

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.18.001
文章编号: 1005-8982 (2019) 18-0001-07

基础研究·论著

白杨素对 5-氟尿嘧啶诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的增敏机制研究*

宋秀道¹, 毛晨梅², 马锦²

(1. 南京中医药大学附属苏州医院, 江苏 苏州 215009; 2. 苏州大学附属儿童医院药剂科, 江苏 苏州 215025)

摘要: **目的** 探讨白杨素对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的增敏作用。**方法** 白杨素单独或联合 5-FU 作用 Bel-7402 细胞, 用 MTT 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡与周期分布变化; Western blotting 检测 Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白。**结果** 50 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素作用 Bel-7402 细胞 48 h 呈浓度依赖性的抑制细胞活力, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素组细胞存活率为 (82.261 \pm 7.793) %。100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素单独作用 24 h 对 Bel-7402 细胞活力和凋亡均无影响 ($P > 0.05$)。与空白对照组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素作用 24 h 后, 不同浓度 5-FU (12.5、25.0 及 50.0 $\mu\text{g/ml}$) 作用 48 h 对 Bel-7402 细胞活力的抑制作用增强 ($P < 0.05$); 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 诱导 Bel-7402 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$); G2/M 期细胞比例升高 ($P < 0.05$); 促凋亡蛋白 Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$); 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下调 ($P < 0.05$)。**结论** 白杨素增强 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡, 其机制可能与线粒体凋亡通路激活有关。

关键词: 肝肿瘤; 5-氟尿嘧啶; 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R735.7; R965

文献标识码: A

Chrysin sensitizes 5-fluorouracil-induced apoptosis in human liver cancer Bel-7402 cells*

Xiu-dao Song¹, Chen-mei Mao², Jin Ma²

(1. Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu 215009, China; 2. Department of Pharmacy, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215025, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chrysin pretreatment on 5-fluorouracil (5-FU) -induced apoptosis human liver cancer cells. **Methods** Bel-7402 cells were treated with chrysin alone or jointly treated with 5-FU. The cell viability was assessed by MTT assay, the cell apoptosis and cell cycle were determined by flow cytometry (FCM) and the protein expressions of Bcl-2, Bax, Bad, and Cleaved Caspase-3 were analyzed by western blotting. **Results** Treatment of Bel-7402 cells induced dose-dependent cytotoxicity from 50 to 250 $\mu\text{mol/L}$ chrysin for 48 h and (82.261 \pm 7.793) % of the cell viability rate in the 100 $\mu\text{mol/L}$ chrysin group. The cell viability and apoptosis were no significantly different in Bel-7402 cells treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ chrysin for 24 h alone comparing with the

收稿日期: 2019-03-29

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81801559); “科教强卫工程”江苏省青年医学人才 (No: QNRC2016259); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目 (No: KJXW2016017)

[通信作者] 马锦, E-mail: majin0912@163.com; Tel: 6512-80692103

control group ($P > 0.05$). Compared with control group, after the pretreatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ chrysin for 24h, the cytotoxicity was enhanced by 5-FU (12.5, 25.0, and 50.0 $\mu\text{g/ml}$) to Bel-7402 cells ($P < 0.05$); the rate of 5-FU-induced apoptosis was increased in 25.0 $\mu\text{g/ml}$ group ($P < 0.05$); accumulation of Bel-7402 cells in the G2/M phase was increased ($P < 0.05$); the expressions of apoptotic protein Cleaved Caspase-3, Bax, and Bad upregulated ($P < 0.05$); the protein level of antiapoptotic protein Bcl-2 downregulated ($P < 0.05$). **Conclusions** Chrysin sensitizes 5-FU-induced apoptosis in Bel-7402 cells, which may be closely associated with the activation of mitochondrial apoptosis pathway.

