

苯甲酰乌头原碱对人肺癌 A549 细胞自噬和凋亡的影响^Δ

邵鑫^{1,2*}, 韩彬², 蒋先虹³, 黎风^{1,2}, 何梅², 刘福^{1#} (1. 川北医学院药学院, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637000; 3. 川北医学院临床医学系, 四川南充 637000)

中图分类号 R734.2; R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2782-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.10

摘要 目的: 研究苯甲酰乌头原碱(BAC)对人肺癌 A549 细胞自噬和凋亡的影响, 探讨其用于非小细胞肺癌治疗的作用机制。方法: 采用不同剂量的 BAC(10、50、100、200、400 μmol/L) 分别对 A549 细胞进行处理后, 观察细胞的形态变化, 并采用 CCK-8 法测定细胞的增殖抑制率。将细胞分为对照组(不加药物)和 BAC 低、高剂量组(200、400 μmol/L), 分别加入相应药物处理后, 采用流式细胞术测定细胞凋亡率, 采用聚合酶链式反应法和 Western blotting 测定细胞中凋亡相关因子 B 淋巴细胞瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 凋亡相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3) 和自噬相关因子 Beclin1、LC3、P62 的基因及蛋白表达水平。结果: 采用不同剂量的 BAC 处理后, 细胞出现皱缩、排列稀疏、溶解等现象, BAC 100、200、400 μmol/L 剂量组细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示, BAC 低、高剂量组细胞凋亡率分别在药物作用 24、48 h 时有不同程度的上升, 且该促凋亡作用具有剂量、时间依赖趋势。与对照组比较, BAC 各剂量组细胞中 Bcl-2、P62 的 mRNA 和蛋白表达水平均有不同程度的降低, Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3 的 mRNA 和 Bax、Active Caspase-3、P62、Beclin1、LC3 II/I 的蛋白表达水平均有不同程度的升高, 其中 BAC 低剂量组 Caspase-3 的 mRNA 和 Bcl-2、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I、P62 蛋白表达水平, 以及 BAC 高剂量组各目标基因的 mRNA 和蛋白的表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且上述影响均呈剂量依赖趋势。结论: BAC 可抑制 A549 细胞的增殖、促进其凋亡, 并且能促进 Beclin1、LC3(LC3 II/I)、Bax、Caspase-3(Active Caspase-3) 表达和抑制 P62、Bcl-2 等自噬/凋亡相关基因及蛋白的表达; 其机制可能与 BAC 通过促进细胞发生过度自噬从而导致细胞凋亡有关。

关键词 苯甲酰乌头原碱; 非小细胞肺癌; A549 细胞; 增殖; 自噬; 凋亡

- 纳米粒的体外释药特性研究[J]. 中国药房, 2013, 24(5): 441-442.
- [11] 杨晨, 覃宗玲, 董晓莹, 等. 基于天然多糖复合凝胶珠的制备及其释药性能[J]. 功能高分子学报, 2015, 28(4): 403-409.
- [12] SILAMBARASAN T, RAJA B. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 679(1/2/3): 81-89.
- [13] JAIN D, BANSAL MK, DALVI R, et al. Protective effect of diosmin against diabetic neuropathy in experimental rats[J]. *J Integr Med*, 2014, 12(1): 35-41.
- [14] DUNG TD, DAY CH, BINH TV, et al. PP2A mediates diosmin p53 activation to block HA22T cell proliferation and tumor growth in xenografted nude mice through PI3K-Akt-MDM2 signaling suppression[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1802-1810.
- [15] QUEENTHY SS, JOHN B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718(1/2/3): 213-218.
- [16] CRESPO ME, GÁLVEZ J, CRUZ T, et al. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS[J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 651-653.
- [17] ATIA NM, HAZZAH HA, GAAGAR PME, et al. Diosmin nanocrystallite-loaded wafers for treatment of diabetic ulcer: in vitro and in vivo evaluation[J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(5): 1857-1871.
- [18] 潘金强, 段永亮, 冯涛. 微化地奥司明片在糖尿病足溃疡愈合中的应用价值[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(2): 197-199.
- [19] 韩海霞, 朱金芳, 王娟, 等. 两色金鸡菊提取物中 3 种黄酮苷在大鼠胃肠道的水解代谢研究[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(5): 626-629.
- [20] 陈泣. 大蓟炭止血药效物质基础及止血增效作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [21] 李海艳, 尚德军, 巩志国, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测葡萄干中 5 种植物生长调节剂的残留[J]. 保鲜与加工, 2014, 14(1): 27-32, 36.
- [22] 李广, 王清刚, 王义明, 等. 黄酮类化合物的定量色谱分析[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 57-61.
- [23] 罗国平, 闫梦茹, 孟会宁, 等. 地肤子总皂苷凝胶剂的制备及体外透皮吸收实验研究[J]. 应用化工, 2017, 46(12): 2420-2423.
- [24] 郑俊民. 药剂学现代药物制剂技术丛书: 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 17.

