

榄香烯乳诱导线粒体凋亡途径逆转肺癌 A549/DDP 细胞株耐药

姚成才^{1,2}, 涂远荣², 姜杰³, 康宁⁴, 叶社房⁴, 张义¹, 陈俊鹏¹

Elemene reversed the multidrug resistance of A549/DDP lung cancer cells via mitochondrial apoptosis pathway

Yao Chengcai^{1,2}, Tu Yuanrong², Jiang Jie³, Kang Ning⁴, Ye Shefang⁴, Zhang Yi¹, Chen Junpeng¹

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

【Abstract】 Objective: To explore the mechanism that elemene (ELE) reversed the multidrug resistance (MDR) of A549/DDP lung adenocarcinoma cell. **Methods:** MTT assay was used to determine the growth inhibition of human lung adenocarcinoma A549/DDP cells in vitro. Mitochondrial membrane potential (MMP) was monitored by JC-1 fluorescence probe with laser confocal scanning microscopy, the intercellular reactive oxygen species (ROS) level was measured by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining and flow cytometry and the ratio of GSH/(GSSG + GSH) was calculated according to detection results of GSH kit. The expression of Cytochrome C, Caspase-3 and the Bcl-2 family proteins and in the case of cyclosporine A and DEVD-CHO, the expression of Caspase-3 expression were measured by Western blot. **Results:** MTT results showed that different concentrations ELE could inhibit the proliferation of A549/DDP cells in a time- and dose- dependent manner. Intriguingly, ELE plus cisplatin enhanced the sensitivity of A549/DDP cells to cisplatin and reversed A549/DDP cells drug resistance. Different concentrations ELE decreased mitochondrial membrane potential, increased intracellular ROS concentration and decreased GSH/(GSSG + GSH) ratio of A549/DDP cells in a time- and dose- dependent manner. Furthermore, the combination with both ELE and cisplatin also enhanced the protein expression of Cytoplasmic C, Caspase-3 and Bad, and reduced the protein levels of Bcl-2 and Pro-caspase-3 in the cisplatin-resistant A549/DDP cancer cells. **Conclusion:** ELE reversed the MDR of A549/DDP cell line may damage mitochondrial membrane, active intracellular redox system and induce the mitochondrial apoptosis pathway.

【Key words】 lung cancer; Elemene; mitochondria; apoptosis; A549/DDP cell strains

Modern Oncology 2014, 22(06): 1276-1281

【摘要】 目的: 探讨榄香烯乳 (elemene, ELE) 逆转人肺腺癌耐顺铂 (cisplatin, DDP) 细胞 A549/DDP 的耐药性及作用机制。方法: 采用 MTT 法检测榄香烯乳单用的细胞毒作用及与 DDP 合用时耐药逆转作用。荧光探针 JC-1 结合激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位的变化。DCFH-DA 荧光探针结合流式细胞仪检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平。用谷胱甘肽试剂盒结合分光光度法检测计算 GSH/(GSSG + GSH) 比值。蛋白质印迹法检测胞质中 Cyto C、Pro-caspase-3、Caspase-3 和 Bcl-2 家族蛋白表达情况。结果: 不同浓度榄香烯乳抑制 A549/DDP 细胞株生长, 呈时间-剂量依赖性效应, 联合顺铂能提高 A549/DDP 细胞株对顺铂的敏感性而逆转耐药。不同浓度榄香烯乳联合顺铂使 A549/DDP 细胞株线粒体膜电位下降, ROS 浓度增加, GSH/(GSSG + GSH) 比值降低, 上调胞质中 Cyto C、Caspase-3、Bad 蛋白表达, 下调 Pro-caspase-3、Bcl-2 蛋白表达。结论: 榄香烯乳逆转 A549/DDP 细胞株耐药性可能与其损伤线粒体膜, 活化胞内氧化还

【收稿日期】 2013-12-01

【修回日期】 2013-12-14

【基金项目】 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2010 D 014)

【作者单位】 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

【作者简介】 姚成才 (1973-) , 男, 安徽人, 副主任医师, 肿瘤学硕士, 外科学博士, 主要从事乳腺、胸部肿瘤的早期诊断和微创治疗。E-mail: yao-130@163.com

