扶正消积胶囊对人肺癌细胞株 A549 增殖抑制及凋亡的影响

杨 骏 薛 刚 刘 杰 石 建
(南京中医药大学附属如皋市中医院,江苏如皋 226500)

摘 要 目的:研究扶正消积胶囊在体外对人肺癌细胞 A549 增殖抑制及凋亡的影响。方法:应用 MTT 法检测扶正消积胶囊对 A549 细胞增殖的影响,应用流式细胞仪检测扶正消积胶囊对 A549 细胞凋亡的影响,应用 Western bolt 检测扶正消积胶囊对 A549 细胞凋亡相关基因表达的影响。结果:与空白组比较,扶正消积胶囊作用 A549 细胞 24h 后,能显著抑制 A549 细胞的增殖,且这种抑制成浓度依赖关系。Annexin-V/PI 双染法结果显示扶正消积胶囊能诱导 A549 细胞的凋亡,且呈现浓度依赖关系。Western bolt 结果显示,扶正消积胶囊能上调 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,激活 caspase-3、caspase-9、PARP 的活性。结论:扶正消积胶囊能有效抑制人胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡,其机制可能是通过激活 caspase 家族蛋白酶活性以及上调 Bax、下调 Bcl-2 表达而实现的。

关键词 扶正消积胶囊 A549 细胞 细胞增殖 细胞凋亡 肺癌细胞株 实验研究
中图分类号 R734.2 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)01-0073-03

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,有统计表明其发病率居各类肿瘤之首[1-2]。目前治疗肺癌的主要手段是手术、化疗、放疗、分子靶向治疗等。近年来,中医药治疗肺癌已被证实在提高生活质量和改善临床症状等方面有肯定的疗效[3]。扶正消积胶囊为我院院内制剂,具有益气健脾、解毒消积、活血通络、抗癌止痛之效,临床治疗肺癌、肝癌、食管癌、胃癌等肿瘤取得了较好的疗效[4]。本研究以体外实验的方法,探讨扶正消积胶囊治疗肺癌的相关分子机制,以期为临床治疗提供实验依据。

1 实验材料

1.1 药物制备 扶正消积胶囊(药物组成:黄芪,蛇舌草,水红花子,党参,生大黄,三棱,炒薏苡仁,莪术,蜈蚣,炙鳖甲,西洋参,参三七,全蝎)为本院自主研发的院内制剂,规格:0.5g/粒,苏药制字:Z04001609,批号:100614。临用前用完全培养基稀释成所需浓度。

1.2 细胞株 人肺癌细胞株 A549 细胞购自中研所,培养材料:含 10%小牛血清以及 1%双抗的 1640 培养液,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 材料及试剂 1640 培养液、小牛血清、双抗,美国 Gibco 公司;0.25%胰酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT),Biosharp 公司;β-actin 一抗,美国 Sigma 公司;半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)、caspase-9、poly ADP-ribose polymerase(PARP)、Bax 一抗,美国 Cell Signaling 公司;Bcl-2 一抗,美国 santa cruz 公司;山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗,北京中杉生物技术公司。其余试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 MTT 法检测扶正消积胶囊对人肺癌细胞 A549 增殖的影响 将对数期生长的 A549 细胞接种于 96 孔板,每孔 8×10^3 个细胞,待其贴壁后,实验组加入不同浓度的扶正消积胶囊(浓度依次为 5、2.5、1.25、0.625mg/mL)以及浓度为 1‰二甲基亚砜(DMSO),对照组加入不含任何药物的 1640 完全培养液,继续培养 24h 后,每孔再加入 120μL 含 MTT 的细胞培养液,于酶标仪上检测 490nm 波长吸光值。设 1‰ DMSO 为阴性对照组,不加任何药物的培养液组为空白对照组。计算扶正消积胶囊对人肺癌细胞 A549 增殖的抑制率,实验重复 3 次。

2.2 Annexin-V/PI 双染法联合流式细胞仪检测人肺癌细胞 A549 的凋亡比率 将细胞个数为 3×10^5 个 A549 细胞接种于直径为 6cm 的培养皿,待细胞贴壁后,设 2 个给药组(扶正消积胶囊 5mg/mL、

基金项目:如皋市科技计划项目[SRG(15)3018]

2.5mg/mL)以及1个5-FU阳性对照组(50μg/mL),1个空白对照组,继续培养24h后,离心收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每个皿中加入Binding Buffer(10mmol/L Hepes/NaOH,pH7.4,140mmol/L NaCl,2.5mmol/L $CaCl_2$)500μL重悬细胞,再加入5μL Annexin-V以及5μL PI,避光振荡10min,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.3 Western Bolt实验 提取各组浓度相关蛋白(浓度分别为5mg/mL,2.5mg/mL),随后用Bradford法测取每组蛋白浓度,各组取20μg上样量经SDS PAGE电泳,分离后转到PVDF膜上,将PVDF膜用5%脱脂奶粉溶液覆盖封闭1h,上一抗封闭过夜,次日二抗室温孵育,使用ECL液进行发光,Western Bolt成像仪成像,进行Western Bolt条带分析。