Δ 基金项目: 四川省科技计划项目(No.2019YJ0386)
* 药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学、循证药学。E-mail: 18284165610@163.com
通信作者: 主任药师, 教授, 硕士生导师。研究方向: 医院药学、临床药学。电话: 0817-2262246。E-mail: nslf91@163.com

(收稿日期: 2019-01-23 修回日期: 2019-07-21)
(编辑: 张元媛)

Effects of Benzoyl Aconitine on Autophagy and Apoptosis of Human Lung Cancer Cell Line A549

SHAO Xin^{1,2}, HAN Bin², JIANG Xianhong³, LI Feng^{1,2}, HE Mei², LIU Fu¹(1. School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 3. Dept. of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of benzoyl aconitine (BAC) on autophagy and apoptosis of human lung cancer A549 cells, and to investigate its mechanism in anti-non-small cell lung cancer. METHODS: A549 cells were treated with different doses of BAC (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$), and then cell morphology was obtained; the proliferation inhibition rate of the cell was determined by CCK-8 assay. The cells were divided into control group (without drug), BAC low-dose and high-dose groups (200, 400 $\mu\text{mol/L}$). After treated with relevant drugs, the apoptosis rate of cells was determined by flow cytometry. The gene and protein expression of apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, Caspase-3 as well as autophagy-related factors Beclin1, LC3, P62 were determined by RT-PCR and Western blotting assay. RESULTS: After treated with different doses of BAC, the cells were shrunken and sparsely arranged; inhibitory rate of cell proliferation was increased significantly in BAC 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Results of flow cytometry showed that the apoptotic rates of cells were increased to different extents in BAC low-dose and high-dose groups after treated for 24 and 48 h, in a concentration and time-dependent manner. Compared with control group, mRNA and protein expression of Bcl-2 and P62 were decreased to different extents in BAC groups; mRNA expression of Bax, Caspase-3, Beclin1 and LC3 as well as protein expression of Bax, Active caspase-3, P62, Beclin1, LC3 II/I were increased to different extent; there was statistical significance in mRNA expression of Caspase-3, and protein expression of Bcl-2, Active Caspase-3, Beclin1, LC3 II/I and P62 in BAC low-dose group as well as all target mRNA and protein expression in BAC high-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), in dose-dependent manner. CONCLUSIONS: BAC can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of A549 cells, promote Beclin1, LC3 (LC3 II/I), Bax and Caspase-3 (Active Caspase-3) gene and their protein expression, but inhibit P62 and Bcl-2 gene and their protein expression. The mechanism may be related to BAC inducing apoptosis by promoting excessive autophagy of cells.

KEYWORDS Benzoyl aconitine; Non-small cell lung cancer; A549 cells; Proliferation; Autophagy; Apoptosis

肺癌是全球发病率和致死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)患者约占肺癌病例总数的80%,且其发病隐匿、预后不良,约75%的NSCLC患者被确诊时已到晚期,总体5年生存率仅为20%^[1-2]。自噬是细胞内蛋白降解的主要途径之一,是一种“自食”过程,其通过自噬-溶酶体途径将细胞质蛋白、复合物或细胞器吞入自噬体,然后使自噬体进入晚期体内中,或者将自噬体转运至溶酶体融合以产生自溶酶体,然后通过酸性水解酶释放使自噬体降解^[3-4]。有研究报道,诱导自噬可抑制人肺癌A549细胞的增殖、促进其凋亡^[5-6]。

近年来的研究显示,从植物药中提取的许多天然单体成分已表现出抗肿瘤活性,而多种中药配方及其提取物更已被证实对NSCLC具有可靠的治疗效果^[7-9]。乌头类中药在临床应用广泛,具有抗炎、降血压和抗肿瘤等活性,临床上常用来治疗风湿性关节炎、高血压、肿瘤等多种疾病^[10]。苯甲酰乌头原碱(Benzoyl aconitine, BAC)是主要存在于制川乌、草乌和附子等中药中的活性单体,其分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$,分子量为603.705(化学结构式见图1)。已有研究证实,BAC能有效抑制人胎盘绒膜癌BeWo细胞生长^[11],但其对NSCLC细胞增殖和凋亡的影响少见报道。因此,本课题组以人肺癌A549细胞为研究对象,考察BAC对该细胞增殖与凋亡的影响,并

根据凋亡相关因子B淋巴细胞瘤因子2(Bcl-2)、Bcl-2凋亡相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)和自噬相关因子Beclin1、LC3、P62的基因及蛋白表达水平的变化,从自噬途径探索BAC可能的抗肿瘤分子机制,为中药活性单体用于NSCLC的治疗提供新思路和新靶点。