原体系,诱导线粒体凋亡路径有关。

【关键词】肺癌; 榄香烯; 线粒体; 凋亡; A549/DDP 细胞株

【中图分类号】R734.2

【文献标识码】A

DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2014.06.13

【文章编号】1672-4992-(2014)06-1276-06

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*, ELE)是从中药莪术中提取的抗癌新药,其成分 β -榄香烯发挥主要的抗肿瘤作用,具有最高的抗肿瘤活性^[1]。榄香烯乳注射液目前广泛用于肺癌等多种恶性肿瘤的治疗^[2-5],并取得了较好的治疗效果。近年研究发现它还可抑制肿瘤细胞的耐药^[6-7]。我们观察了榄香烯乳对人肺腺癌耐药细胞株 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

人肺腺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP 及其敏感株 A549 购自中国军事医学科学院。顺铂(云南个旧生物制药有限公司,批号:090202);榄香烯乳注射液(大连金港制药有限公司,批号:081152);鼠抗人 Cyto C、Caspase-3、Bcl-2、Bad、Pro-caspase-3 单克隆抗体及其辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的相应兔抗鼠 IgG 二抗及内参鼠抗人 β -actin 单克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA) 荧光探针购自 Invitrogen 公司;台盼蓝染色液(TrypanBlue)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、四甲基氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、RPMI 1640 培养基、Cyclosporine A、DEVD-CHO 和其他生化试剂均为美国 Sigma 公司产品;线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 购自南京凯基生物发展有限公司;GSH/GSSG 检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。A Coulter EpicsXL 流式细胞仪(Beckman 公司);Tcs SP2 激光共聚焦显微镜(Lecia 公司);分光光度计(Eppendorf)、电泳仪及转膜设备(Bio-rad)、OLMPUS IX71 荧光显微镜(OLMPUS)、AE31/CCIS 倒置显微镜(Motic Co. Ltd)、5804R 低温高速离心机(Eppendorf) 为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549、A549/DDP(用终质量浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 维持其耐药性) 细胞用 10% 胎牛血清培养,在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养,2d 传代 1 次。实验前 1 周将 A549/DDP 细胞换用无 DDP 的培养基培养。以下实验中均取对数生长期细胞,每组 3 孔,胰酶消化后,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配成细胞悬液,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板内,待细胞贴壁后,进行实验,实验重复 3 次。

1.2.2 A549、A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性 A549 和 A549/DDP 细胞贴壁后,分别加入 0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 $32\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度梯度的 DDP(用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释) 作用 24h,台盼蓝拒染法计数细胞。

1.2.3 MTT 法测定 ELE 对 A549/DDP 细胞的毒性 A549/DDP 细胞贴壁后,实验组加入终质量浓度为分别为 10、20、40 和 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ELE(用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释),对照组加相同浓度的药物溶解介质。孵育 12、24、48、72h 后,每孔加入 $20\mu\text{l}$ MTT 液($5\text{mg}/\text{ml}$) 继续培养 4h,然后以 $191 \times \text{g}$ 离心 3min,弃上清,每孔加入 150ml DMSO,置摇床上低速振荡 10min。全自动酶标仪于 570nm

处测定各孔吸光值(A 值),参比波长为 630nm。取平均值计算细胞生长率:生长率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。规定生长率 $>95\%$ 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 法测定 ELE 对 A549/DDP 细胞的耐药逆转 对照组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再加入 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ELE。方法同 1.2.3。取平均值计算细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值}/\text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。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(IC_{50}),计算耐药细胞的耐药倍数。耐药倍数 = 耐药细胞的 IC_{50} /敏感细胞的 IC_{50} 。逆转倍数 = 耐药细胞逆转前的 IC_{50} /耐药细胞逆转后的 IC_{50} 。

1.2.5 激光共聚焦荧光显微镜检测 ELE 对 A549/DDP 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)的影响 对照组为 A549/DDP 细胞(终质量浓度为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 维持其耐药性),实验组在对照组基础上再加入 20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ELE。药物作用 0、6、12、24h 后,各组加入无血清培养基稀释的 JC-1 染料(终浓度为 $10\text{mg}/\text{L}$) 37°C 孵育 15min, $760 \times \text{g}$ 离心 5min,吸弃游离的多余染料,每组制片 3 张,置于激光共聚焦显微镜下进行扫描、拍照。JC-1 单体在激发波长 488nm/发射波长 530nm 被检测(绿色荧光),JC-1 聚合物在激发波长 535nm/发射波长 590nm 被检测(红色荧光)。镜下选取 10 个不重复视野,计算平均荧光密度(Lecia, LCS Universal Imaging 软件),以红色荧光/绿色荧光光密度比值表示线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 的高低,比值下降表示线粒体 $\Delta\Psi\text{m}$ 下降。

