

. 实验研究 .

芹菜素对脑胶质瘤细胞U87增殖、侵袭及迁移能力的影响

肖庆保 陈 波 余小祥

【摘要】目的 探讨芹菜素对脑胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响及作用机制。**方法** 体外培养脑胶质瘤 U87 细胞,加入 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素干预,以培养基作为空白对照组。使用 MTT 法检测 U87 细胞的增殖抑制率,使用 Hoechst 染色法观察细胞凋亡情况;使用 Transwell 检测 U87 细胞侵袭能力;划痕实验法检测 U87 细胞迁移能力;使用免疫印迹法检测 U87 细胞基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、Bak1、Caspase-3 表达水平。**结果** 与空白对照组比较,芹菜素组细胞抑制率显著增加($P<0.05$)、细胞凋亡数目明显增加($P<0.05$)、细胞侵袭数目显著下降($P<0.05$)、细胞迁移数目明显减少($P<0.05$)、U87 细胞 MMP-2、MMP-9、Bak1 蛋白表达显著下降($P<0.05$)、Caspase-3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);而且均呈浓度依赖性。**结论** 芹菜素可有效抑制脑胶质瘤 U87 细胞增殖、促进凋亡,可能与下调 MMP-2、MMP-9、Bak1 蛋白表达水平,上调 Caspase-3 表达有关。

【关键词】 脑胶质瘤;U87 细胞;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移;芹菜素

【文章编号】 1009-153X(2019)08-0486-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 73-37

Effects of apigenin on proliferation, invasion and migration of glioma cell line U87 cells

XIAO Qing-bao, CHEN Bo, YU Xiao-xiang. Department of Neurosurgery, Wuhan Municipal Third Hospital, Wuhan 430000, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of apigenin on the proliferation, invasion and migration of glioma cell line U87 cells and their mechanism. **Methods** U87 cells were cultured in vitro and then were divided into blank control group, experimental group I in which U87 cells were treated with low-dose apigenin (20 $\mu\text{mol/L}$), experimental group II in which the cells were treated with medium-dose apigenin (40 $\mu\text{mol/L}$) and experimental group III in which the cells were treated with high-dose apigenin (80 $\mu\text{mol/L}$). The U87 cells proliferation, apoptosis, and invasive and migration abilities were determined respectively by MTT, Hoechst staining, transwell test and scratch assay. The levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, Recombinant Bcl2 Antagonist/Killer 1 (Bak1), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) expressions in the U87 cells were detected by Western blotting. **Results** Compared with the blank control group, the abilities of U87 cells proliferation, migration and invasion were significantly inhibited in all the experimental groups ($P<0.05$). The rates of the inhibition of U87 cells proliferation, migration and invasion were positively related to the dose of apigenin used to treat the U87 cells ($P<0.05$). Compared with the blank control group, in the U87 cells the expressions of MMP-2, MMP-9 and Bak1 in the U87 cells were significantly inhibited and the protein expression of Caspase-3 protein was significantly up-regulated in all the experimental groups ($P<0.01$). The levels of MMP-2, MMP-9 and Bak1 protein expression in the U87 cells were negatively related to the dose of apigenin used to treat the U87 cells and the level of Caspase-3 protein expression in the U87 cells was positively related to the dose used to treat the U87 cells ($P<0.01$). **Conclusion** It is suggested that apigenin can inhibit the proliferation, invasion and migration of glioma cell line U87 cells possibly by the down-regulation of the levels of MMP-2, MMP-9 and Bak1 protein expression and up-regulate the level of Caspase-3 protein expression.