2.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,各组之间比较采用t检验,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 扶正消积胶囊对人肺癌细胞A549的增殖抑制作用 见表1。浓度为1.25、2.5、5mg/mL的扶正消积胶囊作用于A549细胞24h后,其对A549细胞的抑制率明显高于阴性对照组($P<0.05$),且随着浓度的增加,其对A549细胞的增殖抑制率亦增加,而当浓度达到5mg/mL时,其对A549细胞增殖的抑制率达到一个峰值。

表1 扶正消积胶囊对A549细胞增殖的影响

组别	浓度(mg/mL)	24h抑制率(%)
实验组	5	89.74±4.3*
	2.5	68.74±9.3*
	1.25	46.25±3.9*
	0.625	21.36±2.7
阴性对照组	–	1.18±0.15
空白对照组	–	0

注:*与阴性对照组比较,$P<0.05$。

3.2 扶正消积胶囊对人肺癌细胞A549凋亡的影响 在检测出不同浓度扶正消积胶囊作用肺癌细胞A549 24h的抑制率后,我们探讨其是否能诱导肺癌细胞凋亡,为此我们选用一个高剂量浓度5mg/mL,以及一个中剂量浓度2.5mg/mL,此外还选用常见的化疗药物5-FU作为阳性对照组。结果显示,扶正消积胶囊在作用于人肺癌细胞A549 24h后,随着给药浓度的增加,A549细胞早期凋亡率从5.62%增加到17.60%、39.60%,5-FU阳性对照组早期凋亡率为14.68%,与阳性对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$),且随着给药浓度的增加早期凋亡率呈上升趋势,呈浓度依赖关系。见图1。

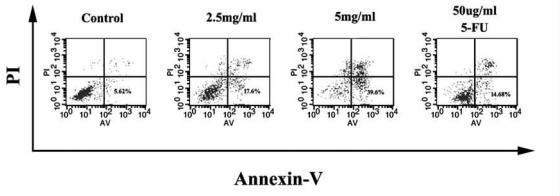

图1 Annexin-V/PI双染法联合流式细胞仪检测扶正消积胶囊对人肺癌细胞A549的凋亡比率

3.3 扶正消积胶囊对A549细胞凋亡相关基因表达的影响 Annexin-V/PI双染法显示扶正消积胶囊能诱导人肺癌细胞凋亡,因此,我们运用Western Blot实验进一步探讨其诱导A549细胞凋亡的分子机制。结果显示,扶正消积胶囊作用于A549细胞24h后,与空白对照组比较,5mg/mL、2.5mg/mL扶正消积胶囊组Bax蛋白条带显示随着给药浓度的上升其表达量明显增高,Bcl-2蛋白条带显示随着给药浓度的增加表达量减小,procaspase-3、9蛋白酶表达随着给药浓度的增加而明显减小,PARP蛋白酶表达量随着给药浓度的增加而明显减小,见图2。由此我们可得出结论,扶正消积胶囊能上调人肺癌细胞A549 Bax蛋白表达,下调Bcl-2蛋白表达,激活caspase-9、caspase-3、PARP活性,引起细胞凋亡。

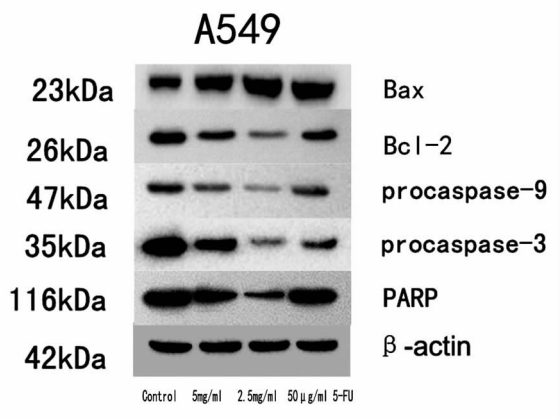

图2 Western Blot检测扶正消积胶囊对A549细胞凋亡相关因子表达的影响

4 讨论

肿瘤细胞的失控性生长是恶性肿瘤的特征之一,这可能与细胞周期紊乱、增殖过快及凋亡减少有关[5-6]。在肿瘤的发病机制中细胞凋亡有着极其重要的作用,目前已经在很多生物学领域展开对细胞凋亡的研究[7-8]。研究表明,细胞凋亡与细胞坏死以及死亡不同,前者不是一个被动的过程,而是一个主动过程,涉及一系列的基因激活、表达以及调控

