

## · ARTICLES ·

## · 论 著 ·



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.05.008

http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201905522.pdf

## 白杨素对口腔鳞状细胞癌KB细胞凋亡的影响及其机制

谢雅馨<sup>1</sup>, 彭小宁<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西口腔医学院, 成都 610041; 2. 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000)

**[摘要] 目的:** 探讨白杨素对口腔鳞状细胞癌KB细胞凋亡的影响及其机制, 为临床上口腔鳞状细胞癌的治疗提供思路。**方法:** 用不同浓度白杨素(1, 2, 4, 8, 16和32  $\mu\text{mol/L}$ )处理KB细胞24 h, 采用MMT法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 化学发光法检测caspase-3/7活性, JC-1法检测KB细胞线粒体膜电位的变化, 蛋白质印迹检测蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)的活化。**结果:** 白杨素以浓度依赖方式抑制KB细胞增殖并诱导其凋亡, 促进caspase-3/7的活化, 降低KB细胞线粒体膜电位; 同时抑制AKT和PI3K磷酸化。**结论:** 白杨素诱导KB细胞凋亡作用可能与线粒体功能障碍和抑制PI3K/AKT通路相关。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌; 白杨素; 线粒体膜电位; 凋亡; 蛋白激酶B; 磷脂酰肌醇3-激酶

## Effects of chrysin on the apoptosis in oral squamous carcinoma KB cell line and the underlying mechanisms

XIE Yaxin<sup>1</sup>, PENG Xiaoning<sup>2</sup>

(1. West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041;

2. Jishou University School of Medicine, Jishou Hunan 416000, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effect of chrysin on apoptosis of oral squamous carcinoma KB cell line and the possible mechanisms, and to provide new ideas for the treatment of oral cancer.

**Methods:** Oral cancer KB cells were treated with different concentrations of chrysin (1, 2, 4, 8, 16, and 32  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. Cell proliferation was detected by MMT assay; apoptosis was detected by flow cytometry; the activity of caspase-3/7 was detected by chemiluminescent assay; mitochondrial membrane potential in KB cells was determined by JC-1 assay; and Western blotting was used to determine the activation of protein kinase B (AKT) and phosphoinositide-3-kinase (PI3K).

**Results:** Chrysin inhibited the proliferation of KB cells in a concentration-dependent manner,

收稿日期(Date of reception): 2018-09-30

第一作者(First author): 谢雅馨, Email: x1998yx@163.com, ORCID: 0000-0002-1925-9800

通信作者(Corresponding author): 彭小宁, Email: Pxiaoning@hunnu.edu.cn, ORCID: 0000-0001-9383-7608

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(81472860)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81472860).

accompanied by increase in apoptosis of KB cells, activation of caspase-3/7, decrease in mitochondrial membrane potential, and suppression of the phosphorylation of AKT and PI3K.

**Conclusion:** The effect of chrysin on KB cell apoptosis may be related to mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/AKT pathway.

## KEY WORDS

oral squamous carcinoma; chrysin; mitochondrial membrane potential; apoptosis; protein kinase B; phosphoinositide-3-kinase

口腔鳞状细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内其发生率位居第六<sup>[1]</sup>。尽管使用了手术、放射治疗及化学药物治疗的联合治疗, 口腔癌的治疗预后仍不乐观, 5年生存率低于50%<sup>[2]</sup>。因此, 进一步研究口腔鳞状细胞癌的发生发展机制, 寻找新的治疗药物及有效靶点对口腔鳞状细胞癌的治疗至关重要。白杨素(chrysin)是一种天然存在的黄酮, 是亚洲国家使用最广泛的草药之一。研究<sup>[3-4]</sup>表明: 白杨素具有广泛的药理活性, 如抗氧化、抗炎、抗过敏、抗菌和抗肿瘤等。体内外实验<sup>[5]</sup>证明白杨素对宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌和肝细胞癌等肿瘤具有凋亡诱导作用。但其对口腔癌的作用尚不清楚。本研究研究白杨素对口腔鳞状细胞癌KB细胞增殖和凋亡的影响, 并进一步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

DMEM高糖培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国Gibco公司; 白杨素和噻唑蓝溴化四唑(MTT)购于美国Sigma-Aldrich公司; 兔抗人蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、磷酸化蛋白激酶B(phosphate protein kinase B, p-AKT)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)和磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(phosphate phosphoinositide-3-kinase, p-PI3K)多克隆抗体购于美国Cell Signaling Technology(CST)公司; 辣根过氧化酶偶联山羊抗鼠二抗购于美国Santa Cruz Biotechnology公司; LY294002购于美国Sigma公司, 增强化学发光检测试剂盒购于美国Amersham Pharmacia Biotech公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; caspase-3/7活性检测试剂盒购于美国Promega公司; 线粒体膜电位检测试剂盒购于美国Genview公司。

