

## 基础研究 · Basic Research

## 榄香烯乳逆转肺腺癌A549/DDP细胞耐药性及可能作用机制的研究

姚成才<sup>1,2</sup>, 涂远荣<sup>2</sup>, 杜好信<sup>1</sup>, 姜杰<sup>3</sup>, 叶社房<sup>4</sup>, 张义<sup>1</sup>, 陈隽鹏<sup>1</sup>

1. 福建中医药大学附属厦门中医院胸外科, 福建 厦门 361009; 2. 福建医科大学附属第一医院胸外科, 福建 福州 355000; 3. 厦门大学附属第一医院胸外科, 福建 厦门 361001; 4. 厦门大学分子生物学与材料学院, 福建 厦门 361000

[摘要] 目的:探讨榄香烯乳 (elemene) 逆转人肺腺癌耐顺铂 (cisplatin, DDP) 细胞 A549/DDP 的耐药性及可能的作用机制。方法:采用 MTT 法检测榄香烯乳单药作用时的细胞毒作用及与 DDP 联合作用对 A549/DDP 细胞耐药的逆转作用;Hoechst 33342 法进行细胞核染色, 荧光显微镜下观察细胞形态的改变;FCM 检测细胞凋亡率;蛋白质印迹法检测细胞质中细胞色素 C (cytochrome C, cyt C)、pro-caspase-3、caspase-3 和抗凋亡因子 B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族蛋白表达的情况。结果:不同浓度榄香烯乳对 A549/DDP 细胞均有一定的抑制作用, 呈时间-剂量依赖性效应, 联合 DDP 能提高耐药细胞株 A549/DDP 对 DDP 的敏感性而逆转其耐药性。Hoechst 33342 法和 FCM 法检测结果显示, 榄香烯乳联合 DDP 能更大程度上诱导 A549/DDP 细胞的凋亡, 提高耐药细胞的凋亡率, 同时还上调 A549/DDP 细胞质中 cyt C、caspase-3 和 Bad 蛋白的表达, 而下调 pro-caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达。结论:榄香烯乳能逆转 A549/DDP 细胞耐药性可能与其损伤线粒体膜, 使线粒体释放 cyt C 到细胞质、同时活化 caspase-3、上调促凋亡蛋白 Bad 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达以启动凋亡路径有关。

[关键词] 肺肿瘤;抗药性;肿瘤;细胞凋亡;榄香烯;A549/DDP 细胞

[中图分类号] R734.2, R730.53 [文献标志码] A

[文章编号] 1000-7431 (2013) 12-1061-08

## The effect of elemene reversing the multidrug resistance of A549/DDP lung cancer cells

YAO Cheng-cai<sup>1,2</sup>, TU Yuan-rong<sup>2</sup>, DU Hao-xin<sup>1</sup>, JIANG Jie<sup>3</sup>, YE She-fang<sup>4</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, CHEN Jun-peng<sup>1</sup>

1. Department of Thoracic Surgery, Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361009, Fujian Province, China; 2. Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 355000, Fujian Province, China; 3. Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361001, Fujian Province, China; 4. College of Molecular Biology and Material, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China

[ABSTRACT] Objective: To investigate the effect of elemene on the drug resistance of cisplatin (DDP)-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cells, and its possible mechanism. Methods: The growth inhibition of A549/DDP cells treated with elemene alone or combined with different concentrations of DDP was detected by MTT assay. The morphological changes of apoptosis of A549/DDP cells treated with different concentrations of elemene (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h were observed by Hoechst 33342 staining under fluorescence microscope. The apoptosis rate of A549/DDP cells treated with different concentrations of elemene (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) after 24 h were detected by FCM (flow cytometry). The expressions of cytochrome C, pro-caspase-3, caspase-3 and the Bcl-2 family proteins were measured by Western blotting analysis. Results: MTT result showed that different concentrations elemene could inhibit the proliferation of A549/DDP cells in a time- and dose- dependent manner. Intriguingly, elemene plus DDP enhanced the sensitivity of A549/DDP cells to DDP and reversed the resistance of A549/DDP cells. Elemene was also a strong inducer of apoptosis in this model system, and a synergistic effect on induction of cell death was observed when the tumor cells were treated with both agents. The result showed that elemene could enhance A549/DDP cell apoptosis. Furthermore, the combination of elemene and DDP also enhanced the protein expressions of cytochrome C, caspase-3 and Bad, and reduced the protein levels of Bcl-2 and pro-caspase-3 in the A549/

[基金项目] 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2010D014)

Correspondence to: YAO Cheng-cai (姚成才)

E-mail: yao-130@163.com

Received 2013-08-19 Accepted 2013-09-27

DDP cells. Conclusion: The reversal of the multi-drug resistance of A549/DDP cell line by elemene may result from its effect on induction of apoptosis. Elemene treatment can impair mitochondrial membrane, release cytochrome C into cytoplasm, activate caspase-3, up-regulate pro-apoptotic protein Bad and down-regulate anti-apoptotic protein Bcl-2, and finally caused apoptosis.

