

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.008

白藜芦醇对人脑胶质瘤 U87 细胞自噬的影响*

胡火军¹, 黄益玲^{2△}, 汪雷¹, 郭金满¹, 马金阳¹

(1. 三峡大学第一临床医学院/宜昌市中心人民医院神经外科, 湖北宜昌 443003;

2. 三峡大学医学院病理学系, 湖北宜昌 443002)

[摘要] **目的** 研究白藜芦醇对脑胶质瘤 U87 细胞自噬的诱导作用及其可能的作用机制。**方法** 分别用不同浓度的白藜芦醇处理脑胶质瘤 U87 细胞 12、24、48 h 后, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测白藜芦醇对 U87 细胞生长的抑制作用; 电子显微镜观察药物处理后 U87 细胞自噬空泡的出现; 逆转录 PCR 及 Western blot 分别检测白藜芦醇作用后自噬相关基因微管相关蛋白 I 轻链 3(LC-3)、抗 Bax 交互作用因子(Bif-1)mRNA 及蛋白表达的变化。**结果** 随着药物浓度的增加及作用时间的延长, 白藜芦醇对 U87 细胞的生长抑制作用逐渐增大。电镜检测发现未使用白藜芦醇处理的细胞未出现自噬空泡, 而白藜芦醇处理过的细胞出现明显的自噬空泡。白藜芦醇能剂量依赖性地增强自噬相关基因 LC-3、Bif-1 mRNA 及蛋白水平的表达。**结论** 白藜芦醇可以通过诱导细胞自噬来抑制 U87 细胞增殖, LC-3、Bif-1 基因表达上调是其诱导自噬的可能机制。

[关键词] 神经胶质瘤; 自噬; 白藜芦醇; U87 细胞**[中图分类号]** R739.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3190-03

The effect of resveratrol on human glioma U87 cell autophagy*

Hu Huojun¹, Huang Yiling^{2△}, Wang Lei¹, Guo Jinman¹, Ma Jinyang¹

(1. Department of Neurosurgery, the First Clinical Hospital of China Three Gorges University/Central People's Hospital of Yichang City, Yichang, Hubei 443003, China; 2. Department of Pathology, Medical College,

China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

[Abstract] **Objective** To study the autophagy induction effect of resveratrol(Res) on glioma U87 cells and to explore the possible mechanism. **Methods** Glioma cell line U87 was treated with different concentration of Res. Cell growth inhibition was detected by MTT assay. Electronic microscope was used to observe the typical autophagic vacuoles. RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the mRNA and protein expression level of LC-3 and Bif-1 gene. **Results** With the increase of drug concentration and the prolongation of action time, the inhibition effect of Res on the growth of U87 cells was gradually increased. Electron microscopic examination showed that the control group did not appear autophagic vacuoles, but the experiment group showed obvious autophagic vacuoles. Res increased the expression of autophagy related gene LC-3 and Bif-1 in both mRNA and protein levels in a dose-dependent manner. **Conclusion** Resveratrol could inhibit the proliferation of U87 cells by inducing autophagic cell death; the up-expression of autophagy related gene LC-3 and Bif-1 might mediate this process.

[Key words] glioma; autophagy; resveratrol; U87 cell

白藜芦醇(resveratrol)是含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物, 广泛存在于葡萄、松树、花生等天然植物或果实当中, 具有调节脂质代谢、抑制血小板聚集、保护心血管、抗炎、抗肿瘤等多种生物学活性^[1-2]。近年来研究发现, 肿瘤细胞中的自噬活动可以在一些治疗因素作用下被激活, 过度自噬导致的细胞死亡可以杀灭肿瘤细胞^[3-4]。白藜芦醇能否通过诱导自噬抑制脑胶质瘤的生长尚未见报道。本研究以人脑胶质瘤 U87 细胞为模型, 探讨白藜芦醇对脑胶质瘤 U87 细胞的自噬诱导作用, 并初步探讨其作用机制, 为白藜芦醇的抗肿瘤作用提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 白藜芦醇购自 Sigma 公司; DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司; RPMI 1640 培养基和 FBS 购自美国 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Amresco 公司; Trizol 总 RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司; GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladders 购自 Fermentas 公司(试剂来源见文献[5]), 引物由 Sigma 公司合成; 一抗 Bax 交互作用因子(Bax-interacting factor-1, Bif-1)、 β -actin、二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG 抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; 微管

