番茄红素通过下调异柠檬酸脱氢酶1诱导胃癌细胞凋亡

臧诗蕾，唐旗羚，董芳蕊，刘　欢，臧林泉　（广东药科大学药学院，广东广州 510006）

摘　要：目的　探究番茄红素对胃癌细胞增殖和凋亡的影响及其可能机制。**方法**　不同剂量番茄红素处理胃癌细胞株SGC-7901、MGC-803，用MTT法检测细胞增殖，Hoechst 33258染色、流式细胞仪检测细胞凋亡、线粒体膜电位(MMP)、活性氧(ROS)，免疫印迹检测异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)、IDH2蛋白表达。**结果**　番茄红素呈剂量依赖性抑制SGC-7901、MGC-803细胞增殖。大于25 μmol/L番茄红素诱导SGC-7901细胞凋亡，增加ROS水平；50 μmol/L番茄红素降低MMP，下调IDH1蛋白表达(P<0.01或0.05)。**结论**　番茄红素可抑制胃癌细胞增殖、诱导凋亡；促凋亡机制可能是通过下调IDH1，阻断细胞ATP生成和提高细胞内ROS。

关键词：番茄红素；胃癌；异柠檬酸脱氢酶；凋亡

中图分类号：R 739　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-3610(2017)04-0342-05

Lycopene induces apoptosis through downregulating isocitrate dehydrogenase expression in gastric cancer cells

ZANG Shi-lei, TANG Qi-ling, DONG Fang-rui, LIU Huan, ZANG Lin-quan (College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective**　To investigate the effect and possible mechanism of lycopene on gastric cancer cells. **Methods**　After treated with different concentrations of lycopene, proliferation, apoptosis, mitochondrial membrane potential (MMP), reactive oxygen species (ROS), and isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 expression in gastric cancer cell lines SGC-7901 and MGC-803 were detected by MTT, Hoechst 33258 staining, flow cytometry, and Western blot, respectively. **Results**　SGC-7901 and MGC-803 cells were suppressed by lycopene in a dose-dependent manner. More than 25 μmol/L lycopene induced the apoptosis and increased the ROS level of SGC-7901 cells; 50 μmol/L lycopene reduced the MMP and downregulated the IDH1 expression of SGC-7901 cells (P<0.01 or 0.05). **Conclusion**　Lycopene can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of gastric cancer cells. Its proapoptotic mechanisms may be involved in the blockade of ATP production and elevation of cellular ROS content via downregulation of IDH1 expression.

Key words: lycopene; gastric cancer; isocitrate dehydrogenase; apoptosis

番茄红素是一种天然的类胡萝卜素，具有抗氧化、抗炎和预防癌症等多种生物活性[1]。其研究热点主要集中在抗前列腺癌的作用。作用机制包括抑制PI3K/ Akt和NF-kappaB信号通路、诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期等[2-4]。随着研究的深入，番茄红素被发现具有广泛地预防和治疗肿瘤的作用，包括乳腺癌、胃癌、卵巢癌等[5]，但是其对胃癌的作用机制尚未见文献报道。

越来越多的研究表明活性氧能够诱导细胞的凋亡从而发挥抗癌作用[6]。异柠檬酸脱氢酶(IDH)是三羧酸循环(TCA)中的关键酶，其亚型IDH1和IDH2还能够调节一个逆向的三羧酸循环路径，使细胞质中产生的原型辅酶ⅡNADPH转移到线粒体中，从而调节细胞内的氧化还原平衡，是癌细胞对抗氧化损伤的一条重要的关键通路。同时该过程产生的柠檬酸能够进入到线粒体中补充缺氧状态下TCA反应所需的原料，使得癌细胞在缺氧状态下依然能够有效地进行TCA循环以获取所需能量[7]。番茄红素是否具有抗胃癌作用？其量效关系如何？是否通过阻碍癌细胞对抗氧化损伤等机制从而发挥抗肿瘤作用？本实验拟以胃癌细胞株SGC-7901为研究对象，探索番茄红素是否具有抗胃癌作用及其机制，旨为临床防治胃癌提供理论依据。

