

• 论 著 •

槐耳清膏对肺腺癌细胞增殖 凋亡及相关基因表达的影响^{*}

王 卉¹, 吴唐维¹, 刘水逸^{1,2}, 李晓怡¹, 陈卫群³, 卢宏达², 孔庆志², 卢忠心^{2△}

(1. 武汉市中心医院检验科, 湖北武汉 430014; 2. 武汉市肿瘤研究所, 湖北武汉 430014;

3. 武汉市中心医院中心实验室, 湖北武汉 430014)

摘 要:目的 探讨槐耳清膏抑制肺腺癌细胞增殖、促进细胞凋亡的抗肿瘤作用的分子机制。方法 应用不同浓度槐耳清膏处理肺腺癌细胞, 细胞增殖活性利用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色法检测, 细胞凋亡应用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测, 细胞中相关基因表达利用免疫技术检测。结果 CFSE 染色结果发现槐耳能够明显抑制肺腺癌细胞的增殖, 并具有浓度和时间依赖性; Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡结果发现槐耳能够促进肺腺癌细胞凋亡, 具有浓度和时间依赖性; 免疫蛋白印迹实验结果发现在肺腺癌细胞中, 槐耳能够抑制相关基因 EZH2、 β -catenin 和 bcl-2 的表达。结论 在肺腺癌细胞中槐耳清膏抗肿瘤作用的分子机制可能是通过抑制 EZH2/ β -catenin 信号通路, 抑制肺腺癌细胞增殖、促进细胞凋亡。

关键词:槐耳清膏; 肺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 分子机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1483-03

Effects of extractum trametes robiniphila murr on proliferation, apoptosis and related genes expressions of lung cancer cells^{*}

Wang Hui¹, Wu Tangwei¹, Liu Shuiyi^{1,2}, Li Xiaoyi¹, Chen Weiqun³, Lu Hongda², Kong Qingzhi², Lu Zhongxin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China;

2. Tumor Research Institute, Wuhan, Hubei 430014, China; 3. Center

Laboratory, Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract:Objective To investigate the mechanism involved in the antitumor effects of Huaier. **Methods** The carboxyl fluorescein diacetate succinimide ester(CFSE) labeling method and Annexin V-FITC/PI double-staining were used to identify the effects of Huaier on A549 cells. The western blot was used to detect the protein levels of EZH2, β -catenin and bcl-2 after Huaier treatment in A549 cells. **Results** The CFSE labeling and Annexin V-FITC/PI double-staining results indicated that huaier suppressed proliferation and induced apoptosis of A549 cells by time and concentration dependent pattern. Western blotting result found that Huaier treatment down regulated EZH2, β -catenin and bcl-2 protein levels in A549 cells compared with untreated cells. **Conclusion** Huaier might suppress proliferation and induce apoptosis in lung cancer by EZH2-mediated approach in lung cancer cells, which provides a new idea for understanding the anti-tumor effects of Huaier.

Key words: Huaier; lung cancer; proliferation; apoptosis; molecular mechanism

肺癌是当今世界上病死率最高的恶性肿瘤^[1]。尽管多种治疗手段如外科手术治疗、内科放化疗、生物治疗等已广泛用于临床, 但由于治疗产生的不良反应及多重耐药性, 其治疗效果一直不佳。传统中药因其安全、天然和不良反应小, 能够延长生存期、提高生活质量, 在肿瘤防治研究中正逐渐受到关注^[2]。槐耳清膏是真菌槐耳的提取物, 其主要活性成分为多糖蛋白, 已广泛用于肿瘤防治, 但其具体机制不清楚。本研究通过应用槐耳清膏处理肺腺癌细胞, 观察细胞增殖活性、细胞凋亡及相关基因表达, 从而分析槐耳抗癌作用的可能分子机制。

1 材料与方

1.1 细胞与试剂 人肺腺癌细胞株 A549 细胞从美国模式培养物保藏所(ATCC)购买, 由本实验室保存。槐耳清膏购自江苏启东盖天力药业有限公司, 制备浓度为 100 mg/mL 无菌槐

耳清膏浓缩液, -20 ℃保存备用。胎牛血清、RPMI-1640 细胞培养基由美国 Hyclone 公司提供, 蛋白浓度测定试剂盒由北京鼎国昌盛生物技术公司提供, 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)由美国 Invitrogen 公司提供, 异硫氰酸荧光素标记膜联蛋白-V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, β -catenin、Bcl-2 抗体由美国 Santa Cruz 公司提供, Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)抗体由美国 Cell Signaling Technology 公司提供, β -actin 抗体和羊抗鼠二抗由美国 Sigma 公司提供。

