

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.010

联合应用衣霉素增加顺铂诱导人大细胞肺癌 H460 细胞凋亡*

杜敏娟¹,徐晓光²,刘瑞琦¹,蒋颖超²,杨亚琴²,吴丽丽²(1. 吉林医药学院附属医院肿瘤科,吉林 132001;2. 吉化集团公司总医院/
北华大学第二附属医院呼吸内科,吉林 132021)

[摘要] **目的** 探讨顺铂联合衣霉素对人大细胞肺癌 H460 细胞生长增殖的作用。**方法** H460 细胞在体外培养,MTT 方法检测在不同浓度顺铂单独组及联合作用 24 h 对细胞活性的影响。用 Western blot 法检测 H460 细胞内 cleaved caspase-3 和 cytochrome C 的表达水平。**结果** MTT 结果显示顺铂能抑制 H460 细胞的增殖并呈现剂量依赖性,同时顺铂可以引起 H460 细胞中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和 cytochrome C 的表达水平明显的升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合衣霉素可以进一步增加顺铂引起的 H460 细胞的增殖抑制作用,同时进一步增加凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和 cytochrome C 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 衣霉素可以增加 H460 细胞对顺铂的敏感性,从而提高顺铂治疗大细胞肺癌的疗效。

[关键词] 顺铂;衣霉素;H460 细胞**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3343-03**The combined application of tunicamycin and cisplatin-induced apoptosis in human large-cell lung cancer H460 cells***Du Minjuan¹, Xu Xiaoguang², Liu Ruiqi¹, Jiang Yingchao², Yang Yaqin², Wu Lili²(1. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin 132001, China;
2. Department of Respiratory, General Hospital, Jilin Chemical Group Corporation/
the Second Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132021, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of cisplatin in combine with tunicamycin on the growth of human large cell lung cancer H460 cells. **Methods** H460 cells were cultured in vitro and MTT assay was used to examine the cell viability of cells treated by cisplatin alone or in combine with tunicamycin for 24 h. Western blot was applied to examine the expression levels of cleaved caspase-3 and cytochrome C in H460 cells. **Results** MTT results revealed that cisplatin could inhibit the growth of H460 cells in concentration dependent manners and increase the expression of apoptotic related proteins cleaved caspase-3 and cytochrome C, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Combined with tunicamycin can further inhibit the growth of H460 cells induced by cisplatin and up-regulate the expression of cleaved caspase-3 and cytochrome C, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Tunicamycin can increase the cisplatin sensitivity of H460, which raise the anticancer effect of cisplatin to human large cell lung cancer.

[Key words] cisplatin; tunicamycin; H460 cells

肺癌高居癌症死亡原因的首位^[1],证据表明肺癌早发现有利于治疗效果,有助于患者预后^[2]。非小细胞肺癌占肺癌的 80% 以上。目前临床上对中晚期非小细胞肺癌主要采取化疗方法^[3]。大细胞肺癌作为非小细胞肺癌的一种,通常采用顺铂作为化疗药物的一种,但大细胞肺癌患者长期使用顺铂,逐渐地对顺铂产生了耐受性。衣霉素是蛋白 N-糖基化抑制剂,能诱导内质网应激,常被作为内质网应激诱导剂^[4-5]。本文通过体外培养 H460 细胞,利用分子生物学技术探讨衣霉素在顺铂诱导 H460 细胞凋亡中的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所用的大细胞肺癌细胞株 H460 购自中国医学科学院细胞库, RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。顺铂(cisplatin)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司,衣霉素(tunicamycin, TUND)购自美国 CalBiochem 公司,主要试剂 cleaved caspase-3、cytochrome C 均购自美国 Santa Cruz 公司。PVDF 膜(0.45 μm)购自德国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 培养人非小细胞肺癌 H460 用含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 RPMI 1640 培养液培养,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。每天换液 1 次,待细胞生长至对数生长期时,用 0.25% 胰酶进行消化,按 1:4 比例进行传代,待细胞传至第 3 代后进行实验。实验分组:对照组、顺铂 10 μmol/L 组、顺铂 15 μmol/L 组、顺铂 20 μmol/L 组;联合用药时分组:对照组、衣霉素组、顺铂组(15 μmol/L)、顺铂(15 μmol/L)+衣霉素组。