Keywords: liver neoplasms; fluorouracil; cells; apoptosis

白杨素是黄芩、南枣酸及木蝴蝶等中药的活性成分,也是一种广泛存在于蜂胶、蜂蜜、西番莲蓝莓及其他膳食植物提取物中的黄酮类化合物,具有多种药理作用,且不良反应小,毒性低^[1]。在多种肿瘤细胞系和动物肿瘤模型中,白杨素具有抗肿瘤与化疗增敏作用^[2-3]。本研究通过白杨素增强 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的诱导作用,提高 5-FU 化疗的敏感性,减少 5-FU 的使用量与毒副作用,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 人肝癌 Bel-7402 细胞株由苏州大学生命科学学院惠赠,白杨素(纯度 99%)和 5-FU(纯度 99%)购自北京百灵威科技有限公司,MTT 购自美国 Sigma 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、胎牛血清及 β -actin 单克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司,DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司,0.25% 胰蛋白酶液购自上海闪晶生物公司,Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司,碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液购自美国 Sigma 公司,苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)裂解液购自上海源聚生物科技有限公司,ECL Plus 超敏发光液购自北京 Solarbio 公司,山羊抗兔二抗购自美国 CMCTAG 公司,B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bcl-2 相关死亡启动因子(Bcl-2 associated death promoter, Bad)及半胱氨酸蛋白酶蛋白-3(cysteine specific proteinase 3, Caspase-3)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 仪器 全自动酶标仪(550 型)和垂直电泳

仪(Mini-P3)购自美国 Bio-Rad 公司,MoFlo XDP 型超速流式细胞分选系统购自美国 Beckman Coulter 公司,DY CZ-40B 型转膜仪购自北京六一仪器厂,Centrifuge 5810R 冷冻高速离心机购自德国 Eppendorf 公司,AlphaImager HP 化学发光成像系统购自美国 ProteinSimple 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞活力人肝癌 Bel-7402 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 5% 二氧化碳 CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度条件的恒温培养箱中传代培养。取对数生长期人肝癌 Bel-7402 细胞制成细胞悬液,调整细胞密度并接种于 96 孔细胞培养板($1.2 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ 个/孔),于恒温培养箱中孵育 24 h 后,吸出培养液,每孔加入 100 μl 白杨素的培养基(终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$),空白对照组不加药;培养 24 h 后,吸出培养液后,加入含 5-FU 终浓度为 0.0、12.5、25.0 及 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养基作用 48 h,每组设 6 个复孔。每组依次加入白杨素终浓度为 50、100、150、200 及 250 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基作用 48 h,空白对照组不加药。继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h 后,吸弃上清液,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min 以使结晶物充分溶解,测定 490 nm 处吸光度(optical density, OD)值。计算各组细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 OD/空白对照组 OD $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡与周期 取对数生长期人肝癌 Bel-7402 细胞制成细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml,接种于 6 孔细胞培养板,2 ml/孔。于恒温培养箱中孵育过夜后,加入含 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素培养基(空白对照组为正常培养基)作用 24 h 后,吸出培养液,每孔加入 25 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 作用 48 h;然后用 0.25% 胰酶(不含乙二胺四乙酸)

消化收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗 2 遍。设立白杨素单独组 (100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素)、5-FU 单独组 (25 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU)、白杨素联合 5-FU 组 (100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素 +25 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU)。细胞凋亡检测: 先加 105 μl 含 Annexin V-FITC 的结合缓冲液重悬细胞, 混匀后室温避光染色 10 min, 再加 5 μl PI 染液, 室温避光染色 5 min, 流式细胞仪上样检测 (激发波长 / 发射波长为 488 nm/530 nm), 获得细胞凋亡率, 实验重复 3 次。细胞周期检测: 流式管内缓慢加入 -20°C 预冷的 70% 乙醇, 重新悬浮细胞, 避光 30 min, 4°C 条件下 PBS 洗涤后以 1 000 r/min 离心 5 min, 加入 500 μl PI 工作液, 室温避光 30 min, 用流式细胞仪进行检测, 获得各组细胞有关增殖周期时相的数据, 实验重复 3 次。

1.2.3 Western blotting 检测蛋白表达 取对数生长期人肝癌 Bel-7402 细胞制成细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^5 个 /ml, 接种于 6 孔细胞培养板, 2 ml/孔, 于恒温培养箱中孵育过夜后, 加入含 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素培养基 (对照组为正常培养基) 作用 24 h 后, 吸出培养液, 每孔加入 25 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 作用 48 h; 然后用 0.25% 胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 冷 PBS 漂洗 1 遍, 收集细胞。收集的细胞加入 1 mmol/L PMSF 裂解液 100 μl , 吹打均匀置于冰上裂解 30 min, 4°C 、12 000 r/min 离心 30 min, 取蛋白上清液, BCA 法检测蛋白浓度, 剩余蛋白与上样缓冲液按比例混匀, 沸水浴 5 min, -80°C 保存。在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行蛋白分离, 4°C 条件下转至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 加入一抗, 4°C 摇床孵育过夜。TBST 洗涤 4 次, 加入相应的二抗, 孵育 2 h 后, TBST 洗 4 次, ECL 化学发光显色, 成像系统照相, 用 Image-J 软件进行图片分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或析因设计的方差分析, 进一步两两比较用 Turkey's 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 两组不同浓度人肝癌 Bel-7402 细胞活力的抑制作用 ($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	0.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	25.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU	50.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU
空白对照组	100.000 \pm 0.000	88.983 \pm 1.414	71.442 \pm 2.014 ^①	50.224 \pm 5.323 ^①
100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素组	90.694 \pm 4.426	71.644 \pm 3.816 ^②	47.116 \pm 6.117 ^②	34.214 \pm 7.637 ^②

