

·基础研究·

木犀草素增强 Cx32/Cx26 组成的细胞缝隙连接功能

李丽君, 余美玲, 张素枝, 王 琴, 陶 亮*

(中山大学中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】体外观察木犀草素对转染并稳定表达缝隙连接蛋白 32/26(Cx32/Cx26)的 HeLa 细胞缝隙连接通讯功能(GJIC)和 Cx26 蛋白表达水平的影响。【方法】用 SRB 法检测不同浓度木犀草素对 HeLa 细胞的毒性;用细胞接种荧光示踪法观察不同浓度木犀草素对 GJIC 的影响;用 western blotting 研究木犀草素在影响 GJIC 功能浓度范围内对 Cx26 表达的影响。【结果】木犀草素在 0~1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对 HeLa 细胞无毒性作用;木犀草素(0.01~1 $\mu\text{mol/L}$)能浓度依赖性地增强 GJIC 及 Cx26 蛋白表达量。【结论】木犀草素增强转染并稳定表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞 GJIC;这种增强作用可能与其增加 Cx26 蛋白表达水平有关。

关键词: 木犀草素;连接蛋白;缝隙连接通讯

中图分类号:R961

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2011)03-0281-05

Luteolin Enhances Function of Gap Junction Composed of Cx32/Cx26

LI Li-jun, YU Mei-ling, ZHANG Su-zhi, WANG Qin, TAO Liang*

(Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of luteolin on gap junction intercellular communication and the expression of protein in Cx32/Cx26-transfected HeLa cells.【Methods】SRB assay was used to detect the cytotoxicity of luteolin on HeLa cells. The function of GJIC was determined by “parachute” dye-coupling assay. Western blotting was performed to detect the expression level of Cx26.【Results】Luteolin had no cytotoxicity on HeLa cells at the concentration of 0~1 $\mu\text{mol/L}$; Preatreatment of cells with luteolin increased intercellular dye transfer and the Cx26 protein expression.【Conclusion】Luteolin enhanced the function of gap junction in Cx32/Cx26-transfected HeLa cells, probably through the improvement of Cx26 expression.

Key words: luteolin; connexin; gap junction intercellular communication

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3):281-285]

细胞缝隙连接(gap junction, GJ)由特殊的通道蛋白——连接蛋白(connexin, Cx)组成。6个Cx环绕组成一个“半通道”(hemichannel),两个位于相邻细胞细胞膜上的“半通道”对接形成一个全通道,即GJ^[1]。GJ通道的两端开口分别位于两个相邻细胞的胞浆内,是细胞与细胞之间的直接联系通道。细胞浆中分子量小于1 ku的物质(如离子,细胞信号分子和代谢物质等)可通过GJ扩散、转运到与其毗邻的细胞浆。研究证实,由GJ介导的

细胞间信号转导在组织生长发育、维持细胞内环境稳定、细胞分化和肿瘤发生中发挥重要作用^[2-3]。GJ蛋白通道被公认为是一种潜在的,治疗心血管疾病、神经系统疾病和肿瘤等疾病的药物新靶点^[4-5]。在肿瘤形成的过程中,常伴有GJ功能的减弱和消失;恢复肿瘤细胞的GJ可抑制肿瘤的形成和生长。因此,目前认为GJ是一种肿瘤抑制基因。研究(包括我们的研究)证明,GJ能增强顺铂等多种抗肿瘤药物的作用^[6-7]。因此,能增强GJ功能的

收稿日期:2011-01-20

基金项目:国家自然科学基金(30772577;30973434)

作者简介:李丽君,硕士研究生,研究方向:细胞缝隙连接与疾病,E-mail:lilijunlucky@gmail.com; *通信作者:陶亮,教授,博士生导师,研究方向:细胞缝隙连接与疾病,E-mail:taol@mail.sysu.edu.cn

药物可能具有抑制肿瘤生长和增强抗肿瘤药物疗效的双重作用。但是迄今为止,还没有发现能特异地增强 GJ 功能的药物。黄酮类化合物是广泛分布于植物界的一类物质,具有抗炎、防癌、抗癌等多种生物活性^[8]。文献报道,一些黄酮类药物如染料木素、槲皮素等可以增强细胞 GJ 功能及 Cx 表达^[9]。木犀草素(luteolin)属于常见的天然黄酮类化合物,主要存在于菊花、四方蒿、荆芥、白毛夏枯草等许多天然药物和蔬菜之中。文献报道,木犀草素具有抗菌、抗炎、保护心血管、免疫调节、抗肿瘤等多种药理作用^[10],但其对 GJ 功能及 Cx 蛋白表达的影响尚未见报道。本文旨在研究木犀草素对 Cx32/Cx26 组成的 GJ 功能的影响,并探讨其机理。