1.2.2 细胞毒性试验 MTT 法检测肺癌细胞 H460 对 CD-DP 和 TG 的耐受性。将 MTT 粉末用 0.01 mol/L PBS 配制成 5 mg/mL 的工作液;取对数生长期的 A5 细胞,0.25% 胰酶消化后进行细胞计数,混匀后以 1×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板,每孔加 100 μL,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,使细胞达到生长对数期,给予不同浓度的顺铂,每个浓度设 5 个复孔,继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液后继续培养 4 h,即可弃去孔板内的液体,再每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DM-

* 基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目[吉教科合字(2015)第 406 号]。 作者简介:杜敏娟(1981-),硕士,主治医师,主要从事肺癌的基础研究及临床治疗。

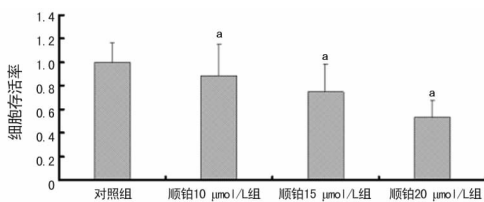
SO),溶解活细胞内琥珀脱氢酶与 MTT 反应生成的甲瓩,放于平板振荡器上振荡 10 min,酶标仪检测每孔光密度(OD)值(570 nm 波长)。测 3 次取平均值,按公式计算细胞存活率。细胞存活率(%)=[A 实验孔-A 空白孔/(A 对照孔-A 空白孔)] \times 100%,每次实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 Western blot 检测 H460 细胞中蛋白质的表达水平。(1)细胞总蛋白的提取:细胞给药作用 24 h 后,用胰酶消化收集到离心管中,加入预冷的 PBS(1 mL),1 000 r/min,室温离心 2 次。取上清液转移到 1.5 mL 离心管中,混匀后,4 $^{\circ}$ C,3 000 r/min 再次离心。去上清液,每管加入 200~300 μ L RIPA 蛋白裂解液(含 1%PMSF),超声 5 s 左右打碎基因组后 4 $^{\circ}$ C 放置 45 min(以上全程冰上操作)。之后用 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心,取上清液检测蛋白浓度,按体积比例加入一定量的 5 \times Loading Buffer,98 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 使蛋白变性,然后 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min 冷却处理后存放在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。(2)蛋白上样:按照所检测的蛋白浓度加入不同体积的样品,丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白质进行分离,考马斯亮蓝检测总蛋白表达水平。待将蛋白水平调至一样水平后,进行目的蛋白表达水平的检测,丙烯酰胺凝胶电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,100 V,转膜 120 min。转膜结束后,用 PBST 清洗数分钟,放入 5%脱脂奶粉封闭 120 min。封闭结束后,加入相应的一抗(按照抗体的说明书进行稀释),孵育过夜,第 2 天加入对应的二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 2 h,洗膜 3 次,1 次 15 min,2 次 5 min,加 ECL 显色液进行显影,提取结果并用软件分析数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各实验组间数据的均值比较采用 *t* 检验。Western blot 结果数据的分析,采用天能图像分析系统以及 Quantity One 软件进行分析处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对 H460 细胞的生长抑制作用 与对照组相比,不同浓度顺铂组均可导致 H460 细胞生存率的下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且呈现剂量依赖性,见图 1。



^a: $P<0.05$,与对照组比较。

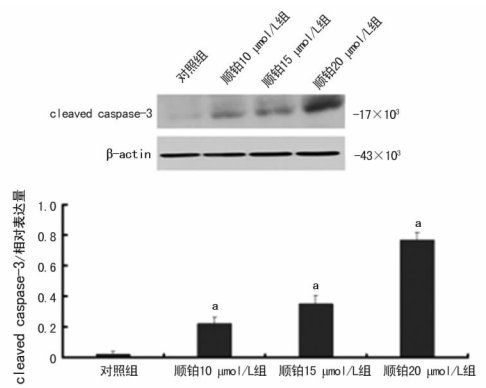
图 1 不同浓度顺铂对 H460 细胞存活率的影响

2.2 顺铂上调 H460 细胞的 cleaved caspase-3 蛋白的表达 Western blot 进一步检测凋亡的改变,结果表明各浓度顺铂促进了细胞内 cleaved caspase-3 蛋白表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.3 顺铂上调 H460 细胞的 cytochrome C 蛋白的表达 Western blot 进一步检测线粒体凋亡相关蛋白,结果表明各浓度顺铂组与对照组比较可增加 cytochrome C 蛋白的表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