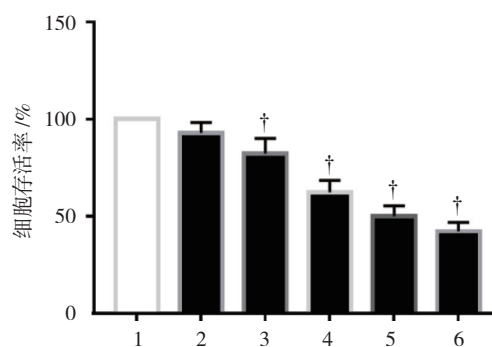
注: ①与 0.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 比较, $P < 0.05$; ②与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 白杨素增强 5-FU 对人肝癌 Bel-7402 细胞活力的抑制作用

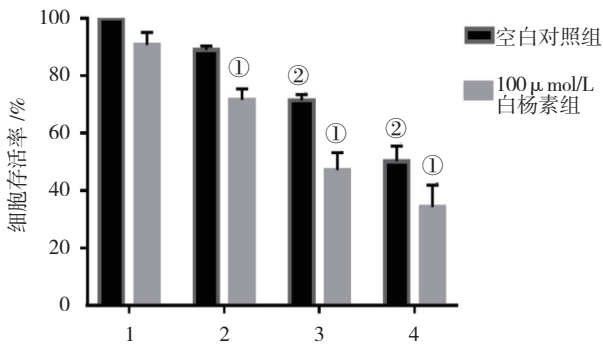
MTT 法筛选实验显示, 白杨素在 0、50、100、150、200 及 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下作用肝癌 BEL-7402 细胞 48 h, 细胞存活率分别为 (100.00 \pm 0.000) %、(92.982 \pm 5.313) %、(82.261 \pm 7.793) %、(62.423 \pm 6.082) %、(50.022 \pm 5.454) % 和 (42.372 \pm 4.564) %, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=56.724$, $P=0.000$); 白杨素浓度为 100、150、200 及 250 $\mu\text{mol/L}$ 时肝癌 BEL-7402 细胞的存活率低于空白对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素) ($P < 0.05$)。见图 1。

将 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理人肝癌 Bel-7402 细胞 24 h 后不出现细胞活力抑制作用的剂量用于研究白杨素对 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡是否有增强作用。各组细胞存活率比较, 经析因设计的方差分析, 处理因素白杨素的主效应比较, 差异有统计学意义 ($F=159.124$, $P=0.000$); 处理因素 5-FU 的主效应比较, 差异有统计学意义 ($F=81.933$, $P=0.000$); 两者交互作用比较, 差异无统计学意义 ($F=2.768$, $P=0.0756$)。无论是否进行白杨素预处理, 人肝癌 Bel-7402 细胞活力随 5-FU 浓度增加而降低。100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 24 h 能增强 5-FU 对人肝癌 Bel-7402 细胞活力的抑制作用。见表 1 和图 2。



1: 空白对照组; 2: 50 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素; 4: 150 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素; 6: 250 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素。
†与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度白杨素作用人肝癌 Bel-7402 细胞 48 h 后的细胞活力 ($\bar{x} \pm s$)



1: 0.0 μmol/L 5-FU; 2: 12.5 μmol/L 5-FU; 3: 25.0 μmol/L 5-FU; 4: 50.0 μmol/L 5-FU。①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与 0.0 μg/ml 5-FU 比较, $P < 0.05$ 。

图 2 两组不同浓度 5-FU 作用人肝癌 Bel-7402 细胞的存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 白杨素增强 5-FU 对人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的诱导作用