### 1.2 人口腔鳞状细胞癌KB细胞培养

人口腔鳞状细胞癌KB细胞购于中国科学院上海

生命科学研究院细胞资源中心, 用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素G和100 μg/mL链霉素)在37 ℃, 5% CO<sub>2</sub>的湿润条件下进行培养。取对数生长期细胞用于实验。

### 1.3 MTT法检测细胞增殖活性

将KB细胞( $1 \times 10^4$  个/孔)接种于96孔板, 培养过夜, 次日添加不同浓度白杨素(1, 2, 4, 8, 16和32 μmol/L), 并分别设置不含药物的对照组、含0.1% DMSO的溶媒对照组及空白对照组, 每组设5个复孔。24 h后, 每孔加MTT溶液(5 mg/mL, 用PBS配制, pH值为7.4)10 μL继续孵育4 h, 之后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加100 μL DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分融解。选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度(OD)值, 记录结果, 利用Graphpad prism 6.0计算IC<sub>50</sub>值。细胞存活率=(实验组OD值均数-空白对照组OD值均数)/(对照组OD值均数-空白对照组OD值均数)×100%。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期KB细胞( $1 \times 10^5$  个/孔)接种于普通6孔板中, 经白杨素(10 μmol/L)处理24 h, 根据Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书对实验细胞进行荧光染色, 最后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.5 化学发光法检测caspase-3/7活性

将KB细胞( $1 \times 10^4$  个/孔)接种于96孔培养板于37 ℃, 5% CO<sub>2</sub>湿润条件下培养过夜, 次日添加10 μmol/L白杨素孵育24 h, 按caspase-3/7活性检测试剂盒说明书测定caspase-3/7活性。

### 1.6 JC-1法检测线粒体膜电位变化

取对数生长期KB细胞( $1 \times 10^5$  个/孔)接种于普通6孔板中, 经白杨素(10 μmol/L)或0.1% DMSO处理24 h后, 加入1 mL JC-1染色工作液和1 mL培养基, 充分混匀后于细胞培养箱中37 ℃孵育20 min; 孵育结束后,

用JC-1染色缓冲液洗涤2次;最后于倒置荧光显微镜下观察,以红绿荧光的相对变化来衡量线粒体电位的变化。

### 1.7 蛋白质印迹检测PI3K和AKT的表达和活化

取对数生长期KB细胞( $1 \times 10^5$ 个/孔)接种于普通6孔板中,经白杨素( $10 \mu\text{mol/L}$ )处理24 h后,加入裂解液冰上裂解30 min获得细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行10% SDS-PAGE凝胶电泳分离样品,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,0.5%脱脂牛奶封闭过夜,分别用抗AKT, p-AKT, PI3K和p-PI3K一抗于4 °C孵育过夜,二抗于室温孵育2 h,最后采用增强化学发光检测试剂检测蛋白表达。

### 1.8 统计学处理

采用SPSS 16.0软件对数据进行分析。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有实验重复3次。多组间比较采用单因素方差分析,当有统计学意义时,进一步做两两组的比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度白杨素对KB细胞增殖的影响

MTT试验显示:与未给药对照组相比,KB细胞经不同浓度白杨素(1, 2, 4, 8, 16和 $32 \mu\text{mol/L}$ )处理24 h后,其细胞增殖活性被抑制( $P < 0.05$ ,图1),其细胞生存率分别为( $71 \pm 3.2\%$ ), ( $70 \pm 4.0\%$ ), ( $56 \pm 4.3\%$ ),

( $40 \pm 9.5\%$ ), ( $34 \pm 4.7\%$ )和( $14 \pm 3.5\%$ );0.1% DMSO处理对KB细胞的增殖无明显影响( $P > 0.05$ )。白杨素的 $\text{IC}_{50}$ 值为 $11.49 \mu\text{mol/L}$ ,故采用浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的白杨素用于后续实验。

### 2.2 白杨素对KB细胞凋亡的影响

与不含药物的对照组相比, $10 \mu\text{mol/L}$ 白杨素处理24 h后,KB细胞凋亡率明显增加( $15.55\%$  vs  $8.02\%$ ),而0.1% DMSO处理对细胞无明显影响( $P > 0.05$ ,图2A)。进一步研究发现: $10 \mu\text{mol/L}$ 白杨素同样能显著诱导caspase-3/7的活化( $P < 0.05$ ,图2B)。

