

左旋含羞草碱下调 Bcl-2 的表达并促进 FaDu 细胞凋亡的研究

向银洲 李雪军 邹玉华 陈恩耀 徐征 李建萍

[摘要] 目的 探讨左旋含羞草碱对人咽鳞状细胞癌 FaDu 细胞 Bcl-2、Bax 等表达的影响及促进细胞凋亡的可能机制。方法 培养和传代 FaDu 细胞,不同浓度左旋含羞草碱作用后观察细胞生长状况;流式细胞仪检测左旋含羞草碱与柠檬酸铁铵(FAC)对 FaDu 细胞凋亡的影响;CCK8 法检测左旋含羞草碱与 FAC 干预后 FaDu 细胞的增殖活性;Western-blot 法检测左旋含羞草碱处理 FaDu 细胞后 Bcl-2、Bax、Bak、Bik、Bid 等凋亡相关蛋白的表达。结果 不同浓度的左旋含羞草碱作用于 FaDu 细胞后细胞的生长受到抑制;左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ 组 FaDu 细胞凋亡最显著,左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较,细胞凋亡率无统计学差异(t 分别=2.64、2.13, P 均 >0.05)。FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 FaDu 细胞凋亡率均低于对照组(t 分别=3.61、3.98, P 均 <0.05)。对 FaDu 细胞增殖活性的抑制作用由强到弱依次为左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ 组、左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、左旋含羞草碱 200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组;随着左旋含羞草碱浓度的增加, FaDu 细胞 Bcl-2 蛋白的表达降低, Bax、Bak、Bik、Bid 等蛋白的表达增高。结论 200 $\mu\text{mol/L}$ 左旋含羞草碱抑制 FaDu 细胞生长,促进细胞凋亡,是通过干扰肿瘤细胞铁代谢,激活 Bcl-2 家族蛋白发挥重要调控作用的线粒体通路实现的。

[关键词] 左旋含羞草碱; FaDu 细胞; 凋亡; Bcl-2; 铁整合

Research about L-mimosine down-regulating Bcl-2 expression and promoting FaDu cell apoptosis XIANG Yin-zhou, LI Xuejun, ZOU Yuhua, et al. Department of Otolaryngology, Taizhou First People's Hospital, Taizhou 318020, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of L-mimosine on the expression of Bcl-2 and Bax in human pharyngeal squamous cell carcinoma FaDu cells and the possible mechanism of promoting cell apoptosis. **Methods** FaDu cells were cultured and passaged. Cell growth was observed after different concentrations of L-mimosine processing FaDu cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis effects after different concentrations of L-mimosine and ammonium ferric citrate treating FaDu cells. Cell growth activity was examined by CCK-8 method after different concentrations of L-mimosine and ammonium ferric citrate processing FaDu cells. Western-blot was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins including Bcl-2, Bax, Bak, Bik, and Bid after different concentrations of L-mimosine treating FaDu cells. **Results** The growth of FaDu cells could be inhibited by L-mimosine. The most significant apoptosis rate of FaDu cells can be observed in 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine group. Compared with the control group, the apoptosis rate of FaDu cells in 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine +50 $\mu\text{mol/L}$ ammonium ferric citrate group and 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine +100 $\mu\text{mol/L}$ ammonium ferric citrate group was not statistically different ($t=2.64, 2.13, P>0.05$). The apoptosis rate of FaDu cells in the 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ ferric ammonium citrate group was significantly lower than that in control group ($t=3.61, 3.98, P<0.05$). The effects on the proliferation activity of FaDu cells ranked from strong to weak was 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine group, 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine+ 50 $\mu\text{mol/L}$ ammonium ferric citrate group and 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine+ 100 $\mu\text{mol/L}$ ammonium ferric citrate group. With the increasing of L-mimosine concentration, the expression of Bax, Bak, Bik and Bid in FaDu cells increased, while Bcl-2 protein decreased. **Conclusion** 200 $\mu\text{mol/L}$ L-mimosine inhibits the growth of FaDu cells and promotes apoptosis by interfering with the iron metabolism of tumor cells and activating the

mitochondrial pathway of bcl-2 family protein, which plays an important regulatory role.

