hoechst 33258 荧光染色试剂盒(上海碧云天生物公司);双染法细胞凋亡检测试剂盒(上海七海复泰生物技术有限公司);总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、Rnase-free Dnase I(北京天根生化科技有限公司);鼠抗人 Cyt-c 单抗、β-actin 鼠单抗、羊抗鼠二抗(美国 Santa 公司)。

1.2　*方法*

1.2.1　细胞培养及处理　HepG2 细胞培养于 DMEM 高糖培养基(含体积分数 0.10 的胎牛血清)中,置 37 ℃、体积分数 0.05 的 CO_2 培养箱培养。实验组为分别经 1.0、2.0、3.0 mmol/L 的 IP_6 作用 24 h 的 HepG2 细胞,对照组为未加 IP_6 培养相同时间的 HepG2 细胞。

1.2.2　Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞凋亡情况　将洁净的盖玻片置于 6 孔板底部,加入细胞悬液培养过夜,待细胞密度约为 80% 时,分别加入不同浓度的 IP_6 作用 24 h 后,加入 0.5 mL 的固定液固定 10 min,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗;加入 Hoechst 33258 荧光染色液 0.5 mL,避光染色 5 min,用 PBS 缓冲液冲洗;用抗荧光淬灭封片液封片,于荧光显微镜下观察并记录。

1.2.3　流式细胞仪 annexin-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率的变化　不同浓度的 IP_6 作用后培养 24 h,收集细胞,每个浓度组设 3 个平行样。用孵育缓冲液洗涤一次,加入 100 μL 的标记溶液,室温避光孵育 10 min,离心沉淀后用孵育缓冲液洗涤一次,然后加入荧光染液放于 4 ℃冰箱,避光 20 min 后用流式细胞仪分析。

1.2.4　流式细胞仪检测线粒体膜电位(ΔΨm)的变化　将 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,调整每孔细胞数为 1.0×10^5/L,分别加入不同浓度的 IP_6,每个浓度组设 3 个平行样。作用 24 h 后收集细胞,PBS 漂洗细胞 2 遍,加入罗丹明 rhodamine 123 染色液2 μL,震荡混匀,置于 37 ℃温箱中避光负载 30 min,每隔 5 min震荡一次,PBS 冲洗两遍,吹打成单细胞悬液,200 目尼龙网过滤,将样品加入流式细胞仪的样品室检测线粒体膜电位的变化。

1.2.5　RT-PCR 法检测细胞内 caspase-3 mRNA 的表达　不同浓度的 IP_6 作用后培养 24 h,收集细胞,每个浓度组设 6 个平行样,按试剂盒说明书提取细胞总 RNA,用总 RNA 4.0 μg 进行逆转录,合成的 cDNA 直接用于 PCR 扩增反应,按 caspase-3 引物序列(上海生工生物工程公司合成):上游:5′-TTCATCCAGTCGCTTTGTGCC-3′,下游:5′-GGTCAAAATGAGA-GGGAAATACAGT-3′,在 β-actin 做内参照条件下,检测 caspase-3 mRNA 的表达。

1.2.6　Western blot 检测 Cyt-c 蛋白的表达　不同浓度的 IP_6 作用后培养 24 h,收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加细胞裂解液于冰上裂解,4 ℃离心,取上清用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测待测样品的蛋白浓度。取 20 μL 待测蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并电转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用封闭液封闭,并置于摇床上震荡 3 h,加入相应的一抗、二抗孵育,显色后观察胶片上的条带情况。结果重复测量 3 次。

1.3　*统计分析*　采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm S$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。

2　结　果

2.1　Hoechst 33258　荧光染色法观察细胞凋亡情况,经 0.0 mmol/L IP_6 作用的细胞形态规则,核完整,染色质分布均匀。而经 1.0、2.0、3.0 mmol/L IP_6 作用的细胞,核染色质浓缩、凝集、着色明显增强,细胞核裂解,可见核破碎及凋亡小体,观察到细胞凋亡的现象。

2.2　*流式细胞仪 annexin-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率的变化*　对照组、1.0、2.0、3.0 mmol/L IP_6 作用于 HepG2 细胞 24 h 后细胞凋亡率分别为(1.4 ± 0.07)%、(2.1 ± 0.85)%、(6.1 ± 0.24)%、(11.8 ± 0.11)%;与对照组相比,IP_6 作用细胞后凋亡率均增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),并且随着 IP_6 浓度的增高,细胞凋亡率呈逐渐上升的趋势($P < 0.05$)。

