

黄酮和黄酮醇通过诱导 PIG3 表达 引发人食管癌细胞凋亡

张 强 赵新淮*

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 采用两株人食管癌细胞(鳞癌 KYSE-510 和腺癌 OE33)为肿瘤模型, 在体外探讨黄酮、黄酮醇化合物诱导细胞凋亡的分子机制。DNA 片段化、吖啶橙染色以及流式细胞术的分析结果表明, 3 种黄酮(木犀草素、白杨素、芹菜素)和 3 种黄酮醇(槲皮素、山奈酚、杨梅素)均能诱导两株食管癌细胞发生凋亡。荧光定量 RT-PCR 和 Western-blot 分析结果表明, 黄酮和黄酮醇是通过诱导 PIG3 mRNA 和蛋白质的表达、经线粒体途径以非 p53 依赖的方式, 引发两株食管癌细胞凋亡。同时, 这一过程可能受到 p63 和 p73 的调节。

关键词 黄酮, 黄酮醇, 分子机制, 细胞凋亡, 癌症

学科分类号 Q25, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00385

类黄酮化合物是一类富含于植物性食物中的苯- γ -吡喃衍生物, 按分子结构不同可分为黄酮(flavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷酮(flavanones)、黄烷醇(flavanols)、异黄酮(isoflavones)以及花色苷(anthocyanins)^[1], 其中黄酮和黄酮醇是含量最为丰富的两类^[2,3]。已有许多研究证实, 黄酮和黄酮醇作为重要的植物化学物质, 对多种肿瘤细胞具有抑制作用^[4~6], 并且可通过参与细胞氧化应激和 DNA 损伤过程, 诱导肿瘤细胞凋亡^[7,8]。

p53 可诱导基因 3(p53-inducible gene 3, PIG3)是 PIG 家族的成员之一, 与多种氧化还原酶同源, 并参与细胞氧化应激或辐射引起的细胞凋亡^[9]。通常, PIG3 受肿瘤抑制蛋白 p53 调控, 其表达与细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生相关^[9]。但是, 在许多携带突变型 p53 的癌细胞中, PIG3 的诱导表达能否不依赖于 p53 而参与细胞凋亡, 目前还不十分清楚。本研究以两株携带突变型 p53 的人食管癌细胞(KYSE-510 和 OE33)为肿瘤模型, 探讨黄酮[木犀草素(luteolin)、白杨素(chrysin)、芹菜素(apigenin)]和黄酮醇[槲皮素(queretin)、山奈酚(kaempferol)、杨梅素(myricetin)]诱导癌细胞凋亡的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

白杨素(纯度 > 96%)、杨梅素(纯度 > 95%)和 MTT 购自 Sigma 公司。槲皮素、木犀草素、芹菜素以及山奈酚(纯度 > 98%)购自南京青泽医药科技发展有限公司。碘化丙锭(PI)、溴化乙锭(EB)、吖啶橙(AO)、二甲基亚砜(DMSO)以及 RNase 购自北京索莱宝生物科技有限公司。TRIzol 试剂和荧光定量 PCR 反应试剂盒(SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR)分别购自 Gibco 公司和大连宝生物工程有限公司。Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自北京玉林迈得生物试剂有限公司。细胞凋亡 DNA Ladder 提取试剂盒、细胞裂解液和超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。兔抗人 PIG3 和 caspase 3 活化片段多克隆抗体分别购自 Chemicon 公司和 Abcam 公司。鼠抗人 caspase 8 活化片段单克隆抗体购自 Lab Vision 公司。鼠抗人 p53、p63、 β -actin 单克隆抗体以及兔抗人 p73 和 caspase 9 活化片段多克隆抗

* 通讯联系人. Tel: 0451-55191813, Fax: 0451-55190340

E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

收稿日期: 2008-05-26, 接受日期: 2008-06-30

体均购自 Santa Cruz 公司. 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、抗鼠第二抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 细胞培养

人食管鳞癌 KYSE-510 细胞和腺癌 OE33 细胞分别购自天津市肿瘤医院和河北医科大学第四医院, 于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640(Gibco 公司)培养液中(37℃, 5% CO₂)培养.