1 材料与方法

1.1 试剂

木犀草素购于自中国药品检验所;二甲基亚砜(DMSO)、丽丝胺罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)、三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA)、Tris、抗 HA 抗体购自 Sigma;G418、青-链霉素和多西环素(doxycycline)购自 Calbiochem;HRP 标记的羊抗小鼠二抗、硝酸纤维素膜(NC 膜)购于 Amersham;ECL-plus 化学发光剂、BSA 蛋白定量试剂盒、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购于 Bio-rad;DMEM 干粉、胰酶(typsin)购于 Gibco;Calcein-AM 和 CM-DIL 购自 Molecular Probes。

1.2 细胞培养

HeLa 细胞本身无 Cx 表达^[11],用实验用浓度的木犀草素处理未转染的 HeLa 细胞,不能引起 Cx26 表达和 GJ 形成。本实验采用的转染含有 Cx32/Cx26 cDNA 的 PBI 质粒,并稳定表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞,由美国新泽西医学牙医学大学药理学/生理学系 Andrew L. Harris 教授惠赠^[12]。该 PBI 质粒可以通过多西环素而控制 Cx 表达。在培养基中加入多西环素时能诱导 Cx 表达并形成有效的 GJIC。细胞接种于含 100 mL/L 新生牛血清和 1%青-链霉素的 DMEM 培养液中,置于 37℃、含体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.3 SRB 法测定药物的细胞毒性

采用丽丝胺罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)

法^[13]测定不同浓度木犀草素对 HeLa 细胞增殖的影响,以确定用于研究 GJ 功能作用的木犀草素浓度。取生长良好的细胞,以 4 000 个/孔种植于 96 孔细胞培养板,空白组只含培养液,每组 5 个平行孔。培养 24 h 后,实验组加入不同终浓度的用 DMSO 溶解的木犀草素(0.01、0.1、1 μmol/L),对照组加入 1 μL/mL 浓度的 DMSO(与实验组浓度相同),药物作用 4h 后更换新鲜培养液,继续培养 48 h。小心弃培养液,慢慢加入经 4℃预冷的 100 mL/L 三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA;200 μL/孔),室温静置 5 min,移至 4℃放置 1 h。弃去固定液,用超纯水洗涤 5 遍以去除 TCA。经空气干燥后,加 0.4% SRB 染色液(100 μL/孔),于 37℃染色 30 min,弃去染色液,用 10 mL/L 冰醋酸洗涤 3 遍以充分去除未结合的 SRB,空气干燥,加 150 μL/孔、10 mmol/L Tris 液溶解(150 μL/孔),摇床振动 5~10 min,直至染料全部溶解。用酶标仪在 570 nm 波长处测定 A 值。每个试验均重复 3 次。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{试验组 D}(570) - \text{空白组 D}(570)}{\text{对照组 D}(570) - \text{空白组 D}(570)} \times 100\%$$

1.4 细胞接种荧光示踪法测定缝隙连接功能

采取细胞接种荧光示踪法^[14]测定缝隙连接功能。供体细胞和受体细胞均生长至融合,供体细胞用 5 μmol/L 的 CM-DiI 和 5 μmol/L 的 calcein-AM 共孵育 30 min。CM-DiI 是亲脂性的膜荧光染料,不能通过细胞膜传至相邻细胞。Calcein-AM 进入细胞后,其上所带的乙酰甲酯(acetoxymethyl ester, AM)被胞内脂酶水解而形成发绿色荧光的 calcein,不能透过细胞膜,但能经 GJ 传递至邻近细胞。将供体细胞按 1:150 比例接种到融合的受体细胞上,同时加入木犀草素,培养 4 h,待形成稳定的 GJ 后,用荧光显微镜观察,记录 GJ 功能。计数一个供体细胞周围发绿色荧光的受体细胞数,作为评价 GJ 功能的指标。每次试验中,实验组平均每个供体细胞周围发绿色荧光的受体细胞个数与对照组进行比较得出相对数。

