

• 论 著 •

新藤黄酸对人肺癌细胞株 A549 的增值和凋亡的影响

范从进, 段惠芳

(南京军区庐山疗养院, 江西九江 332000)

摘要:目的 探讨新藤黄酸(GNA)对人肺癌细胞株 A549 的增值和凋亡的影响及其调控的可能机制。方法 用不同浓度的 GNA 处理 A549 细胞,分为对照组和 GNA 组(GNA 浓度分别为 0.5、1.5、2.0 mg/L),采用 MTT、细胞划痕、Hoechst 染色法观察细胞的增值、迁移和凋亡状况;Western blot 检测凋亡相关蛋白 caspase3、caspase9、p53 和 NF- κ B 的表达变化。结果 GNA 能明显抑制细胞的体外增值和迁移且呈剂量依赖性;Hoechst 染色显示 GNA 能诱导细胞凋亡,且随着浓度的升高凋亡现象越来越明显;Western blot 显示 GNA 能上调促进凋亡的蛋白 caspase3、caspase9、p53 和下调 NF- κ B 的表达($P < 0.05$)。结论 GNA 能明显抑制人肺癌细胞株 A549 的增值和迁移并诱导凋亡。

关键词:新藤黄酸; 凋亡; 表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2180-03

Effects of gambogic acid on proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells

Fan Congjin, Duan Hui Fang

(Lushan Sanatorium of Nanjing Military Region PLA, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of gambogic acid(GNA) on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells and its possible mechanism of regulation. **Methods** A549 cells were treated with different concentrations of GNA, which divided into control group and GNA group(0.5, 1.5, 20 mg/L). The cell proliferation and apoptosis of A549 was analyzed by MTT, Hoechst staining; The expression of apoptosis-related protein caspase3, caspase9, p53 and NF- κ B were studied by Western blot. **Results** GNA could inhibit growth of A549 cells; Moreover GNA could also induce apoptosis with the concentration increased more obviously; Western blot showed that GNA down-regulate NF- κ B, increased caspase3, caspase9 and p53 expression($P < 0.05$). **Conclusion** GNA can efficiently promote the cell proliferation inhibition and the apoptosis of A549 cells.

Key words: gambogic acid; apoptosis; expression

2004~2005 年江西省恶性肿瘤死亡病例 7 842 例,病死率为 115.37/10 万,男性为 144.59/10 万,女性为 83.77/10 万,肺癌、肝癌和胃癌是严重危害江西省城乡居民最主要的肿瘤死因^[1]。开发新的抗肿瘤药物已迫在眉睫。藤黄系藤黄科植物藤黄所分泌出的干燥树脂,其抗肿瘤作用逐渐受到高度关注^[2]。新藤黄酸(gambogic acid, GNA)是中药藤黄重要成分之一,常用来衡量中药藤黄药效及质量分级。近年来相关研究表明, GNA 能选择性的作用于靶细胞,而对动物正常免疫系统、造血系统和神经系统毒副作用小,抗癌谱广,抗肿瘤作用尤为显著^[3],有希望成为新结构类型的抗肿瘤药物。本次研究主要初步探讨 GNA 对人肺癌细胞株 A549 的生长增殖能力、迁移能力、细胞凋亡及相关凋亡蛋白表达的变化,并且初步探讨这些作用可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人非小细胞肺癌细胞株 A549,美国 ATCC 公司,中心实验室保存;GNA 由上海融禾医药科技有限公司提供;细胞培养液(High glucose DMEM), Gibco 公司;灭活小牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;MTT, Sigma 公司;相关凋亡一抗 Actin、caspase3、caspase9、NF- κ B、p53,二抗, Santa Cruz 公司;Hoechst 33258,合肥碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 癌细胞培养 人非小细胞肺癌细胞株 A549 由本中心

实验室保存,培养条件:含 10% 小牛血清的高糖 DMEM(实验室手工配制),混匀悬液,培养瓶置于 CO₂ 培养箱中(37℃、5% CO₂)。次日,倒置显微镜下观察细胞密度,胰酶消化传代,备用。

1.2.2 GNA 对 A549 细胞生长抑制试验 采用 MTT 法。传代后的 A549 细胞用 0.25% 胰酶消化,配置细胞悬液,细胞计数板计数,配置适量的稀释液,平均接种到 96 孔板中(每孔约 5 000 个细胞)。次日弃去原液加入含 0.5、1.5、2.0 mg/L GNA 的培养液, GNA 作用 48 h 后进行 MTT 检测。取出 96 孔板,倒置显微镜下观察细胞状态,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL), 37℃ 4 h,弃去上清,滤纸控干,每孔加入 100 μ L DMSO,溶解 10 min,选择 570 nm 波长下测定吸光度值(A 值)。每浓度设 6 个复孔,取各组中吸光度平均值(OD),按照如下公式计算细胞生长的抑制率:抑制率%=(正常对照孔 OD₅₇₀-GNA 试验孔 OD₅₇₀)/正常对照孔 OD₅₇₀×100%,实验重复 3 次^[4]。