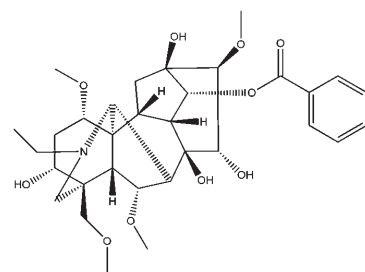


图1 BAC的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of BAC

1 材料

1.1 仪器

Heal Force型超净工作台、HF90型 CO_2 培养箱(上海力新仪器有限公司);MLS-3020型高压蒸汽灭菌器(日本Sanyo公司);DMi8型倒置显微镜(日本Olympus公司);BDFACS Aria III型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);Pultton P200+型微量紫外分光光度计(北京五洲东方科技发展有限公司);BL-150型电子天平(德国Sartorius公司);7900 Real-Time型聚合酶链式反应

(PCR)仪(美国ABI公司)。

1.2 药品与试剂

BAC对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号: MUST-17102610,纯度:98.9%);RPMI-1640培养基、青-链霉素(美国Hyclone公司);胎牛血清、胰酶、二甲基亚砜(DMSO)(美国Gibco公司);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所);Bcl-2、Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3、P62、 β -肌动蛋白(β -actin)引物(生工生物工程上海股份有限公司);Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);Trizol试剂(北京索莱宝科技有限公司);Transcription Kit Quanti Nova 逆转录试剂盒(德国Qiagen公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司);RIPA蛋白裂解液(上海碧云天生物科技有限公司);兔抗人Bcl-2单克隆抗体、兔抗人Active Caspase-3单克隆抗体、兔抗人LC3单克隆抗体(杭州华安生物科技有限公司);兔抗人Bax单克隆抗体、兔抗人Beclin1单克隆抗体、兔抗人P62单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司);鼠抗人 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗、HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(成都ZenBioScience公司);ECL化学发光液(合肥市Biosharp生物公司);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶、电泳液、转膜液、PBST缓冲液、封闭液等试剂均为自行配制;水为超纯水。

1.3 细胞

人肺癌A549细胞由川北医学院附属医院风湿免疫研究所贾艾敏研究员馈赠,购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞培养

将A549细胞接种于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的RPMI-1640培养基(即完全培养基,下同),置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。待细胞长至融合时,以胰酶消化后进行预培养,待细胞生长至对数期时,进行后续试验。

2.2 BAC对A549细胞形态的影响考察

取对数生长期细胞,加入含BAC分别为0(即不加药物,对照组)、10、50、100、200、400 μ mol/L(均以终浓度计,给药剂量按预试验结果制定,下同)的无血清基础培养基100 μ L。各组细胞于37℃、5%CO₂的培养箱中培养24 h后,在显微镜下观察细胞形态是否出现皱缩、变小、排列疏松等情况,以判断BAC是否对细胞产生促凋亡作用。每组设置3个复孔,试验均重复3次。

2.3 BAC对A549细胞增殖的影响考察

采用CCK-8法检测细胞增殖率。取对数生长期细胞,胰酶消化,以800 r/min离心5 min后,用完全培养基调整密度至 5×10^4 个/mL,接种100 μ L于96孔板;另设空白组,加入等体积完全培养基(不加入细胞)。各组细胞

于37℃、5%CO₂的培养箱中培养24 h,待细胞贴壁成形后弃去原培养基,加入含BAC分别为0(对照组)、10、50、100、200、400 μ mol/L(给药剂量按预试验结果制定)的无血清基础培养基100 μ L,继续培养24 h;弃去原培养基,加入含10% CCK-8试剂的无血清培养基100 μ L,继续培养2 h后采用酶标仪于570 nm波长处测定各孔吸光度(OD)。按公式计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%)=(对照组细胞OD值-给药组细胞OD值)/(对照组细胞OD值-空白组OD值) $\times 100\%$ 。同时,按同样的操作方法,设置对照组(不含BAC)和BAC低、高剂量组(200、400 μ mol/L;根据上述不同剂量组的增殖抑制率结果,并考虑药物效果及细胞毒性制定,下同),同法培养24、48、72 h后,分别检测各孔OD值并计算细胞增殖抑制率。每组设置3个复孔,试验均重复3次。

2.4 BAC对A549细胞凋亡的影响考察

采用流式细胞术检测细胞凋亡率。取对数生长期细胞,胰酶消化,以800 r/min离心5 min后,用完全培养基调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,接种2 mL于6孔板,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,待细胞融合率约为60%时弃去原培养液。将细胞分为对照组(不含BAC)和BAC低、高剂量组(200、400 μ mol/L;剂量根据“2.3”项下考察结果制定,下同),加入含相应浓度BAC的无血清基础培养基2 mL,继续分别培养24、48 h后,加入0.25%不含EDTA的胰酶消化。收集各组细胞,4℃下以800 r/min离心5 min;弃去上清,以PBS漂洗2次后,再以PBS 500 μ L重悬细胞并计数。每组取 1×10^6 个细胞,先后加入AnnexinV-FITC、PI染色试剂各5 μ L,混匀,在冰上避光孵育15 min后,在1 h内采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。采用FlowJo V10软件进行数据采集及处理。每组设置3个复孔,试验均重复3次。