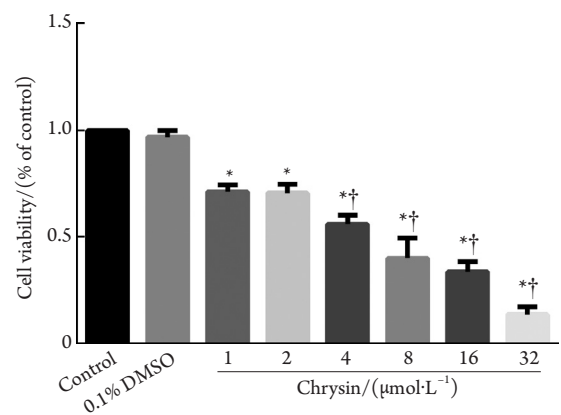


图1 不同浓度的白杨素抑制KB细胞增殖

Figure 1 Different concentration of chrysin inhibited proliferation of KB cells

MTT assay was used to evaluate the effect of chrysin on proliferation of KB cells. \* $P < 0.05$  vs the control group, † $P < 0.05$  vs  $1 \mu\text{mol/L}$  chrysin group

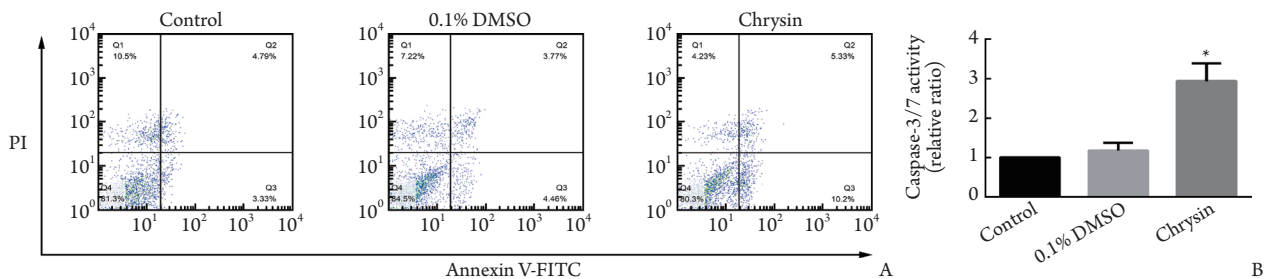


图2  $10 \mu\text{mol/L}$ 白杨素诱导KB细胞凋亡

Figure 2  $10 \mu\text{mol/L}$  chrysin induced the apoptosis of KB cells

A: Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the apoptosis of KB cells treated with  $10 \mu\text{mol/L}$  chrysin for 24 h. B: Caspase-3/7 activation in KB cells after treatment with  $10 \mu\text{mol/L}$  chrysin for 24 h. \* $P < 0.05$  vs the control group

### 2.3 白杨素对KB细胞线粒体膜电位的影响

KB细胞经 $10 \mu\text{mol/L}$ 白杨素处理24 h后,红色荧

光降低,绿色荧光显著增强,0.1% DMSO处理组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图3)。