1.2.3 细胞迁移试验 对数期生长的 A549 细胞,胰酶消化,稀释至 5×10⁴/mL 悬液,接种到 6 孔板内,待细胞平铺到 75% 左右,换取新的培养基,用专用划痕灭菌枪头在单层细胞中划十字痕, PBS 洗去漂浮的细胞,选取间距相差比较近的四组,随即分为对照组, GNA 组(0.5、1.5、2.0 mg/L GNA),立即拍照(0 h),观察细胞迁移情况并于 48 h 后换液拍照,照片备用。实

验重复 3 次。

1.2.4 细胞凋亡 Hoechst 染色 预先灭菌消毒 6 孔板和盖玻片,消化后的 A549 细胞接种于含盖玻片的 6 孔板中,次日待细胞贴壁后换取含 0.5、1.5、2.0 mg/L GNA 的 DMEM,连续刺激 48 h 后用无菌镊子小心取出盖玻片,置于载玻片上,用 PBS 洗去残留培养基,固定 20 min,预冷 PBS 洗 3 遍,小心用吸水纸吸去残留液体,Hoechst 染色液暗处染 5 min,再用 PBS 洗 3 遍,吸水纸吸去残留液体,倒置载玻片,并立即用荧光淬灭剂封片,指甲油固定,实验室荧光显微镜下观察细胞形态并拍照分析。

1.2.5 提取细胞总蛋白 经 0.5、1.5、2.0 mg/L GNA 刺激 48 h 的 A549 细胞,刮取细胞置 EP 管中,加细胞裂解液缓冲溶液,置冰上 30 min,并反复冻融 3 次,待细胞完全裂解 4 ℃ 14 000 r/min 离心 15 min,吸取上清备用,用 BCA 蛋白定量试剂盒和酶标仪精确测定每组蛋白浓度,通过计算并稀释成相同蛋白浓度,最后加入蛋白上样缓冲液,高温变性,置于一 20 ℃ 备用。

1.2.6 蛋白印迹 Western blot 配制 12.5% 的 PAGE 胶;每孔上样 40 μg;先用 50 V 电泳然后用 100V 跑完;用 100 mA 将蛋白转移至 PVDF 膜上,3% 牛奶封闭 2 h,洗膜,分别加入一抗为 Actin 1 : 1 000,p53 1 : 400,NF-κB 1 : 1 000,caspase3 1 : 1 000,caspase9 1 : 300,摇床 4 ℃ 过夜。洗膜并加入相应的二抗(如抗鼠 1 : 4 000,抗鼠 1 : 1 500,抗兔 1 : 2 500,抗兔 1 : 2 500,抗兔 1 : 1 000,抗鼠 1 : 1 000)室温孵育 2 h,暗室中显影、定影、曝光。重复实验 3 次。

1.3 统计学处理 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,试验结果均采用专用软件 SPSS19.0 进行统计学分析。Western blot 灰度值用 Image Pro 4.5 进行分析,并做柱状图。组间计量资料用方差检验。

2 结 果

2.1 GNA 对 A549 细胞增殖的抑制 由 MTT 结果得出:随着 GNA 浓度的增加对 A549 细胞的生长抑制率也随之增加,抑制率最高达到 68.76%。说明 GNA 能影响 A549 细胞的体外增殖,且呈一定的剂量抑制作用,见表 1。

表 1 不同浓度 GNA 对于 A549 细胞增殖的影响(n=5)			
组别	浓度(mg/L)	OD($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
对照组	0.0	1.94 ± 0.12	—
GNA 组	0.5	1.67 ± 0.08*	14.14
	1.5	1.02 ± 0.11*	47.23
	2.0	0.61 ± 0.14*	68.76

* : $P < 0.05$,与对照组比较。

2.2 GNA 抑制 A549 细胞的迁移 通过细胞损伤迁移结果可以看出,健康组(图 1-A)细胞爬行比较活跃,GNA 组爬行明显变慢(图 1-B,C,D),且随 GNA 浓度的升高现象越来越明显。提示 GNA 对 A549 细胞的迁移呈明显的剂量抑制作用,各组之间的差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 GNA 诱导 A549 细胞的凋亡 经 GNA 连续刺激 48 h 后,进行 Hoechst 染色。结果显示,与对照组(见图 2-A)比较,GNA 组细胞数目有所减少,且随着浓度的升高凋亡细胞占总