2.5 BAC对A549细胞中相关凋亡基因和自噬基因表达的影响考察

采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测各目标基因表达水平。取对数生长期细胞,按“2.4”项下方法分为对照组和BAC低、高剂量组(200、400 μ mol/L),加入含相应浓度BAC的无血清基础培养基2 mL,同法培养48 h。采用Trizol试剂提取各组细胞总RNA,并以紫外分光光度法检测RNA的浓度及纯度。然后以逆转录试剂盒进行逆转录获得cDNA,采用PCR仪检测Bcl-2、Bax、Caspase-3、Beclin1、P62、LC3基因的表达水平。按相应试剂盒说明书操作(反应体系共20 μ L),扩增程序为:95℃预变性2 min;95℃反应5 s,60℃退火及延伸14 s,40个循环。以 β -actin为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法^[12]计算各目标基因mRNA的表达水平。每组设置3个复孔,试验均重复3次。引物序列见表1。

2.6 BAC对A549细胞中相关凋亡蛋白和自噬蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法检测各目标蛋白表达水

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'-3')	引物大小, bp
Bcl-2	正义链 TCCCATCAATCTTCAGCACTCT 反义链 TCGATCTGGAAATCCTCTAAT	105
Bax	正义链 GATGCGTCCACCAAGAAGCT 反义链 CGGCCCCAGTTGAAGTTG	170
Caspase-3	正义链 CTCACAGCACCTGGTTATT 反义链 AAGCTTGTCCGACATACTGTT	100
Beclin1	正义链 CCGCAAGATAGTGGCAGAA 反义链 CGACCCAGCCTGAAGTTAT	264
P62	正义链 GGGGACTTGGTGCCTTTT 反义链 CAGCCATCGCAGATCACATT	139
LC3	正义链 AATCCCGGTGATCATCGAGC 反义链 GCCGGATGATCTTGACCAAC	119
β -actin	正义链 AGCACTGTGTTGGCGTACAG 反义链 TCCTTGGGAAGAGCTACGA	194

平。取对数生长期细胞,按“2.5”项下方法分组和给药,提取总蛋白,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。取适量总蛋白,以PBS稀释至相同浓度后,加入5×Loading buffer上样缓冲液,在90℃金属浴条件下变性10 min,于-20℃保存,待用。分别取上述变性蛋白样品50 μg,以 β -actin为内参,在80 V条件下进行SDS-PAGE凝胶电泳90 min,以200 mA湿法转膜80 min,放入含5%脱脂奶粉的PBST缓冲液中室温封闭1 h;然后分别加入 β -actin、Bcl-2、Bax、Active Caspase-3、Beclin1、P62、LC3的相应一抗(稀释度均为1:1 000),于4℃孵育过夜;次日于常温脱色摇床上继续孵育1 h复温, PBST缓冲液洗膜10 min×3次;然后根据一抗的种属,兔源的Bcl-2、Bax、Active Caspase-3、Beclin1、P62、LC3加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗、鼠源的 β -actin加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(稀释度均为1:10 000),然后于室温下脱色摇床孵育1 h;PBST洗膜10 min×3次,在凝胶成像仪中采用ECL化学发光液显色。采用Image J 1.52a软件对蛋白条带进行图像分析,以 β -actin为内参计算相对灰度值,用来表示蛋白表达水平。每组设置3个复孔,试验均重复3次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件对试验数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BAC对A549细胞形态的影响

镜下可见,对照组细胞呈三角形、梭形或不规则形等,很少见到漂浮的细胞,细胞质较为丰富,细胞核清晰可见;随着BAC浓度增大,BAC各剂量组细胞开始出现皱缩现象,以BAC 200、400 μmol/L组尤为明显,细胞排列稀疏、细胞间连接较松散,并出现漂浮细胞,贴壁细胞基本无完整的细胞核及细胞质,多数细胞已开始溶解,详见图2。