2.3　*流式细胞仪检测线粒体膜电位(ΔΨm)变化(图 1)*　对照组、1.0、2.0、3.0 mmol/L IP_6 作用于 HepG2 细胞 24 h 后线粒体膜电位分别为(72.41 ± 0.16)、(60.19 ± 0.14)、(57.50 ± 0.17)、(47.22 ± 0.13);与对照组相比,各组线粒体膜电位值均有降低(F = 14 802.610, q = 101.531 ~ 209.237, P < 0.05),并且随着剂量的增加,线粒体膜电位随之下降,各剂量之间相比均有统计意义(q = 22.344 ~ 107.706, P < 0.05),具有明显的剂量依赖关系。

2.4　*RT-PCR 法检测细胞内 caspase-3 mRNA 的表达变化(图 2)*　PCR 产物经凝胶电泳鉴定,扩增片段特异性强,caspase-3 条带大小约 280 bp,β-action 条带大小约 564 bp,均与预期大小相符。对照组、1.0、2.0、3.0 mmol/L IP_6作用 24 h 后 HepG2 细胞 caspase-3 mRNA 表达的相对量分别为(0.436 ± 0.038)、(0.576 ± 0.077)、(0.694 ± 0.092)、(0.809 ± 0.066);与对照组相比,各 IP_6作用组 caspase-3 mRNA 表达均升高(F = 30.474, q = 3.406 ~ 9.103, P < 0.05),且具有剂量效应关系(q = 2.803 ~ 5.697, P < 0.05)。