细胞的比例也明显上升(图 2-B,C,D)。荧光显微镜下明显观察到 GNA 组细胞折光性强、核染色质固缩凝集形成凋亡小体。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.4 GNA 对 A549 细胞相关凋亡蛋白表达的影响 经 GNA 连续刺激 48 h 后 Western blot 结果显示,随着 GNA 浓度的升高起凋亡促进作用的蛋白 caspase3、caspase9 和 p53 上调;而凋亡抑制作用的蛋白 NF-κB 下调。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

由于环境污染、生活习惯改变和人口老龄化等因素,肺癌已成为呼吸系统中常见的恶性肿瘤。全世界每年约 118 万人死于肺癌,病死率仍居各种肿瘤的首位^[4-6]。据统计,每年约 120 万的新增肺癌患者,其中非小细胞肺癌约占 80%,且其发生率呈上升趋势^[7]。与大多数恶性肿瘤的治疗相同,肺癌的治疗主要是通过手术切除和化疗,但其 5 年存活率仍只有 16%^[8]。然而目前针对肺癌特别是非小细胞肺癌的化疗药物尚存不良反应大,长期使用出现不同程度耐药等缺点。因此,开发新的有效的针对非小细胞肺癌的抗癌药物具有重要临床意义。

本次研究发现 GNA 对非小细胞肺癌细胞株 A549 有明显的生长和迁移抑制作用,发现随着 GNA 浓度增高,对 A549 细胞的增殖和迁移的抑制作用也增强,且呈一定的剂量依赖性。不同的凋亡指数(AD,即凋亡细胞占细胞总数的百分比,在一定程度上与其对放、化疗的敏感性、肿瘤分化程度、分级、发展及肿瘤的生物行为有关^[9]。诱导肿瘤细胞发生凋亡是目前进行肿瘤控制与治疗的可行方法之一,也是筛选抗癌药物的指标之一。

Hoechst 33258(HOE 33258),相对分子质量为 533.88,分子式为 C₂₅H₂₄N₆O · 3HCl。是一种能穿透细胞膜的特异性 DNA 荧光染料,对细胞的毒性较低。与双链 DNA 结合后,最大激发波长为 352 nm,最大发射波长为 461 nm。HOE33258 主要与细胞核染色体 DNA 双螺旋富含 A/T 碱基对区域的小沟结合,使活细胞核被荧光标记^[10]。实验发现,随着 GNA 浓度增高,细胞数量和凋亡现象越来越明显,且出现明显的凋亡小体,提示 GNA 能诱导 A549 细胞凋亡。

核因子 NF-κB 在人类癌细胞生长发展的过程中起重要作用,NF-κB 基因也被证实有重要的促增殖和抗凋亡的作用,有助于肿瘤细胞的发生发展和抗治疗^[11-12]。有报道显示,沉默肺癌细胞 NF-κB 基因,有助于抗癌治疗^[13-14]。p53 是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因,目前研究表明,沉默或者诱导 p53 基因突变,能阻碍成熟肝细胞去分化形成祖细胞,从而容易诱发肝细胞癌或胆管癌^[15]。caspase 属于高度保守的依赖半胱氨酸和天冬氨酸的酸性蛋白酶家族^[16]。受凋亡刺激,首先活化细胞起始凋亡因子(如 caspase1,caspase2,caspase8,caspase9 和 caspase10),接着活化凋亡效应因子如(caspase3,caspase6 和 caspase7),从而诱导细胞凋亡^[17]。caspase3 在胞凋亡中起核心的作用^[18]。本次研究 westen 结果显示,促凋亡作用的 p53,caspase3,caspase9 呈上调趋势,而 NF-κB 呈下调趋势。推测 GNA 可能是通过某种途径激活 p53 和 NF-κB 基因,进而激活 caspase 家族,诱导肺癌细胞株 A549 发生凋亡,目前详细机制的研究正在进行之中。

参考文献

[1] 朱丽萍,李艾,赵军,等. 江西省第 3 次死因回顾恶性肿瘤调查结
果分析[J]. 中国慢性病预防与控制,2012,20(5):510-513.

[2] 刘卫海,肖国丽,赖小平,等. 新藤黄酸诱导 HepG2 细胞凋亡与
bax 及 bcl-2 的关系[J]. 中国药理学通报,2012,28(3):439-440.

[3] 刘卫海,赖小平,周兴挺. 新藤黄酸的研究进展[J]. 时珍国医国
药,2010,21(9):2347-2349.

[4] 袁育珩,朱华庆,周青,等. 高浓度葡萄糖诱导 HepG-2 细胞凋
亡及其调控的相关机制[J]. 安徽医科大学学报,2011,46(12):1223-
1226.

