

芍药苷对肺腺癌细胞A549凋亡的诱导作用

祁王忠^{1*}, 段韶军²(1.晋城市陵川县人民医院药剂科,山西晋城 048300;2.晋城市人民医院药学部,山西晋城 048300)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3103-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.24

摘要 目的:研究芍药苷对肺腺癌A549细胞凋亡的诱导作用。方法:以0(阴性对照)、5、10、20、40 μmol/L芍药苷培养A549细胞48 h后,以MTT法检测A549细胞活力。上述浓度芍药苷培养A549细胞24 h后,酶标法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)活性;Western blot法检测Bcl-x1、Bax、核因子κB p65(NF-κB p65)、磷酸化核因子κB p65(NF-κB pp65)蛋白表达。结果:与阴性对照比较,5~40 μmol/L芍药苷培养A549细胞48 h后,细胞活力减弱;5~40 μmol/L芍药苷培养细胞24 h后,细胞Caspase-3活性、Bax蛋白表达增强;10~40 μmol/L芍药苷培养细胞24 h后,细胞Bcl-x1蛋白表达减弱,NF-κB pp65蛋白表达减弱;以上差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:芍药苷可诱导A549细胞凋亡,其机制可能与激活NF-κB信号通路、调节相关基因表达有关。

关键词 芍药苷;肺腺癌A549细胞;凋亡

Induction Effect of Paeoniflorin on the Apoptosis of Lung Adenocarcinoma A549 Cells

QI Wang-zhong¹, DUAN Shao-jun²(1.Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Lingchuan County in Jincheng City, Shanxi Jincheng 048300, China; 2.Dept. of Pharmacy, Jincheng People's Hospital, Shanxi Jincheng 048300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the induction effect of paeoniflorin on the apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells. METHODS: MTT method was used to detect the viability of A549 cells 48 h after the cells were cultured with paeoniflorin of 0 (negative control), 5, 10, 20 and 40 μmol/L. 24 h after A549 cells were cultured with paeoniflorin at the above-mentioned concentrations, enzyme-linked immunosorbent assay was employed to detect the viability of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase-3), and Western blot to determine the protein expression of Bcl-x1, Bax, nuclear factor κB p65 (NF-κB p65) and phosphorylated nuclear factor κB p65 (NF-κB pp65). RESULTS: Compared to the negative control group, A549 cells cultured with paeoniflorin of 5-40 μmol/L for 48 h showed lower cell viability; A549 cell cultured with paeoniflorin of 5-40 μmol/L for 24 h showed higher activity of Caspase-3 and the expression of Bax; A549 cell cultured with paeoniflorin of 10-40 μmol/L for 24 h showed lower protein expression of Bcl-x1 and NF-κB pp65. There were statistically difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: Paeoniflorin induces the apoptosis of A549 cells by a mechanism which may be related to the activation of NF-κB signaling pathway and regulation related gene expression.

KEYWORDS Paeoniflorin; Lung adenocarcinoma A549 cell; Apoptosis

肺癌是目前世界上病死率最高的恶性肿瘤^[1-2]。化疗是当前最有效治疗恶性肿瘤的方法,但其对肺癌细胞有效率仅为20%~30%^[3]。化疗诱导肿瘤细胞凋亡的同时也会增加肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,导致疗效降低。而化疗药物激活核因子-κB(NF-κB)是肿瘤细胞产生耐药性的重要机制之一^[4],因此寻找一种可以抑制NF-κB活性、减少肿瘤细胞耐药性并促进癌细胞凋亡的安全、有效的药物具有重要意义。

芍药苷(Paeoniflorin, PF)是从毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora*)中提取的有效单体成分,具有促进肝癌HepG2细胞^[5]、胃癌SGC7901细胞凋亡的作用,其机制为抑制NF-κB活性^[6];同时亦有报道指出PF具有促进肺腺癌A549细胞凋亡的作用^[7]。因此,笔者研究了PF是否可以通过激活NF-κB信号通路来促进A549细胞凋亡及其具体作用机制,报道如下。

1 材料

1.1 仪器

BSA/24S型电子天平、PB-10型pH计(北京赛多利斯科学

* 副主任中药师。研究方向:中药学。E-mail: qiwangzhong 150305@126.com

仪器有限公司);CO₂培养箱(美国Thermo Scientific公司);F200/M200型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Chemi Doc™ XRS型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