1.3 细胞增殖抑制测定

将 KYSE-510 和 OE33 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后分别加入木犀草素、白杨素、芹菜素、槲皮素、山奈酚以及杨梅素的 DMSO 溶液. 作用浓度分别为 10、20、40 和 80 μmol/L, 作用时间分别为 24 h、48 h 和 72 h. 0.1% DMSO 和 100 μmol/L 5-氟脲嘧啶(5-FU)处理组分别设为阴性和阳性对照. 作用后, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液, 继续培养 4 h. 4℃, 1 800 g 离心 5 min, 弃上清液. 每孔加入 100 μl DMSO, 酶标仪(Bio-Rad)测定 A₅₇₀ 值.

1.4 DNA 片段化分析

接种于 6 孔细胞培养板中的两株食管癌细胞培养 24 h 后, 分别加入浓度为 80 μmol/L 的 6 种化合物作用 24 h. 采用细胞凋亡 DNA Ladder 提取试剂盒提取细胞 DNA, 经 1.5% 琼脂糖凝胶(0.3 g/L EB)电泳, 紫外灯下观察, 凝胶图像分析仪(UVP)摄影并分析结果.

1.5 吖啶橙染色荧光显微观察

于 6 孔细胞培养板中接种的两株食管癌细胞培养 24 h 后, 分别加入浓度为 80 μmol/L 的 6 种化合物作用 24 h. 吸弃上清液, 加入 1 ml PBS 和 40 μl 100 mg/L AO 染液(PBS 配制), 室温避光染色 30 min. 吸弃染液, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察摄影.

1.6 流式细胞术测定细胞凋亡率

接种于 6 孔细胞培养板中的两株食管癌细胞培养 24 h 后, 分别加入浓度为 80 μmol/L 的 6 种化合物作用 24 h. 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒厂家说明进行细胞染色, 流式细胞仪(Beckman 公司)分析.

1.7 荧光定量 RT-PCR

接种于 6 孔细胞培养板中的两株食管癌细胞, 经 6 种化合物(80 μmol/L)作用 24 h 后, 采用 TRIzol 试剂, 按厂家说明提取细胞总 RNA, 存于 -80℃. 依照 PCR 反应试剂盒厂家说明, 进行

PIG3 基因表达(mRNA)的荧光定量 RT-PCR 分析. 内参基因为 β-actin. 基因引物序列分别为: PIG3, 上游 5' CGC TGA AAT TCA CCA AAG GTG 3', 下游 5' AAC CCA TCG ACC ATC AAG AGC 3'. β-actin, 上游 5' AAC ACC CCA GCC ATG TAC G 3', 下游 5' ATG TCA CGC ACG ATT TCC C 3'.

1.8 Western-blot 测定

两株食管癌细胞接种于 6 孔细胞培养板, 经 6 种化合物(80 μmol/L)作用 24 h 后, PBS 洗涤 3 次. 加入冷的细胞裂解液冰上作用 30 min, 刮取细胞于微量离心管中. 4℃, 14 000 g 离心 15 min 后, 吸取上层澄清液. 紫外分光光度计(Amarsham)测定各样品总蛋白质浓度, 并调节浓度一致. 样品行 10%~12% SDS-PAGE (浓缩胶 80 V; 分离胶 120 V) 4 h 后, 转印于硝酸纤维素膜. 硝酸纤维素膜经封闭液(5%脱脂乳, 0.05% Tween 20, pH 7.6)封闭 3 h 后, TBS(20 mmol/L, pH 7.6)洗涤 3 次, 于第一抗体工作液(稀释比例 1:500~1:2000)中孵育 2 h. TBS 洗涤 3 次, 于辣根过氧化物酶标记的第二抗体工作液(稀释比例 1:2000)孵育 2 h. TBS 洗涤 3 次, 超敏发光液显光, X 感光片感光后, 显影定影. β-actin 作为内参蛋白.

2 结 果

2.1 黄酮和黄酮醇对食管癌细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法考察黄酮和黄酮醇对 KYSE-510 细胞和 OE33 细胞增殖的抑制作用, 结果见图 1. 3 种黄酮和 3 种黄酮醇对两株食管癌细胞均有明显

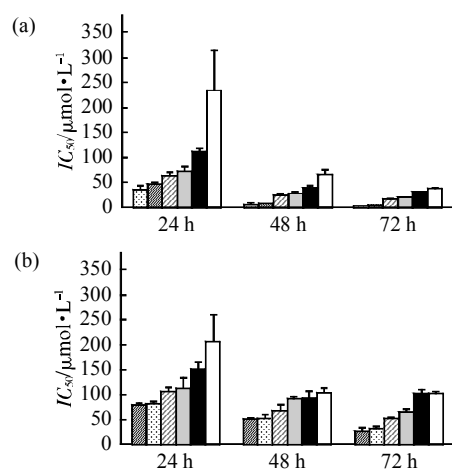


Fig. 1 Inhibitory effects of flavones and flavonols on the growth of KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b)

IC₅₀s were determined from the concentration response curves for 24 h, 48 h and 72 h. □: Luteolin; ■: Quercetin; ▨: Chrysin; ▤: Kaempferol; ▩: Apigenin; ◻: Myricetin.

