

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.30.002

氧化苏木素诱导肺癌 A549 细胞凋亡及对内质网应激通路的影响*

陶黎阳¹, 黎渐英², 张建业³

(1. 广州医科大学基础学院病理教研室, 广州 510182; 2. 中山大学附属第一医院肾内科, 广州 510080;
3. 广州医科大学药学院, 广州 510182)

[摘要] **目的** 探讨氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞的凋亡作用及其对内质网应激通路的影响。**方法** 采用噻唑蓝(MTT)细胞毒实验检测氧化苏木素对肺癌 A549 细胞的毒性作用; 流式细胞仪检测细胞凋亡的发生; Western blot 检测葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)和细胞质细胞色素 C(cyto-c)表达的变化。**结果** 氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞的 IC₅₀ 值为 (5.36 ± 0.62) μmol/L。0、5、10、20 μmol/L 的氧化苏木素作用肺癌 A549 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率分别为 (1.15 ± 0.32)%、(19.61 ± 4.52)%、(30.18 ± 6.35)% 和 (39.48 ± 7.44)% , 各组间差异有统计学意义 (P < 0.05)。与对照组比较, 5、10 和 20 μmol/L 氧化苏木素作用肺癌 A549 细胞 48 h 后, GRP78 出现显著的升高, 细胞质中的 cyto-c 也显著增加。**结论** 氧化苏木素通过内质网应激途径诱导了人肺癌 A549 细胞凋亡。

[关键词] 肺肿瘤; 氧化苏木素; A549 细胞; 内质网应激途径

[中图分类号] R73-36

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)30-4180-03

Brazilein induced cells apoptosis in human lung cancer A549 cells and its effects on endoplasmic reticulum stress*

Tao Liyang¹, Li Jianying², Zhang Jianye³

(1. Department of Pathology, Basic School of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China;
2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Pharmaceutical College, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

[Abstract] **Objective** To study the apoptotic effect of brazilein on human lung cancer A549 cells and endoplasmic reticulum stress. **Methods** The cytotoxic activity was tested by MTT assay in A549 cells. The flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blotting was performed to detect GRP78 and cyto c protein expression. **Results** The IC₅₀ values of brazilein against A549 cells was (5.36 ± 0.62) μmol/L. After treatment with 0, 5, 10 and 20 μmol/L brazilein for 48 h, the percent of apoptosis was (1.15 ± 0.32)%, (19.61 ± 4.52)%, (30.18 ± 6.35)% and (39.48 ± 7.44)% respectively. There was significant difference among the different treatment (P < 0.05). Compared with control group, the protein expression of GRP78 and cytosolic cyto c was increased after 5, 10 and 20 μmol/L brazilein treated for 48 h. **Conclusion** Brazilein induced apoptosis in human lung cancer A549 cells though endoplasmic reticulum stress pathway.

[Key words] lung neoplasms; brazilein; A549 cells; endoplasmic reticulum stress

肺癌是一个全球范围内高发的恶性肿瘤, 在我国因为环境污染的加剧, 近年来的统计显示其发病呈逐年增加和年轻化的趋势, 尽管手术、化疗、放疗及靶向治疗相联合的肺癌综合治疗策略在临床上的使用, 但肺癌的 5 年生存率并没有得到显著的改善, 再加上肿瘤多药耐药的产生, 肺癌的 5 年生存率仅仅不到 16%^[1]。寻找新的抗肿瘤药物仍然是目前研究的热点, 从中药中寻找抗肿瘤药物在我国有着悠久的历史, 氧化苏木素 (brazilein) 是从中药苏木中分离的一个小分子化合物, 以往的研究显示氧化苏木素具有抗肿瘤的活性^[2], 本研究观察了氧化苏木素对肺癌的抗肿瘤活性, 并探讨了其相关的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 人肺癌 A549 细胞株购自美国标准生物品收藏中心(ATCC), DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司, Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒为联科生物科技公司产品,

MTT、二甲基亚砷(DMSO)等化学试剂购于美国 Sigma 公司, PVDF 膜购于美国 Millipore 公司, 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、细胞色素 C(cyto-c)、GAPDH 等抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 化学发光试剂盒购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 人肺癌 A549 细胞培养 人肺癌 A549 细胞用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 (含 100 IU/mL 的青霉素和链霉素), 在 37 °C 5% CO₂ 条件下培养, 0.4% 胰酶消化传代培养。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)细胞毒实验 0.4% 胰酶消化对数生长长期的 A549 细胞, 预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 遍, 悬浮于 DMEM 培养液使浓度致 7 500 个/mL 细胞, 取 200 μL 稀释的细胞接种到 96 孔板, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入对倍稀释的氧化苏木素, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 68 h, 每孔加入 MTT 使浓度致 0.5 mg/mL, 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 4