[KEY WORDS] Lung neoplasms; Drug resistance, neoplasms; Apoptosis; Elemene; A549/DDP cells

[TUMOR, 2013, 33 (12): 1061-1068]

临床上发现肺癌患者多为晚期, 确诊时约 2/3 患者已失去手术机会, 因而化疗是大多数患者的主要治疗手段之一。肺癌细胞对化疗药物的耐药是导致肺癌化疗失败的重要原因之一。榄香烯乳 (elemene) 是从中药莪术中提取的一种抗癌新药, 主要包括  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ - 和  $\delta$ - 榄香烯等 4 种类型, 其中以  $\beta$ - 榄香烯发挥主要的抗肿瘤作用, 具有最高的抗肿瘤活性, 是榄香烯复合物中的一种单体<sup>[1]</sup>。榄香烯注射液目前已被广泛用于肺癌<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>、消化系统恶性肿瘤<sup>[4]</sup>和膀胱癌<sup>[5]</sup>等恶性肿瘤的治疗, 并取得了较好的治疗效果。近年来的研究发现, 其可逆转肿瘤细胞的耐药性<sup>[6,7]</sup>。因此, 本研究旨在观察榄香烯乳对人肺腺癌耐顺铂 (cisplatin, DDP) 细胞株 A549/DDP 多药耐药的逆转作用, 并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料 人肺腺癌 DDP 耐药细胞株 A549/DDP 购自中国军事医学科学院, 其敏感株 A549 细胞为厦门大学生命科学院张其清教授惠赠。DDP 购自云南个旧生物制药有限公司 (批号: 090202) 榄香烯乳注射液 ( $\beta$ - 榄香烯) 购自大连金港制药有限公司 (批号: 081152); 鼠抗人细胞色素 C (cytochrome C, cyt C)、caspase-3、B 细胞淋巴瘤 -2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bad 和 pro-caspase-3 单克隆抗体及其辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的相应羊抗鼠 IgG 二抗及内参鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品; 锥虫蓝染色液、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒、增强化学发光试剂盒、Hoechst 33342 染色试剂 (浓缩液)、MTT、二甲基亚砜、RPMI 1640 培养液、线粒体膜上的通透性转运孔 (permeability transition pore, PTP) 抑制剂环孢素 A (cyclosporine A) 和 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 均为美国 Sigma 公司产品。电泳仪及转膜设备为美国 Bio-Rad 公司产品,

OLYMPUS IX71 荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品, AE31/CCIS 倒置显微镜为美国 Motic 公司产品、紫外分光光度计和 Eppendorf 5804R 低温高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品, FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549 和 A549/DDP 细胞 (用终质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DDP 维持其耐药性) 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  体积分数为 5% 的培养箱中培养, 2 d 传代 1 次。实验前 1 周将 A549/DDP 细胞换为不含 DDP 的培养液进行培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 A549 及 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性 取对数生长期的 A549 和 A549/DDP 细胞, 每组 3 孔, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成细胞悬液, 以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板内。待细胞贴壁后, 分别加入梯度浓度的 DDP (0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 24 h, 采用锥虫蓝拒染法计数细胞, 实验重复 3 次, 绘制生长曲线。

1.2.3 MTT 法测定榄香烯乳对 A549/DDP 细胞的细胞毒性 取对数生长期的耐药 A549/DDP 细胞, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成细胞悬液, 以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板内。细胞贴壁后, 实验组中分别加入终质量浓度为 10、20、40 和 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的榄香烯乳 (用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释), 对照组中加相同体积和浓度的 RPMI 1640 培养液, 每个浓度设 3 个平行孔。药物处理 12、24、48 和 72 h 后, 每孔分别加入 20  $\mu\text{L}$  MTT (5  $\text{mg}/\text{mL}$ ), 继续培养 4 h, 然后以  $191 \times g$  离心 3 min, 弃上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在全自动酶标仪波长 570 nm 处测定各孔吸光度 ( $D$ ) 值, 参比波长为 630 nm, 实验重复 3 次。取 3 孔的平均值计算细胞生长率: 生长率 = 实验组  $D$  值 / 对照组  $D$  值  $\times 100\%$ 。以生长率  $> 95\%$  的药

物浓度为该药的非细胞毒性剂量, 并作为最佳逆转耐药浓度。

1.2.4 MTT 法检测榄香烯乳对 A549/DDP 细胞的耐药逆转作用 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成细胞悬液, 以  $5 \times 10^3$  个 / 孔的密度接种于 96 孔板内。对照组分别加入终质量浓度分别为 0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DDP, 实验组在对照组基础上分别再加入 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  榄香烯乳; 作用 24 h, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT (5  $\text{mg}/\text{mL}$ ), 继续培养 4 h, 然后以  $191 \times g$  离心 3 min, 弃上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在全自动酶标仪波长 570 nm 处测定各孔的吸光度 ( $D$  值), 参比波长为 630 nm。每个浓度设 3 个平行孔, 实验重复 3 次, 取 3 孔的平均值计算细胞增殖抑制率 =  $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。采用直线回归方程计算出细胞生长抑制率 50% 时的 DDP 浓度, 即为半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 值; 计算耐药细胞的耐药倍数, 耐药倍数 = 耐药细胞的  $\text{IC}_{50}$  值 / 敏感细胞的  $\text{IC}_{50}$  值。逆转倍数 = 耐药细胞逆转前的  $\text{IC}_{50}$  值 / 耐药细胞逆转后的  $\text{IC}_{50}$  值。