的增殖抑制作用, 且抑制效应随化合物浓度的增加及作用时间的延长而加强, 呈现剂量 - 效应和时间 - 效应依赖关系。但是, 6 种化合物对两株癌细胞的增殖抑制活性不完全相同。对 KYSE-510 细胞的抑制活性顺序(按 IC_{50} 值)为: 木犀草素 > 槲皮素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素; 对 OE33 细胞的抑制活性顺序(按 IC_{50} 值)为: 槲皮素 > 木犀草素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素。

2.2 黄酮和黄酮醇诱导食管癌细胞 DNA 片段化的结果

黄酮和黄酮醇作用 KYSE-510 细胞和 OE33 细胞后, 细胞基因组 DNA 发生有序降解, 形成细胞凋亡特有的梯状条带(图 2), 表明黄酮和黄酮醇对两株食管癌细胞具有凋亡诱导作用。

2.3 黄酮和黄酮醇诱导食管癌细胞凋亡的 AO 染色结果

黄酮和黄酮醇作用细胞后, 经 AO 染色, 荧光

显微镜下观察可见 KYSE-510 和 OE33 细胞数量明显减少, 且细胞体积缩小、细胞核固缩, 可见浓缩致密的暗绿色或黄绿色荧光, 呈团状或串珠状(图 3)。对照组(0.1% DMSO)则为均匀一致的绿色荧光(图 3)。

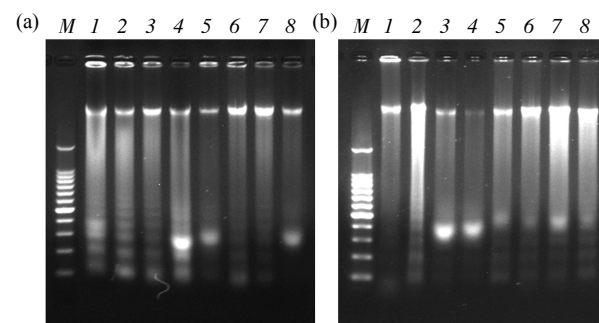


Fig. 2 Effects of flavones and flavonols on the induction of DNA fragmentation in KYSE-510 cells (a) and in OE33 cells (b)

M: DNA marker; 1: 0.1% DMSO; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU; 3: Luteolin; 4: Quercetin; 5: Chrysin; 6: Kaempferol; 7: Apigenin; 8: Myricetin.