中国公共卫生 CPH

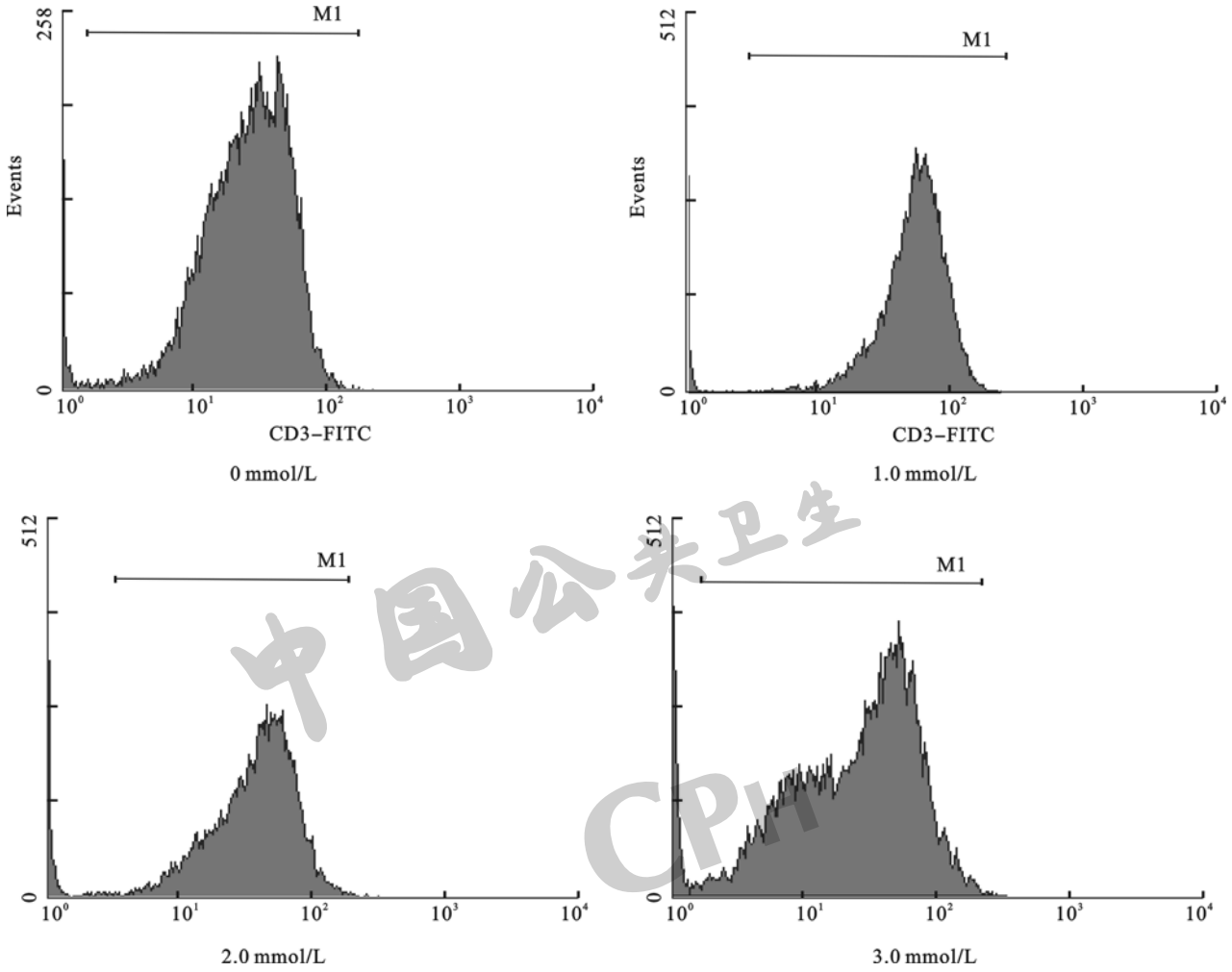
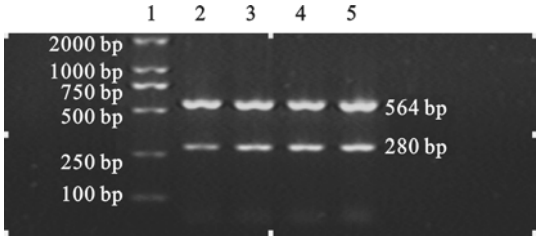
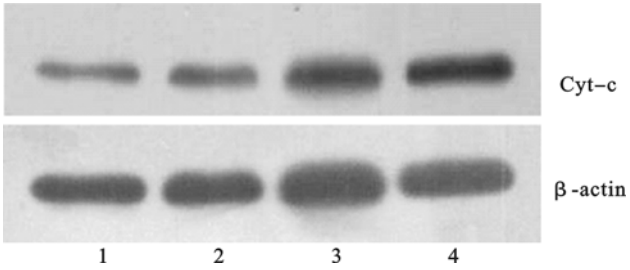


图 1　IP_6 作用 HepG2 细胞后线粒体膜电位图



注：1：DNA Marker；2 ~ 5：分别为 IP_6 浓度 0、1.0、2.0、3.0 mmol/L作用 24 h。

图 2　凝胶电泳显示 caspase-3 mRNA 表达



注：1：对照 2：1.0 mmol/L 3：2.0 mmol/L 4：3.0 mmol/L。

图 3　不同浓度 IP_6 对 HepG2 细胞内 Cyt-c 蛋白的表达变化

2.5　Western-blot 法检测细胞内 Cyt-c 蛋白表达情况（图 3）　对照组、1.0、2.0、3.0 mmol/L IP_6 作用于 HepG2 细胞后 Cyt-c 蛋白的表达分别（0.712 ± 0.016）、（0.913 ± 0.044）、（1.123 ± 0.080）、（1.296 ± 0.014）；与对照组比较，实验组 IP_6 处理 HepG2 细胞后均上调 Cyt－c 的表达（$F = 87.194$，$q = 5.246 \sim 15.218$，$P < 0.05$），并且随着作用浓度的增加，上调越明显（$q = 4.517 \sim 9.972$，$P < 0.05$）。

3　讨　论

细胞凋亡是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的、程序性的死亡过程，凋亡的发生是在机体的严密调控下发生的。很多疾病的发病都与凋亡有关。许多抗癌药物也是通过最终触发肿瘤细胞的凋亡通路从而抑制肿瘤生长。本实验应用 Hoechst 33258 荧光染色法和流式细胞仪观察细胞的凋亡情况，发现经 IP_6 作用后 HepG2 细胞出现明

