

三羟异黄酮上调肝癌 HepG2 细胞 PTEN 基因的表达及其诱导凋亡作用

张继红¹, 梁力建¹, 黄洁夫¹, 王家泽²

(1. 中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510080; 2. 广东省深圳市第二人民医院 ICU 科, 广东 深圳 518035)

摘要:【目的】探讨三磷酸肌醇(IP₃)和 PTEN 蛋白变化在三羟异黄酮(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 三羟异黄酮作用于 HepG2 细胞不同时间后, 应用同位素试剂盒检测细胞 IP₃ 含量, Western blot 分析细胞 PTEN 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, PTEN 蛋白与内参 actin 蛋白灰度和面积之积的比值 V-PTEN/V-actin 为 0.12 ± 0.00; 细胞凋亡率为 (2.6 ± 0.1)%。三羟异黄酮作用于肝癌 HepG2 细胞 12、24、48、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; V-PTEN/V-actin 分别为 13.13 ± 0.20, 19.17 ± 1.09, 28.51 ± 2.18, 41.12 ± 3.80; 细胞凋亡率分别为 (2.7 ± 0.2)%, (7.4 ± 0.5)%, (20.5 ± 2.0)%, (30.7 ± 1.6)%。与对照组比, 三羟异黄酮作用于肝癌 HepG2 细胞 12 h 后各时相 IP₃ 显著降低 (P < 0.01), PTEN 蛋白表达显著增高 (P < 0.01), 24 h 后各时相细胞凋亡率显著增高 (P < 0.01)。【结论】三羟异黄酮能减少 IP₃ 生成, 上调 PTEN 基因表达, 诱导肝癌细胞凋亡。

关键词: 肝细胞癌; 三羟异黄酮; PTEN; 细胞凋亡

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0285-04

Role of Genistein on Upregulation of PTEN Gene Expression and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

ZHANG Ji-hong, LIANG Li-jian, HUANG Jie-fu, WANG Jia-ze

(1. Department of Hepato-biliary Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510180, China
2. Intensive Care Unit, The Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518035, China)

Abstract:【Objective】To probe into the role of the change of 1,4,5-trisphosphate inositol (IP₃) and PTEN protein in apoptosis of hepatocellular carcinoma 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, PTEN protein and apoptosis rate was assayed by IP₃-[³H] Birtrak Assay, Western blotting and flow cytometry, respectively. 【Results】The IP₃ of control was (29.2 ± 0.6) pmol / 10⁶ cells. V-PTEN/V-actin, which was the gray degree multiply area of PTEN / the gray degree multiply area of actin, in control was 0.12 ± 0.00. The apoptosis rate of control was (2.6 ± 0.1)%. IP₃ of HepG2 cells incubated with 60 μmol/L genistein for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h was (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, respectively. V-PTEN/V-actin of HepG2 cells incubated with 60 μmol/L genistein for 12 h, 24 h, 48 h and 72 h was 13.13 ± 0.20, 19.17 ± 1.09, 28.51 ± 2.18 and 41.12 ± 3.80, respectively. The apoptosis rate of HepG2 cells incubated with 60 μmol/L genistein for 24 h, 48 h and 72 h was (2.7 ± 0.2)%, (7.4 ± 0.5)%, (20.5 ± 2.0)%, (30.7 ± 1.6)%, respectively. IP₃ of HepG2 cells decreased significantly (P < 0.01), while PTEN protein expression of HepG2 cells incubated with genistein after 12 h was increased compared with the control (P < 0.01); and apoptosis rate of HepG2 cells incubated with genistein after 24 h was significantly increased vs control (P < 0.01). 【Conclusions】Genistein can induce apoptosis of HepG2 cells by reducing IP₃ and increasing PTEN protein expression.

Key words: hepatocellular carcinoma; genistein; PTEN; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 2(3):285-288]

收稿日期: 2005-11-12

基金项目: 深圳市科技基金资助项目(200304095)

作者简介: 张继红(1963-), 男, 重庆合川人, 博士生; 梁力建, 教授, 导师, 通讯作者. E-mail: zhjihong@hotmail.com

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],达到治疗恶性肿瘤的目的。三羟异黄酮(genistein)能对多种肿瘤细胞的生长发挥诱导凋亡的作用^[2-6]。肿瘤细胞凋亡受细胞内许多信号通路和基因调控。譬如,磷酸肌醇信号通路转导能力增强,表现为催化这一通路生化反应的关键酶磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)激酶、磷脂酰肌醇-磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PIP)激酶活性增强,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;均在恶性肿瘤的生长、繁殖、浸润、转移中,起重要的作用^[2,3]。PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)蛋白具有诱导细胞凋亡的作用^[7]; PTEN 基因缺失、突变或表达下调在肝细胞癌发生发展和预后中起重要作用^[7,8]。但肝癌细胞磷酸肌醇通路信号转导能力与 PTEN 基因表达的关系尚不清楚。本实验探讨抑制磷酸肌醇信号通路 PIP 激酶活性的三羟异黄酮^[2]能否上调 PTEN 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和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