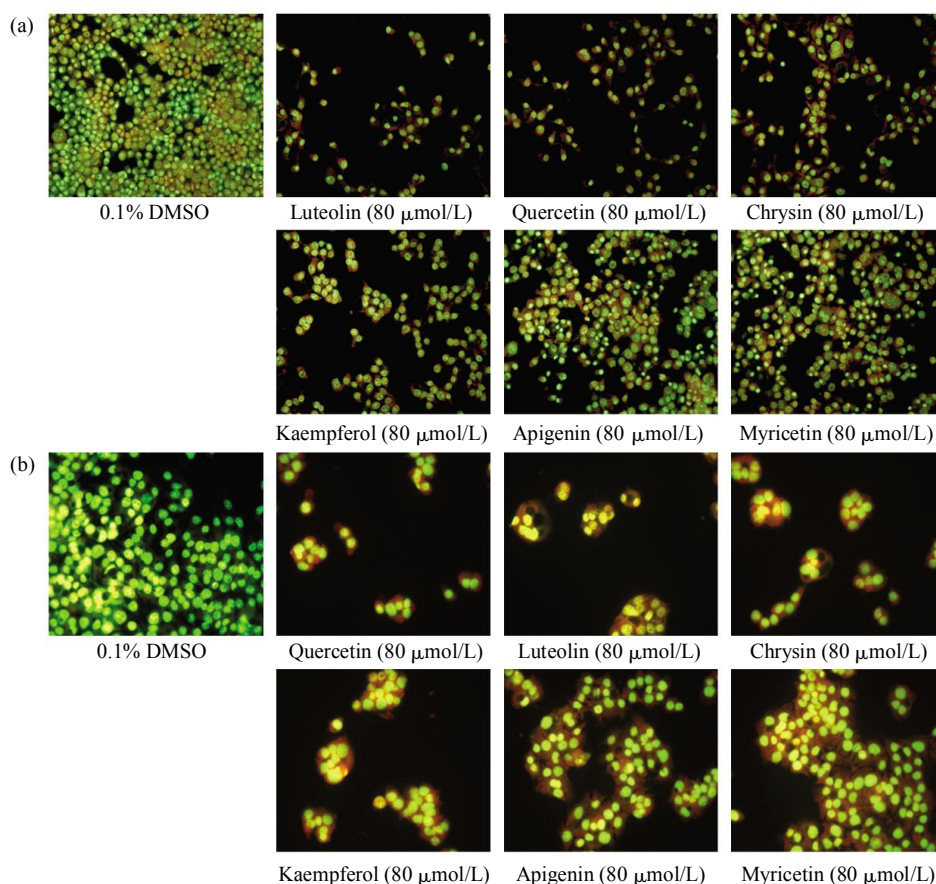


Fig. 3 Effects of flavones and flavonols on induction of apoptosis in KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b) stained by AO

2.4 黄酮和黄酮醇诱导食管癌细胞凋亡的流式细胞术分析结果

细胞凋亡时, 磷脂酰丝氨酸外翻于细胞膜外,

细胞膜本身依然完整。而坏死细胞的细胞膜发生破裂。FITC 标记的 Annexin V 可特异性结合磷脂酰丝氨酸, 而 PI 只有当细胞膜破裂时, 才能进入细胞

染色胞核. 因此, 早期凋亡细胞 FITC 荧光信号强烈, PI 荧光信号很弱(图 4 直方图中 B4 区), 晚期凋亡或坏死细胞 FITC 和 PI 荧光信号都很强烈(图 4 直方图中 B2 区), 而正常细胞(图 4 直方图中 B3 区)两种荧光信号都很弱. 如图 4 结果所示, 与阴性对照相比, 各化合物作用两株食管癌细胞后, 凋

亡特征区(图 4 直方图中 B4 区)的细胞比例均有不同程度地增加, 增加程度与化合物对癌细胞增殖抑制活性(图 1)基本一致. 由此进一步表明, 黄酮和黄酮醇可能通过诱导细胞凋亡, 抑制两株食管癌细胞增殖.