【Key words】 Glioma; Apigenin; U87 cells; Proliferation; Invasion; Migration

脑胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤^[1],易复发,预后差。即使采用手术联合放、化疗的综合治疗,其生存期中位数只有 12~14 个月^[2]。许多研究发现芹菜素对多种恶性肿瘤具有抑制作用^[3-5]。本文探讨芹菜素对脑胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 芹菜素(纯度>98%)购自上海鼎瑞化工有限公司;基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、Caspase-3、Bak1 试剂盒子购自上海沪震实业有限公司;Hoechst 染色剂购自武汉华联科有限公司;二甲基亚砜购自天津科密欧有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 脑胶质瘤 U87 细胞(中国科

学院细胞库)培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素 RPMI1640 培养基中。分为空白对照组(只含培养基)、低浓度芹菜素组(20 $\mu\text{mol/L}$)、中浓度芹菜素组(40 $\mu\text{mol/L}$)、高浓度芹菜素组(80 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期 U87 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液,以 7 500 个/孔接种于 96 孔板。加入芹菜素继续培养 1 d,加入 40 μl MTT(2 mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 4 h,震荡 5 min 使结晶完全溶解。使用酶标仪检测 550 nm 波长吸光值 A,并计算细胞生长抑制率。抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 Hocst 染色法观察细胞凋亡情况 取对数生长期 U87 细胞,以 $1\times 10^7/\text{L}$ 密度接种于 96 个孔板,加入芹菜素继续培养 1 d,去培养基,用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,加入 Hocst 染色剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 时避光 10 min,荧光显微镜下观察细胞,鉴别正常与凋亡的目标细胞摄片,随机取不同视野计算细胞凋亡率,重复 3 次。

1.2.4 Transwell 试验检测 U87 细胞侵袭能力 将 100 μl 稀释后的基质胶均匀覆盖于 Transwell 小室底部。取对数期生长 U87 细胞,以芹菜素预处理,调整细胞密度为 2×10^5 个/ml,取 100 μl 细胞悬液加于上室,下室加入等体积含血清培养基,培养 48 h 后取出小室,按照说明书进行固定、染色,下室面表面细胞为侵袭细胞,随机选取 5 个不同视野进行拍照、计数,取平均值作为细胞侵袭数。

1.2.5 划痕实验法检测 U87 细胞迁移能力 取对数生长期 U87 细胞制成悬液,芹菜素预处理,将 U87 细胞培养 1 d 后显微镜下再次观察拍照。

1.2.6 免疫印迹法检测相关蛋白的表达 芹菜素干预后 1 d,去除培养液,取 U87 细胞按照 MMP-2、MMP-9、Bak1、Caspase-3 试剂盒使用方法操作,检测蛋白表达。用 10% SDS-PAGE 电泳提取总蛋白,半干法将蛋白转移到 PVDF 膜,置于 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入各需要检测蛋白的抗体,孵育 2 h,TBS 洗净,以 β -actin 为内参蛋白,采用显色液显色后行吸光度分析,计算各蛋白相对表达量。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析和 SNK- q 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芹菜素对 U87 细胞增殖的影响 与空白对照组比较,芹菜素组细胞抑制率显著增加($P<0.05$),且呈

浓度依赖性($P<0.01$)。见图 1。
2.2 芹菜素对 U87 细胞凋亡影响 空白对照组细胞核染色分布均匀,且细胞荧光较多。与空白组相比,芹菜素组荧光分布不均匀,且荧光数目显著减少;而且,随芹菜素浓度增加,荧光分布无序、细胞数目减

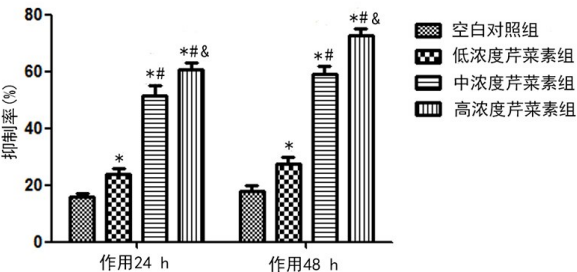


图 1 芹菜素对脑胶质瘤 U87 细胞增殖抑制率的影响
与空白对照组相比,* $P<0.05$;与低浓度芹菜素组相比,# $P<0.05$;与中浓度芹菜素组相比,& $P<0.05$