3.2 BAC对A549细胞增殖的影响

与对照组比较,BAC 10、50 μmol/L剂量组细胞增殖

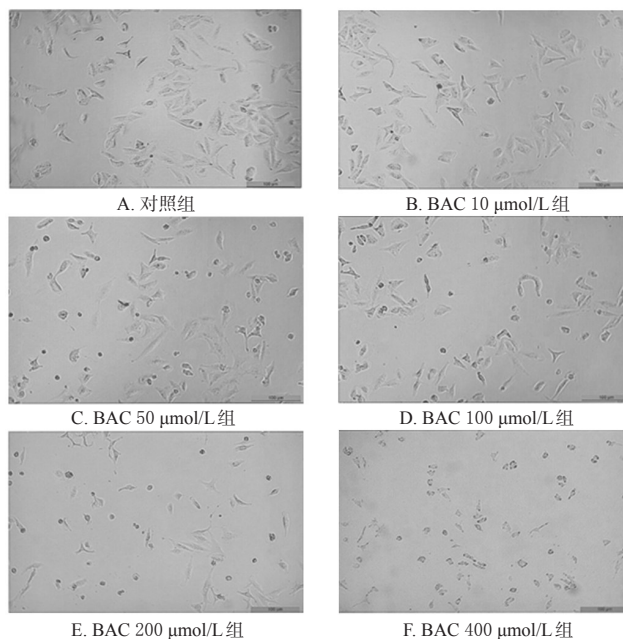


图2 各组细胞形态显微图(×100)

Fig 2 Morphological micrographs of cells in each group (×100)

抑制率差异无统计学意义;BAC 100、200、400 μmol/L剂量组细胞增殖抑制率均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且剂量越高,其对细胞增殖的抑制率越高,结果见表2。这表明BAC对细胞的增殖抑制作用呈剂量依赖趋势。

表2 不同剂量BAC作用下A549细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Proliferation inhibition rate of A549 cells treated with different doses of BAC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量, μmol/L	细胞增殖抑制率, %
对照组	0	0
BAC给药组	10	2.72±2.90
	50	4.88±2.77
	100	9.86±2.13*
	200	21.68±4.49*
	400	43.65±5.30**

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

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

与对照组比较,BAC低、高剂量组细胞增殖抑制率均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用时间越长,其对细胞增殖的抑制率越高,结果见表3。这表明BAC对细胞的增殖抑制作用呈时间依赖趋势。

3.3 BAC对A549细胞凋亡的影响

与对照组比较,BAC低、高剂量组细胞凋亡率均分别在药物作用24、48 h时有不同程度的上升,且随着BAC剂量增加和作用时间的延长,细胞凋亡率呈上升趋势,提示该促凋亡作用具有剂量、时间依赖趋势;其中,BAC低剂量组细胞的早期、晚期凋亡率(作用48 h时)以及BAC高剂量组细胞的早期、晚期凋亡率(作用24、48 h

表3 BAC作用不同时间下A549细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Inhibition rate of A549 cells proliferation after treated with BAC for different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量, $\mu\text{mol/L}$	细胞增殖抑制率, %		
		24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0	0
BAC低剂量组	200	19.40 \pm 5.70*	28.96 \pm 4.90**	29.86 \pm 6.72**
BAC高剂量组	400	42.42 \pm 3.68**	51.69 \pm 5.48**	51.83 \pm 1.73**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

时)差异均有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞图见图3(注:图中Q1象限代表机械性死亡细胞, Q2象限代表晚期凋亡细胞, Q3象限代表早期凋亡细胞, Q4象限代表活细胞), 凋亡率检测结果见表4。

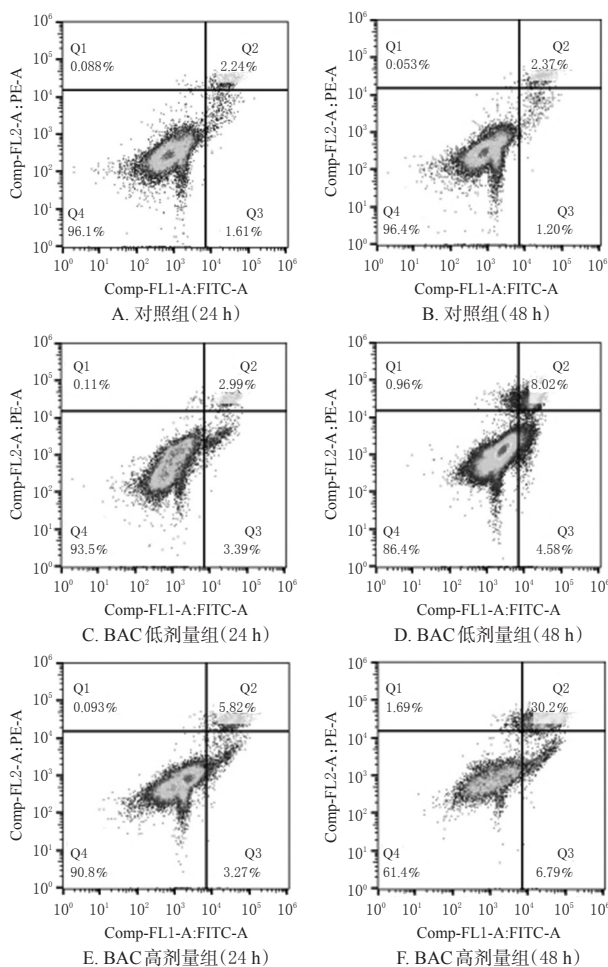


图3 不同剂量BAC作用不同时间后A549细胞的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometry plot of A549 cells after treated with different doses of BAC for different time