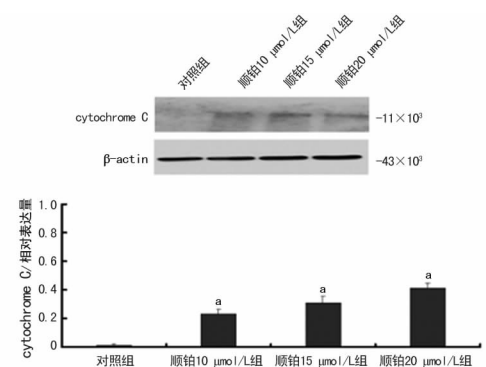
2.4 衣霉素增强顺铂对 H460 细胞的抑制作用 MTT 结果显示对照组与衣霉素组相比,两者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。与顺铂组相比,联合用药组明显抑制了细胞增

殖,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



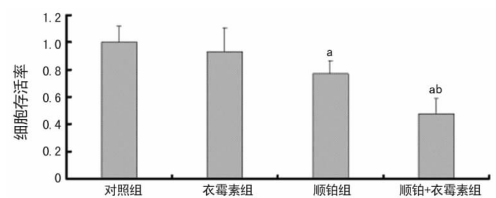
^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 2 不同浓度顺铂对 H460 细胞 cleaved caspase-3 表达水平的影响



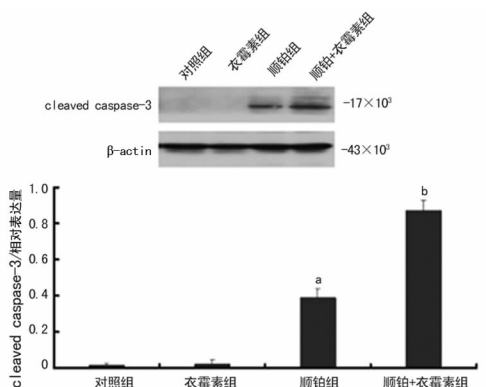
^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 3 不同浓度顺铂对 H460 细胞 cytochrome C 表达水平的影响



^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与顺铂组比较。

图 4 联合用药对 H460 细胞存活率的影响



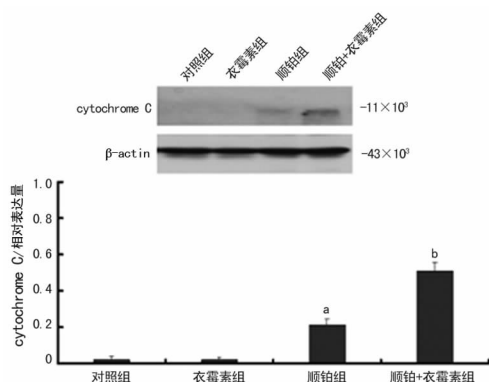
^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与顺铂组比较。

图 5 联合用药对 H460 细胞 cleaved caspase-3 表达水平的影响

2.5 联合用药增强了 H460 细胞的 cleaved caspase-3 蛋白的

表达 对照组与衣霉素组几乎不表达 cleaved caspase-3 蛋白, 顺铂组与联合用药组都可增加 cleaved caspase-3 蛋白的表达, 其中联合用药组作用更显著, 与对照组、衣霉素组相比, 顺铂组与联合用药组差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图 5。

2.6 联合用药增强了 H460 细胞的 cytochrome C 蛋白的表达
衣霉素组与对照组几乎都不表达 cytochrome C, 而顺铂组及联合用药组与对照组相比 cytochrome C 的表达增加, 且联合用药组较顺铂组的增强作用更显著, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图 6。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与顺铂组及对照组比较。