等。在此过程中,半胱氨酸蛋白酶家族(caspase)引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,激活途径主要包括线粒体依赖途径和死亡受体介导的信号转导途径,而激活后的下游 caspase 通过切割特异性底物,导致细胞凋亡[9-11]。Bcl-2 家族蛋白是重要的细胞凋亡调节因子,其成员间的相互作用对线粒体介导的细胞凋亡起调控作用[12-14]。Bcl-2 家族同源蛋白有 15 种以上,按照促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白分类,分别为促凋亡蛋白:Bax、Bak、Bad、Bim、Bik、Bok 和 Hrk 等,抗凋亡蛋白:Bcl-2、Bel-xL、Mel-l 和 Bcl-W。因此,研究 caspase 凋亡信号通路及其与 Bcl-2 家族的影响对于探索药物的肿瘤治疗机理具有重要价值。

本研究通过 MTT 实验检测到扶正消积胶囊对肺癌细胞 A549 增殖具有抑制作用,为此,我们进一步探讨其抑制肿瘤细胞的增殖是否通过凋亡途径来实现。Annexin-V/PI 双染法联合流式细胞仪检测扶正消积胶囊对肺癌细胞的凋亡率显示:在给药 24h 后,随着给药浓度的增加,A549 细胞早期凋亡率从 5.99%增加到 17.60%、39.60%,且与化疗药物 5-FU 相比,在扶正消积胶囊浓度为 5mg/mL 时引起 A549 细胞的凋亡率明显高于 50μg/mL 的氟尿嘧啶,表明扶正消积胶囊能诱导肺癌细胞的凋亡。我们进一步探讨其诱导细胞凋亡的相关机制,Western Blot 实验结果提示,扶正消积胶囊作用于 A549 细胞后,procaspase-3、9、PARP 蛋白酶表达随着浓度的增加而明显减小,也就是说 procaspase-9、procaspase-3、PARP 活性成分被剪切下来,Bax 蛋白的表达随着给药浓度的上升而上调,而 Bcl-2 蛋白的表达随着给药浓度的上升而下调,且这种表达呈现出浓度依赖关系。我们猜测,扶正消积胶囊诱导细胞凋亡的机制是通过激活 caspase 级联反应而发生的,且与上调 Bax 表达,下调 Bcl-2 蛋白表达有关。关于上述治疗机制是由扶正消积胶囊中何种成分主导的还将做进一步研究。

参考文献

[1] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al.Cancer statistics in China,2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):115.

[2] CHISTI A,SHARARA N,GUPTA M,et al. A Global Cancer Project Map Integrating Global Cancer Statistics to Guide International Efforts[J].Journal of Global Oncology,2016,2(3):9s.

[3] 郑婷婷,焦丽静,阙祖俊,等.中药诱导肿瘤凋亡相关机制研究进展[J].上海中医药杂志,2016,50(10):103.

[4] 刘杰. 扶正消积胶囊对晚期非小细胞肺癌化疗患者近期疗效及生活质量的影响[J].临床医学研究与实践,2016,1(14):105.

[5] MORET I,LORENZO M J,SARRIA B,et al.Increased lung neutrophil apoptosis and inflammation resolution in nonresponding pneumonia[J]. Eur Respir J,2011,38(5):1158.

[6] CROCE C M,REED J C. Finally,An Apoptosis-Targeting Therapeutic for Cancer[J].Cancer Res,2016,76(20):5914.

[7] JORDAN V C.The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer[J]. Endocr Relat Cancer,2015,22(1):R1.

[8] PHAM T T,ANGUS S P,JOHNSON G L. MAP3K1: Genomic Alterations in Cancer and Function in Promoting Cell Survival or Apoptosis [J].Genes Cancer,2013,4(11-12):419.

[9] GHAVAMI S,HASHEMI M,ANDE S R,et al.Apoptosis and cancer:mutations within caspase genes[J].J Med Genet,2009,46(8):497.

[10] TANG H L,TANG H M,FUNG M C,et al.Abstract 3495:Tracking reversal of apoptosis after caspase activation in cancer cells[J].Cancer Research,2016,76(14):3495.

[11] PARK H J,KIM Y J,LEEM K,et al.Coptis japonica root extract induces apoptosis through caspase3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells[J]. Phytother Res,2005,19(3):189.

[12] OKAMOTO K,ZAANAN A,KAWAKAMI H,et al.Reversal of Mutant KRAS-Mediated Apoptosis Resistance by Concurrent Noxa/Bik Induction and Bcl-2/Bcl-xL Antagonism in Colon Cancer Cells[J].Mol Cancer Res,2015,13(4):659.

[13] DE ARAÚJO JÚNIOR RF,LEITÃO OLIVEIRA AL,DE MELO SILVEIRA RF,et al.Telmisartan induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human renal cancer cells[J]. Exp Biol Med(Maywood),2015,240(1):34.

[14] HATA A N,YEO A,FABER A C,et al. Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers[J].Cancer Res,2014,74(11):3146.

第一作者:杨骏(1977—),男,本科学历,副主任药师,从事临床药学研究。

通讯作者:薛刚,硕士,主治中医师。279483074@qq.com

收稿日期:2016-10-14

编辑:吴　宁