3.4 BAC对A549细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3、P62 mRNA表达的影响

与对照组比较, BAC各剂量组细胞中Bcl-2、P62的mRNA表达水平均有不同程度的降低, Bax、Caspase-3、

表4 不同剂量BAC作用不同时间后A549细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Apoptosis rate of A549 cells after treated with different doses of BAC for different time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量, $\mu\text{mol/L}$	凋亡率(24 h), %		凋亡率(48 h), %	
		早期凋亡	晚期凋亡	早期凋亡	晚期凋亡
对照组	0	1.66 \pm 0.42	2.66 \pm 0.74	1.76 \pm 0.55	2.07 \pm 0.26
BAC低剂量组	200	2.76 \pm 0.70	4.15 \pm 1.74	4.18 \pm 1.36*	9.19 \pm 1.04*
BAC高剂量组	400	3.48 \pm 0.73*	6.66 \pm 1.60*	6.38 \pm 0.97**	26.74 \pm 3.21**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

Beclin1、LC3的mRNA表达水平均有不同程度的升高, 且随BAC剂量的增加, 上述基因mRNA表达水平的下降或上升越明显, 提示该影响作用具有剂量依赖趋势; 其中, BAC低剂量组Caspase-3的mRNA表达水平以及BAC高剂量组各目标基因的mRNA表达水平与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各目标基因mRNA表达水平检测结果见表5。

表5 BAC对A549细胞中Bcl-2、Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3、P62 mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Effects of BAC on the mRNA expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Beclin1, LC3 and P62 in A549 cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量, $\mu\text{mol/L}$	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Beclin1	LC3	P62
对照组	0	1.151 \pm 0.198	1.099 \pm 0.146	1.067 \pm 0.112	1.388 \pm 1.404	1.807 \pm 0.867	1.101 \pm 0.453
BAC低剂量组	200	0.813 \pm 0.157	1.308 \pm 0.127	1.560 \pm 0.220*	1.744 \pm 0.903	2.025 \pm 0.984	1.020 \pm 0.671
BAC高剂量组	400	0.537 \pm 0.055**	1.807 \pm 0.209**	1.858 \pm 0.190**	1.908 \pm 1.374*	2.187 \pm 0.966*	0.581 \pm 0.165*

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

3.5 BAC对A549细胞中Bcl-2、Bax、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I、P62蛋白表达的影响

与对照组比较, BAC各剂量组细胞中Bcl-2、P62蛋白表达水平均有不同程度的降低, Bax、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I (LC3 II和LC3 I分别为LC3蛋白的两种表现形式, 此处即两者蛋白表达水平之比, 下同)蛋白表达水平均有不同程度的升高, 且随着BAC剂量的增加, 上述蛋白表达水平的下降或上升越明显, 提示该影响作用具有剂量依赖趋势; 其中, 除BAC低剂量组Bax蛋白外, 其余各组目标蛋白表达水平与对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各目标蛋白表达水平检测结果见图4、表6。

4 讨论

BAC为单酯型生物碱, 主要存在于乌头属植物中^[13], 具有抗肿瘤活性, 可抑制人胎盘绒膜癌细胞和心肌细胞等的生长, 促进细胞凋亡^[11, 14]。本研究结果显示, BAC能显著影响人肺癌A549细胞的正常生长形态, 随着BAC剂量的增加, A549细胞开始出现皱缩、变小、溶解等现象。进一步通过CCK-8试验证实, BAC能明显抑制

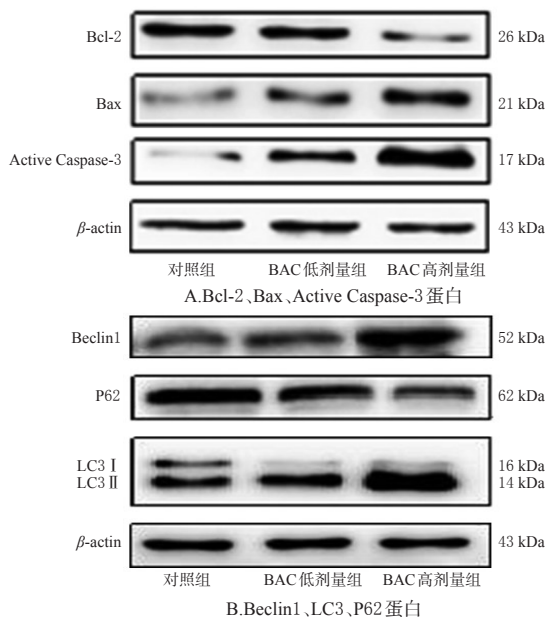


图4 BAC对A549细胞中Bcl-2、Bax、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I、P62蛋白表达影响的电泳图

Fig 4 Electrophoresis of the effects of BAC on protein expression of Bcl-2, Bax, Active Caspase-3, Beclin1, LC3 II/I and P62 in A549 cells