1.2.6 检测 ELE 对 A549/DDP 细胞内活性氧(ROS)和还原型谷胱甘肽(GSH)的影响 实验分组同 1.2.5。ELE 作用细胞 24h 后,消化、离心收集细胞加入 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ DCF-DA 探针 37°C 孵育 20min,无血清培养基洗涤三次,用流式细胞仪在激发波长 488nm/发射波长 525nm 处检测各组荧光强度。同时参照 GSH 检测试剂盒说明测定上述各组中 GSH。先测得总谷胱甘肽(GSSG + GSH) 含量,再用适量的 GSH 清除剂清除样品中的 GSH,重复上述操作,即测得 GSSG 的含量,总谷胱甘肽(GSSG + GSH) 减去氧化型 GSSG 含量即为 GSH 含量。取 GSH/(GSSG + GSH) 二者的比值,比值高则反映 GSH 水平高,反之亦然。

1.2.7 Western blot 检测 A549/DDP 细胞中 Cyto C、Caspase-3 活性和 Bcl-2 家族蛋白表达 实验分组同 1.2.5。ELE 作用细胞株 24h, PBS 洗三次,离心收集细胞,加入细胞裂解液,置冰上 15min, 4°C $32116 \times \text{g}$ 离心 10min,留取沉淀并进行蛋白定量;取 $50\mu\text{g}$ 蛋白样品经 12% SDS-PAGE 电泳,转膜采用聚二氟乙烯(PVDF)膜;5% 脱脂牛奶封闭 2h, TBST 洗膜,鼠抗人 Cyto C(1:800 稀释)、Caspase-3(1:1000 稀释)、Bcl-2(1:1000 稀释)、Bad(1:1000 稀释)、Pro-caspase-3(1:1000 稀释) 单克隆抗体及内参鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(1:2000 稀释) 进行孵育, TBST 洗膜后加入相应的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 二抗(1:2000 稀释),室温孵育

2h 采用 ECL 化学发光试剂盒进行化学发光法显影,以每条蛋白电泳带的灰度值表示蛋白的表达量。

1.2.8 Cyclosporine A 和 DEVD - CHO 抑制 ELE 诱导 A549/DDP 细胞凋亡 实验分 4 组(终质量浓度为 2 μg/ml 的 DDP 维持其耐药性):对照组、40 μg/ml ELE 组、40 μg/ml ELE + DEVD - CHO 组、40 μg/ml ELE + Cyclosporine A 组。方法同 1.2.7。

1.3 统计学分析

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 χ^2 检验。规定 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 台盼蓝拒染法测定 A549、A549/DDP 细胞的药物敏感性

0.25、0.5、1、2、4、8、16 和 32 μg/ml 浓度梯度的 DDP 作用细胞 24h 结果显示低浓度 DDP 就能明显抑制 A549 细胞增殖,IC₅₀ 为 (5.73 ± 2.11) μg/ml,而高浓度 DDP 才可抑制

A549/DDP 细胞增殖,IC₅₀ 为 (15.34 ± 1.05) μg/ml,差异有统计学意义($t = 2.3571, P < 0.01$),说明 A549/DDP 细胞具有 DDP 耐药性。

2.2 ELE 对 A549/DDP 细胞的毒性

不同浓度 ELE 对 A549/DDP 细胞均有一定的抑制作用,并具有时间 - 剂量依赖性效应。ELE (10、20、40 和 80 μg/ml) 作用 A549/DDP 细胞 24h,其生长率分别为 96.11%、96.03%、85.72% 和 76.59%,分析发现 20 和 40 μg/ml ELE 组间差异有统计学意义($\chi^2 = 2.6249, P < 0.05$);作用 48h,其生长率分别为 95.02%、93.42%、70.89% 和 61.42%,分析发现 20 和 40 μg/ml ELE 组间差异仍有统计学意义($\chi^2 = 2.1449, P < 0.05$),但 20 μg/ml ELE 作用 A549/DDP 细胞 24h 和 48h 无差异 (96.11% vs. 95.02%; $\chi^2 = 27.4632, P > 0.05$),而 40 μg/ml ELE 作用 A549/DDP 细胞 24h 和 48h 有差异 (85.72% vs. 70.89%; $\chi^2 = 2.4136, P < 0.05$,图 1)。故据上结果,我们选择 20 μg/ml ELE 作用 A549/DDP 细胞 24h 为研究 ELE 逆转 A549/DDP 细胞耐药性的最适浓度和时间。