1.5 Western Blot 检测 Cx26 蛋白表达

为了判断木犀草素是否影响 Cx 表达,我们用不同浓度(0.01~1 μmol/L)的木犀草素作用于表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞 4 h 后,用 Western blot 方法检测 Cx26 蛋白表达。Western blot 参照本实验

室以前的操作方法^[6,15]。细胞达 90%融合时弃培养液,用冰冷的 PBS 洗细胞 3 次,加适量细胞裂解液裂解细胞,用细胞刮匙将细胞刮下来,超声破碎细胞。细胞液于 4℃ 以 12 000 ×g 速度离心 30 min,取上清,标准蛋白定量(Bio-rad DC assay)。蛋白定量后抽取 25 μg 蛋白加样至 10% SDS-PAGE 胶中进行电泳分离,分离后转膜至 NC 膜上。转膜完成后用 50 g/L 脱脂奶粉/TBST 封闭 30 min,孵育抗体,一抗为抗 HA-7 抗体,浓度为 1:1 000,二抗为羊抗鼠抗体,浓度为 1:3 000。使用 Bio Imaging system (Gene Genius)对胶片进行灰度扫描分析。

1.6 统计学处理方法

实验结果使用 SPSS 13.0 软件进行分析。两组之间计量资料比较进行 *t* 检验,多组之间计量资料比较进行 ANOVA 分析,组间比较采用 LSD 法, *P* < 0.05 认为有统计学意义,统计图表采用 Sigma Plot 10.0 绘制。

2 结果

2.1 药物细胞毒性

为了排除药物的细胞毒性或细胞增殖作用对 GJ 功能的影响,我们首先用 SRB 法检测不同浓度木犀草素对 HeLa 细胞生长的影响。结果显示,木犀草素在 0~1 μmol/L 时不影响 HeLa 细胞存活率,即木犀草素在这个浓度范围内对 HeLa 细胞既无细胞毒性作用也无促增殖作用(图 1A)。在做剂量毒性的同时,我们测定了木犀草素(1 μmol/L)在不同时间点对转染并稳定表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞毒性,结果显示木犀草素作用 4、24 和 48 h 对细胞增殖均无影响(图 1B)。

2.2 木犀草素增强细胞缝隙连接功能

结果显示,木犀草素(0.01 ~ 1 μmol/L)浓度依赖性地增加了 GJ 介导的细胞间荧光传递,当浓度为 1 μmol/L 时,其增强效应达到最大。上述结果表明木犀草素可以增强由 Cx32/Cx26 组成的 GJ 功能(图 2)。

2.3 木犀草素对 Cx26 蛋白表达的影响

研究结果表明,木犀草素处理细胞 4h 后,可以浓度依赖性地增加 Cx26 蛋白表达量;木犀草素在浓度为 1 μmol/L 时,增强 Cx 蛋白表达的作用

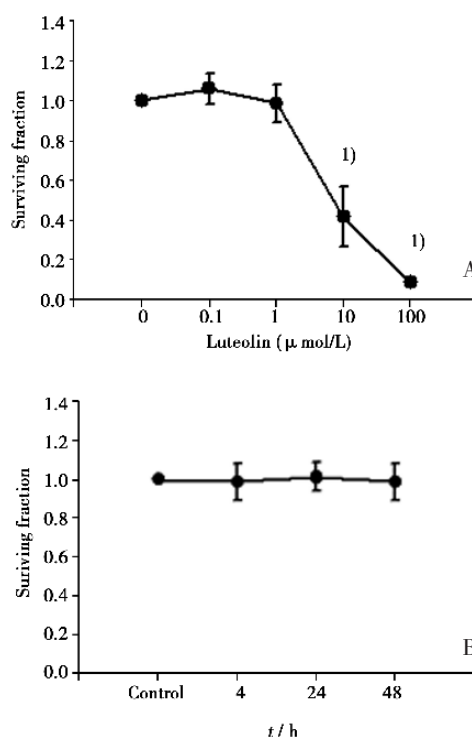


图1 木犀草素对表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞存活率的影响

Fig.1 The cytotoxicity of luteolin on HeLa cells expressing Cx26/Cx32

A: The surviving fraction of HeLa cells after treatment with 0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L, and 100 μmol/L luteolin for 4 hours. B: The surviving fraction of HeLa cells after treatment with 1 μmol/L luteolin for 4 hours, 24 hours, and 48 hours. Data points are mean ± SD for five experiments. 1) *P* < 0.05, comparing with control group