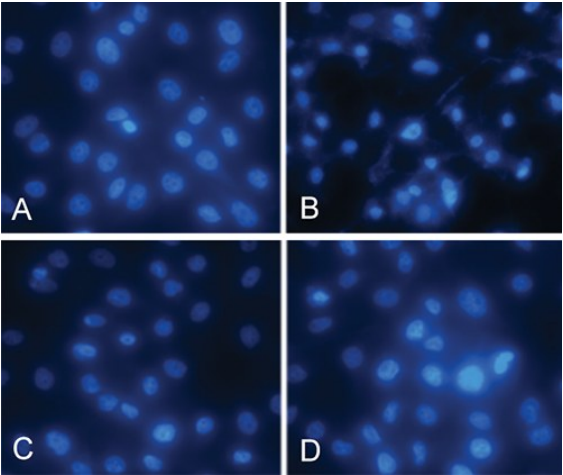


图 2 Hocst 染色观察芹菜素对脑胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响($\times 400$)
A. 空白对照组;B. 低浓度芹菜素组;C. 中浓度芹菜素组;D. 高浓度芹菜素组

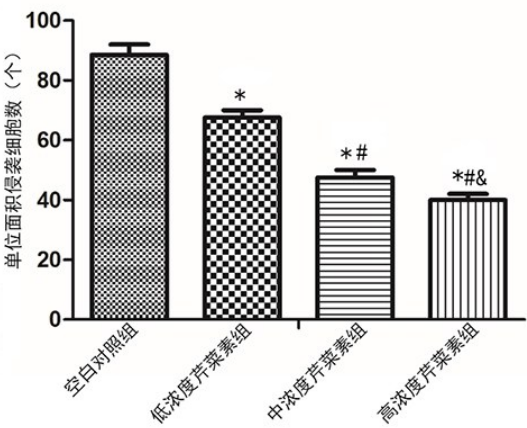


图 3 芹菜素对脑胶质瘤 U87 细胞侵袭能力的影响
与空白对照组相比,* $P<0.05$;与低浓度芹菜素组相比,# $P<0.05$;与中浓度芹菜素组相比,& $P<0.05$

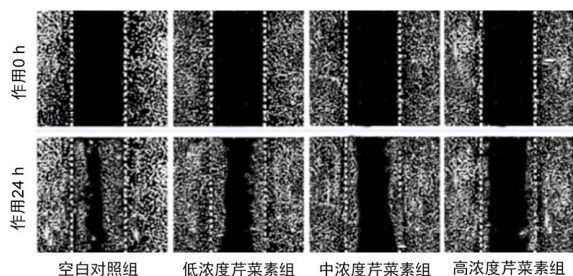


图4 划痕实验观察芹菜素对脑胶质瘤U87细胞迁移能力的影响

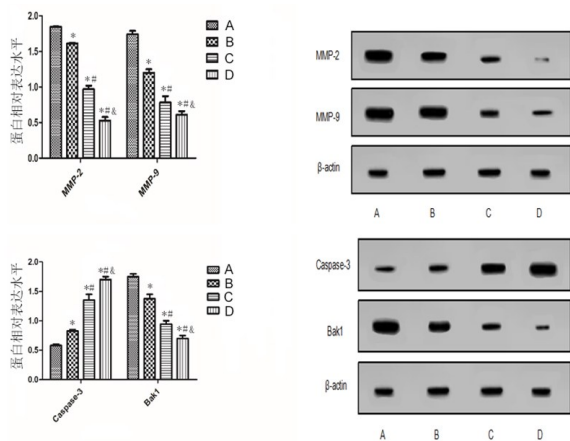


图5 芹菜素对脑胶质瘤U87细胞相关蛋白表达的影响与A组相比,* $P<0.05$;与B组相比,# $P<0.05$;与C组相比,& $P<0.05$;A.空白对照组;B.低浓度芹菜素组;C.中浓度芹菜素组;D.高浓度芹菜素组;MMP-2.基质金属蛋白酶-2;MMP-9.基质金属蛋白酶-9