肝癌 HepG2 细胞株(中山大学动物实验中心细胞库),三羟异黄酮(分析纯 genistein, 美国 Sigma 公司), IP₃-[H³] Birtrak Assay 试剂盒(瑞典 Amersham 公司), PTEN 和 Actin 鼠抗人单克隆抗体(美国 Neomarker 公司),带化学发光物的抗小鼠 IgG(二抗)ECM Kit(武汉博士德公司)。

1.2 细胞培养

将 HepG2 细胞快速解冻,分装入 25 cm³ 培养瓶,加入含体积分数 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 RPMI 1640 培养基,单层培养和孵化于体积分数 5% CO₂ 和体积分数 95% 湿润空气、温度为 37 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 g/L 含 0.1 mmol/L EDTA 的胰蛋白酶,于 37 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,加入含血清的培养基 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, 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。

1.3 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,调至 2 × 10⁶/mL,分瓶后加入体积分数 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 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 溶解三羟异黄酮配制成浓度 10 mmol/L 储存药液,-20 保存,实验时应用上述含血清的完全培养基稀释成 60 μmol/L,每种药液中 DMSO 的最终体积分数 0.8%。对照组培养基中加入体积分数 0.8% 二甲亚砜(DMSO)培养 72 h 取样检测各指标;实验各组培养基中加入 60 μmol/L 三羟异黄酮,分别培养 12、24、48、72 h,取细胞进行相关指标检测。

1.4 IP₃-[H³] Birtrak Assay 检测 IP₃ 含量

按 IP₃-[H³] 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 [H³]-IP₃ 稀释液、100 μL 结合蛋白,旋转混合,冰上孵育 15 min,4 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 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,即为 1 × 10⁶ 细胞(cells)中的 IP₃ 物质的量(pmol)。

1.5 Western blot 方法测定 PTEN 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。取出聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭,加入一抗 PTEN 鼠抗人单克隆抗体,以 actin 单克隆抗体为内参,4 轻摇过夜。洗 PVDF 膜未结合的抗体,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。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集各组细胞, PBS 清洗 2 遍。用体积分数 75% 冷乙醇 4 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。

1.7 统计分析

实验均重复进行 3 次, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析, 方差齐者用方差分析法进行分析, 方差不齐者进行秩变换后使具备方差齐性, 然后进行方差分析。检验水准, $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 IP_3 含量变化

对照组 IP_3 含量为 (29.2 ± 0.6) $\text{pmd}/10^6$ cells, $60 \mu\text{mol/L}$ 三羟异黄酮作用 12、24、48、72 h 组 IP_3 分别为 (12.0 ± 1.4) $\text{pmd}/10^6$ cells, (7.5 ± 0.8) $\text{pmd}/10^6$ cells, (5.6 ± 0.5) $\text{pmd}/10^6$ cells, (3.3 ± 0.6) $\text{pmd}/10^6$ cells。与对照组相比, 加药后各时相 IP_3 均显著降低, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 PTEN 基因表达

如图 1 所示, 从左向右, 对照组几乎不表达 PTEN 蛋白, $60 \mu\text{mol/L}$ 三羟异黄酮作用 12、24、48、72 h, PTEN 表达逐渐增加, 具有明显的时间依赖性。与内参 actin 的灰度与面积之积对比 (V-PTEN/V-actin) 做半定量分析, 可见对照组 V-PTEN/V-

actin 为 0.12 ± 0.00 , 加药 12、24、48、72 h 分别为 13.13 ± 0.20 , 19.17 ± 1.09 , 28.51 ± 2.18 , 41.12 ± 3.80 。加药 12 h 后各时相组 PTEN 表达较对照组显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

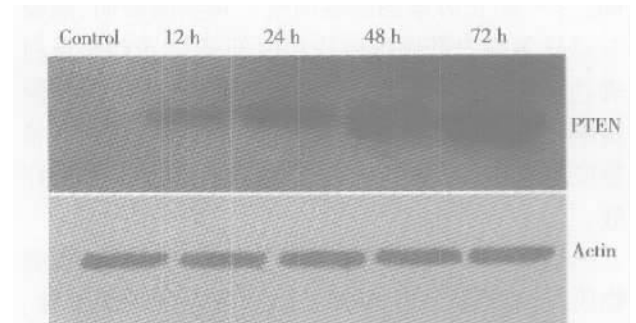


图 1 HepG2 细胞各时相 PTEN

Fig.1 PTEN protein of Hep G2 cells in various time

Shows PTEN protein of HepG2 cells increasing with time-dependent manner when incubating with $60 \mu\text{mol/L}$ genistein

2.3 细胞凋亡

如图 2 所示, 随着三羟异黄酮作用时间延长, 凋亡峰逐渐出现, 细胞凋亡率逐渐增加。对照组凋亡率 $(2.6 \pm 0.1)\%$, $60 \mu\text{mol/L}$ 三羟异黄酮作用 12、24、48、72 h 组 IP_3 分别为 $(2.7 \pm 0.2)\%$, $(7.4 \pm 0.5)\%$, $(20.5 \pm 2.0)\%$, $(30.7 \pm 1.6)\%$ 。与对照组相比, 加药 12 h 前细胞凋亡率无显著变化, 但加药 24 h 后各时相细胞凋亡率均显著增加, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

