

# 漆黄素通过调节 Apaf-1, ERK 和 COX-2 信号通路诱导 人宫颈癌细胞凋亡

刘立群<sup>1</sup>, 郭微<sup>2\*</sup>, 余文丹<sup>2</sup>, 游泽山<sup>1</sup>

(1.中山大学附属第一医院黄埔医院, 广东 广州 510700; 2.大连医科大学肿瘤中心, 辽宁 大连 116044)

**摘要:**【目的】探讨天然产物漆黄素抗宫颈癌细胞生长及其分子作用机制。【方法】以人宫颈癌 HeLa 细胞为模型, 将漆黄素作用于细胞, 利用 MTT、PI 以及 Annexin V 方法观察细胞的生长和凋亡情况, 通过 Western blot、RT-PCR 以及免疫荧光方法分别考察凋亡相关信号通路的关键蛋白 caspase 和 Apaf-1 的表达水平和活性变化, ERK/MAPK 信号通路中 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平的变化, 以及 COX-2 蛋白和 PGE2 的表达水平的变化, 并通过使用小分子抑制剂和 RNA 干扰技术等方法进一步分析上述关键蛋白在漆黄素抗肿瘤细胞生长中的作用。【结果】漆黄素(当作用浓度为 80~200  $\mu\text{mol/L}$  时)可显著抑制 20%~48% HeLa 细胞增殖和(当作用浓度为 100~200  $\mu\text{mol/L}$  时)显著诱导细胞凋亡; 使 Caspase-3 和 Caspase-9 的蛋白酶活性分别增加 20%~50% 和 22%~38%; 促进 Apaf1 蛋白的表达; 能有效诱导 Cytochrome-C 的释放; 降低 ERK/MAPK 信号通路中 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平; 与 ERK 抑制剂或 siRNA 联合使用可抑制 60%~70% 细胞增殖; 减少 COX-2 蛋白的表达; 明显减少 PGE2 的产生, 仅 1800~2600 pg/mL; 减少 p300、NF- $\kappa$ B、p50、p65 与 COX-2 启动子的结合, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。【结论】漆黄素通过调控 Apaf-1、ERK 和 COX-2 的分子机制来诱导宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡及抑制细胞生长。

**关键词:**漆黄素; caspase; Apaf-1; ERK; COX-2; 宫颈癌 HeLa 细胞

**中图分类号:**R73-3      **文献标志码:**A      **文章编号:**1672-3554(2013)01-0075-08

## Fisetin Simultaneously Targets Apaf-1, ERK, and COX-2 Signaling Leading to Growth Inhibition and Apoptosis in Human Cervical Carcinoma Cell In Vitro

LIU Li-qun<sup>1</sup>, GUO Wei<sup>2\*</sup>, YU Wen-dan<sup>2</sup>, YOU Ze-shan<sup>1</sup>

(1.The First Affiliated Hospital-Huangpu Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510700, China;

2.Dalian Medical University Cancer Center, Dalian 116044, China)

**Abstract:** 【Objective】 To identify the molecular mechanisms by which fisetin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in HeLa cells. 【Methods】 HeLa cells were treated with fisetin, and the effect of fisetin on cell growth and apoptosis was observed by MTT, PI, and Annexin V. The expression level and activity changes of apoptotic key proteins, caspase, and Apaf-1, the phosphorylated level of ERK1/2, and the expression of COX-2 and PGE2 were detected by Western blot, RT-PCR, immunofluorescence imaging, respectively. The inhibition by siRNA or inhibitors was used to confirm the function of above key proteins in fisetin-mediated antitumor effects. 【Results】 Fisetin, with a concentration of 80–200  $\mu\text{mol/L}$ , inhibited the proliferation at a rate of 20% to 48% and with a concentration of 100–200  $\mu\text{mol/L}$ , induced apoptosis of HeLa cell. It increased the activities of Caspase-3 and Caspase-9 at ranges of 20%~50% and 22%~38%, respectively, induced Apaf1 protein expression and cytochrome-C release. With the increase of the dosage, Fisetin inhibited the phosphorylation of ERK1/2 protein of the ERK MAPK signaling pathways. Combined with the ERK inhibitor or siRNA, it suppressed the proliferation at a rate of 60% to 70% and COX-2 protein expression of the HeLa cell. Also, it reduced PGE2 production to 1800 pg/mL-2600 pg/mL and abrogated the binding of p300, NF- $\kappa$ B, p50, and p65 to COX-2 promoter. Compared with the control groups, these differences were significant ( $P < 0.05$ ). 【Conclusions】 Fisetin induced apoptosis and proliferation inhibition by modulating the Apaf-1, ERK, and COX-2-dependent mechanisms in HeLa cell.