空白对照组细胞凋亡率为 (4.15 ± 0.88) %、

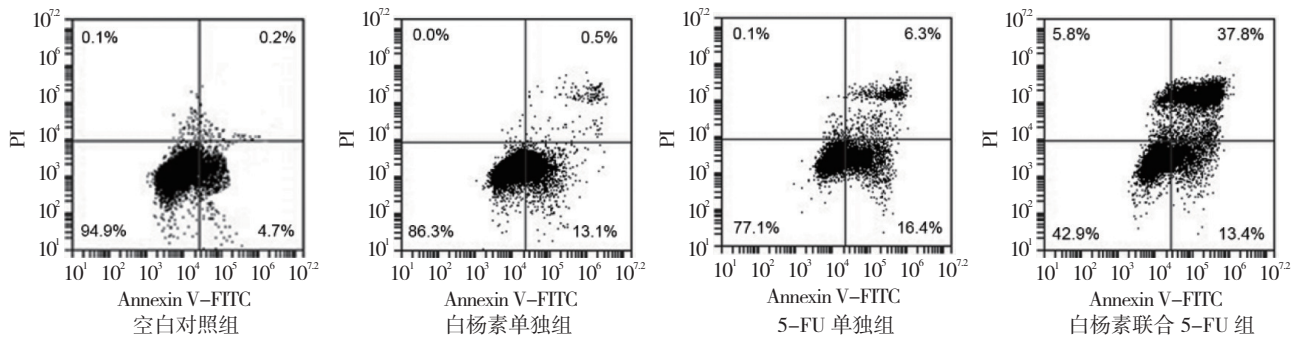
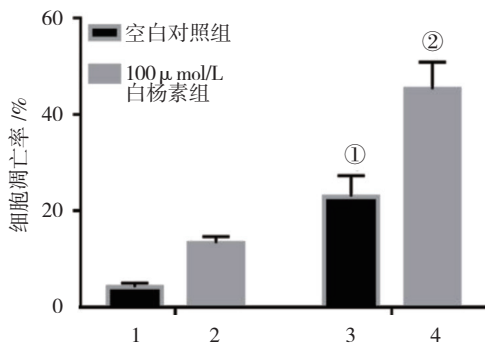


图 3 各组流式细胞仪检测结果



1: 空白对照组; 2: 白杨素单独组; 3: 5-FU 单独组; 4: 白杨素联合 5-FU 组。①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与白杨素单独组及 5-FU 单独组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

G2/M 期: (3.66 ± 0.68) %; 白杨素单独组 [(G0/G1 期: (80.92 ± 4.34) %, G2/M 期: (8.06 ± 1.05) %]; 5-FU 单独组 [(G0/G1 期: (73.54 ± 5.49) %, G2/M 期:

白杨素单独组为 (13.32 ± 1.33) %、5-FU 单独组为 (22.98 ± 4.32) %、白杨素联合 5-FU 组为 (45.22 ± 5.65) %。各组细胞凋亡率比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 70.234$, $P = 0.000$); 5-FU 单独组细胞凋亡率较空白对照组高 ($P < 0.05$); 白杨素单独组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 白杨素联合 5-FU 组细胞凋亡率较 5-FU 单独组和白杨素单独组高 ($P < 0.05$)。100 μmol/L 白杨素预处理 24 h 可增强 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用。见图 3、4。

2.3 白杨素增强 5-FU 对人肝癌 Bel-7402 细胞 G2/M 期阻滞的诱导作用

用 PI 单染法检测人肝癌 Bel-7402 细胞周期分布情况, 空白对照组 [G0/G1 期: (85.35 ± 2.61) %,

(12.67 ± 2.28) %]; 白杨素联合 5-FU 组 [(G0/G1 期: (55.47 ± 3.69) %, G2/M 期: (26.16 ± 2.17) %]。各组人肝癌 Bel-7402 细胞 G0/G1 期细胞数比较, 经析因设计的方差分析, 处理因素白杨素主效应比较, 差异有统计学意义 ($F = 60.012$, $P = 0.000$); 处理因素 5-FU 主效应比较, 差异有统计学意义 ($F = 21.881$, $P = 0.0016$); 两者交互作用比较, 差异有统计学意义 ($F = 8.042$, $P = 0.022$)。各组细胞 G2/M 期细胞数比较, 经析因设计的方差分析, 处理因素白杨素的主效应比较, 差异有统计学意义 ($F = 192.212$, $P = 0.000$); 处理因素 5-FU 的主效应比较, 差异有统计学意义 ($F = 83.693$, $P = 0.000$); 两者交互作用比较, 差异有统计学意义 ($F = 21.610$, $P = 0.0016$)。100 μmol/L 白杨素预处理 24 h 可增强 5-FU 对人肝癌 Bel-7402 细胞发生 G2/M 期阻滞。见图 5、6。