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101781); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(20131273)。 作者简介: 陶黎阳 (1975—), 博士, 副教授, 主要从事抗肿瘤药物研发、肿瘤多药耐药的研究。

h, 弃去培养液, 每孔加入 100 μ L DMSO 溶解 MTT 结晶, 美国 Bio-Rad 公司的酶标仪 (Model 550) 540 nm 波长处测定吸光度值, 计算氧化苏木素对肺癌 A549 细胞半数抑制浓度 (IC_{50} 值)。

1.2.3 细胞凋亡的流式细胞仪分析 0.4% 胰酶消化对数生长期的 A549 细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 悬浮于 DMEM 培养液使浓度致 2×10^4 个/mL 细胞, 取 2 mL 稀释的细胞接种到 6 孔板, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入 0、5、10、20 μ mol/L 的氧化苏木素, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 48 h, 胰酶 (无 EDTA) 消化收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 悬浮于冷 PBS 使浓度致 1×10^5 个/mL 细胞, 取 400 μ L 稀释的细胞按照试剂盒的要求加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min。预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 500 mL 冷 PBS 重悬细胞, 置冰上待检。凋亡的监测使用美国贝克曼库尔特公司的流式细胞仪 (Cytomics FC500) 完成, 流式软件统计分析凋亡细胞占所有细胞的比率。

1.2.4 细胞总蛋白和胞浆蛋白的提取 0.4% 胰酶消化对数生长期的 A549 细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 悬浮于 DMEM 培养液使浓度致 2×10^4 个/mL 细胞, 取 2 mL 稀释的细胞接种到 6 孔板, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入 0、5、10、20 μ mol/L 的氧化苏木素, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 48 h, 胰酶 (无 EDTA) 消化收集细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍。细胞总蛋白的提取: 取上述获得的细胞沉淀加入 $1 \times$ SDS 上样缓冲液裂解细胞, 95 $^{\circ}$ C 10 min, $10\ 000 \times g$ 离心 20 min, 上清液即为细胞总蛋白。细胞质蛋白的提取: 取上述获得的细胞沉淀加入细胞质提取缓冲液, 10 min 后 (期间不断震荡) $700\ g$ 离心 10 min, 取上清液 $10\ 000 \times g$ 离心 30 min, 上清液即为细胞胞质蛋白。

1.2.5 Western blot 检测 取上述获得的细胞总蛋白或胞质蛋白进行 SDS-PAGE (8% 积层胶, 12% 分离胶) 凝胶电泳, 100 V 3 h 后蛋白电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜上的非特异性结合位点, 加入相应的特异性一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 缓冲液洗 PVDF 膜 3 次, 加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h, 使用化学发光试剂盒和 X 线片。显色目的条带。GAPDH 作为内参照蛋白, 以显示相同的蛋白上样量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 Student's-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞的抗肿瘤活性 MTT 细胞毒实验结果显示, 氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞具有显著的细胞毒活性, 其 IC_{50} 值为 $(5.36 \pm 0.62)\ \mu$ mol/L, 见图 1。

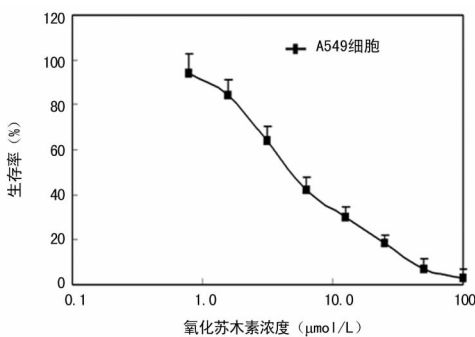


图 1 氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞的细胞毒作用

2.2 氧化苏木素对人肺癌 A549 细胞的致凋亡作用 Annex-

in V/PI 双染流式细胞仪检测显示氧化苏木素诱导了肺癌 A549 细胞的凋亡, 见图 2。从表 2 可见 0、5、10、20 μ mol/L 的氧化苏木素作用肺癌 A549 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率分别为 $(1.15 \pm 0.32)\%$ 、 $(19.61 \pm 4.52)\%$ 、 $(30.18 \pm 6.35)\%$ 和 $(39.48 \pm 7.44)\%$, 各浓度间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