**Key words:** fisetin; caspase; Apaf-1; ERK; COX-2; cervical cancer cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1):75–82]

收稿日期:2012-07-30

基金项目:广东自然自然科学基金(S2011010003522)

作者简介:刘立群, 硕士, 主治医师, 研究方向:妇科, E-mail:liuliquwo@163.com; \* 通信作者:郭微, E-mail:luckyww1015@yahoo.com.cn

宫颈癌是在全世界妇女群体中最常见的恶性肿瘤之一。虽然新疗法和药物组合的引入提高了宫颈癌的预后,但由于其高转移性和化疗抗性,这种疾病仍然无法治愈<sup>[1]</sup>。因此迫切需要找到治疗宫颈癌的新疗法。随着越来越多的癌症化学预防剂的使用,探索化学预防剂抗肿瘤作用的分子机制将为抗癌药物的设计提供重要的线索和依据<sup>[2-4]</sup>。漆黄素(fisetina, FT)是一种天然的黄酮类化合物,研究显示,漆黄素在癌症治疗过程中具有化疗的潜力,它可以调节与细胞存活,增殖和凋亡相关的多种信号转导途径<sup>[5-7]</sup>。但漆黄素参与化疗的确切的分子作用机制尚未得到证实。推测漆黄素抑制肿瘤细胞增殖和诱导人宫颈癌细胞凋亡是通过调节多种信号通路来实现的。为了验证这一假说,在本研究中,评估了漆黄素对半胱天冬酶(Caspase), Apaf-1, 细胞色素 C (Cytochrome-C), ERK, MAPK, COX-2/PGE2 和 NF- $\kappa$ B/p300 信号的调节作用。研究结果揭示了漆黄素的新的作用机制,并且表明漆黄素在预防或治疗人宫颈癌中的潜在价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞培养和化学试剂

人宫颈癌细胞系来自美国菌种保藏中心(ATCC, Rockville, MD)。细胞培养在 DMEM (Invitrogen, carlsbad, CA) 培养基中,同时添加 100 mL/L 胎牛血清(FBS),必需氨基酸,100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。所有细胞均保持在 37°C,体积分数 5%的 CO<sub>2</sub>的湿润环境中。所有的实验均采用 60%汇合的细胞作为实验对象。漆黄素购自 Sigma 公司。ERK inhibitor-II (sc-203945) 购自 Santa Cruz Biotech。所有药物均溶于二甲基亚砷(DMSO)中,终浓度为 100 mmol/L,以小等份储存在-20°C,然后根据需要在细胞培养液中稀释。

### 1.2 Western blot 分析

细胞裂解液通过 4%~15%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)梯度胶(Bio-Rad, Hercules, CA)电泳分离并电转移至硝酸纤维素膜(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)上。蛋白印迹分别用抗 APAF-1, 磷酸化 ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), COX-2, NF- $\kappa$ B, 或 P300 (Santa Cruz

Biotech, Santa Cruz, CA)的抗体进行标记。蛋白条带最终通过增强化学发光(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)进行检测。

### 1.3 细胞活力分析

细胞活性通过 MTT (Roche Diagnosis, Indianapolis, IN)方法进行分析。简单来说,细胞被种在 96 孔板里(5000 cells/well),然后以不同剂量的漆黄素进行处理,72 h 后进行细胞活力检测。

### 1.4 细胞凋亡分析

分别采用 Annexin V 和 propidium iodide (PI) 染色法进行测定。简单地说,将细胞接种在 6 孔板里,然后用漆黄素处理细胞 48 h,然后用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 和流式细胞仪检测荧光标记的凋亡细胞。同样将漆黄素处理后的细胞用 10 g/L 多聚甲醛溶液固定细胞,700 mL/L 的乙醇处理,最后用 PBS 洗涤。再用 PI 染色法,并通过流式细胞仪检测 Sub-G1 凋亡细胞值。

### 1.5 RNA 干扰分析

靶向 Apaf-1 或 ERK1 基因的 siRNA 购自 Santa Cruz 公司。通过 Oligofectamine 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 转染双链 RNA 于事先接种于 96 孔 (5000 cells/well) 或 6 孔 (200,000 cells/well) 培养板的细胞中,作用 48 h 后,采用 Western blot 和 MTT 来分别检测细胞的蛋白表达和活力。

### 1.6 免疫荧光分析

以  $1 \times 10^5$  细胞/孔密度将细胞接种在载玻片上,并用漆黄素处理细胞 48 h,经 PBS 洗涤,用 10%中性缓冲骆驼蓬碱固定细胞。内源性过氧化物酶的活性经 3%过氧化氢和 10%的甲醇处理后淬灭,再用 0.1%的 Triton-X 和 1 g/L 柠檬酸钠透化细胞。分别用鼠源抗 Cyto-C 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA),以及用罗丹明标记的羊抗鼠 IgG (Santa Cruz) 先后孵育细胞,再用 4',6-diamidino-2-苯基吡啶 (DAPI) 进行细胞核染色,最后在荧光显微镜下观察细胞。

### 1.7 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

使用 Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 试剂盒抽提细胞的总 RNA,再通过 Superscript<sup>™</sup>-III kit (Invitrogen) 逆转录总 RNA 成 cDNA,并以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。以 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

### 1.8 Caspase 活性分析

细胞以  $4 \times 10^5$ /皿的密度接种在 60 mm 的培养皿中 24 h, 然后分别以漆黄素处理细胞, 48 h 后, 收获细胞, 制备细胞裂解物, 使用 ApoAlert 测定试剂盒(BD Biosciences)分析 caspase 活性, 蛋白酶活性以未经处理的细胞的酶活性的倍数来计算。

### 1.9 PGE2 分析

通过酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 来分析漆黄素处理过的细胞的培养液中 PGE2 的含量。

### 1.10 启动子活性分析

人 COX-2 基因的启动子区 (-891 至 +9) 以及它的缺失片段被重组到荧光素酶报告基因载体 PGL3 上。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 将重组后的载体转入细胞中, 通过荧光素酶报告基因的瞬时表达来检测启动子的活性。报告基因的表达水平以试剂盒来检测 (Promega, Madison, WI)。