[Key words] L-mimosine; FaDu cells; apoptosis; Bcl-2; iron chelate

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.001.003

作者单位: 318020 浙江台州, 台州市第一人民医院耳鼻咽喉科

下咽癌多发生于下咽区域的梨状窝、环状软骨后区和下咽后壁等处,其中约95%属于鳞状细胞癌^[1],约占头颈部鳞状细胞癌的3%~5%^[2]。预后较差^[3]。研究发现左旋含羞草碱能够抑制多种肿瘤细胞的生长增殖,促进肿瘤细胞的凋亡,其作用机制尚未明了^[4,5]。本次研究旨在观察铁对左旋含羞草碱诱导人下咽鳞状细胞癌FaDu细胞凋亡的影响,以及Bcl-2家族蛋白在凋亡过程中的变化,为下咽癌的防治提供一定的实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 选择武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科研究所2018年4月至2019年1月期间的人咽鳞状细胞癌FaDu细胞株(由武汉大学耳鼻咽喉头颈外科研究所提供)。FaDu细胞接种于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(由美国Sigma公司生产),放置于37℃、5%CO₂孵箱中培养。

1.2 细胞的形态学观察 人咽鳞状细胞癌FaDu细胞均匀加入到6孔板中,添加适量RPMI-1640培养液,在5%CO₂、37℃、饱和湿度条件下的恒温培养箱中孵育过夜,细胞贴壁后,加入终浓度为0 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L的左旋含羞草碱(由美国Sigma公司生产)培养液,继续培养24 h、48 h后,取出放在倒置显微镜下观察细胞的生长状况。

1.3 流式细胞仪检测FaDu细胞的凋亡 选择枸橼酸铁铵(ferric ammonii citras, FAC)(由武汉友名生物技术有限公司生产)实验浓度分别为0 μmol/L、100 μmol/L、500 μmol/L、1000 μmol/L,分别加入FaDu细胞培养基中培养48 h后收集细胞。-20℃预冷70%酒精固定细胞30 min,4℃冰箱冷藏过夜。次日取出细胞,倒去酒精,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(由吉诺生物医药技术有限公司生产)洗涤细胞3次,100 μmol/L的RNA酶(由美国Sigma公司生产)200 μl消化细胞,37℃恒温水浴箱水浴30 min,滴加20 μmol/L碘化丙啶(由Sigma公司生产)1 ml,4℃冰箱并遮光染色30 min,流式细胞仪检测不同浓度FAC对FaDu细胞凋亡的影响。另一组实验将FaDu细胞分为左旋含羞草碱200 μmol/L组、FAC 50 μmol/L组、FAC 100 μmol/L组、左旋含羞草碱200 μmol/L+FAC 50 μmol/L组、左旋含羞草碱200 μmol/L+FAC 100 μmol/L组。同法处理细胞后流式细胞仪检测FAC联合左旋含羞草碱对FaDu细胞凋亡的影响。以上实验每组设3个复孔,以0.9%氯

化钠注射液作为对照组,实验重复3次。

1.4 CCK-8检测FaDu细胞活性 FaDu细胞接种于96孔板,放置到含5% CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养,实验分为左旋含羞草碱200 μmol/L组、FAC 50 μmol/L组、FAC 100 μmol/L组、左旋含羞草碱200 μmol/L+FAC 50 μmol/L组、左旋含羞草碱200 μmol/L+FAC 100 μmol/L组,并设置阴性对照孔为对照组,每种浓度均设3个复孔。分别于培养24 h、48 h、72 h、96 h时取出培养板加入CCK8试剂(由江苏碧云天生物技术公司生产)10 μl继续培养2 h,酶标仪测450 nm处OD值,每次实验重复3次。