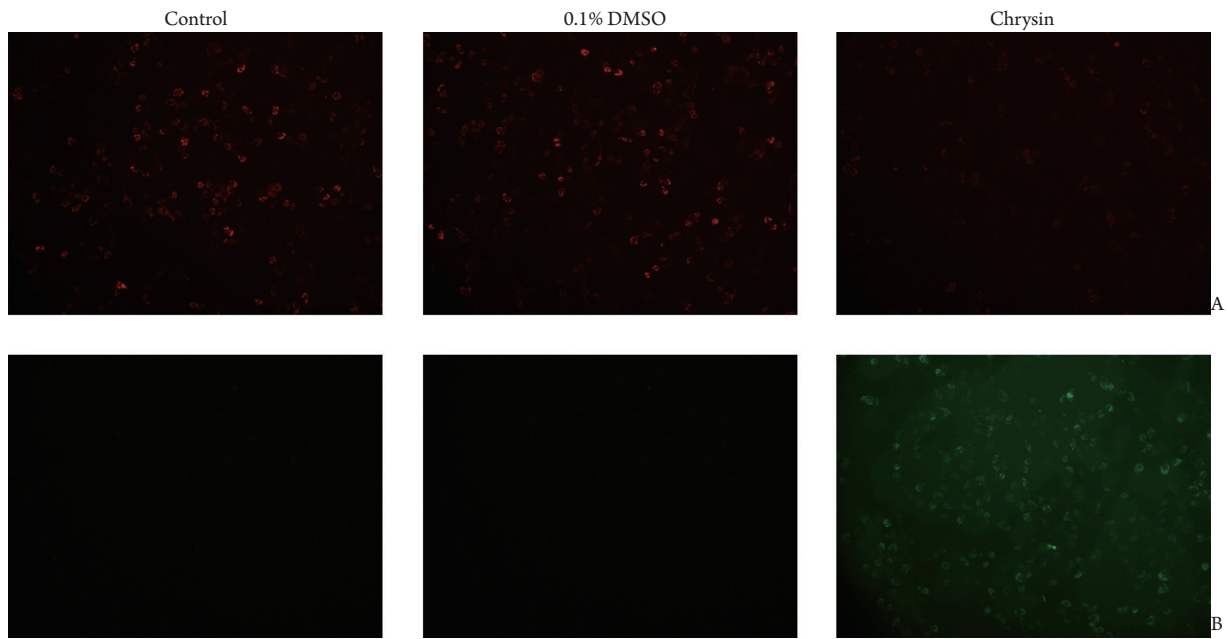


图3 白杨素降低KB细胞线粒体膜电位( $\times 100$ )

Figure 3 Chrysin decreased the mitochondrial membrane potential in KB cells ( $\times 100$ )

A: Expression of red fluorescence; B: Expression of green fluorescence

#### 2.4 白杨素对KB细胞AKT和PI3K的影响

蛋白质印迹结果显示：0.1% DMSO对KB细胞中AKT和PI3K的活化无明显影响( $P > 0.05$ )；与不含药物

的对照组相比，10  $\mu\text{mol/L}$ 白杨素抑制AKT和PI3K磷酸化水平( $P < 0.05$ ，图4)。

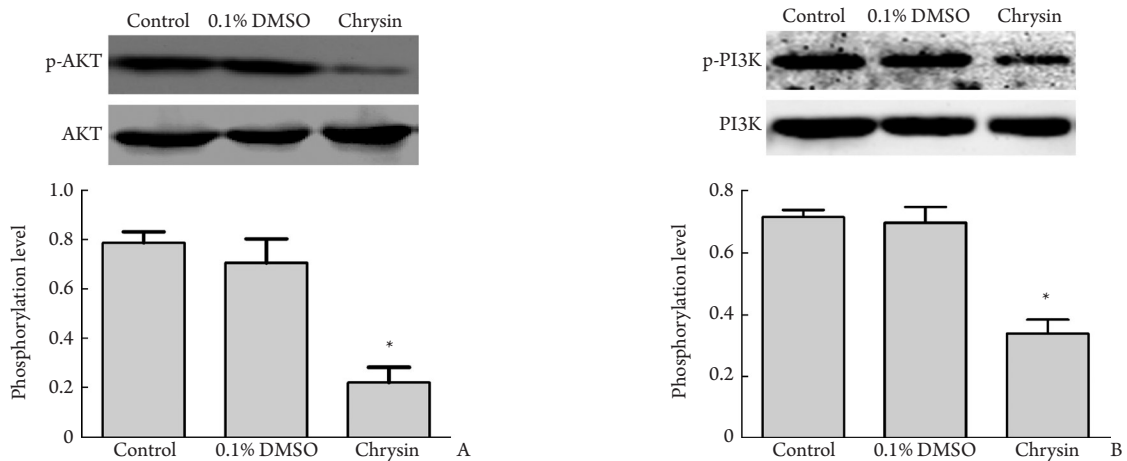


图4 白杨素抑制AKT和PI3K磷酸化

Figure 4 Chrysin inhibits AKT and PI3K phosphorylation

Phosphorylation levels of AKT (A) and PI3K (B) in KB cells were significantly suppressed after being treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  chrysin,  $*P < 0.05$  vs the control group

### 3 讨论

白杨素, 即5,7-二羟基黄酮, 是第一种被发现的黄酮类化合物。白杨素广泛存在于多种植物、蜂胶和蜂蜜中, 是蜂胶的主要有效成分。研究<sup>[3, 6-9]</sup>表明白杨素具有抗氧化、抗病毒、抗炎症、抗高血糖、抗焦虑等广泛的药理作用, 具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。本研究结果表明: 白杨素能有效抑制口腔鳞状细胞癌KB细胞增殖并诱导其凋亡。