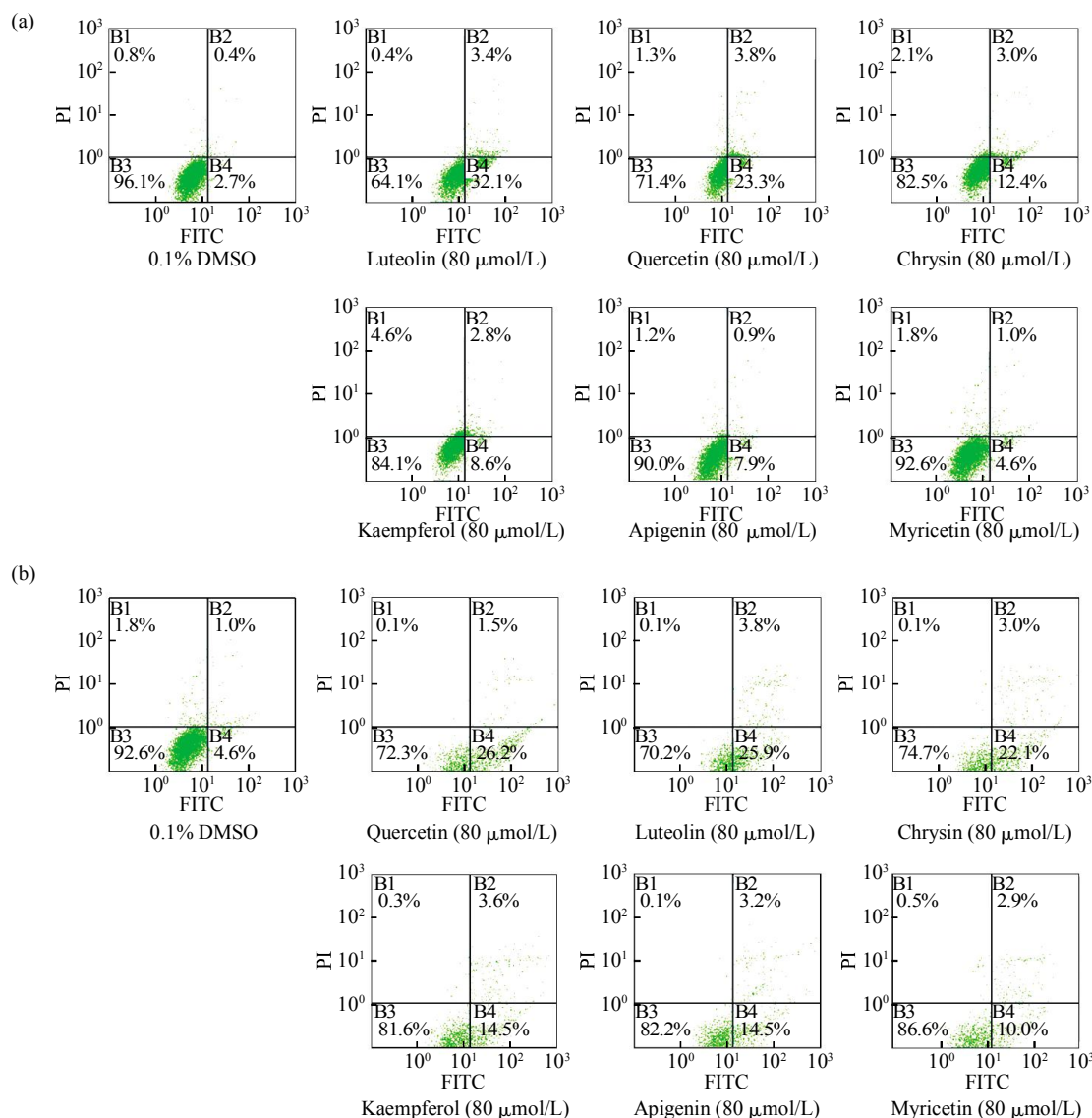


Fig. 4 Effects of flavones and flavonols on the induction of apoptosis in KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b)

2.5 黄酮和黄酮醇诱导 PIG3 mRNA 表达的荧光定量 RT-PCR 分析结果

在我们的前期研究工作中, 采用基因芯片技术分析表明, 黄酮和黄酮醇可诱导 OE33 细胞中 PIG3 基因的 mRNA 表达^[10]. 为进一步考察黄酮和黄酮醇作用 KYSE-510 和 OE33 细胞后, PIG3 基因是否得到诱导表达, 进而介导两株食管癌细胞发

生凋亡, 采用荧光定量 RT-PCR 分析了 PIG3 mRNA 的表达情况, 结果见图 5. 经各化合物作用后, 两株癌细胞中 PIG3 mRNA 的表达水平均有不同程度的增加, 且增加程度(图 5)与化合物诱导细胞凋亡的活性(图 4)基本一致. 由此表明, PIG3 的诱导表达很可能与黄酮和黄酮醇对食管癌细胞凋亡的诱导活性相关.

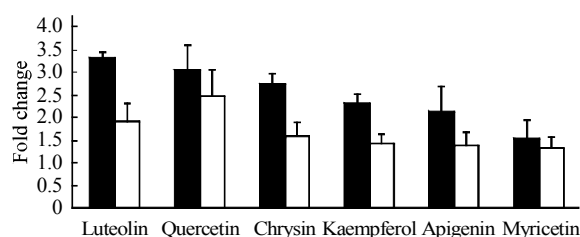


Fig. 5 Effects of flavones and flavonols on induction of PIG3 expression at the mRNA level in KYSE-510 cells and OE33 cells
■: KYSE-510; □: OE33.

2.6 Western-blot 分析结果

首先, 为了确定黄酮和黄酮醇对 PIG3 mRNA 表达的诱导作用是否最终提高了 PIG3 的蛋白质水平, 采用 Western-blot 分析了 PIG3 蛋白表达. 如图 6 所示, 与对照组(0.1% DMSO)相比, 各化合物均能不同程度地提高两株食管癌细胞中 PIG3 的蛋白质表达水平. 由此表明, 黄酮和黄酮醇对 PIG3 mRNA 表达的诱导作用, 很可能使该基因的生物学功能得以增量体现. 其次, 为确定在携带突变型 p53 的 KYSE-510 和 OE33 细胞中, 黄酮和黄酮醇