1.5 Western-blot法检测Bcl-2、Bax等凋亡相关蛋白的表达 将FaDu细胞接种于100 ml培养瓶内,放置于5% CO₂、37℃、饱和湿度的孵箱内培养24 h后,见细胞贴壁生长,加入左旋含羞草碱,终浓度分别为0 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L,继续培养24 h,收集细胞,离心5 min,倒去上清液,PBS液洗涤3次,分别转移到1.5 ml Ep管中,100 μl蛋白质裂解液Buffer(由Sigma公司生产)处理细胞,-20℃冰箱保存待测。次日用10% SDS-PAGE处理细胞样品,SDS聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质被转移到硝酸纤维素膜上,4℃冰箱封闭过夜。次日取出硝酸纤维素膜放进含一抗抗体(Bcl-2兔抗人单克隆抗体、Bax兔抗人单克隆抗体、Bak兔抗人单克隆抗体等由上海科敏生物公司生产)的封闭液中,4℃冰箱孵育过夜。次日取出膜电转液洗涤3次,每次10 min。将膜放入含二抗抗体的封闭液中,室温下孵育2 h,电转液洗涤3次,每次10 min。最后将膜放在保鲜膜上,电化学发光法检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Bak、Bik、Bid的表达水平。

1.6 统计学方法 采用SPSS 19.0版软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学的影响 常规培养24 h、48 h后,倒置显微镜下观察正常培养的FaDu细胞,见细胞贴壁生长,连接紧密,密集成片生长,轮廓欠清,透明度大,折光性强,大小均匀。经不同浓度左旋含羞草碱作用后,可见细胞相互离散,细胞皱缩,体积变小,间隙增宽,细胞固缩深染,折光性减弱,细胞数目明显减少。随着左旋含羞草浓度的增加和作用时间延长,培养液中悬浮细胞增多,贴壁生长的细

胞减少,培养液变浑浊。

2.2 FAC对FaDu细胞的凋亡的影响见表1

表1 FAC对FaDu细胞凋亡的影响/%

组别	凋亡率
FAC 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.75 ± 0.31
FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	$1.07 \pm 0.28^*$
FAC 500 $\mu\text{mol/L}$ 组	$2.12 \pm 0.42^*$
FAC 1000 $\mu\text{mol/L}$ 组	$2.46 \pm 0.49^*$

注: *:与FAC 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,不同浓度FAC对FaDu细胞凋亡有显著性差异($F=6.54, P < 0.05$)。FaDu细胞在FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用下,其凋亡率低于FAC 0 $\mu\text{mol/L}$ 组,差异有统计学意义($t=3.25, P < 0.05$),FAC 500 $\mu\text{mol/L}$ 、FAC 1000 $\mu\text{mol/L}$ 作用下的FaDu细胞的凋亡率则高于FAC 0 $\mu\text{mol/L}$,差异均有统计学意义(t 分别=3.63、3.97, P 均 < 0.05)。

2.3 左旋含羞草碱联合FAC对FaDu细胞凋亡的影响见表2

由表2可见,不同浓度左旋含羞草碱联合FAC

表3 左旋含羞草碱联合FAC对FaDu细胞活性的影响

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01
FAC50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.81 ± 0.05
FAC100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.86 ± 0.05
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.57 ± 0.04
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.64 ± 0.05
对照组	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.75 ± 0.04

由表3可见,左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ 对FaDu细胞生长增殖活性的抑制作用最显著,然后由强到弱依次为左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 、左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5 左旋含羞草碱对FaDu细胞Bcl-2、Bax等凋亡相关蛋白表达的影响见图1

由图1可见,随着左旋含羞草碱浓度的增加,Bcl-2蛋白家族中具有抑制凋亡作用的Bcl-2蛋白的表达显著降低,促进凋亡作用的Bax、Bak、Bik、Bid等蛋白的表达明显增强。