1.2.5 榄香烯乳对 A549/DDP 细胞凋亡的影响 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成细胞悬液, 以  $5 \times 10^3$  个 / 孔的密度接种于 96 孔板内。对照组为 A549/DDP 细胞 (以终质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DDP 维持其耐药性), 实验组为在对照组基础上再加入终质量浓度为 20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的榄香烯乳。每个浓度设 3 个平行孔。药物作用 24 h 后, 收集细胞, 用 DNA 荧光染料 Hoechst 33342 进行细胞核染色, 在荧光显微镜下观察细胞核形态。同时采用 FCM 检测细胞的凋亡率, 取药物处理 24 h 后的 A549/DDP 细胞吹打成细胞悬液,  $760 \times g$  离心 5 min, 收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 收集  $2 \times 10^5$  个细胞, 加入 500  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 重悬细胞, 再加入 Annexin V-FITC (5  $\mu\text{L}$ ) 混匀后, 再加入 PI (20  $\mu\text{L}$ ) 混匀, 室温避光反应 5 ~ 15 min, 再加入 Binding Buffer (250  $\mu\text{L}$ ), 混匀后经 300 目尼龙网过滤, 在 1 h 内上流式细胞仪进行检测, 激发波长 (Ex) 为 488 nm, 发射波长 (Em) 为 525 nm。采用未染色细胞进行调零, 以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照, 测定

每个上样管数据, 利用 Cell Quest Pro 软件进行参数获取和资料分析, 实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白质印迹法检测 A549/DDP 细胞中 cyt C 和 caspase-3 的活性及抗凋亡因子 Bcl-2 家族蛋白的表达 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 分为 2 组, 每个浓度设 3 个平行孔, 实验重复 3 次。实验组在对照组 (终质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DDP 维持其耐药性) 基础上再加入终质量浓度为 20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的榄香烯乳。药物作用 24 h 后, 处理 A549/DDP 细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 离心收集细胞, 加入细胞裂解液, 置于冰上 15 min,  $4 \times 10^4 \times g$  离心 10 min, 留取沉淀并进行蛋白定量; 取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品行 12% 的 SDS-PAGE 分离蛋白, 分离后的蛋白转移至聚二氟乙烯膜上; 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 TBST 洗膜后, 分别加入一抗 [鼠抗人 cyt C (1 : 800 稀释) caspase-3 (1 : 1 000 稀释) Bcl-2 (1 : 1 000 稀释) Bad (1 : 1 000 稀释) pro-caspase-3 (1 : 1 000 稀释) 单克隆抗体及内参鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (1 : 2 000 稀释)] 进行孵育, 4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜, TBST 洗膜后加入相应的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (1 : 2 000 稀释), 室温孵育 2 h, 采用增强化学发光试剂盒进行化学发光显影, 以每条蛋白电泳条带的灰度值表示蛋白的相对表达量。

1.2.7 环孢素 A 和 Ac-DEVD-CHO 对榄香烯乳诱导的 A549/DDP 细胞中 caspase-3 表达的影响 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 实验分 4 组: 对照组 A549/DDP 细胞 (以终质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DDP 维持其耐药性) 榄香烯乳组 [在对照组的基础上加入榄香烯乳 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ]、榄香烯乳联合 Ac-DEVD-CHO 组 [在对照组的基础上加入榄香烯乳 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 Ac-DEVD-CHO (50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) ]、榄香烯乳联合环孢素 A 组 [在对照组的基础上加入榄香烯乳 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和环孢素 A (2  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) ]。每个浓度设 3 个平行孔, 实验重复 3 次。药物作用 24 h 后, 处理 A549/DDP 细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 离心收集细胞, 加入细胞裂解液, 置于冰上 15 min,  $32 \times 10^4 \times g$  离心 10 min, 留取沉淀并进行蛋白定量; 取 50  $\mu\text{g}$  蛋白样品经 12% 的 SDS-PAGE 分离, 转膜聚二氟乙烯膜; 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 用 TBST 洗膜, 加入鼠抗人 caspase-3 单克隆抗体 (1 : 1 000 稀释) 及内参鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (1 : 2 000 稀释) 进行孵育, 4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 (1 : 2 000 稀释), 室温孵育 2 h, 采用增强化学发光

试剂盒进行化学发光显影, 以每条蛋白电泳条带的灰度值表示蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计分析软件包对所有数据进行统计学分析, 统计数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用  $t$  检验或  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 锥虫蓝拒染法检测 A549 和 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性 采用不同质量浓度梯度的 DDP (0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549 和 A549/DDP 细胞 24 h 后, 锥虫蓝拒染法检测结果显示, DDP 对 A549 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(5.73 \pm 2.11) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 对 A549/DDP 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(15.34 \pm 1.05) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 说明 A549/DDP 细胞具有 DDP 的耐药性 (图 1)。