1.2 细胞增殖活性检测 采用 CFSE 荧光染料标记, 应用流式细胞术检测细胞增殖活性。接种 A549 细胞培养 24 h 后, 用 RPMI-1640 无血清培养基洗 2 遍, 胰酶消化收集细胞, 用 5 μ mol/L CFSE 的磷酸盐(PBS)缓冲液重悬, 37 ℃避光水浴 15

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(81071921, 81372325); 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2011AA02A111); 湖北省卫计委科研项目(WJ2015MB144); 武汉市卫生局科研项目(WX11A03, WX15A12); 武汉市中心医院青年基金项目(YQ13B04)。作者简介: 王卉, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤分子诊断研究。△ 通讯作者, E-mail: LZX71@yahoo.com。

min 染色。随后用预冷 5 倍体积的 RPMI-1640 含血清培养基终止染色。按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 加入槐耳浓缩液, 使其终浓度分别为 0、2、4、8 mg/mL, 处理细胞。分别于处理后 24、48、72 h 收集细胞, PBS 洗涤 2 遍, 用流式细胞仪在 488 nm 的激发光下检测, 分析细胞的增殖指数(P. I.), 研究槐耳对肺腺癌细胞增殖活性的影响。

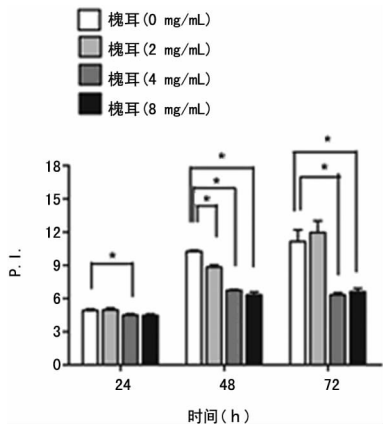
1.3 细胞凋亡率检测 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法应用流式细胞术检测细胞凋亡率。A549 细胞按 5×10^5 个/孔接种 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入槐耳浓缩液, 使其终浓度分别为 0、2、4、8 mg/mL, 处理细胞。分别于处理后 24、48、72 h 收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 于离心管中 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 500 μL 的结合缓冲液重悬。加入 5 μL Annexin V-FITC 染液混匀后, 加入 5 μL PI 染液, 混匀后室温避光反应 15 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4 相关基因表达检测 应用免疫蛋白印迹技术检测相关基因的表达。将对数生长期 A549 细胞接种六孔板, 按 5×10^5 个/孔, 培养 24 h 后, 用槐耳处理细胞, 其终浓度为 4 mg/mL, 对照组用 PBS 处理。48 h 后收集细胞, 提取总蛋白。应用免疫蛋白印迹技术分别检测 EZH2、 β -catenin 和 bcl-2 蛋白表达情况。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 槐耳清膏对肺腺癌细胞增殖活性的影响 4 mg/mL 槐耳清膏作用于细胞不同时间(24 h、48 h、72 h)细胞的 P. I. 依次为 4.5 ± 0.03 、 6.6 ± 0.02 、 6.2 ± 0.05 ; 作用 24 h 后有明显抑制增殖作用; 2、4、8 mg/mL 槐耳清膏作用于细胞 48 h P. I. 依次为 8.8 ± 0.03 、 6.6 ± 0.02 、 6.1 ± 0.05 , 均能够明显抑制肺腺癌细胞增殖; 4 mg/mL 和 8 mg/mL 槐耳清膏处理细胞 72 h 后, P. I. 依次为 6.2 ± 0.05 、 6.4 ± 0.07 , 均有明显抑制增殖作用。见图 1。

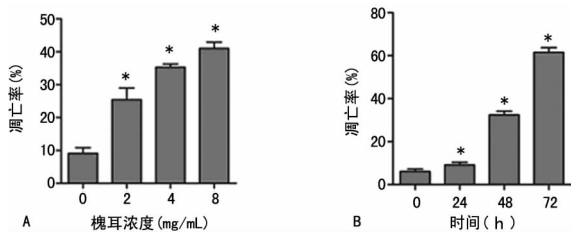


*: $P < 0.05$, 与 0 mg/mL 的槐耳清膏作用于 A549 细胞的 P. I. 比较。

图 1 槐耳清膏对 A549 细胞增殖的影响

2.2 槐耳清膏促进肺腺癌细胞的凋亡 2、4、8 mg/mL 槐耳清膏作用于 A549 细胞 48 h 细胞凋亡率依次为 25.2%、34.3%、40.9%, 而 0 mg/mL 槐耳清膏作用于 A549 细胞 48 h