基金项目：广东省科技计划项目(No.2015A020211028)，国家高技术研究发展计划(No.2012AA020304)

收稿日期：2017-03-20；**修订日期：**2017-06-13

作者简介：臧诗蕾(1992－)，女，硕士研究生。

通信作者：臧林泉(1965－)，男，教授，E-mail：zanglq@163.com。

万方数据

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胃癌细胞株SGC-7901、MGC-803由中山大学赠送。番茄红素(麦克林，≥99%)，DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶消化液(Gibco)、MTT(广州翔博)，细胞周期与凋亡检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天)，IDH1、IDH2、GAPDH一抗、羊抗兔、羊抗鼠二抗(Proteintech)，BCA蛋白定量试剂盒(德国Thermo)，ECL化学发光液(美国Thermo)。

1.2 主要仪器

CO_2恒温细胞培养箱、冷冻多功能离心机(美国Thermo)，倒置荧光显微镜(德国莱卡)，超洁净工作台(苏净安泰)，贝克曼流式细胞仪(美国Beckman)，电泳仪、电转仪(美国BioRad)。

1.3 MTT法检测番茄红素对胃癌细胞的增殖抑制作用

MGC-803和SGC-7901细胞均采用配制好的DMEM完全培养基(含10% FBS)，置于恒温恒湿培养箱中培养，设置培养箱条件为37 ℃，5% CO_2，待细胞至对数生长期即可进行试验。消化对数期细胞，接种于96孔细胞培养板中，每孔细胞数约为1×10^4个，待细胞贴壁后，吸弃培养基，分组[对照组(无血清培养基)、溶剂对照组(含1%乙醇的无血清培养基)、番茄红素实验组(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L)]加入不同浓度的番茄红素，每组5个复孔。番茄红素先溶于无水乙醇中，使其浓度为10^4 μmol/L，加药前以无血清DMEM培养基稀释至所需浓度，无水乙醇浓度小于1%。药物分别作用细胞24、48、72 h后，每孔加入10 μL MTT试液(5 g/L)，继续于细胞培养箱中培养4 h后，取出培养板，吸弃上清，每孔加入100 μL二甲基亚砜(DMSO)溶解甲瓒结晶。摇床振摇10 min，于酶标仪570 nm处测定OD值，计算细胞抑制率。抑制率%=(对照组OD值－实验组OD值)/(对照组OD值－调零组OD值)×100%。

1.4 Hoechst 33258染色法检测番茄红素对胃癌细胞形态学的影响

SGC-7901细胞接种于24孔板中，每孔细胞数约为1×10^5个，细胞贴壁后吸弃上清，给予不同浓度的番茄红素作用24 h，作用后吸弃药液，用PBS轻轻洗涤3次，加入多聚甲醛(4%)固定30 min，PBS洗涤3次去除固定液。加入适量Hoechst 33258(5 mg/L)染液，室温避光反应30 min后用PBS洗去多余染液，避光阴干24孔板，倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

1.5 流式细胞仪检测番茄红素对胃癌细胞的凋亡诱导作用

分组收集药物作用24 h后的SGC-7901细胞，贴壁细胞用无EDTA的胰酶消化，离心后用PBS洗涤两次，2 000 r/min，5 min。500 μL Binging buffer悬浮细胞，调整细胞密度，使待测细胞数为5×10^5个。按说明书加入适当体积的Annexin V-FITC染液混匀，再加入PI染液混匀，室温避光反应5~15 min。经流式细胞仪检测两种染料的荧光强度。