相关蛋白 I 轻链 3- β (LC-3)购自 Cell Signal 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 脑胶质瘤细胞 U87 细胞为本室传代保存, 培养于 5% CO₂, 37 °C 湿化孵箱中。培养基 DMEM 含 10% 胎牛血清(FBS), 0.1 U/L 青霉素, 0.1 g/L 链霉素, 取对数生长期细胞待用^[5]。

1.2.2 MTT 法测定 取对数生长期的 U87 细胞接种于 96 孔细胞培养板中(每孔 2×10^4), 12 h 后加入不同浓度的白藜芦醇(0、12.5、25.0、50.0、100.0、150.0、200.0 μ mol/L), 每个浓度设 6 个平行孔, 继续培养 12、24、48 h, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L; 继续培养 4 h 后加入 200 μ L 二甲亚砜(DMSO)溶解, 测定 MTT-甲臞化合物在 570 nm 处的光密度(OD)值, 按公式: 相对抑制率 = (1 - 试验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) \times 100% 计算细胞生长抑制率。

1.2.3 电镜观察细胞自噬小泡 U87 细胞接种于 12 孔板, 细胞密度 70.0%~80.0% 时, 各孔分别加入不同浓度白藜芦醇处理 12 h, 收集各组细胞, 800 g 离心 10 min, 冰磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞沉淀, 2.5% 戊二醛 4 °C 固定过夜, 0.5% 四氧

化饥饿 30 min 后,用含 2.0%醋酸双氧铀的 50.0%乙醇着色、脱水后,环氧树脂 812 包埋,60 °C 聚合 48 h,80 nm 切片后枸橼酸铅染色,采用 JEOL100CX11 透射电子显微镜观察拍照。

1.2.4 逆转录 PCR(RT-PCR)检测自噬相关基因 LC3 和 Bif-1 mRNA 的表达 收集经白藜芦醇处理的 U87 细胞,用 Trizol 按说明书提取总 RNA,nano drop 测定 RNA 的水平,用逆转录酶和 Oligo(dT)20 引物合成 cDNA 第 1 链,合成条件为 70 °C 5 min,37 °C 5 min,42 °C 60 min,70 °C 10 min。以反转录的 cDNA 为模板,所用引物,退火温度(T_m)及产物长度见表 1。PCR 产物行 1.2%琼脂糖凝胶电泳,紫外拍照分析。

表 1 自噬相关基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	T _m	产物长度(bp)
LC3	F:GAAGATGTCCACTTATTCGAGAG	56	252
	R:ACTCTCATACACCTCTGAGATTG		
Bif-1	F:GCAGTACACATGCCATCAC	56	174
	R:CACCTTCGCTGTCTGAATGA		
β-actin	F:TGGCACCCAGCACAATGAA	56	186
	R:CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA		

1.2.5 Western blot 检测自噬相关基因 LC3 和 Bif-1 蛋白的表达 按文献[4]的方法,离心收获细胞,加入适量的细胞裂解液(临用前加入各种蛋白酶抑制剂)提取蛋白,调整蛋白水平,加入等量 2×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳加样缓冲液,置 95~100 °C 沸水中变性 5 min,行 SDS-PAGE 垂直电泳,电转膜,加 50 g/L 脂奶粉于 4 °C 冷库封闭过夜。PBST 洗膜后,分别加相应一抗 37 °C 孵育 1 h,PBST 洗膜;加相应二抗 37 °C 孵育 1 h,PBST 洗膜,等量的电化学发光(ECL)发光液 A 和 B 混合后加至膜上 1 min,最后 X 线片显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法测定白藜芦醇对 U87 细胞增殖的抑制作用 白藜芦醇对 U87 细胞的生长抑制作用随其浓度的增大而加强,与 0 μmol/L 白藜芦醇,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

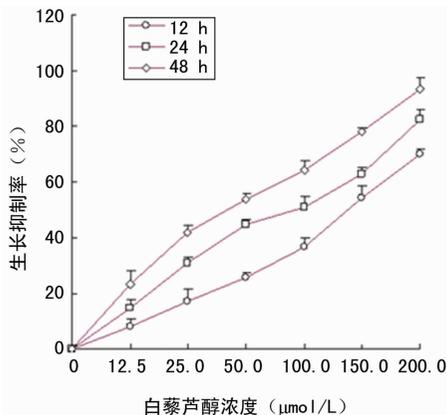


图 1 不同浓度白藜芦醇作用 12、24、48 h 对 U87 细胞的增殖抑制作用

2.2 白藜芦醇对细胞自噬的影响 自噬是以细胞质空泡化为特征的依赖于溶酶体的一种降解途径,在电子显微镜下可以观察到自噬性空泡的出现。0 μmol/L 白藜芦醇处理的 U87 细胞无明显自噬空泡,经 25 μmol/L 白藜芦醇处理 12 h 的 U87 细