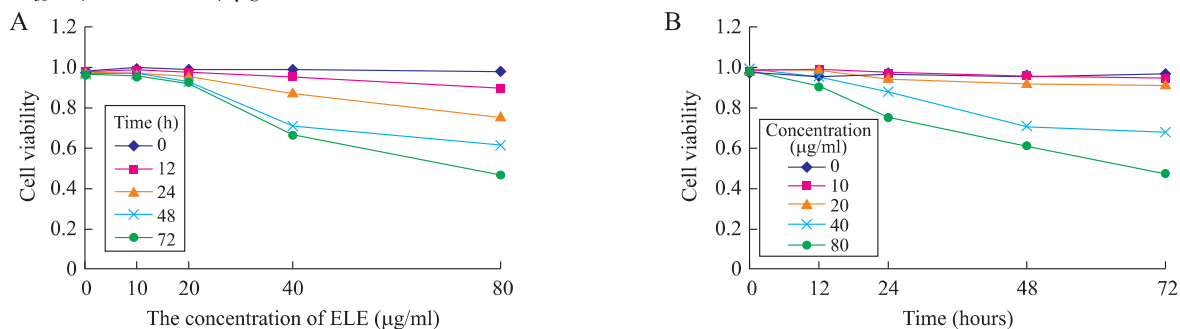


图 1 ELE 对 A549/DDP 细胞成活率的影响

MTT 法检测不同浓度梯度榄香烯(0 - 80 μg/ml) 作用不同时间点(0、12、24、48、72h) A549/DDP 细胞的成活率。最佳逆转浓度为 20 μg/ml (A), 最适时间为 24h (B)。

Fig. 1 The effects of ELE treatment on the proliferation of A549/DDP cells

MTT assays record the cell growth rate of A549/DDP cells treated by ELE with different dosages (0 - 80 μg/ml) and in 0, 12, 24, 48, 72 hours. The optimal dose is 20 μg/ml (A) and best action time is 24 hours (B).

2.3 ELE 对 A549/DDP 细胞耐药的影响

各组随 DDP 浓度增加,20 μg/ml ELE 对孵育 24h 的 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 IC₅₀ 值为 (4.15 ± 0.89) μg/ml,而对照组中则为 (15.46 ± 1.23) μg/ml,差异有统计学意义($t = 1.4321, P < 0.01$),20 μg/ml ELE 逆转耐药倍数为 (3.73 ± 0.38) 倍。见表 1、图 2。

2.4 ELE 对 A549/DDP 细胞线粒体膜电位的影响

结果显示:药物作用 6h,对照组大部分细胞为红色荧光,细胞膜完整,细胞核清晰可见(图 3Aa),提示线粒体 $\Delta\Psi_m$ 无明显变化;相比 20 μg/ml ELE 组部分细胞显示红色荧光,部分显示绿色荧光,部分细胞破裂且细胞内容物外流(图 3Ab),提示线粒体 $\Delta\Psi_m$ 有所下降;40 μg/ml ELE 组可见大量细胞呈绿色荧光,光密度更高,部分细胞呈固缩状,部分细胞破裂且细胞内容物外流(图 3Ac),提示线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降明显。暴露于 20、40 μg/ml ELE 后,A549/DDP 细胞线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降,表现为红色/绿色荧光光密度的比值降低,且具有时间 - 效应关系,20 和 40 μg/ml ELE 作用 A549/DDP 细胞 6h ($\chi^2 = 2.2447, P < 0.05$ 和 $\chi^2 = 2.0256, P < 0.05$),12h ($\chi^2 = 2.0143, P < 0.05$ 和 $\chi^2 = 1.3121, P < 0.01$),24h ($\chi^2 =$