诱导 PIG3 表达的分子途径, 通过 Western-blot 分析了 p53、p63 和 p73 三个 p53 家族成员的蛋白质表达. 图 6 中, 与对照组相比, 两株癌细胞经各化合物作用后, 细胞中 p63 和 p73 的蛋白质水平均得到不同程度地提高. 相反, p53 的蛋白质水平却有所下降. 由此表明, PIG3 的诱导表达并非完全受控于 p53, 而很可能亦受 p63 和 p73 的调控. 最后, 因为细胞凋亡可通过两条途径实现, 一条是线粒体途径, 另一条是受体介导途径. 前者主要通过激活 caspase 9 诱导细胞凋亡, 而后者主要通过激活 caspase 8 实现细胞凋亡. 前期研究表明 PIG3 主要通过线粒体途径参与诱导细胞凋亡^[11, 12]. 所以, 为再次验证 PIG3 是否参与介导黄酮和黄酮醇诱导的食管癌细胞凋亡, 采用 Western-blot 分析了 KYSE-510 和 OE33 细胞中 caspase 的活化情况. 如图 6 所示, 与对照组相比, 两株癌细胞经各化合物作用后, 细胞中 caspase 9 活化片段有所增加, 而 caspase 8 活化片段无明显变化, 同时 caspase 3 活化片段亦有明显增加. 由此进一步表明, 黄酮和黄酮醇可通过诱导 PIG3 表达, 并经线粒体凋亡途径介导两株食管癌细胞凋亡.

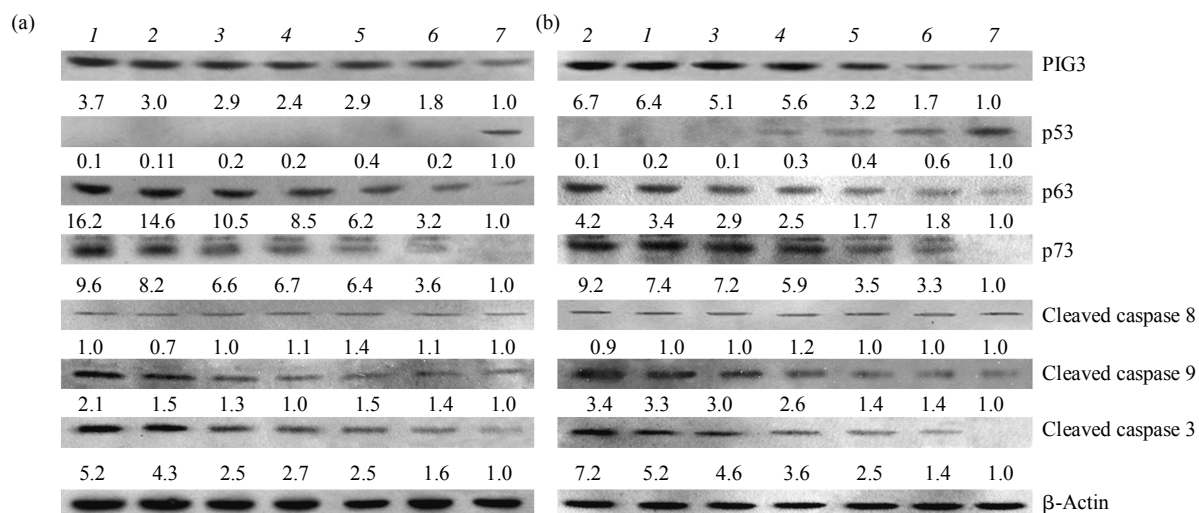


Fig. 6 Effects of flavones and flavonols on the expression of proteins related to apoptosis and cell cycle in KYSE-510 cells (a) and in OE33 cells (b)

1: Luteolin; 2: Quercetin; 3: Chrysin; 4: Kaempferol; 5: Apigenin; 6: Myricetin; 7: 0.1% DMSO.

3 讨 论

迅速增殖是癌细胞的主要特征之一, 遏制癌细胞的迅速增殖是控制癌症发展的重要途径. MTT 法分析结果表明, 黄酮和黄酮醇能够以剂量 - 效应和时间 - 效应依赖方式, 抑制食管癌 KYSE-510 和

OE33 细胞的增殖. 与本研究结果一致, 在有关其他类型癌细胞(如结肠癌细胞、宫颈癌细胞、前列腺癌细胞和肺癌细胞)的研究中, 也发现黄酮和黄酮醇具有细胞增殖抑制活性^[13~16], 表明两类化合物可能具有广泛的抗癌活性.