### 1.11 通过链霉亲和素-琼脂糖亲和分析确定 DNA-蛋白的结合

NF- $\kappa$ B 和 p300 与 COX-2 的核心启动子探针的结合通过链霉亲和素-琼脂糖亲和分析来完成。生物素标记的 478 bp 的双链探针对应于 COX-2 启动子的序列 (-30 到 -508), 非相关的生物素标记的序列 5'-AGAGTGCTCACTACCCCTCTG-3' 用作对照探针。结合于 DNA 探针上的 NF- $\kappa$ B 和 P300 用 Western blot 来分析。

### 1.12 染色质免疫沉淀 (ChIP) 分析

ChIP 按照以前的方法来完成<sup>[20]</sup>。免疫沉淀复合物利用 cox-2 启动子的特异性引物 (5' primer, 709 -CTGTTGAAAGCAACTTAGCT -690, and 3' primer, 32-AGACTGAAAACCAAGCCCAT-51) 来进行 PCR 扩增, 得到的 678 bp 的产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离。

### 1.13 统计学分析

采用方差分析和 *t* 检验比较测试组和对照组样品的值。以  $P < 0.05$  为统计学有显著性差异。所有的统计分析使用 StatView 5.0 (Abacus Concepts, Inc., Keley, CA) 和 SAS 软件。所有的实验均重复 3 次, 计算其平均值和标准差。

## 2 结果

### 2.1 漆黄素阻断细胞增殖并诱导细胞凋亡

我们通过 MTT 法分析了漆黄素作用于 HeLa 细胞 72 h 后对细胞增殖的影响。结果表明, 当漆黄素的浓度在 80 ~ 200  $\mu$ mol/L 之间时, 它以浓度依赖性的方式显著抑制细胞增殖, 导致 HeLa 细胞 20% ~ 48% 的生长抑制 (图 1A)。

通过 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 和基于 propidium iodide (PI) 染色法的流式细胞仪检测漆黄素作用 HeLa 细胞 72 h 后诱导细胞凋亡的情况, 结果表明漆黄素可以以剂量依赖的方式显著增加细胞凋亡 (图 1B)。当处理浓度分别为 100  $\mu$ mol/L 和 200  $\mu$ mol/L 时, 凋亡出现的 Sub-G1 细胞群的诱导率分别为 16.4% 和 24.5% (图 1C)。

### 2.2 漆黄素诱导 caspase 活化和 Apaf1 表达以及 cytochrome C 的释放

漆黄素诱导的 HeLa 细胞凋亡与 caspases 通路激活的相关性显示, 漆黄素可以显著增加 caspase-3 和 caspase-9 的活性分别为 20% ~ 50% 和 22% ~ 38% (图 2A)。利用 Western blot 我们分析漆黄素作用 HeLa 细胞后对 Apaf-1 蛋白表达水平的影响, 结果显示, Apaf-1 蛋白的表达显著增加 (图 2B)。Apaf-1 特异性的 siRNA (si-Apaf-1) 瞬时转染 HeLa 细胞, 然后通过 TUNEL 流式细胞仪检测漆黄素诱导细胞凋亡的情况。采用非特异性 siRNA (si-Ctrl) 作为对照, si-Apaf-1 的转染显著下调了 Apaf-1 的表达, 并且显著减弱了漆黄素诱导的细胞凋亡 (图 2C)。

通过免疫荧光成像分析, 检测漆黄素处理的 HeLa 细胞中 Cyt-C 的亚细胞定位的变化, 如图 2D 所示, 200  $\mu$ mol/L 的漆黄素有效地促进 Cyt-C 从线粒体内膜空间释放进入胞浆。

### 2.3 漆黄素导致 ERK MAPK 信号通路的失活

Western blot 分析表明, 漆黄素作用于 HeLa 细胞后 ERK1/2 蛋白磷酸化水平呈剂量依赖性的下降, 而 ERK1/2 蛋白本身的表达水平则未受影响 (图 3A)。ERK 的选择性抑制剂对漆黄素介导的 HeLa 细胞的增殖阻断作用的影响中, 单独使用 ERK 选择性抑制剂 (SC-203945) (20  $\mu$ mol/L) 预处理细胞可以抑制细胞的增殖, 抑制剂与漆黄素联合使用则在一定程度上促进细胞增殖的抑制 (图 3B)。我们使用 ERK 特异性的 siRNA (si-ERK) 转染细胞来评估其对于漆黄素介导的细胞增殖的影响。与非特异性的对照 siRNA (si-Ctrl) 相比较, si-ERK (100 nmol/L) 的转染显著降低了 ERK 的蛋白