PF(中国食品药品检定研究院,批号:110736-201438,纯度:>98%);二甲基亚砜(DMSO)、MTT均购自上海生工生物工程公司;二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒、彩色预染蛋白质分子质量标准、小鼠p65抗体、β-actin均购自碧云天生物技术研究所;兔Bax抗体、兔Bcl-x1抗体、兔抗pp65抗体均购自美国Epitomics公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)检测盒(南京凯基生物技术有限公司);胎牛血清、DMEM培养基(美国Gibco公司);电化学发光(ECL)法曝光液(杭州联科生物技术有限公司)。

1.3 细胞

A549细胞购自美国标准生物品收藏中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞活力测定

将80%左右融合的A549细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,

细胞密度调整为 $5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔细胞培养板,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。加入含5%胎牛血清的DMEM培养基,以0(阴性对照)、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养48 h;每孔加MTT(5 mg/ml)20 μl ,培养4 h后,弃上清,每孔加入DMSO 150 μl ,待结晶充分溶解后,570 nm波长处测定光密度(OD),以OD值代表相对细胞活力。

2.2 细胞中Caspase-3活性测定

将80%左右融合的A549细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,细胞密度调整为 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。加入含5%胎牛血清的DMEM培养基,以0(阴性对照)、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养24 h后,按Caspase-3检测盒说明书方法,用0.25%胰蛋白酶(不含乙二胺四乙酸(EDTA))消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,常规离心,收集细胞。加入预冷的50 μl 裂解液,吹打均匀,置于冰上裂解40 min左右。其间涡旋振荡3~4次,每次10 s,然后于 4°C 下,以离心半径为7.5 cm、10 000 r/min离心1 min,小心吸取上清液,置于冰上待用。取1~2 μl 上清液,检测其中的蛋白浓度。吸取50 μl 含100~200 μg 蛋白的细胞裂解上清液,加入50 μl 反应液与5 μl Caspase-3底物,于 37°C 避光培养4 h,以酶标仪于405 nm波长处测定吸光度,以吸光度代表酶相对活性。

2.3 细胞中凋亡相关蛋白表达测定

Western blot法测定蛋白表达。将80%左右融合的A549细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,细胞密度调整为 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。加入含5%胎牛血清的DMEM培养基,以0(阴性对照)、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养48 h后,刮下细胞,常规离心;加入适量含有终浓度为1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解液,每隔10 min置于涡旋仪中震荡30 s,40 min后,于 4°C 下,以离心半径为7.5 cm、10 000 r/min离心10 min,小心吸取上清液,即可获得总蛋白,用BCA试剂盒对蛋白浓度进行测定。以20~35 ng/孔蛋白上样,十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶电泳,60 V电压下电泳30 min,80 V电压下至溴酚蓝电泳刚至胶底部,后以湿法转膜。将膜浸入一抗溶液孵育,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;漂洗后,浸入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗溶液中室温孵育1~2 h。将膜取出漂洗,在膜上滴加ECL曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用Quantity One软件对各抗体条带灰度值进行统计并计算NF- κB p65、NF- κB pp65蛋白相对含量。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞活力测定结果

与阴性对照比较,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养细胞48 h后细胞活力减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$),并呈浓度依赖性。细胞活力测定结果见图1。

3.2 细胞中Caspase-3活性测定结果

与阴性对照比较,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养细胞24 h后细胞中Caspase-3活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。细胞中Caspase-3活性测定结果见图2。

3.3 细胞中Bcl-x1、Bax蛋白表达测定结果

与阴性对照比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养细胞48 h后细胞中Bcl-x1蛋白表达减弱;5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养细胞48 h后细胞中Bax蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或