2.2 榄香烯乳对 A549/DDP 细胞的细胞毒作用 MTT 法检测结果显示, 不同质量浓度的榄香烯乳对 A549/DDP 细胞均有一定的抑制作用, 并具有剂量依赖性, 即随着榄香烯乳浓度增加, 抑制作用增强。榄香烯乳 (10、20、40 和 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后, 其生长率分别为 96.11%、96.03%、85.72% 和 76.59%, 统计结果显示不同质量浓度榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组间差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 2.625, P < 0.05$ ); 作用于 A549/DDP 细胞 48 h 后, 其生长率分别为 95.02%、93.42%、70.89% 和 61.42%, 不同质量浓度榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组间差异仍有统计学意义 ( $\chi^2 = 2.145, P < 0.05$ ); 但榄香烯乳 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用于 A549/DDP 细胞 24 和 48 h 的差异无统计学意义 (96.11% vs 95.02%,  $\chi^2 = 27.463, P > 0.05$ ), 而榄香烯乳 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组 24 和 48 h 间的差异有统计学意义 (85.72% vs 70.89%,  $\chi^2 = 2.414, P < 0.05$ ), 见图 2。根据以上结果, 本研究中选择质量浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的榄香烯乳作用 A549/DDP 细胞 24 h 作为研究榄香烯乳逆转 A549/DDP 细胞耐药性的最适浓度和时间。

2.3 榄香烯乳逆转 A549/DDP 细胞的耐药性 MTT 法检测结果显示, 不同浓度的 DDP (0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 联合榄香烯乳 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 24 h 后, 随着 DDP 浓度的增加, A549/DDP 细胞增殖抑制率也不断增加 ( $P$  均  $< 0.05$ )。实验组中 A549/DDP 细胞对 DDP

的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(4.15 \pm 0.89) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 而对照组中则为  $(15.46 \pm 1.23) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 差异有统计学意义 ( $t = 1.432, P < 0.01$ ), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  榄香烯乳的逆转耐药倍数为  $(3.73 \pm 0.38)$  倍 (表 1)。

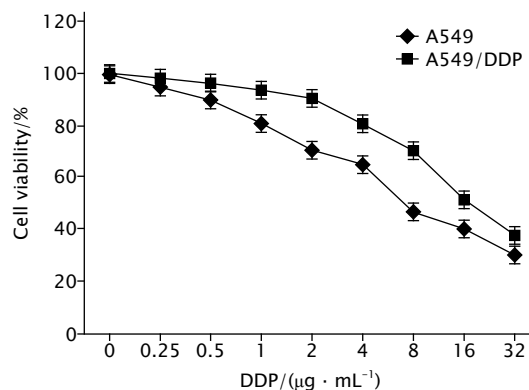


Fig. 1 The growth inhibitory effects of different concentrations of DDP on A549 and A549/DDP cells.

图 1 不同质量浓度 DDP 对 A549 和 A549/DDP 细胞的生长抑制作用

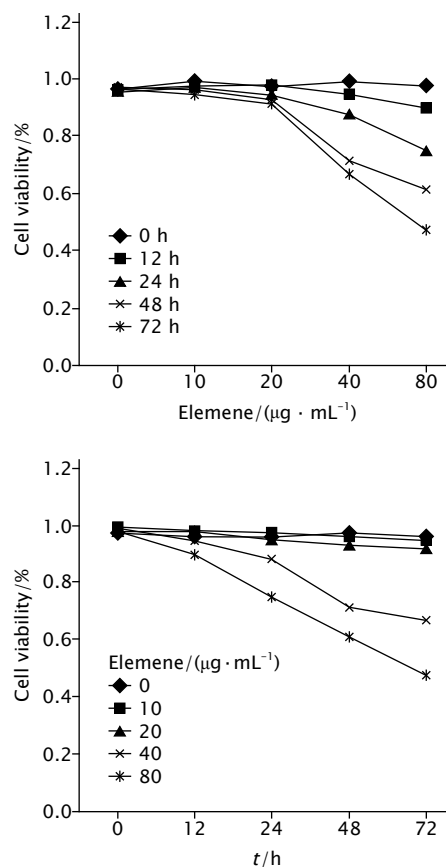


Fig. 2 The growth inhibitory effects of different concentrations of elemene on A549/DDP cells for 12, 24, 48 and 72 h.

图 2 不同质量浓度榄香烯乳作用 A549/DDP 细胞 12、24、48 和 72 h 后对细胞存活率的影响

表 1 榄香烯乳 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 A549/DDP 细胞多药耐药的逆转作用

Table 1 The effect of elemene on reversal multidrug resistance of A549/DDP cells

DDP/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Cell proliferation inhibition rate /%	
	Control group	Experimental group
0.25	6.35 $\pm$ 1.03	16.79 $\pm$ 1.85 <sup>*</sup>
0.5	9.88 $\pm$ 0.99	24.20 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>
1	15.89 $\pm$ 0.46	30.14 $\pm$ 0.47 <sup>*</sup>
2	17.55 $\pm$ 1.35	39.64 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>
4	28.11 $\pm$ 0.65	49.34 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>
8	37.21 $\pm$ 1.45	65.37 $\pm$ 1.05 <sup>*</sup>
16	55.96 $\pm$ 2.03	78.21 $\pm$ 0.79 <sup>*</sup>
32	80.44 $\pm$ 0.77	94.85 $\pm$ 0.91 <sup>*</sup>

\* $P < 0.05$ , vs control group (A549/DDP cells treated with different concentrations of DDP); Experimental group: Elemene (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combined with different concentrations of DDP.