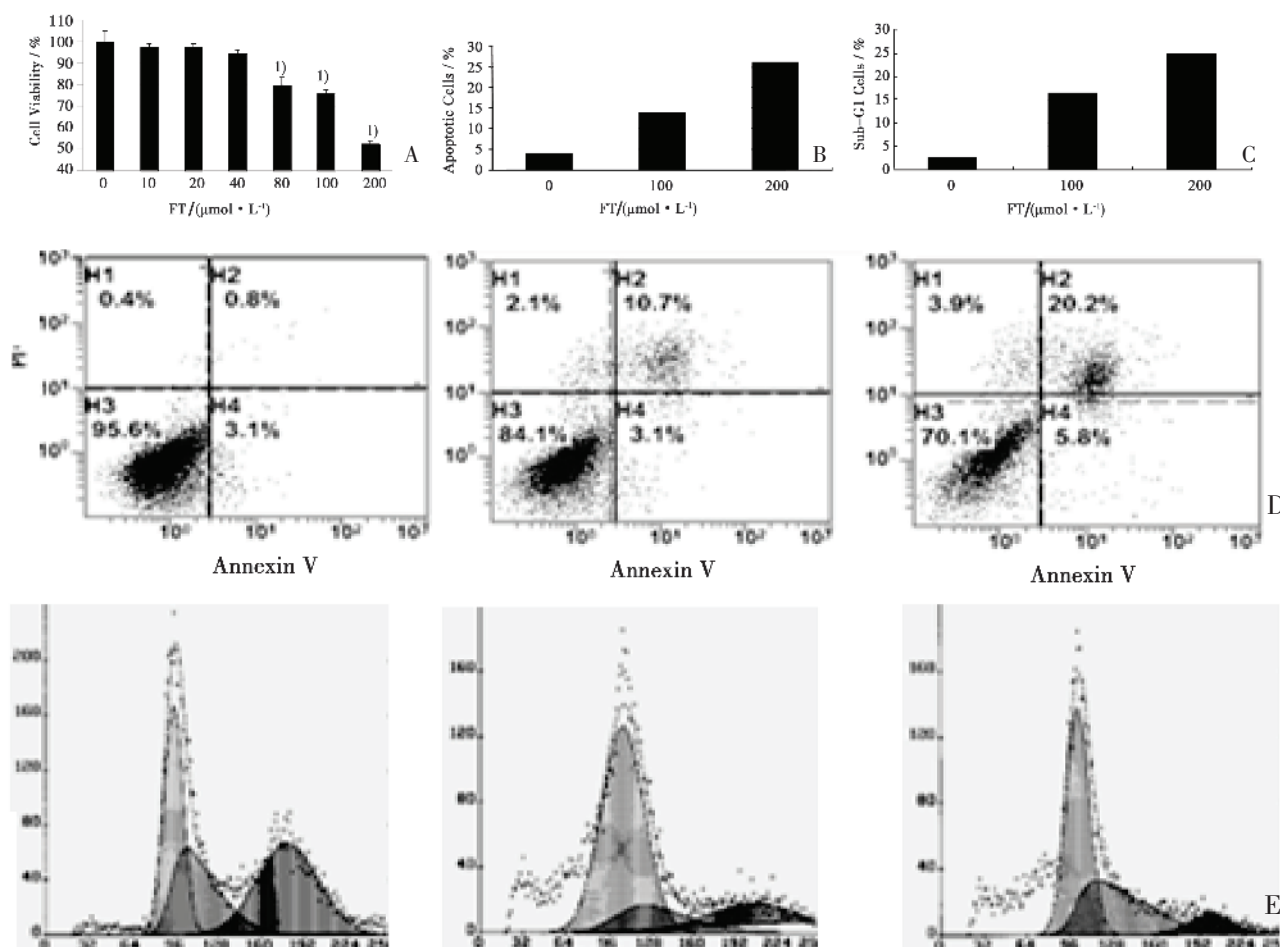


图 1 漆黄素抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡

Fig.1 Fisetin inhibited cell proliferation and induced apoptosis

Hela cells were treated with fisetin at the indicated doses. At 72 h after treatment, the cell viability was determined by MTT assay (A). Cells treated with vehicle control DMSO were used as the referent group with cell viability set at 100%. The percent cell viability in each treatment group was calculated relative to cells treated with vehicle control. The apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC-based (B,D) or PI-based (C,E) FACS analysis. The apoptosis are represented by relative percentages of Annexin V-FITC positive cells or by relative percentages of Sub-G1 cells versus that in DMSO-treated cells. The data are presented as mean  $\pm$  SD of three separate experiments. 1)  $P < 0.05$ , significant differences between treatment groups and control groups.

表达并抑制了细胞增殖 (图 3C)。漆黄素与 si-ERK 联合使用则稍微促进了细胞增殖的抑制 (图 3C)。

#### 2.4 漆黄素抑制 COX-2 的表达和 PGE2 的产生

我们用 Western blot 和 RT-PCR 在蛋白和 mRNA 水平进行 COX-2 表达检测,用酶联免疫吸附(ELISA)检测 PGE2 水平。如图 4 所示,漆黄素处理 Hela 细胞后,可以显著抑制细胞中 COX-2 mRNA 的水平 and COX-2 蛋白的表达 (图 4A),同时也可以以剂量依赖的方式显著减少 PGE2 的产生,当漆黄素的浓度在 100  $\mu\text{mol/L}$  到 200  $\mu\text{mol/L}$

之间时,为 1 800 pg/mL 到 2 600 pg/mL 而对照组 4 500 pg/mL(图 4B)。我们还用含有 900 bp(-891/+9)COX-2 启动子的 5' 侧链片段的荧光素酶表达载体转染 Hela 细胞来考察漆黄素对 COX-2 启动子活性的影响,结果表明,荧光素酶表达被漆黄素相应地抑制,且来呈剂量依赖性(图 4C),且荧光素酶表达被抑制的程度与 COX-2 蛋白和 mRNA 的抑制水平(图 4A)相一致。