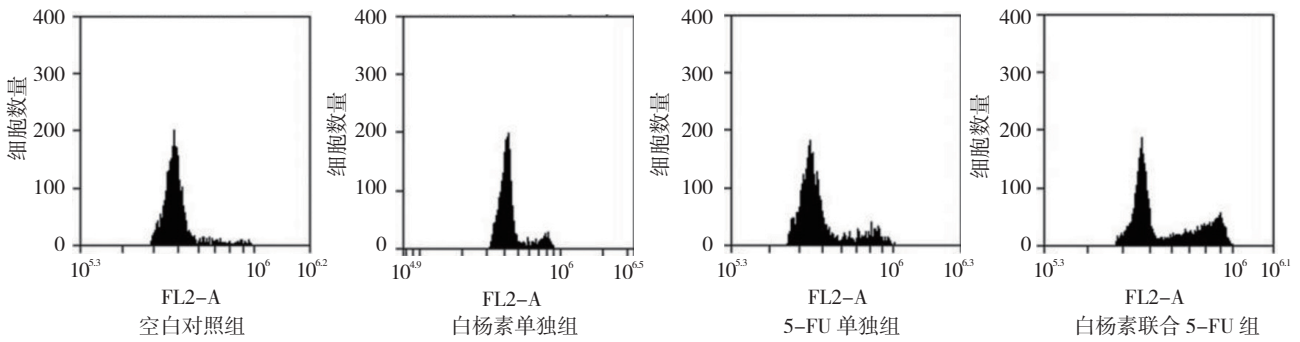
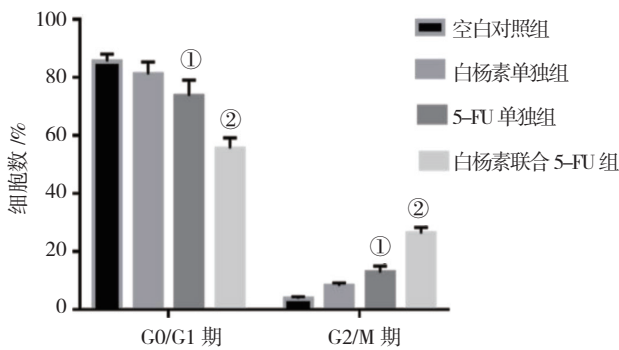


图 5 各组人肝癌 Bel-7402 细胞周期分布情况



①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与白杨素单独组及 5-FU 单独组比较, $P < 0.05$ 。

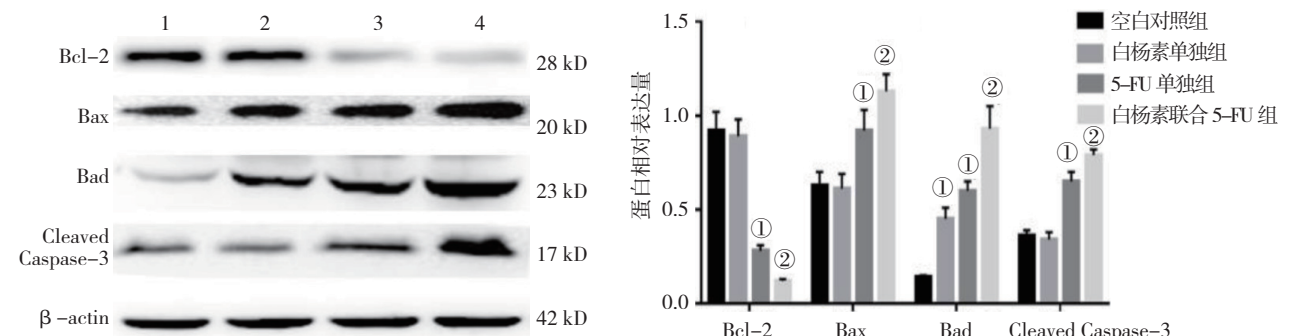
图 6 各组人肝癌 Bel-7402 细胞 G2/M 期的阻滞诱导作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 白杨素对 5-FU 处理人肝癌 Bel-7402 细胞 Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