$P < 0.05$),并呈浓度依赖性。细胞中Bcl-x1、Bax蛋白表达测定结果见图3。

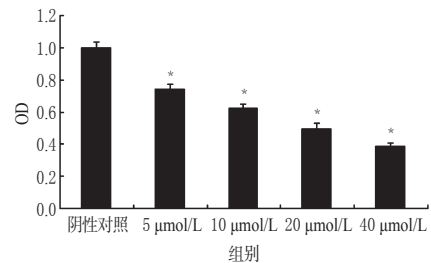


图1 细胞活力测定结果

注:与阴性对照比较,* $P < 0.01$

Fig 1 Determination results of viability of the cells

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$

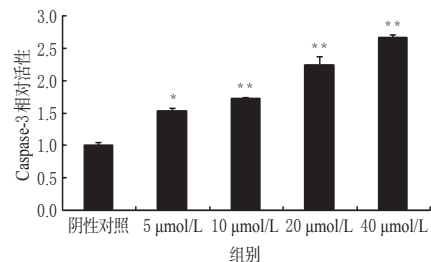


图2 细胞中Caspase-3活性测定结果

注:与阴性对照比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Fig 2 Determination results of the viability of Caspase-3 in the cells

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

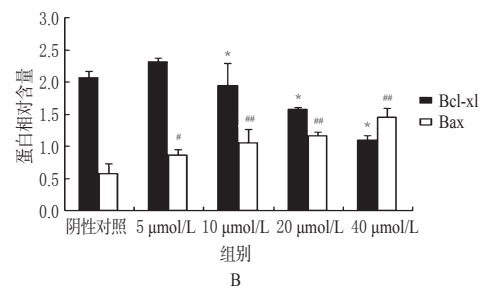
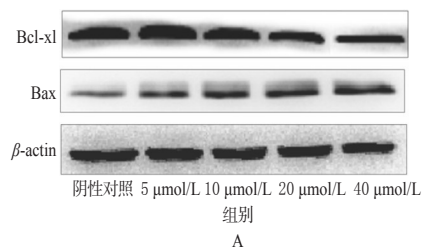


图3 细胞中Bcl-x1、Bax蛋白表达测定结果

A.电泳图;B.柱形图

注:与阴性对照比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Fig 3 Determination results of protein expression of Bcl-x1 and Bax in the cells

A. electrophoretogram; B. histogram

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

3.4 细胞核中NF- κB p65、NF- κB pp65蛋白表达测定结果

与阴性对照比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ PF培养细胞48 h后细胞核中NF- κB pp65蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P <$

0.01 或 $P < 0.05$), 表明 PF 能抑制细胞核 NF- κ B p65 蛋白的磷酸化, 而对细胞核内 p65 表达无任何影响。细胞核 NF- κ B p65、NF- κ B pp65 蛋白表达测定结果见图 4。

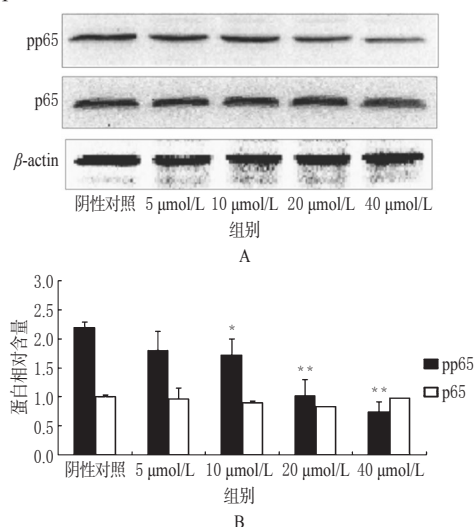


图4 细胞核 NF- κ B p65、NF- κ B pp65 蛋白表达测定结果
A.电泳图;B.柱形图

注:与阴性对照比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Fig 4 Determination results of protein expression of NF- κ B p65 and pp65 in the nucleus

A. electrophoretogram; B. histogram

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

肺癌的化疗易使癌细胞产生耐药性,因此找到一种抑制 NF- κ B 活性、同时减少肿瘤细胞耐药性并能促进肿瘤细胞凋亡的药物,将是肿瘤治疗领域的新突破点。研究表明,PF 具有抗多种肿瘤作用,但其作用机制尚不十分明确。笔者拟通过观察不同浓度(5~40 μ mol/L)PF 对 A549 细胞活力的影响,为 PF 在肺癌治疗方面的应用提供理论依据。本研究结果显示,随着 PF 浓度的增加,A549 细胞活力逐渐降低、凋亡相关蛋白的表达逐渐增强,表明 PF 对肺腺癌的治疗作用可能是通过促进 A549 细胞凋亡实现的。