#### 2.5 漆黄素阻断 NF- $\kappa$ B 和 p300 与 COX-2 启动子的结合

我们用生物素标记的 479 bp 的 COX-2 启动

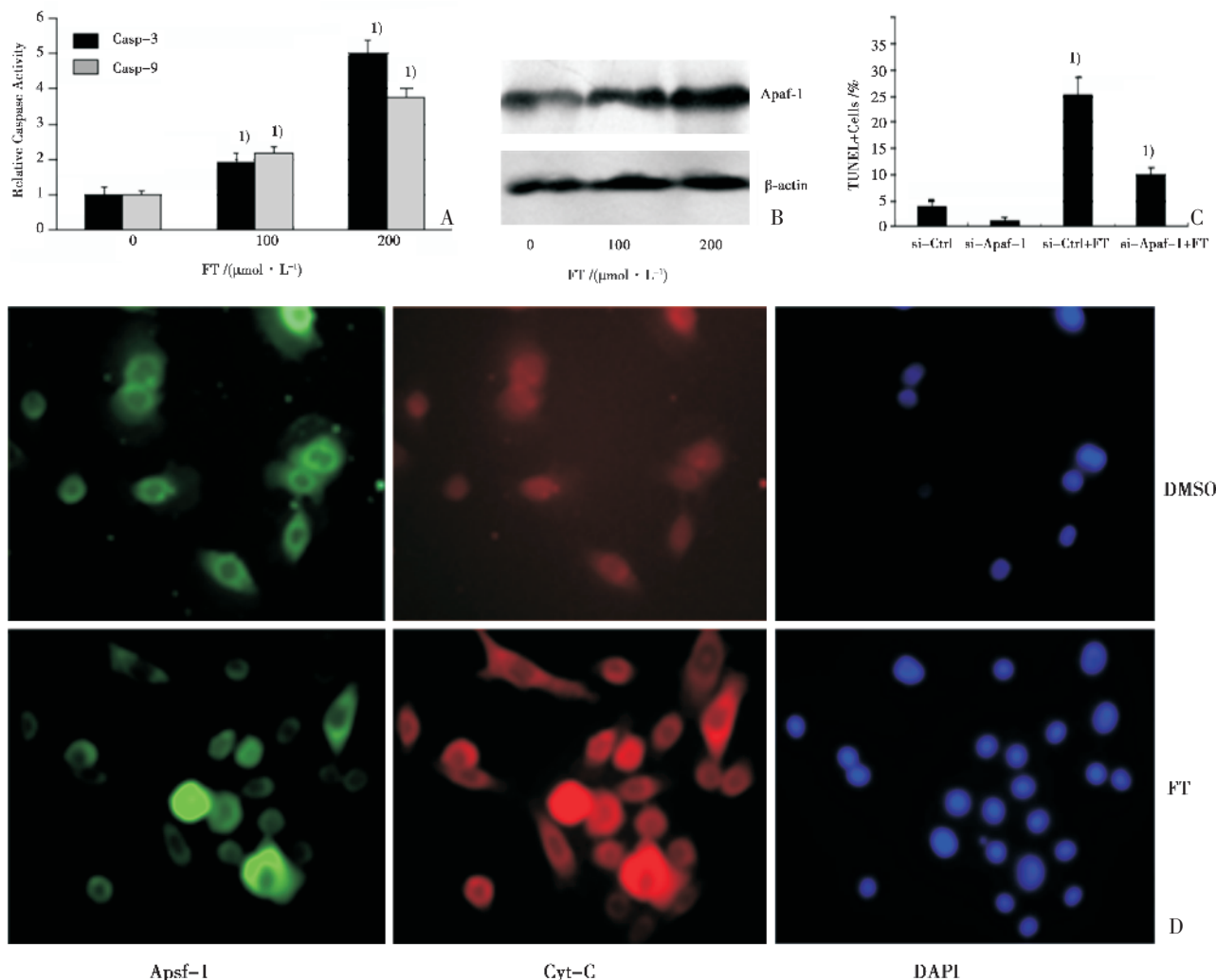


图 2 漆黄素激活 caspase 蛋白酶活性, 诱导 Apaf-1 表达并刺激 cytochrome C 释放

Fig.2 Fisetin activated caspase activities, induced Apaf-1 expression and triggered cytochrome C release

Hela cells were treated with fisetin at the doses of 100 mol/L and 200 mol/L. At 48 h after treatment, the activities of caspase-3 and -9 (A) in cell culture media were determined (A). The levels of Apaf-1 protein were analyzed by Western blot.  $\beta$ -Actin was used as a control for sample loading. (B) Hela cells were transfected with the Apaf-1-specific siRNA (si-Apaf-1), and then treated with fisetin at 200  $\mu\text{mol/L}$ . At 48 h after treatment, Apaf-1 protein expression was detected by Western blot analysis (B), and apoptosis was detected by TUNEL-based FACS analysis (C). The scrambled non-specific control siRNA (si-Ctrl) was used as a negative control. Apoptosis is represented by relative percentages of TUNEL positive cells versus DMSO-treated cells. (D) Hela cell were treated with fisetin at 200 mol/L. At 48 hours after treatment, the release of cyt-C was determined by immunofluorescence imaging (IFI) analysis to monitor cyt-C release from the inter-mitochondrial space into the cytosol. The figures are representative of three experiments. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. 1)  $P < 0.05$ , significant differences between treatment groups and control groups.