图 6 联合用药对 H460 细胞 cytochrome C 表达水平的影响

3 讨论

衣霉素是来源于链霉菌的糖核苷酸类似物, 在真核生物中, 衣霉素抑制 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖^[6], 能促使蛋白质糖链的合成受阻, 妨碍蛋白质糖基化的进程, 糖基化也属于表观遗传学的范畴, 糖基化发生的主要部位是在内质网中, 对于维持蛋白质的功能有着非常重要的作用。因此, 当蛋白质糖基化不能正常运行时, 会诱导错误折叠蛋白堆积在内质网内, 促发内质网应激, 内质网应激本是一种保护机制, 但持续过久的内质网应激最终会导致凋亡^[7]。顺铂作为肺癌化疗的经典药物, 疗效确切, 但不良反应较大且不良反应呈剂量依赖性, 其可以通过内质网应激途径介导细胞凋亡达到抗肿瘤的作用^[8], 所以本文探讨是否可以通过衣霉素增强内质网应激促使 H460 细胞对顺铂的敏感性, 从而提高单用顺铂治疗大细胞肺癌的疗效, 如果两者具有协同增效的作用, 可以一定程度上减少顺铂用量, 减少不良反应, 提高治疗肺癌的疗效。

活化的 caspase-3 都能酶切多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP), 而 PARP 是 DNA 修复酶的一种, 对于维持细胞的稳态发挥着重要的作用, PARP 被酶切后, 失去了原有的活性, 加剧细胞内部的不稳定性, 最终导致了细胞凋亡^[9]。所以 cleaved caspase-3 是检测凋亡重要的指标。cytochrome C 是一种与粒线体内膜有关, 结构松散而微小的血红素蛋白。当粒线体膜完整性受损时, cytochrome C 就会从粒线体释放到细胞质中, 从而激活 caspase-3, 启动凋亡程序。因此细胞质中 cytochrome C 的增多能特异性代表粒线体途径介导的凋亡^[10-11]。

综上, 本文通过衣霉素诱导内质网应激构建了 H460 细胞内质网应激模型, 来研究发现内质网应激在顺铂促发 H460 细

胞凋亡中的作用。实验结果表明衣霉素不仅可以通过内质网应激介导的凋亡, 也可以通过粒线体途径介导的凋亡, 最终诱导了 H460 细胞对顺铂的敏感性的增加, 这为衣霉素在将来能运用到临床上作为顺铂的辅助药物提供了理论基础。但由于其诱导细胞凋亡的机制比较复杂, 可能多种途径并存, 很难通过单一的研究来彻底阐明, 还需要详细地探讨衣霉素在诱导人大细胞肺癌细胞凋亡中的具体机制。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening [J]. N Engl J Med, 2011, 365(5):395-409.
- [3] Konstantinos Z, Paul Z. Treatment of non-small cell lung cancer(NSCLC)[J]. J Thorac Dis, 2013, 5 Suppl 4: S389-396.
- [4] Chen R, Li J, Feng CH, et al. c-Met function requires n-linked glycosylation modification of pro-Met [J]. J Cell Biochem, 2013, 114(4):816-822.
- [5] Fan L, Sun G, Ma T, et al. Melatonin reverses tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells and improves cytotoxic response to doxorubicin by increasing CHOP and decreasing survivin [J]. J Pineal Res, 2013, 55(2):184-194.
- [6] Np P, Tsvetanova B. biosynthesis of the tunicamycins: a review [J]. J Antibiot (Tokyo), 2007, 60(8):485-491.
- [7] Xu Y, Wang C, Li Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress [J]. Mol Clinl Oncol, 2014, 2(1):3-7.
- [8] Xu Y, Yu H, Qin H, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells [J]. Cancer Lett, 2012, 314(2):232-243.
- [9] Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7):763-765.
- [10] Savory J, Herman MM, Ghribi O. Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain [J]. J Inorg Biochem, 2003, 97(1):151-154.
- [11] Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, et al. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(3):156-162.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-06-24)