## 2.4 榄香烯乳对 A549/DDP 细胞凋亡的影响

Hoechst 33342 荧光染色结果显示, 与对照组细胞呈弥散均匀蓝色荧光相比, 采用榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 24 h 后的实验组 A549/DDP 细胞的细胞核变圆、体积缩小、核染色质致密深染, 形成颗粒状蓝色荧光, 呈典型的凋亡形态学改变, 且呈剂量依赖性 (图 3)。

AnnexinV-FITC/PI 双染法 FCM 检测结果显示, 对照组 A549/DDP 细胞的早期凋亡率为 (5.73  $\pm$  0.09)%, 中晚期凋亡率为 (17.3  $\pm$  0.11)%; 而实验组中不同质量浓度的榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549/DDP 细胞 24 h 后, 细胞的早期凋亡率分别为 (17.61  $\pm$  0.10)% 和 (37.80  $\pm$  0.12)%, 中晚期凋亡率分别为 (18.9  $\pm$  0.11)% 和 (32.4  $\pm$  0.13)%, 早期凋亡率和中晚期凋亡率较对照组均有提高 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

## 2.5 蛋白质印迹法检测 A549/DDP 细胞中 cyt C、caspase-3 活性和 Bcl-2 家族蛋白的表达 蛋白质

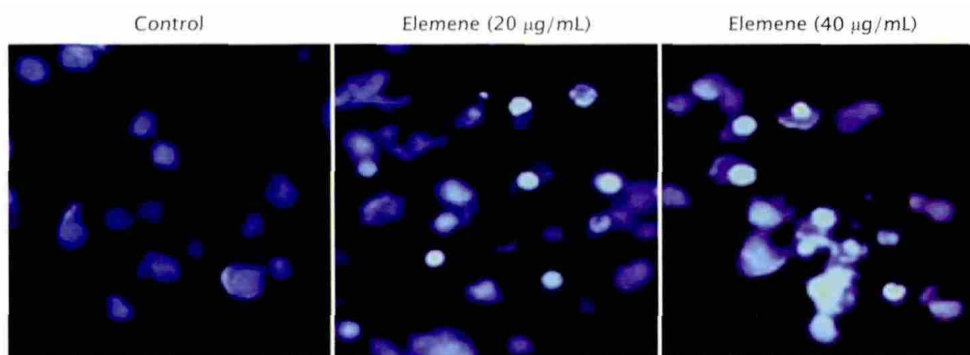


Fig. 3 The morphological changes of apoptosis of A549/DDP cells treated with different concentrations of elemene (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h were observed under a fluorescence microscope (staining by Hoechst 33342,  $\times 400$ ). Control: A549/DDP cells treated without elemene.

图 3 不同质量浓度榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549/DDP 细胞 24 h 后对细胞凋亡形态学的影响 (Hoechst 33342 染色,  $\times 400$ )

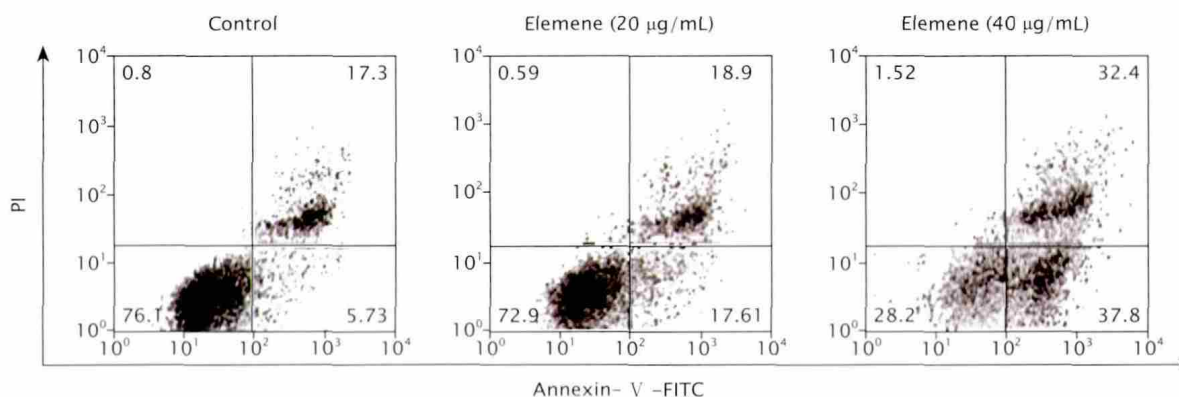


Fig. 4 The apoptosis rates of A549/DDP cells treated with different concentrations of elemene (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h were detected by FCM (flow cytometry). Control: A549/DDP cells treated without elemene.

图 4 不同质量浓度榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549/DDP 细胞 24 h 后对细胞凋亡率的影响



印迹法检测结果显示,不同质量浓度的榄香烯乳(20和40 μg/mL)作用于A549/DDP细胞24 h后,与对照组比较,cyt C、caspase-3及Bad的表达量被上调,而pro-caspase-3和Bcl-2的表达量被下调,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(图5)。以上结果提示,不同质量浓度的榄香烯乳通过损伤线粒体膜,使线粒体释放cyt C到细胞质中,同时活化pro-caspase-3激活caspase-3,上调促凋亡蛋白Bcl-2的表达和下调抗凋亡蛋白Bad的表达而启动凋亡路径来逆转A549/DDP细胞的耐药性的。