黄酮和黄酮醇对两株食管癌细胞增殖的抑制作用, 很可能通过诱导细胞凋亡而实现. DNA 片段

化分析结果、AO 染色的荧光显微观察结果以及流式细胞仪分析结果,充分证明了这一点. 荧光定量 RT-PCR 和 Western-blot 分析结果显示, KYSE-510 和 OE33 细胞经黄酮和黄酮醇作用后, PIG3 的 mRNA 和蛋白质表达水平都明显增高, 增高程度与各化合物对两株癌细胞增殖抑制活性相对应, 表明 PIG3 参与介导了黄酮和黄酮醇诱导的 KYSE-510 和 OE33 细胞凋亡. 同时, Western-blot 检测出 caspase 9 和 caspase 3 活化片段有所增加, 再次表明, 黄酮和黄酮醇可能通过诱导 PIG3, 并通过线粒体途径介导食管癌细胞发生凋亡, 这与 Herr(2001 年)和 Marchenko(2000 年)等的报道一致^[11, 12]. 虽然 Western-blot 也检测出了 caspase 8 活化片段的出现, 但这很可能是细胞体外培养过程中, 小部分正常细胞经历凋亡的体现, 这些正常凋亡细胞不会对化合物的凋亡诱导活性产生明显干扰. 同时, caspase 8 活化片段的蛋白质水平并没有因化合物的作用而发生明显改变, 表明黄酮和黄酮醇不能通过受体介导途径有效诱发两株食管癌细胞发生凋亡. 另外, 值得关注的是, 对于两株不同类型的食管癌细胞, 黄酮和黄酮醇均能通过诱导 PIG3 并经线粒体途径(相同的分子机制)实现凋亡诱导活性. 由此表明, PIG3 很可能是介导两类化合物引起两株食管癌细胞(甚至是除食管癌细胞以外的其他类型癌细胞)发生凋亡的又一新目标基因, 此基因值得后续研究关注.

当细胞经历应激(氧化应激)达到一定程度时, 一系列的促凋亡基因(PIG3、Bax、Killer/DR5、PIDD、PUMA 以及 p53AIP1 等)将会启动表达^[17, 18]. 通常情况下, 肿瘤抑制基因 p53 作为一种基因转录调控因子, 能够启动上述促凋亡基因的转录, 进而促使这些基因参与肿瘤细胞的凋亡过程^[17, 18]. 但是, 在许多携带有突变型 p53 的癌细胞中, 很多促凋亡基因的转录不能正常启动, 造成此类癌细胞较难凋亡死去. 但是, 近年来研究发现, 某些促凋亡基因在携带突变型 p53 的癌细胞中, 仍然可以被诱导表达, 从而表现出这些基因表达的非 p53 依赖性^[17~19]. 后续研究证实, p53 家族的另外两个成员——p63 和 p73, 可以在某种情况下替代 p53 发挥对其下游基因的调控功能. 二者不仅在个体成熟和发育过程中发挥着非常重要的作用, 同时由于它们与 p53 的氨基酸序列具有高度的同源性^[17, 18], 所以当 p53 不能正常行使其生物学功能时, p63 和 p73 将会表现出类似 p53 在细胞凋亡过程中的调控

功能. 因此, 二者实现细胞凋亡调控功能的分子机制也与 p53 同出一辙, 除了能够促进如 PIG3、Bax 等促凋亡基因的表达, 还可以抑制如 Bcl-2 等抑凋亡基因的表达, 从而引起一系列的细胞凋亡事件^[17, 18]. 本实验 Western-blot 分析结果显示, p63 和 p73 蛋白表达水平与 PIG3 蛋白表达水平相伴升高, 而 p53 蛋白表达水平却有所下降. 这一结果提示, 在两株携带有突变型 p53 的食管癌细胞中, p63 和 p73 可代替 p53 诱导 PIG3 的表达, 进而促进细胞凋亡的发生. 另外我们推测, 本实验中造成 p53 蛋白表达水平下降的主要原因, 可能是 MDM2 诱导表达的结果. 与 PIG3 相似, MDM2 作为另一种受 p53 调控的下游基因, 亦受 p63 和 p73 调控^[18, 19], 其诱导表达可抑制 p53 的转录活性并促进 p53 蛋白的降解, 但对 p63 和 p73 的功能没有影响^[20]. 因此, p63 和 p73 蛋白水平的升高, 不仅能够诱导 PIG3 的表达, 还可能同时诱导 MDM2 的表达, 进而促进 p53 蛋白的降解. 上述分子调控过程是否会发生黄酮和黄酮醇诱导人食管癌细胞凋亡的过程中, 尚待进一步有针对性地研究, 从而获得明确证实.