最强(图 3)。

3 讨论

本研究首次证明,在转染并稳定表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞,木犀草素可以浓度依赖性的增加 GJ 功能和 Cx 表达。GJ 通透性是受 Cx 通道门控和细胞膜上 Cx 通道的数量调控的^[16];而细胞 Cx 蛋白的表达量是影响细胞膜上 Cx 通道数量的主要因素。我们用 Western blot 方法检测不同浓度木犀草素对 Cx 蛋白表达的影响,结果表明木犀草素可以浓度依赖性的增强 Cx 蛋白表达,这表明木犀草素可能是通过增强 Cx 蛋白表达增强 GJ 功能。通道门控调节所需时间通常较短,而木犀草素作用于细胞 4 h 即能改变 GJ 功能,提示它有可能

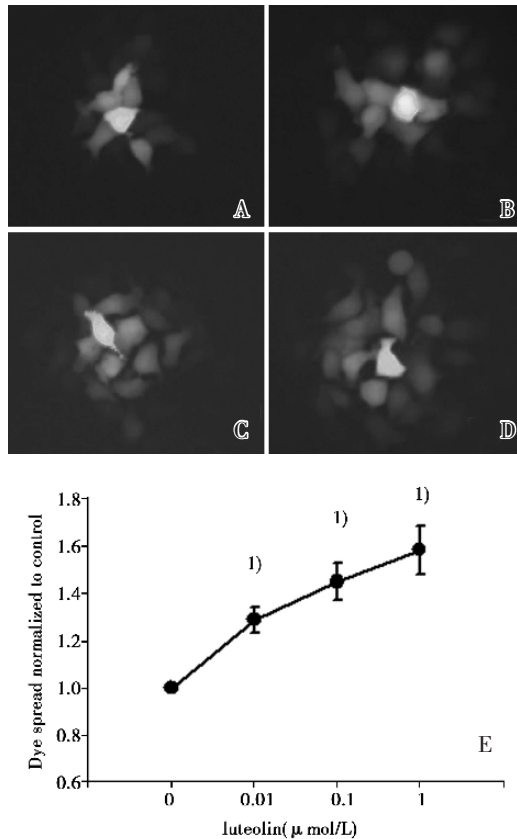


图 2 木犀草素对表达 Cx32/Cx26 的 HeLa 细胞 GJ 功能的影响

Fig.2 Effect of luteolin on dye spread through GJ composed of Cx32/Cx26 in transfected HeLa cells.

A: The dye spread of HeLa cells in control group 400×; B, C, D: The dye spread of HeLa cells in luteolin group 400× (B, luteolin 0.01 μmol/L; C, luteolin 0.1 μmol/L; D luteolin 1 μmol/L;); E: The normalized enhancement of dye coupling through gap junctions treated with 0.01 μmol/L, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L luteolin. Data points are means ± S.D for four experiments. 1) $P < 0.05$, comparing with control group

通过增加 GJ 通道开放而增强 GJ 功能。

木犀草素上调 Cx26 水平的机理不明,它可能通过促进基因转录、蛋白合成或抑制 Cx26 蛋白的降解等途径上调 Cx26 的水平。有文献报道^[17-18],木犀草素可以通过抑制腺苷酸环化酶减少 cAMP 含量,而 cAMP 可以影响 Cx43 蛋白的表达。因此,我们推测木犀草素可能通过改变腺苷酸环化酶-cAMP 信号途径改变 Cx 表达。我们将在今后的研究中探讨这个问题。

有研究表明木犀草素联合化疗药物顺铂、多柔比星等可以增强药物对某些肿瘤的增殖抑制作

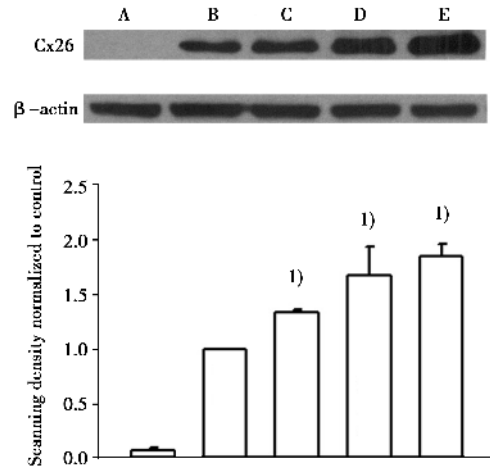


图 3 木犀草素对 Cx26 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of luteolin on the expression of Cx26 determined by Western blotting