2.6 环孢素A和Ac-DEVD-CHO抑制榄香烯乳诱导的A549/DDP细胞中caspase-3的表达 为了进一步了解线粒体膜和凋亡路径在逆

转耐药中的作用,本研究中分别采用线粒体膜PTP抑制剂环孢素A和caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO联合榄香烯乳(40 μg/mL)作用于A549/DDP细胞24 h。蛋白质印迹法检测结果显示,榄香烯乳(40 μg/mL)单药组中caspase-3的表达量较对照组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而榄香烯乳(40 μg/mL)联合环孢素A和榄香烯乳(40 μg/mL)联合Ac-DEVD-CHO组中caspase-3的表达量均较榄香烯乳单药组明显下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图6),表明二者抑制了榄香烯乳诱导的caspase-3的活性,从而阻止细胞的凋亡路径;这也从反面证明,线粒体膜完整和caspase-3活化在榄香烯乳诱导A549/DDP凋亡中起着重要作用。

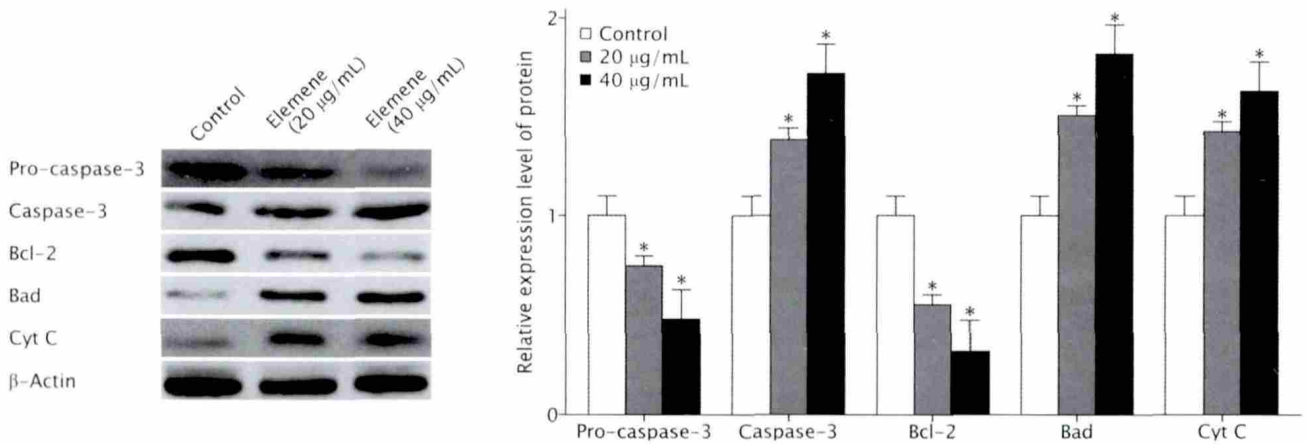


Fig. 5 The expression levels of pro-caspase-3, caspase-3, Bcl-2 (B cell lymphoma-2), Bad and cyt C (cytochrome C) proteins in A549/DDP cells treated with different concentrations of elemene (20 and 40 μg/mL) for 24 h were detected by Western blotting.  $P < 0.05$ , vs control group (A549/DDP cells treated without elemene),  $n = 3$ .

图5 不同浓度榄香烯乳(20和40 μg/mL)作用A549/DDP细胞24 h后对cyto C、pro-caspase-3、caspase-3、Bad和Bcl-2蛋白表达的影响

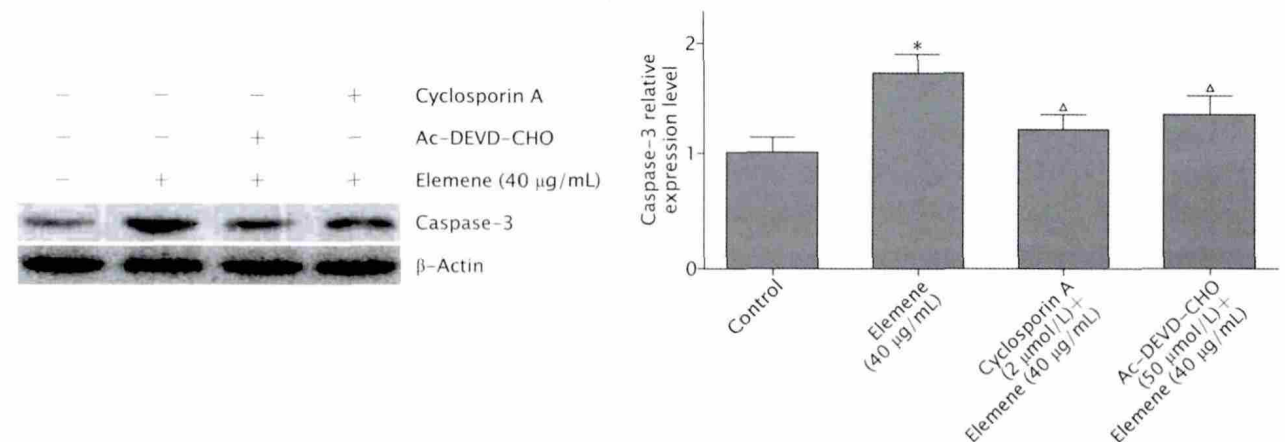


Fig. 6 The expression level of caspase-3 protein was inhibited in A549/DDP cells treated with elemene (40 μg/mL) combined with cyclosporine or Ac-DEVD-CHO for 24 h detected by Western blotting.  $P < 0.05$ , vs control group (A549/DDP cells treated without elemene);  $P < 0.05$ , vs elemene (40 μg/mL) group;  $n = 3$ .