3 讨论

铁元素是细胞生存的关键元素,铁作为辅助因子参与多种氧化还原酶的分子特性也赋予其损伤细胞的能力。不恰当的滞留铁催化产生高度有毒的活性氧物质羟基自由基等,过量的自由基可通过

对FaDu细胞凋亡有显著性差异($F=5.78, P < 0.05$),左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ 组FaDu细胞凋亡最显著。左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较,细胞凋亡率无统计学意义(t 分别=2.64、2.13, P 均 > 0.05),FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组FaDu细胞凋亡率均低于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=3.61、3.98, P 均 < 0.05)。

表2 左旋含羞草碱联合FAC对FaDu细胞凋亡的影响/%

组别	凋亡率
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.95 ± 0.52
FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组	$1.19 \pm 0.27^*$
FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	$1.09 \pm 0.25^*$
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 50 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.81 ± 0.32
左旋含羞草碱200 $\mu\text{mol/L}$ +FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.71 ± 0.30
对照组	1.78 ± 0.33

注: *:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 左旋含羞草碱联合FAC对FaDu细胞增殖活性的影响见表3

DNA氧化、线粒体损伤、膜脂过氧化等刺激细胞凋

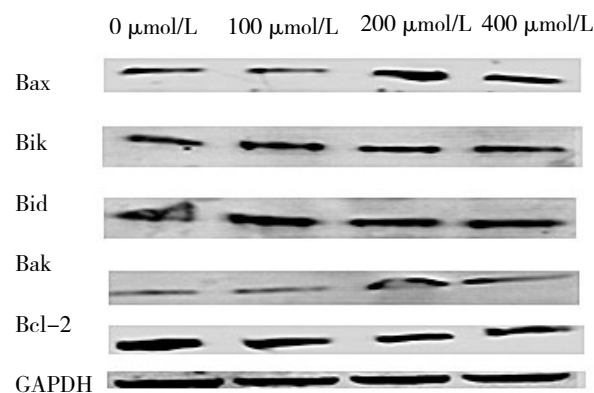


图1 不同浓度左旋含羞草碱对FaDu细胞Bax、Bik、Bid、Bak、Bcl-2蛋白表达的影响

亡和基因突变。铁螯合剂通过螯合细胞内铁影响了癌细胞生物学行为,抑制了核糖核苷酸还原酶活

性,进而影响脱氧核糖核酸的合成和修复,抑制肿瘤细胞的生长。

本次实验结果显示,左旋含羞草碱能够显著抑制FaDu细胞的生长,表现在与正常培养的FaDu细胞相比,左旋含羞草碱作用下的FaDu细胞生长状况差,折光性变弱,轮廓增强,胞浆中常出现空泡,部分贴壁细胞收缩变圆,甚至从瓶壁脱落,证明左旋含羞草碱对人咽鳞状细胞癌FaDu细胞生长有明显的抑制作用。

有研究表明,左旋含羞草碱是一种铁螯合剂,可以螯合细胞内的二价铁离子^[6]。本次实验结果显示,FaDu细胞在FAC 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用下,细胞的凋亡率低于FAC 0 $\mu\text{mol/L}$; FAC 500 $\mu\text{mol/L}$ 、FAC 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作用下,FaDu细胞的凋亡率则高于FAC 0 $\mu\text{mol/L}$ (P 均 <0.05),表明一定量的FAC对FaDu细胞的凋亡具有抑制作用,缺铁或铁过量对细胞凋亡具有促进作用。左旋含羞草碱能够促进FaDu细胞的凋亡,加入适量的FAC后,左旋含羞草碱促进FaDu细胞凋亡的作用近乎消失,与江哲珍等^[6]研究结果相似。CCK-8法实验结果显示,左旋含羞草碱单独作用于FaDu细胞,其抑制细胞生长作用显著,加入一定量的FAC后,其抑制FaDu细胞生长的作用明显减弱。表明左旋含羞草碱诱导FaDu细胞凋亡的作用与其铁螯合作用密切相关,与Panopoulos等^[7]的研究结果基本一致。