表6 BAC对A549细胞中Bcl-2、Bax、Active Caspase-3、Beclin1、LC3 II/I、P62蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 6 Effects of BAC on the protein expression of Bcl-2, Bax, Active Caspase-3, Beclin1, LC3 II/I and P62 in A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量, $\mu\text{mol/L}$	Bcl-2	Bax	Active Caspase-3	Beclin1	LC3 II/I	P62
对照组	0	1.723 \pm 0.657	1.354 \pm 0.243	0.577 \pm 0.148	0.323 \pm 0.091	0.597 \pm 0.167	1.699 \pm 0.151
BAC低剂量组	200	1.466 \pm 0.400*	1.376 \pm 0.192	1.075 \pm 0.209*	0.707 \pm 0.179*	0.899 \pm 0.102*	0.595 \pm 0.104**
BAC高剂量组	400	0.672 \pm 0.211*	1.889 \pm 0.293*	1.695 \pm 0.255**	1.036 \pm 0.205**	1.339 \pm 0.213**	0.450 \pm 0.187**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

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

A549细胞的增殖,且呈剂量和时间依赖趋势,其中以200、400 $\mu\text{mol/L}$ 剂量作用于细胞48 h后该抑制作用尤为明显,细胞增殖抑制率分别达(28.96 \pm 4.90)%、(51.69 \pm 5.48)%以上。流式细胞术检测结果显示,BAC能引起A549细胞的凋亡,且随着药物剂量的增加,细胞早期和晚期凋亡率均逐渐增加,且呈剂量和时间依赖趋势。

自噬是不同于凋亡和坏死的一种细胞死亡方式,与细胞生长、凋亡、内环境稳态密切相关^[15]。Beclin1为自噬的正调节因子,同时也是自噬起始的重要因子^[16]。LC3是自噬的标志性因子,也为正调节因子,其存在LC3 I、LC3 II两种形式,当自噬被激活时,LC3 I发生脂质化形成LC3 II,因此LC3 II蛋白表达的增加可作为自噬激活的标志^[17]。P62是一种在细胞质中合成的位于细胞核的蛋白,当自噬被激活时,P62首先会与泛素化蛋白磷

脂酰乙醇胺相结合,再与自噬体膜上的LC3 II结合形成复合物,进入到自噬体后最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体从而被清除,是评价自噬体降解的重要指标^[18-19]。当自噬流被活化时,P62水平会下降;自噬流被抑制时,P62水平则会增加^[20]。本研究结果显示,经不同剂量BAC(200、400 $\mu\text{mol/L}$)作用48 h后,A549细胞中Beclin1、LC3(LC3 II/I)的mRNA及蛋白表达水平均有不同程度的升高,P62的mRNA及蛋白表达水平则均有不同程度的降低,且呈剂量依赖趋势。这表明BAC可诱导A549细胞发生自噬,并可能具有剂量相关性。

有研究表明,抑制自噬有利于NSCLC细胞成活、减少其凋亡,从而促进早期肺癌的发展,而诱导自噬则可导致NSCLC细胞凋亡增加^[21-22]。自噬参与肿瘤的发生、发展过程并非是一个独立作用,而需要与各通路相互作用,尤其与凋亡途径的关系最为密切^[23]。凋亡是由基因控制的一种细胞的程序性死亡,其病理生理的主要表现为细胞核皱缩、染色体聚集和凋亡小体的形成^[24]。Bcl-2是与凋亡关系最密切的抗凋亡基因,Bax则是与Bcl-2作用相对抗的促凋亡基因,在细胞凋亡的两种信号传导途径中,Bcl-2/Bax基因的比值是启动凋亡的重要分子开关^[25-26]。Bcl-2/Bax基因能够通过线粒体途径调节Caspase-3基因的活性,继而调节细胞凋亡过程^[27]。Caspase-3是细胞凋亡过程中主要的终末剪切酶和最重要的凋亡执行者,Active Caspase-3蛋白是Caspase-3蛋白的活化形式,当凋亡发生时,Caspase-3蛋白发生活化,增加的Active Caspase-3可特异性地切割DNA,促使染色质凝固和核酸激活,导致细胞凋亡^[28]。因此,Active Caspase-3蛋白表达水平是反映细胞发生凋亡的标志之一。本研究结果显示,不同剂量BAC(200、400 $\mu\text{mol/L}$)作用48 h后,A549细胞中Bax、Caspase-3(Active Caspase-3)的mRNA及其蛋白表达水平均有不同程度的升高,Bcl-2的mRNA及其蛋白表达水平均有不同程度的降低,且呈剂量依赖趋势。这表明BAC可诱导A549细胞发生凋亡,并可能具有剂量相关性。

综上所述,BAC可抑制肺癌A549细胞的增殖、促进其凋亡,并且能促进Beclin1、LC3(LC3 II/I)和抑制P62等自噬相关基因及蛋白的表达,促进Bax、Caspase-3(Active Caspase-3)和抑制Bcl-2等凋亡相关基因及蛋白的表达;其作用机制可能与BAC通过促进A549细胞发生过度自噬从而导致细胞凋亡有关。本研究可为肺癌尤其是NSCLC的临床治疗提供新的靶点和思路。后续本课题组将联合应用自噬促进剂或抑制剂从细胞和动物两方面进行体内外研究,进一步深入研究BAC对自噬和凋亡的调控机制。

参考文献

- [1] DESANTIS CE, MA J, GODING SA, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J].