图6 环孢素A和Ac-DEVD-CHO抑制榄香烯乳(40 μg/mL)作用24 h后A549/DDP细胞中caspase-3蛋白的表达

### 3 讨论

近年来研究发现, 榄香烯除具有直接抗肿瘤的作用外, 其还可以逆转肿瘤细胞的耐药性<sup>[6,7]</sup>。张晔等<sup>[8]</sup>研究发现,  $\beta$ -榄香烯能明显抑制白血病 K562 亲本细胞株及其柔红霉素 (daunorubicin, DNR) 耐药株 K562/DNR 的生长, 且呈剂量依赖关系。其作用机制可能是加入低毒剂量  $\beta$ -榄香烯后, K562/DNR 细胞内药物蓄积的浓度明显增加, 使 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 蛋白表达下降且诱导 PARP 裂解, 从而认为  $\beta$ -榄香烯部分逆转 K562/DNR 细胞耐药性。P-gp 是一种依赖于 ATP 的药物外排泵, 它能将细胞内药物泵出细胞外而降低细胞内药物浓度导致耐药<sup>[9]</sup>。目前普遍认为, 化疗耐药性产生与细胞膜上 P-gp 高表达密切相关, 故通过抑制 P-gp 的功能可部分逆转肿瘤细胞耐药<sup>[10,11]</sup>。本课题组前期研究发现, 当榄香烯乳 (20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用于 A549/DDP 细胞 24 h 后, 细胞体内罗丹明-123 (rhodamine-123, Rho-123) 的荧光强度增强, 荧光曲线明显右移, 蛋白质印迹反应进一步显示细胞膜上 P-gp 表达降低。这些结果表明, 当榄香烯乳质量浓度为 20 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时可以增加化疗药物在细胞内的积聚, 下调肿瘤细胞膜上 P-gp 的表达而逆转细胞化疗耐药。本次研究也发现, 榄香烯乳 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549/DDP 细胞 24 h, 实验组的  $\text{IC}_{50}$  值为 (4.15  $\pm$  0.89)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而对照组则为 (15.46  $\pm$  1.23)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 榄香烯乳的逆转耐药倍数为 (3.73  $\pm$  0.38) 倍。可见榄香烯乳 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时即可提高化疗药物 DDP 的细胞毒作用而逆转耐药。

线粒体膜电位下降、通透性增加, 一方面使其膜间隙的 cyt C 释放至细胞质中而触发 caspase 级联反应, 使无活性的 pro-caspase-3 活化, 进一步激活 caspase-3 (caspase-3 活化是细胞凋亡中不可逆转的一步), 从而诱发细胞的凋亡; 另一方面通过其外膜上的 Bcl-2 家族蛋白调控 cyt C 的释放。Bcl-2 蛋白家族包括抗凋亡 (如 Bcl-2 和 Bcl-xL) 和促凋亡 (如 Bax 和 Bad) 蛋白。Bcl-2 家族蛋白调控 cyt C 释放是通过引起线粒体膜上 PTP 的去极化, 造成线粒体膜电位改变而改变其通透性, 因此 cyt C 是细胞凋亡信号转导过程的关键因素之一。cyt C 位于线粒体膜间隙中, 不能通过线粒体外膜, 故不能在细胞质中检测到。当线粒体结构破坏, 尤其是线粒体内外膜间的 PTP 被破坏, 线粒体膜通透性增加, 使原本不能通过线粒体外膜的 cyt C 穿过外膜释放到细胞质中, 使 pro-caspase-3 活化, 进一步激活 caspase-3 而

诱导凋亡途径。同时, Bcl-2 家族蛋白中抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2 和 Bcl-xL) 表达降低, 促凋亡蛋白 (如 Bax 和 Bad) 表达增高, 这又进一步促使 cyt C 释放到细胞质, 触发 caspase 级联放大, 进一步诱导细胞凋亡<sup>[12-19]</sup>。本研究结果显示, 当榄香烯 (20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 A549/DDP 细胞 24 h 后, 细胞质中 cyt C、caspase-3 和 Bad 的表达上调, 而 pro-caspase-3 和 Bcl-2 的表达下调, 说明榄香烯 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 可造成线粒体膜损伤, 使线粒体释放 cyt C 到细胞质中, 活化 pro-caspase-3, 激活 caspase-3 而诱发细胞凋亡。同时, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 低表达、促凋亡蛋白 Bad 高表达又加重线粒体膜损伤, 进一步促使 cyt C 的释放, 进而诱导更多的细胞凋亡, 形成放大效应。进一步研究发现, 在榄香烯乳 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理的细胞中同时加入 PTP 抑制剂环孢素 A 和 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 后, caspase-3 表达较榄香烯乳单药组均下调, 说明环孢素 A 能阻止线粒体膜上 PTP 的通透性, 间接抑制 caspase-3 的激活; 而 Ac-DEVD-CHO 则直接抑制 caspase-3 的激活, 从而抑制 A549/DDP 细胞凋亡。这从反面说明, 榄香烯乳逆转 A549/DDP 细胞耐药与线粒体膜的完整性和 caspase 激活有关。