显的凋亡形态,而随着浓度的增高,凋亡率也随之增高,说明 IP_6 能够诱导 HepG2 细胞发生凋亡。

细胞凋亡除了细胞核的变化外,细胞质中的变化也是细胞凋亡的重要组成部分,其中线粒体的表现最为明显。线粒体是细胞内重要的细胞器,参与细胞电子传递、三羧酸循环和氧化磷酸化,在细胞凋亡的发生过程中发挥重要作用。研究发现,在细胞凋亡早期可观察到线粒体膜电位下降、膜通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放、线粒体内与凋亡相关的基因产物释放,这些变化是诱导凋亡发生的重要事件[6-7]。文献报道,线粒体跨膜电位的耗散早于核酸酶的激活,早于磷酯酰丝氨酸暴露于细胞表面,是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,且线粒体跨膜电位一旦耗散,细胞即进入不可逆的凋亡过程[8]。本实验用 FCM 分析测定结果显示, IP_6 能降低 HepG2 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi m$),并且随着剂量的增加,线粒体膜电位随之下降。这提示, IP_6 引起的线粒体膜电势降低是 IP_6 诱导细胞凋亡的条件之一。线粒体膜电势的耗散常常伴随线粒体膜通透性转运孔(permeability transition pore, MPTP)开放,此时,细胞色素 C、凋亡诱导因子等从线粒体释放进入胞质。细胞色素 C 一旦释放可引起两种后果,一是当细胞色素 C 释放入胞质后,使得线粒体内细胞色素 C 缺乏,可引起呼吸链电子传递中断,导致细胞坏死。二是进入胞质的细胞色素 C 与 Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)结合,在 ATP/dATP 的介导下,启动凋亡级联反应,激活下游因子[9-10]。本实验结果显示,HepG2 细胞经不同浓度 IP_6 处理后,与对照组相比,各 IP_6 组细胞浆内 Cyt-c 表达均升高,并且随 IP_6 的作用浓度增加而明显加强,而且,当细胞浆内细胞色素 C 增加时,细胞 caspase-3 的表达随之升高,因此,caspase-3 的激活与细胞色素 C 的释放密切相关。

综上所述, IP_6 诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的机制可能是通过线粒体途径完成的。IP_6 作用于 HepG2 细胞后引起线粒体膜电位降低,从而增加了 HepG2 细胞的通透性,并促使线粒体内的细胞色素 C 释放入胞浆,激活 caspase-3 并进一步启动凋亡级联相关反应,诱导细胞发生凋亡,从而发挥抗肝癌的作用。

参考文献

[1] Vucenik I, Shamsuddin AKM. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate(IP_6) and inositol: from laboratory to clinic[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(11): 3778S-3784S.

[2] Deliliers GL, Servida F, Fracchiolla NS, et al. Effect of inositol hexaphosphate(IP_6) on human normal and leukaemic haematopoietic cells[J]. British Journal of Haematology, 2002, 117(3): 577-587.

[3] Ferry S, Matsuda M, Yoshida H, et al. Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFκB-mediated cell survival pathway[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(12): 2031-2041.

[4] 宋莉,冷传理,宋扬. 肌醇六磷酸诱导 HT-29 细胞凋亡及相关基因表达[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 419-420.

[5] Vucenik I, Shamsuddin AKM. Protection against cancer by dietary IP_6 and inositol[J]. Nutrition and Cancer, 2006, 55(2): 109-125.

[6] Hassan HT. Ajoene(natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy[J]. Leuk Res, 2004, 28(7): 667-671.

[7] Manjinder K, Chapla A, Rana P. Skin cancer chemopreventive agent, α-santalol, induces apoptotic death of human epidermoid carcinoma A431 cells via caspase activation together with dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome crelease[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 369-380.

[8] Alison M, Adrian F, Nicola E, et al. The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria[J]. FASEB J, 2005, 19(8): 1012-1014.

[9] Liu J, He H, Zhang Z, et al. Mitochondria play a role in the development of non-apoptotic programmed cell death of neutrophils induced by ONO-AE-248[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(6): 447-453.

[10] Sakamoto T, Kondo K, Kashio A, et al. Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c mediated caspase-3 activation pathway[J]. Journal of Neuroscience Research, 2007, 85(3): 548-557.

收稿日期: 2014-04-03　　(吴少慧编辑　周欣琳校对)

中国公共卫生 CPH