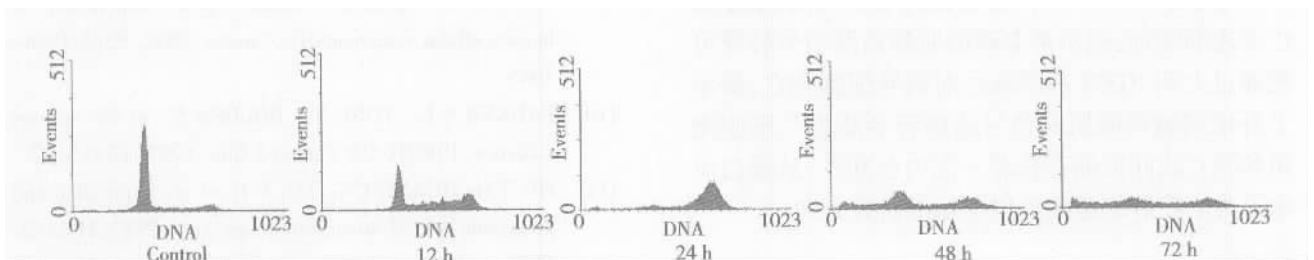


图 2 HepG2 各时相的细胞凋亡

Fig.2 Apoptosis cells increasing with time-dependent manner

The left peak are apoptosis cells which shows apoptosis cells of HepG2 increasing with time of incubation with $60 \mu\text{mol/L}$ genistein

3 讨 论

肝细胞癌手术切除被证明是唯一有效的治愈的方法, 但肝切除术后 80% 以上的患者将在 2 年内复发^[9]。况且大多数肝癌患者就诊时已达病程中晚期, 无法手术切除。目前肝癌的平均生存期仅为 3~

6 个月, 3 年生存率低于 13%^[10]。近年来兴起的肝动脉栓塞化疗、导向治疗、抗血管生成治疗、基因治疗等新的手段治疗肝癌并未取得突破性进展。随着对肿瘤发生发展机制的深入研究, 诱导肿瘤细胞凋亡已逐渐引起重视。

PTEN 基因是位于人类第 10 号染色体 (10q23.3) 上的一个重要抑癌基因, 其编码蛋白具

有双重特异性磷酸酶活性, 不仅能使 PIP_3 的 D3 位脱磷酸, 拮抗 PI_3K 磷酸化, 从而减少 PIP_3 聚集; 同时它又使 Akt 磷酸酪氨酸、磷酸丝/苏氨酸去磷酸, 降低 Akt 的磷酸化水平, 引起细胞周期阻滞和诱导凋亡^[7, 11], 阻止肿瘤的恶性演变。本实验表明, 随着三羟异黄酮对肝癌细胞作用时间延长, PTEN 蛋白表达逐渐增加, 细胞凋亡率逐渐增加, 提示三羟异黄酮可上调 PTEN 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, 提高肝癌的疗效。

三羟异黄酮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。细胞信号转导在应答环境刺激和调节基因表达、生理反应的同时, 维持着细胞正常代谢, 并最终决定细胞增殖、生长、分化、衰老和死亡。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]。三羟异黄酮是磷酸肌醇信号通路抑制剂, 体外实验证实, 三羟异黄酮可降低这些肿瘤细胞 PIP 激酶活性, 导致 IP_3 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, 三羟异黄酮可以减少肝癌 HepG2 细胞 IP_3 生成, 上调 PTEN 基因表达, 随着三羟异黄酮对肝癌细胞作用时间的延长, IP_3 逐渐下降, PTEN 蛋白表达逐渐增加, 细胞凋亡率逐渐增加, 提示抑制磷酸肌醇通路信号转导可能通过上调 PTEN 基因表达而诱导细胞凋亡, 揭示了肝癌细胞磷酸肌醇信号通路转导能力与细胞增殖和凋亡之间可能存在着一定内在联系, 从蛋白质水平为治疗肝细胞癌提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] DENLINGER C E, RUNDALL B K, JONES D R. Modulation of antiapoptosis 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 R L, LOOK K Y, YEH Y A, 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 F H. Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells [J]. *J Nutr*, 2002, 132(12):3623-3631.
- [5] CUI H B, NA X L, SONG D F, et al. Blocking effects of genistein on cell proliferation and possible mechanism in human gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(1):69-72.
- [6] GU Y, ZHU C F, IWAMOTO H, et al. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(41):6512-6517.
- [7] WAITE K A, ENG C. Protein PTEN: from and function [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(4):829-844.
- [8] WAN X W, JIANG M, CAO H F, et al. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(2):100-106.
- [9] IKEGUCHI M, HIROOKA Y, KAIBARA N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 95(9):1938-1945.
- [10] PARKER S L, TONG T, BOLDEN S, et al. Cancer statistics, 1997[J]. *CA Cancer J Clin*, 1997, 47(1):5-27.
- [11] HU T H, HUANG C C, LIN P R, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2003, 97(8):1929-1940.

(编辑 张敏瑞)