### [参考文献]

- [1] 鞠建峰, 于维萍, 傅春升, 等.  $\beta$ -榄香烯的现代研究及临床应用概况 [J]. 齐鲁药事, 2008, 27(9):546-548.
- [2] 郝少欢, 张娟, 张涛. 榄香烯乳剂对含铂类化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌增效减毒作用的观察 [J]. 临床荟萃, 2012, 27(17):1529-1531.
- [3] 赵成, 张蕴超, 孙一予, 等. 榄香烯注射液联合介入化疗治疗原发性肝癌的临床研究 [J]. 疑难病杂志, 2012, 11(11):882-883.
- [4] 程怀东, 杨震, 张明军, 等. 榄香烯联合紫杉醇/替加氟治疗晚期食管癌的临床疗效观察 [J]. 安徽医药, 2012, 16(11):1679-1681.
- [5] 任伟, 杜双宽. 榄香烯预防浅表性膀胱癌术后复发 47 例对比研究 [J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(9):1151-1152.
- [6] LI Q Q, LEE R X, LIANG H, *et al.* Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by  $\beta$ -elemene in resistant human ovarian cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):424-444.
- [7] ZHANG Y, MUX D, LI E Z, *et al.* The role of E3 ubiquitin ligase Cbl proteins in  $\beta$ -elemene reversing multi-drug resistance of human gastric adenocarcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5):10075-10089.

- [8] 张 晔, 曲秀娟, 刘云鹏, 等.  $\beta$ -榄香烯增强柔红霉素杀伤人类白血病细胞的作用及机制[J]. 西安交通大学学报医学版, 2011, 32(6):664-667.
- [9] ALLER S G, YU J, WARD A, *et al.* Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding[J]. *Science*, 2009, 323(5922):1718-1722.
- [10] JOVELET C, BÉNARD J, FORESTIER F, *et al.* Inhibition of P-glycoprotein functionality by vandetanib may reverse cancer cell resistance to doxo-rubicin[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46(5):484-491.
- [11] 陈文慧, 徐 萌, 杜超超, 等. 碱性成纤维生长因子单克隆抗体通过 P-糖蛋白逆转乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞多药耐药性的分子机制[J]. 肿瘤, 2013, 33(1):8-14.
- [12] 刘晓婷, 王延让, 张 明. 线粒体介导细胞凋亡研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(2):182-184.
- [13] 赵 丹, 货莉芳, 刘 晖, 等. 线粒体、细胞色素 C、Caspase 与细胞凋亡[J]. 医学动物防制, 2012, 28(8):1337-1340.
- [14] NG K B, BUSTAMAN A, SUKARIM A, *et al.* Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin a isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13:41.
- [15] NING Y, RIGGINS R B, MULLA J E, *et al.* IFN $\gamma$  restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IFN regulatory factor 1, NF- $\kappa$ B, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5):1274-1285.
- [16] LIANG Y, SUNDBERG J P. SHARPIN regulates mitochondria-dependent apoptosis in keratinocytes[J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 63(3):148-153.
- [17] JOSHI S, BRAITHWAITE A W, ROBINSON P J, *et al.* Dynamin inhibitors induce caspase-mediated apoptosis following cytokinesis failure in human cancer cells and this is blocked by Bcl-2 overexpression[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10:78.
- [18] FAVALORO B, ALLOCATI N, GRAZIANO V, *et al.* Role of apoptosis in disease[J]. *Aging (Albany NY)*, 2012, 4(5):330-349.
- [19] MERHI F, TANG R, PIEDFER M, *et al.* Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving Bad and Noxa activation in human myeloid tumor cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25963.

[ 本文编辑 ] 林 琳

读者 · 作者 · 编者

## 欢迎订阅 2014 年《肿瘤》杂志

《肿瘤》杂志(刊号:CN 31-1372/R、ISSN 1000-7431)是由上海市肿瘤研究所和上海交通大学医学院附属仁济医院共同主办的专业学术期刊,于 1981 年 1 月创刊,是国内最早报道肿瘤相关领域成果和进展的专业期刊之一。自 1992 年起,一直被北京大学图书馆出版的《中文核心期刊要目总览》、中国科学院的“中国科学引文数据库(CSCD)”和中国科学技术信息中心的“中国科技论文核心数据库(CSTPCD)”收录,并被 Cambridge Scientific Abstracts(CSA,美国)、Chemical Abstracts(CA,美国)、EMBASE(Elsevier,荷兰)、VINITI Abstracts Journal(俄罗斯)、Index of Copernicus(IC,波兰)和 Japan Science and Technology Agency(JST,日本)等国际数据库收录。本刊是经国家卫生部和食品药品监督管理局共同审核认定的可以发布处方药广告的医学、药学专业期刊。

《肿瘤》杂志设有专家论坛、前沿进展、基础研究、流行病学研究、临床研究、临床经验、技术与方法、综述和短篇报道等栏目,为从事肿瘤基础、临床和防治工作的科研人员、临床医生以及在校师生提供学术交流的平台,旨在推动和促进我国肿瘤事业的发展 and 国内外的学术交流。

《肿瘤》杂志为月刊,大 16 开本;每册定价人民币 15 元,全年 180 元。每月 25 日出版,国内外公开发行。国内邮发代号 4-289,国外发行代号 BM 4731。全国各地邮局均可订阅,亦可与本刊编辑部直接联系订购。

联系方式:上海市斜土路 2200 弄 25 号(邮编:200032);联系电话:021-64032388,021-64436792;传真:021-64032388;E-mail: tumor@tumorsci.org;网址: http://www.tumorsci.org

《肿瘤》编辑部