子区作为探针, 对应人 COX-2 基因的 5'端的-30 至-508 序列, 以链霉亲和素-琼脂糖亲和方法评估 NF- $\kappa$ B 与 COX-2 启动子的结合。漆黄素处理的 Hela 细胞的细胞核抽提物与连有 COX-2 启动子探针的琼脂糖珠孵育后, 结合复合物被拉下, 通过 Western blotting 分析复合物中 p50 和 p65 NF-

kB。结果表明, 漆黄素显著抑制 NF- $\kappa$ B p50 和 p65 与 COX-2 启动子探针的结合 ( $P < 0.05$ ) (图 4D)。抑制了 P300 在 Hela 细胞中的转录活化子-启动子复合物中的聚集 (图 4D)。为了进一步证实漆黄素抑制 NF- $\kappa$ B 的结合和 P300 的募集, 我们进行 ChIP 分析, 使用 P50, P65 和 P300 抗体沉淀染色

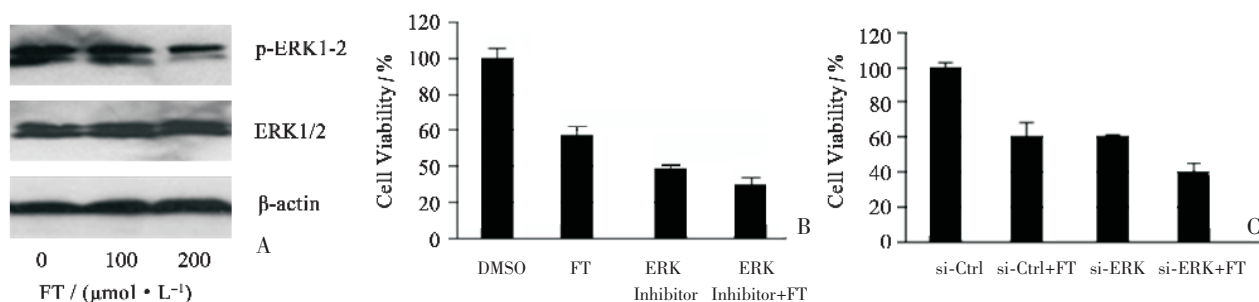


图 3 漆黄素导致 ERK 信号通路的失活

Fig.3 Fisetin inactivated ERK signaling pathways

(A) HeLa cells were treated with fisetin for 72 h. The expression of the phosphorylated and total ERK1/2 protein levels was detected by Western blotting.  $\beta$ -Actin was used as a control for sample loading. (B) HeLa cells were treated with ERK Inhibitor-II inhibitor I (20  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h, and then treated with fisetin at various doses. At 48 hours after treatment, cell viability was determined by MTT analysis. (C) HeLa cells were transfected with the ERK1-specific siRNA (si-ERK) for 12 hours, and then treated with fisetin at 200  $\mu\text{mol/L}$ . At 48 hours after treatment, ERK protein expression and cell viability were determined by Western blot and MTT analysis, respectively. The scrambled non-specific control siRNA (si-Ctrl) was used as a negative control. The percent cell viability in each treatment group was calculated relative to cells treated with the vehicle control. The figures are representative of three experiments. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments.

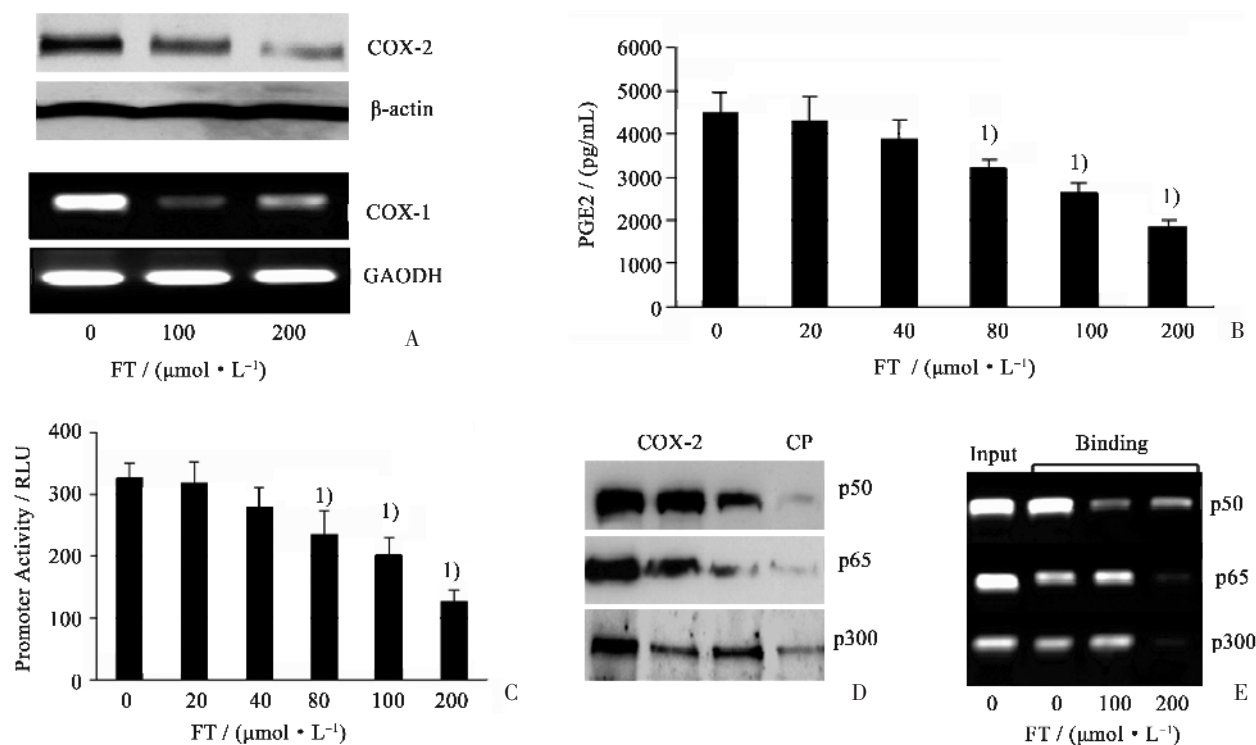


图 4 漆黄素抑制 COX-2 表达, PGE2 产生以及 NF- B/p300 的结合

Fig.4 Fisetin suppressed COX-2 expression, PGE2 production and NF- B/p300 binding