CA Cancer J Clin, 2017, 67(6): 439-448.

- [2] HU W, JIN P, LIU W. Periostin contributes to cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer A549 cells via activation of Stat3 and Akt and upregulation of survivin[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(3): 1199-1208.
- [3] GALLUZZI L, PIETROCOLA F, BRAVO-SAN PJ, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression[J]. *Embo J*, 2015, 34(7): 856-880.
- [4] KAEWPIBOON C, SURAPINIT S, MALILAS W, et al. Feroniellin A-induced autophagy causes apoptosis in multidrug-resistant human A549 lung cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(4): 1233-1242.
- [5] DUFFY A, LE J, SAUSVILLE E, et al. Autophagy modulation; a target for cancer treatment development[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(3): 439-447.
- [6] WANG F, MAO Y, YOU Q, et al. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2015, 28(3): 362-373.
- [7] ABDELMOHSEN UR, BALASUBRAMANIAN S, OELSCHLAEGER TA, et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(2): e30-e41.
- [8] LU X, ZHOU D, HOU B, et al. Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 16(10): 1231-1241.
- [9] XU L, MENG X, XU N, et al. Gambogic acid inhibits fibroblast growth factor receptor signaling pathway in erlotinib-resistant non-small-cell lung cancer and suppresses patient-derived xenograft growth[J]. *Cell Death Dis*, 2018. DOI: 10.1038/S41419-018-0314.6.
- [10] 顾平. 苯甲酰乌头原碱配伍芍药苷治疗类风湿关节炎的药效学及作用机制研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.
- [11] 谢辉辉, 谢彤, 徐建亚, 等. 基于代谢组学方法研究乌头碱和苯甲酰乌头原碱对 BeWo 细胞的毒性机制[J]. *分析化学*, 2015, 43(12): 1808-1813.
- [12] SUN J, LIU C, ZHANG S, et al. Vitamin D receptor expression in peripheral blood mononuclear cells is inversely associated with disease activity and inflammation in lupus patients[J]. *Clin Rheumatol*, 2019. DOI: 10.1007/s10067-019-04594-2.
- [13] 黄勤安, 张聿梅, 何轶, 等. 乌头碱水解转化规律的研究[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(20): 2143-2145.
- [14] 杨晓辉. 附子单酯碱及玉竹总黄酮对心肌细胞凋亡的影响[D]. 上海: 上海中医药大学, 2015.
- [15] MAIURI MC, ZALCKVAR E, KIMCHI A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-752.
- [16] QIAN X, LI X, CAI Q, et al. Phosphoglycerate kinase 1 phosphorylates Beclin1 to induce autophagy[J]. *Mol Cell*, 2017, 65(5): 917-931.
- [17] RUNWAL G, STAMATAKOU E, SIDDIQI FH, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells[J]. *Sci Rep*, 2019. DOI: 10.1038/S41598-019-46657-Z.
- [18] SCHLÄFLI AM, ADAMS O, GALVÁN JA, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 39544-39555.
- [19] SCHLÄFLI AM, BEREZOWSKA S, ADAMS O, et al. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry[J]. *Eur J Histochem*, 2015. DOI: 10.4081/ejh.2015.2481.
- [20] BOYLE KB, RANDOW F. The role of “eat-me” signals and autophagy cargo receptors in innate immunity[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(3): 339-348.
- [21] YOKOYAMA T, TAM J, KURODA S, et al. EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025507.
- [22] QU X, YU J, BHAGAT G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [23] MAHESWARI U, GHOSH K, SADRAS SR. Licarin A induces cell death by activation of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(3/4): 210-225.
- [24] YOULE RJ, STRASSER A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 47-59.
- [25] KORSMEYER SJ, SHUTTER JR, VEIS DJ, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death[J]. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6): 327-332.
- [26] CORY S, ADAMS JM. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 5-6.
- [27] YAIDIKAR L, THAKUR S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 402(1/2): 141-148.
- [28] KÜPER C, BARTELS H, BECK FX, et al. Cyclooxygenase-2-dependent phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bad inhibits tonicity-induced apoptosis in renal medullary cells[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(9): 938-945.

(收稿日期: 2019-04-14 修回日期: 2019-08-03)

(编辑: 段思怡)