目前关于细胞凋亡途径主要有三条,即死亡受体通路^[8]、线粒体通路^[9]和内质网通路^[10]。线粒体凋亡途径是最重要的凋亡途径之一,而线粒体内膜和外膜的通透性又主要由Bcl-2家族蛋白控制,因此Bcl-2家族蛋白是线粒体凋亡途径的主要调控者^[11]。本次实验结果显示,随着左旋含羞草碱干预浓度的升高,FaDu细胞中Bcl-2蛋白家族中具有抑制凋亡作用的Bcl-2蛋白的表达降低,而具有促进凋亡作用的Bax、Bak、Bik、Bid等蛋白的表达增强,说明左旋含羞草碱促进FaDu细胞凋亡,主要是通过Bcl-2家族蛋白介导的线粒体通路实现的^[12]。

综上所述,左旋含羞草碱可能通过干扰人咽鳞状细胞癌FaDu细胞的铁代谢,激活Bcl-2家族蛋白发挥着重要调控作用的线粒体通路,引起细胞色素C和凋亡诱导因子的释放,影响癌细胞生物学行为,最终促进了癌细胞凋亡,为中医药治疗咽鳞状细胞癌提供了重要的依据,其具体的抗肿瘤机制有待进一步研究。另外,本次实验有关左旋含羞草碱对Fa-

Du细胞活性氧物质、血管生成等方面的影响未进行研究,还需要进行这些方面的研究。

参考文献

- Heng PS, Irfan M. Hypopharyngeal cancer masquerading as a thyroid mass[J]. Med J Malaysia, 2016, 71(6): 360-362.
- 周梁. 下咽癌的治疗进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2019, 25(4): 333-338.
- 黄泽雷, 宋琦, 路秀英, 等. 双氢青蒿素对下咽癌Fadu细胞内质网应激途径的作用[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2019, 33(4): 31-35.
- Kacar O, Cevatemre B, Hatipoglu I, et al. The role of cell cycle progression for the apoptosis of cancer cells induced by palladium(II)-saccharinate complexes of terpyridine[J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25(6): 1770-1777.
- Pluchino LA, Liu AK, Wang HC. Reactive oxygen species-mediated breast cell carcinogenesis enhanced by multiple carcinogens and intervened by dietary ergosterol and mimosine[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 80(1): 12-26.
- 江哲珍, 祝少博, 余黎, 等. 左旋含羞草碱诱导骨肉瘤细胞凋亡作用及机制的体外实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2018, 15(2): 1-4.
- Panopoulos A, Harraz M, Engelhardt JF, et al. Iron-mediated H_2O_2 production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced but not interleukin-1beta-induced I κ B kinase complex/nuclear factor-kappaB activation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(4): 2912-2923.
- Yin J, Ni B, Wei GL, et al. Hypoxia induced apoptosis of mouse spermatocytes is mediated by HIF 1 α through a death receptor pathway and a mitochondrial pathway[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 1146-1155.
- 董伯升, 徐克友, 左彩莹. 华蟾素联合多柔比星通过Fas/线粒体通路促进肺癌A549细胞凋亡[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(1): 121-125.
- 徐新明, 陈健, 陆荣柱, 等. 姜黄素通过内质网应激信号通路诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡的作用研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2018, 37(1): 12-17.
- Tsukahara S, Yamamoto S, Shwet T, et al. Inhalation of low level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. Neuro Immuno Modulat, 2006, 13(2): 63-68.
- 郑小蓉, 姜建伟. 姜黄素阻断ERK1/2信号通路抑制前列腺癌PC-3细胞增殖的研究[J]. 全科医学临床与教育, 2018, 16(4): 380-384.

(收稿日期 2020-1-21)

(本文编辑 蔡华波)