(A, B) HeLa cells were treated with fisetin for 48 h. The COX-2 proteins and mRNA (A) were analyzed by Western blotting and RT-PCR, respectively, and PGE2 in medium of HeLa cells (B) was tested by ELISA.  $\beta$ -Actin and GAPDH were used as controls for sample loading. (C) HeLa cells were transfected with a luciferase expression vector containing a 900 bp (-891/+9) COX-25-flanking fragment for 12 h, and then treated with fisetin at 200  $\mu\text{mol/L}$ . At 36 hours after treatment, COX-2 promoter activities were determined. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. 1)  $P < 0.05$ , significant differences between treatment groups and control groups. (D, E) HeLa cells were treated with fisetin for 48 h. The binding of p50 and p65 NF- B and p300 to the biotin-labeled COX-2 promoter probe was analyzed by streptavidin-agarose pull-down assay (D). A non-specific control probe (CP) was used as a control for binding analysis. Chromatin in the fisetin-treated cells was immunoprecipitated with antibodies to p50, p65 and p300 and the COX-2 promoter region in the precipitated chromatin was amplified by PCR (E). Input means the input controls. 1)  $P < 0.05$ , significant differences between treatment groups and control groups.

质。Hela 细胞经漆黄素处理 48 小时后,进行 ChIP 实验,PCR 扩增沉淀复合物中的 COX-2 启动子。如图 4E 所示,漆黄素抑制了 Hela 细胞中 p50 和 p65 NF- $\kappa$ B 与 COX-2 启动子的结合以及 P300 在 COX-2 启动子的募集。

### 3 讨 论

漆黄素 (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) 是一种天然的黄酮类化合物,普遍存在于各种蔬菜和水果当中。它本身具有广泛的药理学活性,包括抗氧化、消炎、抗癌等<sup>[8-10]</sup>。研究显示,漆黄素在癌症治疗过程中具有化疗的潜力,但漆黄素参与化疗的确切的分子作用机制尚未得到证实。

Apaf1 是 p53 的转录靶点,同时也是线粒体凋亡途径中的关键效应因子。以往的研究表明,Apaf-1 的过表达可以加强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。在细胞凋亡过程中,Apaf-1 是参与 caspase-9 活化的一个重要的信号蛋白<sup>[11]</sup>。细胞死亡刺激源作用于细胞后,Apaf-1 通过与 caspase 相关富集位点 (CARD) 相互作用,导致一系列 caspase 的水解活化,继而诱发线粒体依赖的细胞凋亡<sup>[12]</sup>。我们发现,漆黄素作用于 Hela 细胞后,可以促进 Apaf-1 的表达和 Cyt-C 的释放,继而促进 Apaf-1 控制的 caspase 的激活。更为重要的是,我们发现 Apaf-1 是漆黄素发挥其促进细胞凋亡作用的一个重要调控分子,Apaf-1 表达的抑制可以显著减弱漆黄素诱导的细胞凋亡(图 2 C)。而且漆黄素可以启动 Cyt-C 从线粒体膜空间释放进入胞浆(图 2 D),招募并引导 Apaf-1 从细胞质迁移到细胞的关键位置,原位激活 Apaf-1,进而活化 caspase 蛋白,最终促进细胞凋亡。

ERK 是控制细胞增殖、分化、存活和死亡的重要蛋白激酶。ERK MAPK 是控制细胞存活,增殖和凋亡的关键信号通路<sup>[13]</sup>。它可以被各种各样的胞外刺激物所激活,包括促细胞分裂剂,生长因子和细胞因子,已经成为肿瘤诊断和治疗的重要靶点。我们的研究发现漆黄素作用于 Hela 细胞后可以显著减少 Erk1/2 蛋白磷酸化水平,而并没有改变 Erk1/2 蛋白本身的水平(图 3 A)。而无论是采用 ERK 的选择性抑制剂,还是 ERK 特异性的 siRNA 来减少 ERK 蛋白的表达,均可以抑制肿瘤细胞的增殖,并且漆黄素预处理不能显著提高细胞增殖