1.6 流式细胞仪检测番茄红素对胃癌细胞MMP的影响

收集药物作用24 h后的SGC-7901细胞，用PBS洗涤1次，并调整细胞密度为1×10^7个/mL，取1 mL细胞悬液离心，加入按说明书配制好的JC-1染液重悬细胞，37 ℃下振摇20 min。孵育结束后2 000 r/min，4 ℃离心4 min，在4 ℃条件下用JC-1染色缓冲液洗涤细胞2次，洗涤后加500 μL JC-1染色缓冲液重悬细胞，上流式细胞仪检测JC-1的荧光强度，计算红绿荧光比值，进行统计学分析。阳性对照药物使用试剂盒中的CCCP，按说明书使用能够降低线粒体膜电位。

1.7 流式细胞仪检测番茄红素对胃癌细胞ROS水平的影响

接种对数期细胞SGC-7901于6孔板中，待药物作用24 h后，吸弃每孔中的培养基，加入按说明书配制的DCFH-DA荧光探针，作用浓度为10 μmol/L，37 ℃孵育20 min，用PBS洗涤3次去除未进入细胞内的探针，洗涤后浆细胞悬浮于500 μL的PBS中，经流式细胞仪检测DCF的荧光强度。阳性对照药物使用试剂盒中的Rosup，按说明书使用能够使细胞内活性氧含量升高。

1.8 Western blot检测SGC-7901细胞中IDH1和IDH2蛋白表达水平

以RIPA裂解液(RIPA: PMSF=80: 1)裂解并收集番茄红素作用48 h后的SGC-7901细胞，提取细胞总蛋白。用BCA结合检测蛋白浓度并分装蛋白，每样品加入4 μL蛋白上样缓冲液，100 ℃加热5 min。每孔蛋白上样量为40 μg，电泳分离(10% SDS-PAGE凝胶)，浓缩胶电泳条件为70 V，约30 min；分离胶电泳条件为100 V，约60 min；分离完成后在250 mA，50 min条件下进行转膜。将载有蛋白的PVDF膜在5%的脱脂奶粉中室温下封闭1 h，TBST洗涤3次，4

万方数据

℃一抗孵育约48 h，洗涤3次，每次10 min，室温下孵育二抗1 h。在暗房中用ECL发光液孵育，并进行显影和定影，对显影后的胶片拍照，用Image J分析条带灰度值并进行统计学分析。

1.9 统计学处理

流式细胞仪数据采用Flow J软件进行分析得到定量分析的数据，实验数据经GraphPad Prism 6.0统计分析并绘制统计图。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析及q检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 番茄红素对胃癌细胞增殖的影响

MTT实验显示番茄红素对胃癌细胞株SGC-7901和MGC-803均有明显的抑制作用，且有时间-剂量依赖性。随着药物浓度的增加，番茄红素(>12.5 μmol/L)对MGC-803细胞的抑制率增加；6.25 μmol/L的番茄红素即可抑制SGC-7901细胞的增殖($P<0.01$)，其作用效果优于同样浓度和时间条件下的MGC-803细胞株，详见表1、2。

表1 不同浓度番茄红素对MGC-803细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$，n=3)

分组	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
溶剂对照组	98.68±0.45	98.50±0.74	94.00±0.12
番茄红素实验组			
6.25 μmol/L	99.24±1.31	97.74±0.12	96.85±0.28
12.50 μmol/L	99.43±0.75	91.14±0.23	72.23±0.16[a]
25.00 μmol/L	72.67±0.23[a]	27.08±0.18[a]	53.72±0.19[a]
50.00 μmol/L	70.31±0.32[a]	47.28±0.14[a]	25.41±0.11[a]
100.00 μmol/L	57.40±0.22[a]	25.22±0.09[a]	19.50±0.08[a]

与对照组比较：[a]$P<0.01$

表2 不同浓度番茄红素对SGC-7901细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$，n=3)