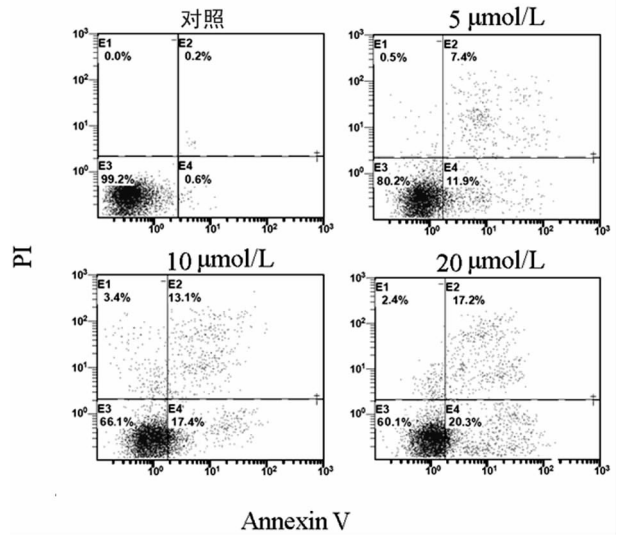


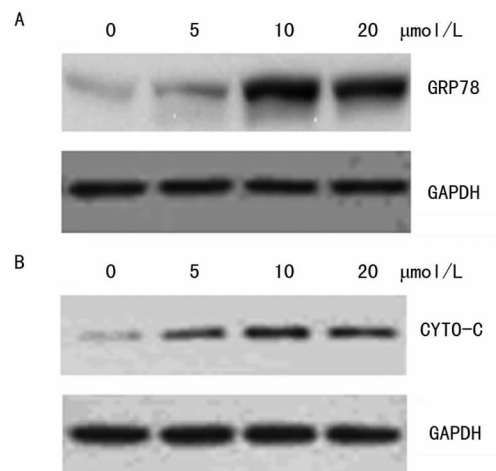
图 2 氧化苏木素诱导了肺癌 A549 细胞凋亡

表 1 氧化苏木素对肺癌 A549 细胞的致凋亡作用

氧化苏木素浓度 (μ mol/L)	肺癌 A549 细胞的凋亡率 (%)
0	1.15 ± 0.32
5	$19.61 \pm 4.52^{**}$
10	$30.18 \pm 6.35^{**\blacktriangle}$
20	$39.48 \pm 7.44^{**\blacktriangle\blacktriangle\#}$

** : $P < 0.01$, 与 0 μ mol/L 比较; \blacktriangle : $P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$: $P < 0.01$, 与 5 μ mol/L 比较; $\#$: $P < 0.05$, 与 10 μ mol/L 比较。

2.3 氧化苏木素对肺癌 A549 细胞内质网应激 (ERS) 通路的影响 从图 3 可见 5、10 和 20 μ mol/L 氧化苏木素作用肺癌 A549 细胞 48 h 后, 与对照比较 GRP78 出现显著的升高 (图 3A), 细胞质中的 cyto-c 也出现了显著的增加 (图 3B)。



A: GRP78; B: cyto-c.

图 3 氧化苏木素对肺癌 A549 细胞 GRP78 和细胞质 cyto-c 表达的影响

3 讨 论

随着现代化学分离鉴定技术的进步,大量的小分子化合物从我国传统中药中分离鉴定出来,氧化苏木素是从苏木提取物中分离的一个单体成分,笔者前期在乳腺癌上的研究显示其可以显著抑制乳腺癌的生长^[2],Hsieh 等^[3]的研究也发现了氧化苏木素可以抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。本研究使用氧化苏木素处理人肺癌 A549 细胞,MTT 细胞毒实验显示了氧化苏木素对人肺癌细胞具有显著的毒性作用,进一步的凋亡流式细胞仪分析显示氧化苏木素诱发了人肺癌细胞凋亡的产生,并且呈现剂量依赖性。