各组 Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 白杨素联合 5-FU 组 Bcl-2 蛋白相对表达量较白杨素单独组和 5-FU 单独组低 ($P < 0.05$), 白杨素联合 5-FU 组 Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量较白杨素单独组和 5-FU 单独组高 ($P < 0.05$)。Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 表达增强或减弱可能是白杨素预处理 24 h 加强 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡作用的机制之一。见表 2 和图 7。

表 2 各组 Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bad	Cleaved Caspase-3
空白对照组	0.924 ± 0.13	0.632 ± 0.072	0.142 ± 0.011	0.363 ± 0.032
白杨素单独组	0.893 ± 0.091	0.613 ± 0.083	0.453 ± 0.062	0.344 ± 0.041
5-FU 单独组	0.284 ± 0.032	0.921 ± 0.11	0.62 ± 0.051	0.652 ± 0.053
白杨素联合 5-FU 组	0.127 ± 0.012	1.132 ± 0.092	0.933 ± 0.124	0.792 ± 0.034
F 值	77.122	22.753	59.574	87.425
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 空白对照组; 2: 白杨素单独组; 3: 5-FU 单独组; 4: 白杨素联合 5-FU 组。①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与白杨素单独组及 5-FU 单独组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 各组 Bcl-2、Bax、Bad 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界发病率较高的恶性肿瘤之一, 位于癌症相关致死率的第 2 位^[4]。早期 HCC 患者治疗以手术切除和肝脏移植辅以化疗为主, 一般可取得满意疗效; 但对于手术后复发、晚期有转移及不能耐受手术的患者, 化疗已成为其治疗主要手段^[5]。5-FU 是临床用于肝癌化疗的一线药物。在过去的 20 年中, 5-FU 临床疗效肯定, 但长期大剂量使用 5-FU 产生的不良反应和耐药性已影响其临床疗效, 阻碍其进一步应用^[6-7]。因此, 目前迫切的任务是寻找新的化合物来增强其化疗敏感性, 为临床解决肿瘤耐药性提供治疗方案。

诱导恶性肿瘤细胞凋亡是现代癌症治疗的主要目标之一。5-FU 等化疗药物发挥化疗药物毒性的最初作用形式是诱导肿瘤细胞发生凋亡, 而细胞凋亡途径异常是 5-FU 发生耐药的重要机制之一^[8]。一般在临床肿瘤化疗中, 为克服耐药对化疗效果的影响, 提倡联合用药。流行病学研究证明, 大量黄酮类化合物的摄入会降低多种肿瘤的发生风险^[9-10]。黄酮类化合物因而被认为可用于肿瘤预防或临床与化疗药物联合应用。白杨素作为一种具有良好临床应用前景的天然黄酮类化合物, 已被证实可直接抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。近年来研究也报道, 白杨素可与阿霉素^[12]、顺铂^[13]等不同化疗药物协同诱导肿瘤细胞凋亡与抑制肿瘤细胞增殖。本实验结果显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 24 h, 人肝癌 Bel-7402 细胞活力、凋亡和周期分布情况未受到影响。该浓度下的白杨素预处理 24 h 可增强 5-FU 抑制人肝癌 Bel-7402 细胞活力的作用, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理人肝癌 Bel-7402 细胞 24 h 后与 12.5 和 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 联用, 人肝癌 Bel-7402 细胞活力抑制效果分别优于 25 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 单用, 表明白杨素与 5-FU 联用的体外抑制人肝癌 Bel-7402 细胞活力具有协同效应。100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 24 h 可增强 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞凋亡的作用。细胞周期 G2/M 期转换在细胞周期进展及凋亡启动中起重要作用。本实验结果表明, 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 24 h 可增强 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞 G2/M 期阻滞的作用, 影响 DNA 复制, 使癌细胞分裂受阻, 从而抑制细胞增殖。因此, 白杨素可提高化疗药物 5-FU 促进肝癌细胞凋亡的作用, 具有作为化疗增敏剂的应用前景。