细胞凋亡的途径主要有两条,一条是通过胞外信号激活细胞内的 Caspase,另一条是通过线粒体释放 Caspase。其中 Caspase-3 被认为是整个凋亡级联反应的一个最关键的执行者,其通常以酶原形式存在,在多种凋亡信号刺激下被激活,从而降解多种蛋白底物。本研究结果表明,随着 PF 给药浓度的增加,Caspase-3 活性逐渐增强,诱导 A549 细胞凋亡,与已有报道^[9]相一致。细胞凋亡又称细胞程序化死亡,是一种在基因调控下的自主性细胞死亡方式。Bax 和 Bcl-x1 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白,是一对正负调节因子,Bcl-x1 的过量表达时,形成 Bcl-x1 同源二聚体,能抑制细胞凋亡,细胞受到保护;而 Bax 的过度表达,不仅可以与 Bcl-x1 形成异源二聚体,拮抗 Bcl-x1 抑制凋亡的作用,还可形成 Bax 同源二聚体,促进细胞色素 C 释放,激活 Caspase 介导的细胞凋亡^[9]。Western blot 法结果显示,PF 能下调 A549 细胞 Bcl-x1 蛋白表达,上调 Bax 蛋白表达,并呈浓度依赖性,从而促进 A549 细胞凋亡。

NF- κ B 是一类能与多种基因启动子或增强子 κ B 位点发生特异性结合并促进其转录的蛋白。在细胞中最常见的作用形式为与 p65 及 p50 组成的二聚体,未受刺激时与核因子抑制蛋

白 I κ B 结合;当受到刺激时,I κ B 被降解、磷酸化,释放 NF- κ B,使之恢复转录活性并从细胞质转移到细胞核内,调节相关基因的表达。已证实 NF- κ B 通过结合 Bax 家族启动子序列,来调节基因的表达^[10]。已有研究发现,在多种恶性肿瘤细胞中,NF- κ B 抑制剂可以下调 Bcl-x1 的表达,上调 Bax 表达,增强 Caspase-3 活性,促进肿瘤细胞凋亡^[11]。本研究结果也表明,PF 能抑制 A549 细胞的细胞核中 NF- κ B p65 蛋白磷酸化,从而上调促凋亡蛋白表达,下调抑凋亡蛋白表达,最终提高 Caspase-3 活性,诱导肿瘤细胞凋亡。

综上所述,PF 可能通过激活 NF- κ B 信号通路、调节相关基因表达而促进 A549 细胞凋亡。

参考文献

- [1] Asai N, Ohkuni Y, Matsuda M, *et al.* Small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation: case report and review of literature[J]. *Indian J Cancer*, 2014, 51(3):384.
- [2] Paesmans M, Grigoriu B, Ocaik S, *et al.* Systematic qualitative review of randomised trials conducted in nonsmall cell lung cancer with a noninferiority or equivalence design[J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(2):511.
- [3] D'Antonio C, Milano A, Righini R, *et al.* Pharmacogenomics in lung cancer chemotherapy: a review of what the oncologist should know[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(10):5241.
- [4] Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(1):33.
- [5] 晏雪生,李瀚旻,彭亚琴,等.芍药苷对人肝癌细胞 HepG2 凋亡及其调控基因的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(7):1346.
- [6] Fang S, Zhu W, Zhang Y, *et al.* Paeoniflorin modulates multidrug resistance of a human gastric cancer cell line via the inhibition of NF-kappaB activation[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(2):351.
- [7] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, *et al.* Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(2):141.
- [8] Kim BG, Kwon HY, Sohn EJ, *et al.* Activation of caspases and inhibition of ribosome biogenesis mediate anti-tumor activity of Chijongdan in A549 non-small lung cancer cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014 (14):420.
- [9] 李凤君,袁进,韩雨萍,等.蛇毒心脏毒素诱导肺癌 A549 细胞的凋亡机制研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(7):583.
- [10] Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of Bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2001, 20(50):7342.
- [11] Loriot Y, Mordant P, Dugue D, *et al.* Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-x1 inhibitor S44563 in small-cell lung cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2014(5):e1423.

(收稿日期:2015-03-07 修回日期:2015-04-20)

(编辑:张静)