少加剧,部分细胞核裂解,呈无规则形状。见图2。

2.3 芹菜素对U87细胞侵袭能力影响 与空白对照组比较,芹菜素组细胞侵袭数目显著下降($P<0.01$),且呈浓度依赖性。见图3。

2.4 芹菜素对U87细胞迁移能力影响 空白对照组培养24 h有大量脑胶质瘤细胞发生迁移。与空白对照组比较,芹菜素组细胞数目明显减少($P<0.05$),呈浓度依赖性。见图4。

2.5 芹菜素对U87细胞相关蛋白表达影响 与空白对照组比较,芹菜素组MMP-2、MMP-9、Bak1蛋白表达显著下降($P<0.05$),Caspase-3蛋白表达显著升高($P<0.05$),且呈浓度依赖性。见图5。

3 讨论

肿瘤细胞在增殖和转移过程中,需要将细胞外基质蛋白水解,才能跨越基底膜屏障进入循环系统,才能向远处转移^[6,7]。MMP是一种能降解细胞外基质预防肿瘤细胞侵袭转的一种金属离子的蛋白水解酶^[8],MMP-2、MMP-9较常见,在肿瘤细胞突破基底

膜屏障而浸润转移中起重要作用^[9]。本文结果显示芹菜素显著降低U87细胞MMP-2、MMP-9表达水平,且呈浓度依赖性。另外,芹菜素显著降低U87细胞Bak1蛋白表达。Caspase-3是执行凋亡的基因,最终导致细胞凋亡^[10]。本文发现芹菜素明显增加U87细胞Caspase-3表达水平。这与程新燕和符翠莉^[11]研究结论一致。

综上所述,芹菜素可有效抑胶质瘤U87细胞增殖、侵袭及迁移,其作用机制可能与下调MMP-2、MMP-9、Bak1蛋白表达水平,上调Caspase-3蛋白表达水平有关。

【参考文献】

[1] 林昌海,李丽仙,冉 静,等.脑胶质瘤血液循环肿瘤标志物研究进展[J].重庆医学,2016,45(30):4293-4296.
[2] 马辉辉,张 帆,杨 林,等.高级别胶质瘤术后放疗联合替莫唑胺治疗临床分析[J].中华肿瘤防治杂志,2017,3(18):1295-1300.
[3] 金 波,邱慧玲,李玉萍.芹菜素通过PI3K/Akt信号通路诱导Hela细胞凋亡[J].现代肿瘤医学,2017,25(3):367-371.
[4] Sung B, Chung HY, Kim ND. Role of apigenin in cancer prevention via the induction of apoptosis and autophagy [J]. J Cancer Prev, 2016, 21(4): 216-226.
[5] 赵亚新,刘洁凡,江明华,等.芹菜素抗乳腺癌多药耐药MCF-7/ADR细胞作用的研究[J].中国癌症杂志,2017,27(8):648-654.
[6] 吴伟东,罗 磊,丁 锋.肺癌相关基质金属蛋白酶研究进展[J].山东医药,2018,58(13):93-96.
[7] 芮小慧,徐 云,蒋敬庭.趋化因子受体在卵巢癌进展中的作用机制[J].临床检验杂志,2017,35(11):836-839.
[8] 胡梅艳,孙晓红.细胞外基质、基质金属蛋白酶与恶性肿瘤关系的研究进展[J].肿瘤药学,2016,6(1):26-30.
[9] 徐海波,熊异平,余恒勇.膀胱癌组织中MMP-2、MMP-9、Survivin、Livin和VEGF表达的临床意义分析[J].标记免疫分析与临床,2017,24(1):51-54.
[10] 黎杏梅.凋亡蛋白基因Mcl-1、Caspase-3研究概况以及丙酸氟替卡松对鼻息肉的作用[J].现代医学与健康研究电子杂志,2018,2(12):194-196.
[11] 程新燕,符翠莉.芹菜素对大鼠骨肉瘤细胞凋亡及相关蛋白Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、细胞色素C的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,4(15):139-142.

(2019-05-09收稿,2019-05-28修回)