的抑制作用(图 3 B,C),进一步表明漆黄素很可能参与了 ERK 信号通路的调节作用。

COX-2 是一种诱导酶,催化花生四烯酸转化为具有生物活性的前列腺素。COX-2 表达在炎症性疾病和癌症发生中发挥着关键作用。已有研究证实 COX-2 表达和 PGE2 的产生可以上调 EGFR,PI3K 和 ERK1/2 信号,从而诱发血管生成、细胞增殖和迁移。阻断 COX-2 表达则可能引起细胞生长的抑制和诱导凋亡。尽管如此,在诸如肿瘤发生这样的病理生理过程中,COX-2 高表达的具体分子机制尚不完全清楚。COX-2 蛋白的转录调控已被广泛地研究和特征化。COX-2 启动子的激活需要多个转录因子结合到启动子区以及转录共因子的参与来完成。特别是 P300 蛋白,被证明是 COX-2 表达必不可少的调控因子,它对于维持 COX-2 启动子区染色质的结构,促进转录因子与启动子结合发挥着重要的作用。在本研究中,我们发现漆黄素可以显著抑制 Hela 细胞中 COX-2 蛋白的表达(图 4 A)并且这种抑制作用是通过减弱 COX-2 启动子的活性来实现的(图 4 C)。我们还设计了一个 479 bp 的包括两个 NF- $\kappa$ B 结合位点的 COX-2 启动子区域作为探针来研究漆黄素对于 COX-2 的转录激活的影响。通过链霉亲和素琼脂糖亲和分析研究我们发现漆黄素可以抑制转录因子 p50 以及 p65 NF- $\kappa$ B 与 COX-2 启动子的结合,同时阻止转录共因子 P300 蛋白在启动子区的富集(图 4 D)。通过体内 ChIP 实验我们也发现,漆黄素可以阻断 P50 以及 p65 NF- $\kappa$ B 与染色质中 COX-2 启动子的结合以及 P300 与 COX-2 启动子区复合物的相互作用(图 4 E)。所有的结果综合表明,漆黄素通过抑制 NF- $\kappa$ B 与 COX-2 启动子区的结合活性以及 P300 在 COX-2 启动子区的富集来抑制子宫颈癌细胞中 COX-2 的表达。

在此项研究中,我们评估了漆黄素抑制人子宫颈癌细胞增殖的分子机理。我们发现,漆黄素可以促进 Apaf-1 的表达并刺激 Cyt-C 的释放,从而引起 caspase 的活化。同时,漆黄素也抑制 ERK1/2 蛋白的磷酸化,导致与细胞存活、增殖和凋亡相关的 ERK MAPK 信号通路的失活。漆黄素也可以抑制 COX-2 蛋白和 mRNA 的水平以及阻断 PGE2 的产生。且其对 COX-2 表达的抑制是通过抑制 NF- $\kappa$ B 和 P300 信号通路来实现的。漆黄素抑制 P50 NF- $\kappa$ B 与 COX-2 启动子的结合,并且阻止

P300 在 COX-2 启动子区的募集。据我们所知,这很可能是首次表明漆黄素抑制人子宫颈癌细胞增殖的分子机理,即通过同时调控人子宫颈癌细胞中的 Apaf-1/caspase, ERK MAPK, COX-2/PGE2 和 p300/NF- $\kappa$ B 信号通路来发挥其抗肿瘤细胞增殖的作用。

总之,我们的研究表明,漆黄素通过激活 caspase/Apaf-1 依赖的凋亡通路,抑制 ERK MAPK, COX-2/PGE2 和 NF- $\kappa$ B/p300 信号通路来发挥其抑制子宫颈癌细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用。我们的研究为漆黄素介导的子宫颈癌细胞的增殖抑制的分子机制提供了新线索,同时也表明漆黄素很有可能成为预防和治疗人子宫颈癌的一个颇具潜力的药物。

#### 参考文献:

- [1] Rousseau B, Chibaudel B, Bachet JB, et al. Stage II and stage III colon cancer: treatment advances and future directions[J]. *Cancer J*, 2010, 16(3): 202-209.
- [2] Mishra PK, Raghuram GV, Bhargava A, et al. In vitro and in vivo evaluation of the anticarcinogenic and cancer chemopreventive potential of a flavonoid-rich fraction from a traditional Indian herb *Selaginella bryopteris* [J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(8): 1-15.
- [3] Fang SC, Hsu CL, Lin HT, et al. Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(2): 814-820.
- [4] Turktekin M, Konac E, Onen HI, et al. Evaluation of the effects of the flavonoid apigenin on apoptotic pathway gene expression on the cervical cancer cell line (HT29) [J]. *J Med Food*, 2011, 14(10): 1107-1117.
- [5] Murtaza I, Adhami VM, Hafeez BB, et al. Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(10): 2465-2473.
- [6] Khan N, Afaq F, Khusro FH, et al. Dual inhibition of PI3K/AKT and mTOR signaling in human non-small cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin [J]. *Int J Cancer*, 2011, 130(7): 1695-1705.
- [7] Suh Y, Afaq F, Khan N, et al. Fisetin induces autophagic cell death through suppression of mTOR signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(8): 1424-1433.
- [8] Szliszka E, Helewski KJ, Mizgala E, et al. The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(4): 771-779.
- [9] Li J, Cheng Y, Qu W, et al. Fisetin, a dietary flavonoid, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 and inhibition of NF- $\kappa$ B pathways in bladder cancer cells [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011, 108(2): 84-93.
- [10] Haddad AQ, Fleshner N, Nelson C, et al. Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2,2'-dihydrochalcone and fisetin in human prostate cancer cells[J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(5): 668-681.
- [11] Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome [J]. *Cell Sci*, 2010, 123(19): 3209-3214.
- [12] Chi J, Zhu Y, Fu Y, et al. Cyclosporin A induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through calcium-sensing receptor-mediated activation of the ERK MAPK and p38 MAPK pathways[J]. *MolCell Biochem*, 2012, 367(1-2), 227-236.
- [13] Persichini T, Maio N, di Patti MC, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces ceruloplasmin and ferroportin-1 gene expression via MAP kinases and C/EBP $\beta$ , AP-1, and NF- $\kappa$ B activation [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 484(2): 133-138.

(编辑 张恩健)