胞开始出现自噬空泡,50 μmol/L 白藜芦醇处理 U87 细胞后出现的自噬空泡更为明显,见图 2。

2.3 白藜芦醇对细胞自噬相关基因 mRNA 的影响 RT-PCR 检测发现,白藜芦醇能增强自噬相关基因 LC-3、Bif-1 mRNA 表达水平,并具有剂量依赖性,见图 3。

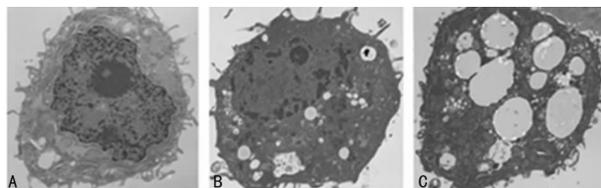


图 2 白藜芦醇对细胞自噬的电镜改变
A: 0 μmol/L 白藜芦醇; B: 25 μmol/L 白藜芦醇; C: 50 μmol/L 白藜芦醇。

图 2 白藜芦醇对细胞自噬的电镜改变

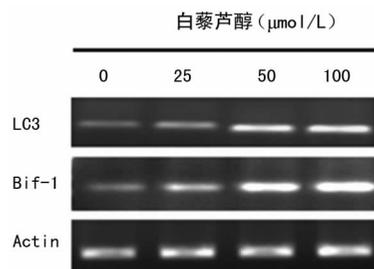


图 3 白藜芦醇对自噬相关基因 LC-3、Bif-1 mRNA 表达的影响(RT-PCR)

2.4 白藜芦醇对自噬相关蛋白的影响 Western blot 检测发现,白藜芦醇作用后可明显升高 LC3-II 水平,Bif-1 的表达也逐渐升高,见图 4。

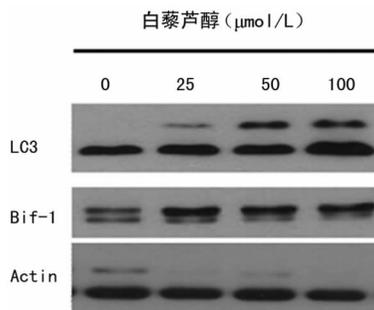


图 4 白藜芦醇对自噬相关蛋白 LC-3、Bif-1 表达的影响 (Western blot)

3 讨 论

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤,约占颅内肿瘤的 46%,具有侵袭性生长的特征,手术不易完全切除,术后复发率高,积极研究有效的抗脑胶质瘤药物尤其必要[6]。从天然药物中寻找能够抑制肿瘤细胞生长的化合物单体或前体化合物,是目前国内外肿瘤治疗药物研发的热点。白藜芦醇属于非黄酮类多酚化合物,近年研究发现白藜芦醇对乳腺癌、前列腺癌、肝癌、白血病、皮肤癌等多种肿瘤细胞的生长均具有显著的抑制作用[7]。白藜芦醇抑制肿瘤细胞生长的机制不尽相同,Liu 等[8]研究发现白藜芦醇可通过 PTEN/PI3K/Akt 和 Wnt/β-catenin 信号通路抑制结肠癌细胞的生长。李明新等[9]研究发现白藜芦醇能诱导黑色素瘤细胞发生凋亡,其发生机制与线粒体膜电位破坏,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性增强及 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (bcl-2) 表达水平降低有关。