分组	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
溶剂对照组	98.34±0.42	96.32±0.30	97.53±0.03
番茄红素实验组			
6.25 μmol/L	86.72±0.01[a]	80.12±0.04[a]	75.28±0.09[a]
12.50 μmol/L	83.90±0.03[a]	42.12±0.07[a]	33.59±0.10[a]
25.00 μmol/L	75.73±0.12[a]	30.59±0.14[a]	23.98±0.05[a]
50.00 μmol/L	66.65±0.11[a]	22.31±0.09[a]	13.66±0.08[a]
100.00 μmol/L	52.51±0.01[a]	14.21±0.13[a]	8.07±0.09[a]

与对照组比较：[a]$P<0.01$

2.2 番茄红素对SGC-7901细胞形态学的影响

H33258染色实验显示，对照组细胞呈淡蓝色，亮度均匀，细胞完整，细胞间贴壁状态良好，细胞密度较高。番茄红素浓度达12.5 μmol/L时，部分细胞荧光强度增加，有细胞碎片出现，25 μmol/L时细胞碎片更加明显，有凋亡小体形成，细胞形态受到破坏，细胞皱缩，体积缩小，细胞间缝隙增加，同样视野范围内的细胞数目明显减少。随着药物浓度的增加，此现象更加明显，如图1A所示。

2.3 番茄红素诱导SGC-7901细胞凋亡

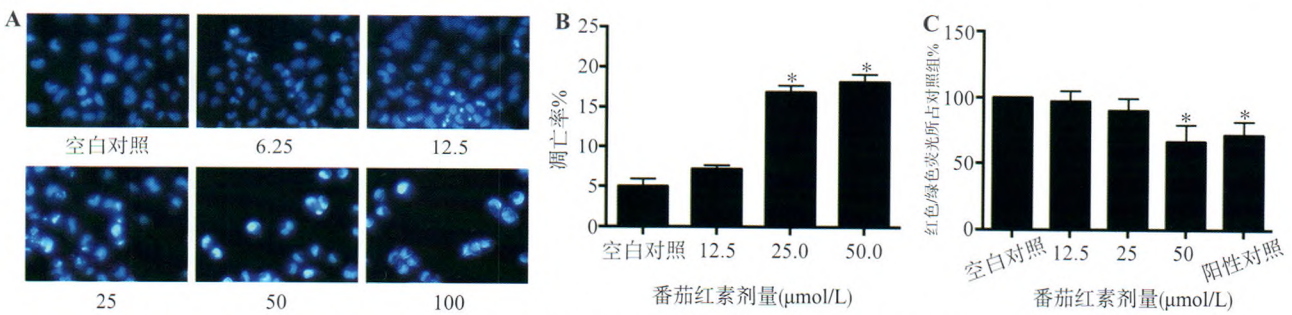
如图1B所示，25 μmol/L的番茄红素即可引起SGC-7901细胞凋亡，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 番茄红素诱导SGC-7901细胞MMP下降

如图1C所示，番茄红素浓度为50 μmol/L时，可见MMP下降，与对照组相比，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 番茄红素对SGC-7901细胞内ROS的影响