细胞凋亡途径主要有 3 种:(1)外源性(死亡受体)途径;(2)内源性(线粒体)途径;(3)ERS^[4]。ERS 近年来逐渐受到学者的关注,内质网是哺乳动物细胞蛋白质、脂类、糖类合成和修饰的重要场所,属于体内比较敏感的膜性细胞器^[5],当体内未折叠蛋白或错误折叠蛋白增加时,就会导致 ERS 的发生,当 ERS 状态不能恢复时,就可诱导细胞凋亡发生^[6]。迄今研究表明,在多数细胞株 ERS 促发的凋亡主要是通过内源性线粒体凋亡途径来完成^[7-8]。一些结合于内质网的一些分子伴侣蛋白在 ERS 促发的凋亡中起到主要的调节和促发作用,其中 GRP78 是通路中一个关键的分子伴侣蛋白^[9],GRP78 激活后进一步诱发钙离子进入线粒体,线粒体膜电位改变,使 cyto-c 外漏释放到胞质,激活下游的 caspase 级联反应,诱导细胞凋亡的发生^[10-11]。本研究 Western blot 检测显示,ERS 中的关键调节分子 GRP78 表达上调,细胞质中的 cyto-c 也出现相应的升高,上述结果提示了氧化苏木素处理肺癌 A549 细胞后激活了 ERS,随后经线粒体途径诱导了细胞凋亡的发生。

综上所述,氧化苏木素通过 ERS 途径诱导了人肺癌 A549 细胞凋亡,具有开发为抗肺癌新药的前景,但其体内的抗肿瘤活性及药物的毒性还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 邵青,王东,杨卫兵. 肺癌患者生活质量测评方法及相关因素分析的研究进展[J]. 重庆医学,2014,43(3):351-356.
- [2] Tao LY, Li JY, Zhang JY. Brazilein, a compound isolated
- (上接第 4179 页)
- [8] 陈安,朱文英,许玉姣,等. 老年人体质指数与高血压和 2 型糖尿病的关系[J]. 中华老年医学杂志,2011,30(9):729-731.
- [9] 应志娟,张克勇. 老年 2 型糖尿病患者血糖波动与循环内皮祖细胞及微血管病变的相关性[J]. 中国老年学杂志,2014,(16):4457-4458,4459.
- [10] Spectre G, Arnetz L, Östenson CG, et al. Twice daily dosing of aspirin improves platelet inhibition in whole blood in patients with type 2 diabetes mellitus and micro-or macrovascular complications[J]. Thromb Haemostas, 2011,106(3):491.
- [11] Tuzcu EA, Arlca S, Ilhan N, et al. Relationship between mean platelet volume and retinopathy in patients with

from *Caesalpinia sappan* Linn., induced growth inhibition in breast cancer cells via involvement of GSK-3 β / β -Catenin/cyclin D1 pathway[J]. Chem Biol Interact, 2013,206(1):1-5.

- [3] Hsieh CY, Tsai PC, Chu CL, et al. Brazilein suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Chem Biol Interact, 2013,204(2):105-115.
- [4] 吴芳,安永康,朱艳琴. 内质网应激与肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(9):2228-2232.
- [5] Di Fazio P, Ocker M, Montalbano R. New drugs, old fashioned ways: ER stress induced cell death[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012,13(11):2228-2234.
- [6] Cui WY, Liu Y, Zhu YQ, et al. Propofol induces endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis in lung cancer cell H460[J]. Tumour Biol, 2014,35(6):5213-5217.
- [7] Zhu J, Chen M, Chen N, et al. Glycyrrhetic acid induces G1-phase cell cycle arrest in human non-small cell lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Int J Oncol, 2015,46(3):981-988.
- [8] Yang KM, Kim BM, Park JB. ω -Hydroxyundec-9-enoic acid induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in non-small cell lung cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,448(3):267-273.
- [9] Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, et al. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling[J]. Mol Cancer, 2010,27(9):283-290.
- [10] 周晓水,张陶然,刘毅,等. 内质网功能状态对卵巢癌细胞顺铂敏感度的影响[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(1):41-44.
- [11] 杨方万,穆茂媛,肖娟娟,等. 内质网应激诱导细胞凋亡机制的研究进展[J]. 医学研究杂志,2014,43(10):176-181.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-05-16)

type 2 diabetes mellitus[J]. Grae Arc Clin Exp, 2014,252(2):237-240.

- [12] Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay [J]. J Throm Thrombolys, 2011,31(2):165-172.
- [13] 葛小静,姜育智,章宏伟,等. 糖尿病皮肤组织“隐性损害”机制研究进展[J]. 中华烧伤杂志,2012,28(1):51-53.
- [14] 黄崇林. 糖尿病并发微血管病患者血浆糖化血红蛋白水平变化及意义[J]. 中国基层医药,2011,18(8):1126-1127.

(收稿日期:2015-04-28 修回日期:2015-07-26)