目前细胞凋亡因启动阶段的不同可分为内源性线粒体通路和外源性死亡受体通路。*Bcl-2* 家族基因是线粒体凋亡途径的重要调控因子, 通过调控线粒体膜的通透性, 促进线粒体释放细胞色素 C 到胞质, 启动 Caspase 级联反应, 如激活下游的凋亡效应因子 Caspase-3, 从而诱导细胞发生凋亡^[14-15]。*Bcl-2* 高表达时, *Bcl-2* 可与 *Bax* 形成异源二聚体, 抑制细胞凋亡; *Bax* 或 *Bad* 高表达时, 细胞对死亡信号敏感可促发细胞凋亡过程。肝癌发生、发展过程中 *Bcl-2* 家族抑凋亡基因 *Bcl-2*、促凋亡基因 *Bax* 与 *Bad* 等表达异常, 从而打破体内凋亡 / 抗凋亡的平衡, 抑制多种化疗药物诱导的细胞凋亡, 与肝癌对化疗的耐药发生有关^[16]。本实验结果显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素预处理 24 h 可使 5-FU 诱导人肝癌 Bel-7402 细胞 Cleaved Caspase-3、*Bax* 及 *Bad* 蛋白表达水平上调, 人肝癌 *Bcl-2* 蛋白表达水平下调, 表明白杨素预处理后, 5-FU 诱导的人肝癌 Bel-7402 细胞线粒体凋亡途径更为活跃, 促进细胞凋亡。白杨素对 5-FU 诱导 Bel-7402 细胞凋亡的增敏作用是否还与外源性死亡受体通路有关, 有待进一步研究。

综上所述, 白杨素可增强 5-FU 抑制人肝癌 Bel-7402 细胞活力和诱导细胞凋亡的作用, 下调 *Bcl-2* 蛋白表达与上调 *Bax* 和 *Bad* 蛋白表达使线粒体凋亡通路激活可能是其重要的分子机制之一。白杨素对 *Bcl-2* 家族表达水平的调控是否与核转录因子 (NF- κ B)、非编码 RNA (microRNA) 等有关, 值得进一步研究。此外, 笔者也将进一步研究白杨素是否能影响人肝癌 Bel-7402 细胞对 5-FU 的化疗敏感性。

参 考 文 献:

- [1] MANI R, NATESAN V. Chrysin: sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action[J]. *Phytochemistry*, 2017, 145: 187-196.
- [2] KASALA E R, BODDULURU L N, MADANA R M, et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives[J]. *Toxicology Letters*, 2015, 233(2): 214-225.
- [3] 冷超, 韦兵, 莫靛, 等. 白杨素抑制 H1299 细胞系肺癌干细胞样细胞肿瘤球形成 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(25): 30-33.
- [4] AHMED-MOHAMMED H A, YANG J D, GIAMA N H, et al. Factors influencing surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis[J]. *Liver Cancer*, 2017, 6(2): 126-136.
- [5] LIU C Y, CHEN K F, CHEN P J. Treatment of liver cancer[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(9): 1110-1111.
- [6] LONGLEY D B, HARKIN D P, JOHNSTON P G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. *Nature Reviews*

- Cancer, 2003, 3(5): 330-338.
- [7] CUESTAS M L, OUBI J R, MATHET V L. Hepatocellular carcinoma and multidrug resistance: past, present and new challenges for therapy improvement[J]. World Journal of Pharmacology, 2015, 4(1): 96-116.
- [8] GU W, FANG F F, LI B, et al. Characterization and resistance mechanisms of a 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell line[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13(9): 4807-4814.
- [9] ROMAGNOLO D F, SELMIN O I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence[J]. Journal of Nutrition in Gerontology & Geriatrics, 2012, 31(3): 206-238.
- [10] RAMOS S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(7): 427-442.
- [11] KHOO B Y, CHUA S L, BALARAM P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(5): 2188-2199.
- [12] GAO A M, KE Z P, SHI F, et al. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway[J]. Chemico-Biological Interactions, 2013, 206(1): 100-108.
- [13] LI X, HUANG J M, WANG J N, et al. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of HepG2 cells by up-regulating p53[J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 232: 12-20.
- [14] WONG W W, PUTHALAKATH H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. IUBMB Life, 2008, 60(6): 390-397.
- [15] PHILCHENKOV A, ZAVELEVICH M, KROCZAK T J, et al. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities[J]. Experimental Oncology, 2004, 26(2): 82-97.
- [16] MA S, CHEN G G, LAI P B. Bcl-2 family members in Hepatocellular carcinoma (HCC) -mechanisms and therapeutic potentials apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy[J]. Springer, Dordrecht, 2009: 219-235.

(唐勇 编辑)