综上所述, 黄酮和黄酮醇可能通过诱导 KYSE-510 和 OE33 细胞中 PIG3 的表达, 并经线粒体途径介导两株癌细胞发生凋亡. 但是, 在这两株癌细胞中, 诱导 PIG3 表达的调控蛋白可能不是 p53, 而是 p63 和 p73(图 7).

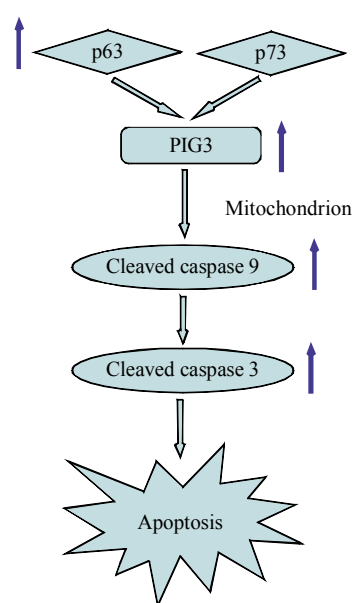


Fig. 7 Schematic representation mechanism by which flavones and flavonols induce apoptosis in KYSE-510 and OE33 cells

参 考 文 献

- Ren W, Qiao Z, Wang H, *et al.* Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 2003, **23**(4): 519~534
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, **79**(5): 727~747
- Martens S, Mithofer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 2005, **66**(22): 2399~2407
- Neuhouser M L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 2004, **50**(1): 1~7
- Neuhouser M L. Flavonoids and cancer prevention: What is the evidence in humans?. *Pharmaceutical Biology*, 2004, **42** (Supplement): 36~45
- Birt D F, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 2001, **90** (2~3): 157~177
- Pietta P G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 2000, **63** (7): 1035~1042
- Yang C S, Landau J M, Huang M T, *et al.* Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 2001, **21**: 381~406
- Flatt P M, Polyak K, Tang L J, *et al.* p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett*, 2000, **156**(1): 63~72
- Zhang Q, Zhao X H, Wang Z J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol*, 2008, **46**(6): 2042~2053
- Herr I, Debatin K M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 2001, **98**(9): 2603~2614
- Marchenko N D, Zaika A, Moll U M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 2000, **275**(21): 16202~16212
- Lim do Y, Jeong Y, Tyner A L, *et al.* Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, **292**(1): G66~G75
- Chiang L C, Ng L T, Lin I C, *et al.* Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human HepG2 cells. *Cancer Lett*, 2006, **237**(2): 207~214
- Vijayababu M R, Kanagaraj P, Arunkumar A, *et al.* Quercetin induces p53-independent apoptosis in human prostate cancer cells by modulating Bcl-2-related proteins: a possible mediation by IGFBP-3. *Oncol Res*, 2006, **16**(2): 67~74
- Leung H W, Lin C J, Hour M J, *et al.* Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45** (10): 2005~2013
- Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, *et al.* ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (3): 1341~1350
- Moll U M, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*, 2004, **2**(7): 371~386
- Stiewe T, Putzer B M. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene?. *Cell Death Differ*, 2002, **9**(3): 237~245
- Irwin M S, Kondo K, Marin M C, *et al.* Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, 2003, **3**(4): 403~410

Flavone-and Flavonol-Caused Apoptosis in Human Esophageal Cancer Cells by Inducing The Expression of PIG3

ZHANG Qiang, ZHAO Xin-Huai*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Two human esophageal cancer cell lines (KYSE-510 and OE33) were chosen as the tumor model to explore molecular mechanism of flavones and flavonols on induction of apoptosis. Effects of flavones (luteolin, apigenin, chrysin) and flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin) on induction of apoptosis in KYSE-510 cells and OE33 cells were observed by DNA fragmentation, acridine orange staining and flow cytometry analysis. The results of real-time RT-PCR and Western-blot analysis showed that the treatment of KYSE-510 cells and OE33 cells with flavones and flavonols induced the expression of PIG3 at the mRNA and the protein levels. Western-blot analytical results further showed that induction of PIG3 caused apoptosis in both esophageal cancer cells through the mitochondrial pathway in a p53-independent manner, and p63 and p73 may be responsible for the induction of PIG3.

Key words flavones, flavonols, molecular mechanism, apoptosis, cancer

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00385

*Corresponding author.

Tel: 86-451-55191813, Fax: 86-451-55190340, E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

Received: May 26, 2008 Accepted: June 30, 2008