如图2A所示，25 μmol/L的番茄红素能够引起细胞内ROS含量升高，与对照组相比，差异有统计学



A. H33258染色实验，横坐标表示番茄红素作用的浓度；B. 番茄红素诱导的SGC-7901细胞凋亡率；C. 番茄红素对线粒体膜电位的影响。*表示与对照组相比$P<0.05$

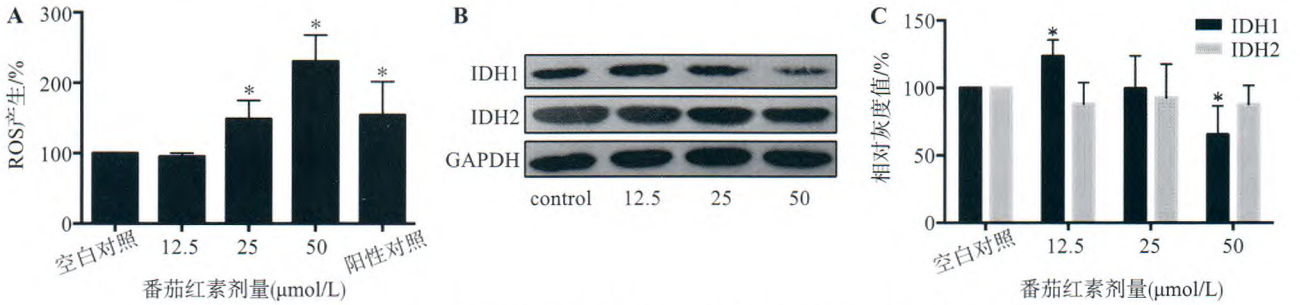
图1 番茄红素诱导SGC-7901细胞凋亡作用

万方数据

意义(P<0.05)。其促ROS升高作用优于试剂盒内的阳性药物(P<0.05)。

2.6　番茄红素对SGC-7901细胞内IDH蛋白表达的影响

如图2B所示，细胞内IDH1蛋白的表达量在低剂量番茄红素的作用下有升高的现象，但高剂量的番茄红色素能够下调IDH1的表达，而IDH2的蛋白表达水平与空白对照组相比差异无统计学意义(P>0.05)。对图2C的灰度值进行分析，可以看出12.5 μmol/L的番茄红素有上调IDH1表达的作用，而50 μmol/L的番茄红素对IDH1蛋白表达具有下调作用，与对照组相比，差异有统计学意义(P<0.05)。



A. 番茄红素对SGC-7901细胞内ROS的影响；B. 番茄红素对SGC-7901细胞内的IDH蛋白表达的影响；C. 番茄红素对SGC-7901细胞内的IDH蛋白相对灰度值的影响。*表示与对照组相比P<0.05

图2　番茄红素对细胞内ROS水平的影响及对IDH1蛋白表达的影响

3　讨论

中国癌症统计数据预测，2015年胃癌的发病率和死亡率将居于癌症中的第2位[8]。贫穷地区的生活条件所致，胃癌的发病率较高，且因诊出较晚，错过了手术治疗的机会。对于中晚期胃癌患者，只能选择化疗药物。目前临床使用的细胞毒类药物毒副作用较大，5年生存率较低，而小分子靶向药的受益人群仅占胃癌患者的20%[9]，所以寻找新的抗胃癌药物十分紧迫。

研究表明，番茄红素具有多靶点的抗癌效果，摄入番茄红素能够降低患胃癌的风险[1, 10]。Zhang等[11]研究发现，麦冬皂苷诱导SGC-7901细胞凋亡与下调MMP及升高细胞内的ROS相关。诱导ROS升高和MMP下降逐渐成为抗癌机制研究的热点。谷氨酰胺代谢通路是癌细胞高度依赖的一条物质及能量获取的通路，IDH1和IDH2是此通路中的关键酶，下调IDH1和IDH2的表达能够下调肿瘤细胞对谷氨酰胺代谢通路的依赖性[12]，是阻断细胞获取物质和能量的一条重要通路。本实验表明，番茄红素的剂量较低时能够通过升高细胞内ROS水平而诱导细胞凋亡；高浓度的番茄红素能够降低MMP，从而影响线粒体的功能，使肿瘤细胞合成ATP受阻，阻断癌细胞的能量供应而抑制癌细胞的生长与增殖。此外，较高浓度的番茄红素还可通过下调IDH1蛋白质的表达而发挥作用，这与其阻断癌细胞的ATP供应协同发挥抗胃癌效应。

中药是我国的瑰宝，研究中药材有效成分是获取新的抗癌活性化合物的重要手段。已有研究表明黄芩苷对人结肠癌有增殖抑制和凋亡诱导作用[13]；高良姜挥发油有抑制白血病细胞株HL-60增殖和诱导其凋亡的作用[14]。所以研究番茄红素的抗癌活性也是研发抗癌新药的一种有效手段。