[5] Kadaria D, Archie DS, Sultan I, et al. Dual time point positron e-
mission tomograph/computed tomography scan in evaluation of
intrathoracic lesions in an area endemic for histoplasmosis and
with high prevalence of sarcoidosis[J]. Am J Med Sci, 2013, 346
(5):358-362.

[6] Bulman W, Saqi A, Powell CA. Acquisition and processing of en-
dobronchial uhrasound-guided transbronchial needle aspiration
specimens in the era of targeted lung cancer chemotherapy[J]. Am
J Respir Crit Care Med, 2012, 185(6):606-611.

[7] 田春宇,张旭. 肺癌相关细胞与因子研究进展[J]. 承德医学院学
报,2014,31(2):159-162.

[8] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/
Latins, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(5):283-298.

[9] 王淑强,郭颖,李海军,等. 苦参碱诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及
其对 bax 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(16):3489-
3491.

[10] 卢慧,施文博,肖玉芳,等. 温度和 Hoechst 33258 浓度对人活精
子标记效果的影响[J]. 上海交通大学学报:医学版,2012,32(8):
979-982.

[11] Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy:
Hopes and pitfalls[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(1):33-40.

[12] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF- κ B in cancer: From inno-
cent bystander to major culprit[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4):
301-310.

[13] Cramer F, Christensen CL, Poulsen TT, et al. Insertion of a nucle-
ar factor κ B DNA nuclear-targeting sequence potentiates suicide
gene therapy efficacy in lung cancer cell lines[J]. Cancer Gene T-
her, 2012, 19(10):675-683.

[14] Choi KE, Hwang CJ, Gu SM, et al. Cancer cell growth inhibitory
effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and
inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells[J]. Toxins (Basel),
2014, 6(8):2210-2212.

[15] Tschaharqaneh DF, Xue W, Calvisi DF, et al. P53-dependent nes-
tin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver
cancer[J]. Cell, 2014, 158(3):579-592.

[16] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond[J]. Oncogene,
2008, 27(4):6194-6206.

[17] Weber IT, Fang B, Agniswamy J. Caspases: structure-guided de-
sign of drugs to control cell death[J]. Mini Rev Med Chem, 2008,
8(11):1154-1162.

[18] Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and
regulation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(33):21777-21781.

(收稿日期:2015-04-12)



(上接第 2179 页)

Systems, 2013, 9(6):1196-1209.

[11] Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and
cell survival[J]. IUBMB life, 2012, 64(5):362-369.

[12] Katare R, Oikawa A, Cesselli D, et al. Boosting the pentose phos-
phate pathway restores cardiac progenitor cell availability in dia-
betes[J]. Cardiovasc Res, 2013, 97(1):55-65.

[13] van 't Erve TJ, Doskey CM, Wagner BA, et al. Heritability of glu-
tathione and related metabolites in stored red blood cells[J]. Free
Radic Biol Med, 2014, 76(1):107-113.

[14] Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics[J].
Clin Chim Acta, 1968, 22(2):296-298.

[15] Hare MJ, Shaw JE, Zimmet PZ. Current controversies in the use
of haemoglobin A1c[J]. Journal of internal medicine, 2012, 271
(3):227-236.

[16] Danzig JA, Moser JT, Belfield P, et al. Glucose-6-phosphate dehy-
drogenase deficiency diagnosed in an adolescent with type 1 diabe-
tes mellitus and hemoglobin A1c discordant with blood glucose
measurements[J]. J Pediatr, 2011, 158(5):849-851.

[17] Akter N, Begum N, Ferdousi S. Glucose-6-Phosphate Dehydro-
genase(G6PD) status in Female Type 2 Diabetes Mellitus and its

Relationship with HbA1c[J]. JBSP, 2010, 5(2):60-65.

[18] Pinna A, Contini EL, Carru C, et al. Glucose-6-phosphate dehy-
drogenase deficiency and diabetes mellitus with severe retinal
complications in a Sardinian population, Italy[J]. Int J Med Sci,
2013, 10(13):1907-1913.

[19] Solomon LR, Cohen K. Erythrocyte O₂ transport and metabolism
and effects of vitamin B6 therapy in type II diabetes mellitus[J].
Diabetes, 1989, 38(7):881-886.

[20] Cohen RM, Franco RS, Khera PK, et al. Red cell life span hetero-
geneity in hematologically normal people is sufficient to alter
HbA1c[J]. Blood, 2008, 112(10):4284-4291.

[21] Albright ES, Ovalle F, Bell DS. Artificially low hemoglobin A1c
caused by use of dapsone[J]. Endocrine Practice, 2002, 8(5):370-
372.

(收稿日期:2015-05-22)