细胞凋亡率为 9.8%, 槐耳具有明显促细胞凋亡作用, 且随着浓度增加凋亡率增加; 4 mg/mL 槐耳清膏处理细胞 24、48、72 h 细胞凋亡率依次为 9.5%、34.3%、60.5%, 均有明显促凋亡作用, 且随着时间延长凋亡率增加。见图 2。



A: 2~8 mg/mL 与 0 mg/mL 的槐耳清膏作用于 A549 细胞 48 h 后细胞凋亡率比较; B: 4 mg/mL 槐耳清膏作用于 A549 细胞 24、48、72 h 后与作用 0 h 细胞凋亡率比较; *: $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 2 槐耳清膏对 A549 细胞凋亡的影响

2.3 槐耳清膏对相关基因表达的影响 与对照组相比, 槐耳处理后肺腺癌细胞中 EZH2、 β -catenin 和 bcl2 的表达下调, 表明在肺腺癌细胞中槐耳清膏抗癌作用的可能机制是: 槐耳清膏通过抑制 EZH2/ β -catenin 通路, 进而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡而起作用。见图 3。

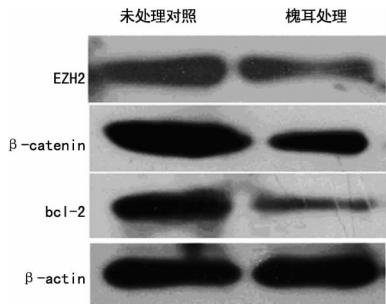


图 3 槐耳清膏处理对 EZH2 及其相关蛋白表达的影响

3 讨 论

世界肺癌联盟发布的最新数据显示, 肺癌发病率和病死率呈逐年上升趋势, 全球每年有约 150 万人死于肺癌。国内第三次人口死因调查结果表明: 肺癌居国内恶性肿瘤死亡原因之首, 每年大约有 60 万人死于肺癌。肺癌的五年生存率不足 15%, 其主要原因在于大多数被确诊的肺癌患者已处于中晚期, 失去外科手术治疗机会, 而放化疗不良反应大, 治疗效果差。

槐耳清膏是真菌槐耳的提取物, 已有近 1 600 年的历史^[3], 其活性成分为蛋白多糖(PS-T)^[4]。由南京中医药大学研制的金克槐耳颗粒具有广谱抗癌作用, 且无明显不良反应, 能够明显延长生存期、提高生活质量, 是国家中药一类新药。但槐耳的抗癌作用机制尚不清楚。有研究发现在肝癌和乳腺癌中槐耳可以促进肿瘤细胞凋亡^[5-6], 抑制肿瘤组织血管生成^[7], 促进肺癌细胞对化疗药物敏感性等^[8]。Yan 等^[9]研究表明槐耳能够抑制卵巢癌的转移。Wang 等^[10]发现槐耳能够抑制乳腺癌细胞增殖。本研究结果发现在肺腺癌细胞 A549 细胞中槐耳清膏能够抑制细胞增殖、诱导凋亡, 并具有时间和剂量依赖性。

EZH2 是多梳蛋白抑制复合物 2 的催化亚基, 能够使组蛋白 3 第 27 位赖氨酸甲基化, 抑制与细胞分化和增殖相关基因

的表达,参与肿瘤发生发展^[11]。研究发现多种肿瘤细胞中 EZH2 呈高表达^[12],Cai 等^[13]发现在鼻咽癌细胞中,EZH2 被 Let-7a 抑制,进而抑制细胞增殖,促进凋亡。本研究发现在肺腺癌细胞 A549 细胞中,槐耳能够抑制 EZH2 蛋白表达,表明 EZH2 与槐耳抗癌作用密切相关。

为进一步研究在槐耳抗癌作用中 EZH2 的作用,本研究进一步检测了 EZH2 相关基因的表达情况。正常细胞胞浆中 β -catenin 被控制在较低水平^[14],而 EZH2 能活化 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 β -catenin 的表达^[15];在结肠癌细胞中, β -catenin/Tcf 信号通路活化, bcl-2 的表达上调^[16];表明在肿瘤细胞中 EZH2 高表达能够活化 β -catenin 信号通路,进而促进 bcl-2 的表达,促进细胞增殖、抑制细胞凋亡。本研究结果显示,在肺腺癌细胞中槐耳能抑制 β -catenin 和 bcl-2 的表达,表明 EZH2、 β -catenin 和 bcl-2 在槐耳抑瘤作用中具有重要作用。