本研究结果表明，番茄红素对胃癌细胞具有增殖抑制及凋亡诱导的作用，MMP下降可能是其诱导细胞凋亡的一个前期事件。活性氧结果显示，番茄红素能够升高细胞内的ROS，而ROS可能是诱导癌细胞发生凋亡的一个重要因素。低剂量的番茄红素能够上调细胞内IDH1的表达，而高剂量时则能够下调IDH1表达。同时高剂量的番茄红素显示出较好的体外药效，低剂量上调IDH1可能是癌细胞为了对抗番茄红素的作用而产生的反馈调节。

本实验结果提示，番茄红素可能是通过两个方面升高细胞内ROS水平从而导致细胞凋亡及死亡的。其一方面直接升高细胞内ROS；另一方面阻断IDH1调节细胞内氧化还原平衡的通路，使细胞内的高ROS水平不能得到缓和。这两种途径可协同升高细胞内ROS，从而诱导癌细胞凋亡。本研究可能为抗胃癌药物的研究提供了新的作用靶标，但还需要大样本分析检测胃癌组织中IDH1的特异性和阳性检出率的高低，以阐明IDH1是否可以作为胃癌的检测标物，而检测IDH1的表达量也为临床利用番茄红素治疗胃癌提供了依据。

万方数据

参考文献：

[1] Shanbhag V K. Lycopene in cancer therapy [J]. J Manag Care Pharm, 2016, 8(2): 170-171.

[2] Chen J, O'Donoghue A, Deng Y F, et al. The effect of lycopene on the PI3K/Akt signalling pathway in prostate cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(6): 800-805.

[3] Gong X, Marisiddaiah R, Zaripheh S, et al. Mitochondrial beta-carotene 9',10' oxygenase modulates prostate cancer growth via NF-kappaB Inhibition:A lycopene-independent function [J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(10): 966-975.

[4] Renju G L, Kurup G M, Bandugula V R. Effect of lycopene isolated from Chlorella marina on proliferation and apoptosis in human prostate cancer cell line PC-3[J]. Tumour biology, 2014, 35(11): 10747-10758.

[5] Arathi B P, Sowmya P R, Kuriakose G C, et al. Enhanced cytotoxic and apoptosis inducing activity of lycopene oxidation products in different cancer cell lines [J]. Food Chem Toxicol, 2016, 9(7): 265-276.

[6] Liu L, Fu L, Jing T, et al. pH-Triggered polypeptides nanoparticles for efficient BODIPY imaging-guided near infrared photodynamic therapy[J]. ACS Appl Mater Inter, 2016, 8(14): 8980-8990.

[7] Jiang L, Shestov A A, Swain P, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth [J]. Nature, 2016, 532(7598): 255-258.

[8] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. J Cancer Res Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[9] Roviello G, Ravelli A, Polom K, et al. Apatinib: A novel receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 372(2): 187-191.

[10] Yang T, Yang X, Wang X, et al. The role of tomato products and lycopene in the prevention of gastric cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies[J]. Med Hypotheses, 2013, 80(4): 383-388.

[11] Zhang W, Zhang Q, Jiang Y, et al. Effects of ophiopogonin B on the proliferation and apoptosis of SGC-7901 human gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4981-4986.

[12] 俞小凤, 张腾, 黄辰, 等. H_2O_2对肺腺癌A549细胞葡萄糖和谷氨酰胺代谢的影响[J]. 肿瘤, 2014, 34(4): 324-330.

[13] 邹颖, 成晓燕, 于丰彦, 等. 黄芩苷对人结肠癌HCT-116细胞增殖和凋亡的影响[J]. 广东医学院学报, 2016, 34(6): 578-581.

[14] 李宁, 李文杰, 张庆余, 等. 高良姜挥发油对人HL-60细胞株增殖及凋亡的影响[J]. 广东医学院学报, 2016, 34(6): 599-605.

版 权 声 明

为适应我国信息化建设，扩大本刊及作者知识信息交流渠道，本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据-数字化期刊群、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播，其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付（在收取发表费时折扣），作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部

万方数据