Caspase家族在凋亡过程中起必不可少的作用, 其活化可激活数百种蛋白, 最终导致细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Caspase-3/7是caspase家族中重要的一员, 在凋亡过程中, 被起始caspase活化, 作用于细胞质, 从而调节凋亡。Caspase-3/7在多种实体瘤中表达下调, 其中包括口腔鳞状细胞癌<sup>[11]</sup>。线粒体是细胞内半自主细胞器, caspase-3/7在线粒体途径诱导的细胞凋亡过程中被高度激活。线粒体受到刺激后, 线粒体膜间隙蛋白(特别是细胞色素c)被释放到细胞质中, 随后激活caspase<sup>[10]</sup>。已有研究<sup>[12]</sup>表明白杨素可使绒毛膜癌JAR和JEG3细胞中线粒体膜电位去极化, 导致细胞质Ca<sup>2+</sup>的积累和活性氧的产生, 最终诱导细胞凋亡。在本研究中, 白杨素可明显降低口腔鳞癌KB细胞caspase-3/7的活性, 同时降低其线粒体膜电位, 提示白杨素对KB细胞的凋亡诱导作用可能涉及线粒体功能障碍。

近年来, PI3K/AKT信号通路作为细胞周期增殖、生长、蛋白质合成和葡萄糖代谢等的主要调节通路受到了广泛的关注。多种恶性肿瘤中PI3K/AKT信号通路异常表达或活化, 如胃癌、乳腺癌、卵巢癌和肺癌<sup>[13-16]</sup>, 而AKT作为细胞内重要的信号转导通路, 拥有超过100个下游靶底物, 影响细胞代谢、增长和生存<sup>[17]</sup>。近期研究<sup>[18]</sup>表明p-AKT在口腔鳞状细胞癌中过表达, 提示p-AKT可能参与了口腔癌早期阶段的多步骤过程。Chang等<sup>[19]</sup>研究发现白藜芦醇抑制口腔癌顺铂耐药性细胞株自噬和凋亡与PI3K/AKT/mTOR信号通路相关, 提示PI3K/AKT可能参与口腔癌细胞凋亡, 但PI3K/AKT信号通路在白杨素诱导KB细胞凋亡的机制鲜有报道。在本研究中, 白杨素作用口腔鳞状细胞癌KB细胞24 h后, p-AKT和p-PI3K表达明显降低, caspase-3/7活化增加, 提示白杨素对KB细胞凋亡的诱导作用可能与抑制PI3K/AKT信号通路相关。

综上所述, 白杨素可抑制口腔鳞状细胞癌KB细胞增殖及诱导其凋亡, 其机制可能涉及抑制PI3K/AKT信号通路和线粒体功能障碍。本研究为白杨素抗口腔鳞状细胞癌作用及其机制提供了一定的实验参考。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

### 参考文献

- [1] Chen YJ, Lin SC, Kao T, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Pathol*, 2004, 204(3): 326-332.
- [2] Lo WL, Kao SY, Chi LY, et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2003, 61(7): 751-758.
- [3] Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 233(2): 214-225.
- [4] Nile SH, Keum YS, Nile AS, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32(1): e22002.
- [5] Khoo BY, Chua SL, Balaran P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(5): 2188-2199.
- [6] Wang J, Qiu J, Dong J, et al. Chrysin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(6): 1551-1558.
- [7] Du Q, Gu X, Cai J, et al. Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 100-104.
- [8] Chen YH, Yang ZS, Wen CC, et al. Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae[J]. *Food Chem*, 2012, 134(2): 717-724.
- [9] Gresa-arribas N, Serratos J, Saura J, et al. Inhibition of CCAAT/enhancer binding protein delta expression by chrysin in microglial cells results in anti-inflammatory and neuroprotective effects[J]. *J Neurochem*, 2010, 115(2): 526-536.
- [10] Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-962.
- [11] Yoon TM, Kim SA, Lee DH, et al. EGR1 regulates radiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1717-1722.
- [12] Park W, Park S, Lim W, et al. Chrysin disrupts intracellular homeostasis through mitochondria-mediated cell death in human choriocarcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3155-3161.
- [13] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7061-7070.
- [14] Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival

- in patients with HER2-positive metastatic breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(4): 1647-1656.
- [15] Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1): 173-179.
- [16] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(3): 197-207.
- [17] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2): 193-204.
- [18] Silva BS, Yamamoto FP, Pontes FS, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012, 17(1): e29-34.
- [19] Chang CH, Lee CY, Lu CC, et al. Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(3): 873-882.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 谢雅馨, 彭小宁. 白杨素对口腔鳞状细胞癌KB细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(5): 522-527. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.05.008

**Cite this article as:** XIE Yaxin, PENG Xiaoning. Effects of chrysin on the apoptosis in oral squamous carcinoma KB cell line and the underlying mechanisms[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2019, 44(5): 522-527. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.05.008