本研究探讨了在肺腺癌细胞中传统中药槐耳抗癌作用的可能机制,发现槐耳能够抑制 EZH2、 β -catenin 和 Bcl-2 的表达,进而抑制肺腺癌细胞增殖、促进凋亡。本研究首次提出槐耳抗癌作用的新的分子机制,即槐耳/EZH2/ β -catenin/ bcl-2/细胞凋亡途径,为槐耳抗癌的临床应用提供了新的理论和实验依据。

参考文献

[1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1): 11-30.

[2] Chen S,Flower A,Ritchie A, et al. Oral Chinese herbal medicine (CHM) as an adjuvant treatment during chemotherapy for non-small cell lung cancer;a systematic review[J]. Lung Cancer,2010, 68(2):137-145.

[3] 李立新,叶胜龙,王艳红,等. 槐耳浸膏的实验研究及临床应用进展[J]. 中国肿瘤,2007,16(2):110-113.

[4] 郭跃伟,程培元,陈玉俊,等. 槐耳菌丝体多糖的分离和分析[J]. 中国生化药物杂志,1993,63(1):56-60.

[5] 张光军,郑起,袁周,等. 槐耳清膏体外诱导人肝癌细胞 MH-CC97H 凋亡[J]. 肿瘤学杂志,2010,16(4):281-284.

[6] Zhang N,Kong X,Yan S, et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis[J]. Canc-

er Sci,2010,101(11):2375-2383.

[7] Wang X,Zhang N,Huo Q, et al. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract[J]. Oncol Rep,2012,28(4): 1167-1175.

[8] 王红梅,刘士欣,廖国清,等. 槐耳颗粒联合多西他赛治疗老年非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2011,11 (4):356-358.

[9] Yan X,Lyu T,Jia N, et al. Huaier aqueous extract inhibits ovarian cancer cell motility via the AKT/GSK3 β / β -catenin pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(5): 63731.

[10] Wang X,Zhang N,Huo Q, et al. Huaier aqueous extract suppresses human breast Cancer cell proliferation through inhibition of estrogen receptor α signaling[J]. Int J Oncol,2013,43(1): 321-328.

[11] Simon JA,Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in Cancer epigenetics[J]. Mutat Res,2008,647(1/2):21-29.

[12] Koh CM,Iwata T,Zheng Q, et al. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms[J]. Oncotarget,2011,2(9): 669-683.

[13] Cai K,Wan Y,Sun G, et al. Let-7a inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting EZH2 in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncol Rep,2012,28(6): 2101-2106.

[14] Schmitz Y,Rateitschak K,Wolkenhauer O. Analysing the impact of nucleo-cytoplasmic shuttling of β -catenin and its antagonists APC, Axin and GSK3 on Wnt/ β -catenin signalling[J]. Cell Signal,2013,25(11):2210-2221.

[15] Cheng AS,Lau SS,Chen Y, et al. EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β -catenin-dependent hepatocarcinogenesis[J]. Cancer Res,2011,71(11):4028-4039.

[16] Li Q,Dashwood WM,Zhong X, et al. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat Bcl-2 promoter and characterization of a pathway involving beta-catenin, c-Myc and E2F1[J]. Oncogene,2007,26(42): 6194-6202.

(收稿日期:2015-01-28)

(上接第 1482 页)

[6] Kossi MM,Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke[J]. Stroke,2000,31(8):1889-1892.

[7] Sastry BK,Indira N,Anand B, et al. A case-control study of plasma homocysteine levels in South Indians with and without coronary artery disease[J]. Indian Heart J,2002,53(6):749-753.

[8] 胡大一,徐希平. 有效控制“H 型”高血压—预防卒中的新思路[J]. 中华内科杂志,2008,47(12):976-977.

[9] 王拥军,刘力生,徐希平,等. 国内脑卒中预防策略思考:同时控制高血压和高同型半胱氨酸[J]. 中华医学杂志,2008,88(4):3316-3318.

[10] 李建平,霍勇,刘平,等. 马来酸依那普利叶酸片降压、降同型半胱氨酸的疗效和安全性[J]. 北京大学学报:医学版,2007,39(6): 614-618.

(收稿日期:2015-02-28)