The figure shows that luteolin increases the expression of Cx26 in dose dependent manners in transfected HeLa cells treated with doxycycline. A: not induced by doxycycline; B: control; C: luteolin 0.01 μmol/L; D luteolin 0.1 μmol/L; E: luteolin 1 μmol/L; B ~ E are induced by doxycycline. Bars are mean ± SD for four experiments. 1) $P < 0.05$, comparing with control group

用,但机制尚不清楚^[19-21]。功能性 GJ 的存在可以增强顺铂对睾丸癌的细胞毒性,也可以增强前列腺癌对肿瘤坏死因子的敏感性^[22-23];增强 GJIC 可以促进依托泊苷所引起的成胶质瘤细胞凋亡^[7]。因此,能增强 GJ 功能的药物有可能具有抑制肿瘤生长和增强抗肿瘤药物疗效的双重作用。但至今为止,尚未发现有此作用的药物。本研究首次证明木犀草素能够增强 GJ 功能;这一发现提示,木犀草素的化疗增敏作用可能是通过增强 GJ 功能而实现的。本研究为寻找以 GJ 为靶点的新型抗肿瘤药物和化疗增敏药提供了基础和依据。

参考文献:

- [1] Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome [J]. Biol Chem, 2002, 383 (5): 725-737.
- [2] Charles AC, Naus CC, Zhu D, et al. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells [J]. J Cell Biol, 1992, 118(1): 195-201.
- [3] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel [J]. Cell, 1996, 84(3): 381-388.

- [4] Salameh A, Dhein S. Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1719(1-2): 36-58.
- [5] Meldrum BS, Rogawski MA. Molecular targets for antiepileptic drug development[J]. *Neurotherapeutics*, 2007, 4(1): 18-61.
- [6] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity of cisplatin via their effects on gap junctions[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(18): 5803-5810.
- [7] Huang RP, Hossain MZ, Huang R, et al. Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(1): 130-138.
- [8] Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety[J]. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22(6): 19-34.
- [9] Conklin CM, Bechberger JF, MacFabe D, et al. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 93-100.
- [10] Horvathova K, Chalupa I, Sebova L, et al. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells[J]. *Mutat Res*, 2005, 565(2): 105-112.
- [11] Johnstone SR, Best AK, Wright CS, et al. Enhanced connexin 43 expression delays intra-mitotic duration and cell cycle traverse independently of gap junction channel function [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(3): 772-782.
- [12] Koren IV, Elsayed WA, Liu YJ, et al. Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells[J]. *Biochem J*, 2004, 383(Pt1): 111-119.
- [13] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [14] Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer[J]. *Biotechniques*, 1995, 18(3): 490-497.
- [15] Tao L, Harris AL. Biochemical requirements for inhibition of Connexin26-containing channels by natural and synthetic taurine analogs[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38544-38554.
- [16] Verrecchia F, Herve JC. Reversible inhibition of gap junctional communication elicited by several classes of lipophilic compounds in cultured rat cardiomyocytes[J]. *Can J Cardiol*, 1997, 13(11): 1093-10100.
- [17] Choi MY, Song HS, Hur HS, et al. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16 melanoma cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(9): 1166-1171.
- [18] Kojima A, Nakahama K, Ohno-Matsui K, et al. Connexin 43 contributes to differentiation of retinal pigment epithelial cells via cyclic AMP signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 532-538.
- [19] Shi R, Huang Q, Zhu X, et al. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4): 1338-1347.
- [20] Wu B, Zhang Q, Shen W, et al. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 313(1-2): 125-132.
- [21] Du GJ, Song ZH, Lin HH, et al. Luteolin as a glycolysis inhibitor offers superior efficacy and lesser toxicity of doxorubicin in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(3): 497-502.
- [22] Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 gene therapy of human bladder cancer: induction of growth suppression, apoptosis, and synergy with Cisplatin [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(18): 2225-2236.
- [23] Wang M, Berthoud VM, Beyer EC. Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt2): 320-329.

(编辑 孙慧兰)