近年来,自噬性程序性细胞死亡吸引了越来越多科学家的关注,有关自噬研究的文献在最近几年呈爆炸式增长,自噬性程序性细胞死亡的研究可能会像细胞凋亡一样成为近几年科

技领域的热点之一^[10-11]。细胞自噬在维持细胞的正常生长、发育中起着重要作用,自噬过度或自噬不足会导致疾病的发生^[12]。

自噬性程序性细胞死亡的形态学特征主要表现为细胞质中出现大量包裹着细胞质和细胞器的空泡样结构,即自噬空泡,同时伴有溶酶体对空泡内成分的降解。LC-3 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,是细胞自噬泡膜的通用标记物^[13]。在自噬泡形成的早期阶段,LC-3 的主要形式是 LC3-I。在哺乳动物 E1 泛素样酶 Atg7 和 E2 泛素样酶 Atg3 的催化下,LC3-I 与位于自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成 LC3-II。LC3-I 的相对分子质量为 16×10^3 ,LC3-II 的相对分子质量为 14×10^3 。LC3 从 LC3-I 到 LC3-II 的转变是自噬发生的标志之一,LC3-II 的水平或 LC3-II/LC3-I 的比例通常与细胞中自噬空泡的数量呈正相关^[14-15]。

Bif-1,又名 Endophilin B1,属于 Endophilin 蛋白家族,它首先在 Bax 的绑定蛋白中被发现。最近研究发现,Bif-1 介导 Bax 构象变化,激活 Bax 促凋亡功能,调控细胞凋亡通路^[16];另一方面,Bif-1 可通过 UVRAG 蛋白与 Beclin-1 结合,从而激活 VPS34 蛋白,参与调控细胞自噬的发生^[17-18]。

本研究用白藜芦醇处理脑胶质瘤 U87 细胞,电镜下可见明显的自噬空泡,且从 mRNA 及蛋白水平均检测到自噬相关基因 LC-3 和 Bif-1 表达水平的上调,表明白藜芦醇作用后可以引发自噬过程的发生,诱导细胞自噬也是白藜芦醇发挥肿瘤抑制作用的机制之一,有关白藜芦醇诱导凋亡及引发自噬的相关关系尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Raederstorff D, Kunz I, Schwager J. Resveratrol, from experimental data to nutritional evidence: the emergence of a new food ingredient[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1290(8):136-141.
- [2] 吕林林,许丽娜,彭金咏.抗脑胶质瘤中药的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(8):1024-1031.
- [3] Kanzawa T, Germano IM, Komata T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4):448-457.
- [4] 占贞贞,陈思,叶艳,等.自噬及自噬性细胞死亡抑制紫杉醇诱导的胃癌细胞凋亡[J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(2):123-127.
- [5] 黄益玲,黄利鸣,尤程程,等.内质网应激途径在天花粉蛋白诱导的 Hela 细胞凋亡中的作用[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(7):5423-5425.
- [6] 黄强,董军.王之敏主编神经肿瘤学[M].北京:人民卫生出版社,2011:215.

- [7] Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3):273-279.
- [8] Liu YZ, Wu K, Huang J, et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1):104-112.
- [9] 李明新,李健,樊伟英.白藜芦醇诱导人脉络膜恶性黑色素瘤细胞凋亡及其机制研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(12):2566-2568.
- [10] Sharma K, Le N, Alotaibi M, et al. Cytotoxic autophagy in cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6):10034-10051.
- [11] Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12):2445-2462.
- [12] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. *Science*, 2004, 306(5698):990-995.
- [13] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing[J]. *EMBO J*, 2000, 19(21):5720-5728.
- [14] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13):2805-2812.
- [15] 夏立平,李凌云,费喜峰,等.自噬参与 6-羟基多巴胺诱导多巴胺能神经元死亡的实验观察[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(12):2649-2651.
- [16] Takahashi Y, Karbowski M, Yamaguchi H, et al. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21):9369-9382.
- [17] Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10):1142-1151.
- [18] Takahashi Y, Meyerkord CL, Wang HG. Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7):947-955.

(收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-06-24)

(上接第 3189 页)

- [11] 胡晓波,程德云,张优仪,等.机械力对培养人肺泡 II 型上皮细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(2):99-102.
- [12] Waters CM, Roan E, Navajas D. Mechanobiology in lung epithelial cells: measurements, perturbations, and responses[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(1):1-29.
- [13] Nayak PS, Wang Y, Najrana T, et al. Mechanotransduction via TRPV4 regulates inflammation and differentiation in fetal mouse distal lung epithelial cells[J]. *Respir*

Res, 2015, 16(1):60.

- [14] Goldsmith CS, Bell-Pedersen D. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks [J]. *Adv Genet*, 2013, 4:1-39.
- [15] Cheng WP, Wang BW, Lo HM, et al. Mechanical stretch induces apoptosis regulator TRB3 in cultured cardiomyocytes and volume-overloaded heart [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0123235.

(收稿日期:2016-04-23 修回日期:2016-06-23)