1.3084, $P < 0.01$ 和 $\chi^2 = 1.0034, P < 0.01$) 与对照组比,差异有统计学意义(图 3B)。

2.5 ELE 对 A549/DDP 细胞内 ROS 和 GSH 的影响

用荧光探针 DCFH - DA 测定细胞内 ROS 水平。DCFH - DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜。进入细胞后,经酯酶作用脱去二酯生成 2',7'-二氯荧光素 (DCFH),DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等 ROS 氧化,生成发荧光的 2',7'-二氯荧光素 (DCF),通过 DCF 水平的变化即可反映 ROS 水平的变化。用还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒测定细胞内还原型 GSH 含量。其测定原理为:GSH 被 5'-二巯基 - 2 - 硝基苯酸 (DTNB) 氧化,生成 GSSG 和稳定的 5 - 巯基 - 2 - 硝基苯酸 (TNB);GSSG 与 GSSG 还原酶及 NADPH 反应,还原生成 GSH。在 NADPH 与 GSSG 还原酶维持 GSH 总量不变的条件下,GSH 和 DTNB 反应生成黄色 TNB (412nm 波长处有最大吸光度)的速率与样品中总谷胱甘肽成正比。结果发现 20、40 μg/ml ELE 作用 A549/DDP 细胞 24h,与对照组比较,细胞内 DCF 荧光强度增加 ($\chi^2 = 3.2443, P < 0.05$; $\chi^2 = 2.1254, P < 0.05$),说明细胞内 ROS 含量增加;GSH/(GSSG + GSH) 比值降低,说明 GSH 含量减少 ($\chi^2 = 2.8437, P < 0.05$; $\chi^2 = 2.1244, P < 0.05$),且呈剂量 - 效应关

系(图4)。

表1 ELE对A549/DDP细胞多药耐药的逆转作用 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The effect of Elemen on reversal multidrug resistance of A549/DDP cells (n=3 $\bar{x} \pm s$)

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

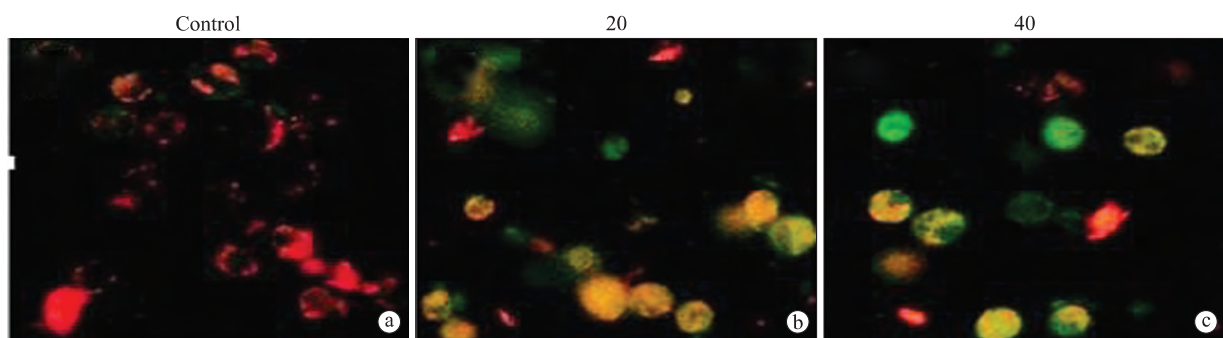
注: * P<0.05,与对照组(不同浓度DDP处理的A549/DDP细胞)比;实验组:在对照组基础上加入20 $\mu\text{g/ml}$ ELE。

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

2.6 A549/DDP细胞中Cyto C、Caspase-3活性和Bcl-2家族蛋白的表达

Western blot法检测结果显示20、40 $\mu\text{g/ml}$ ELE作用于A549/DDP细胞24h与对照组比较,Cyto C灰度值增高,为对照组的(1.43 \pm 0.11)倍($\chi^2 = 1.9642, P < 0.05$)和(1.63 \pm 0.15)倍($\chi^2 = 1.7692, P < 0.05$); Pro-caspase-3灰度值减小,为对照组的(0.75 \pm 0.09)倍($\chi^2 = 3.8782, P < 0.05$)和(0.48 \pm 0.13)倍($\chi^2 = 3.9644, P < 0.05$); Caspase-3灰度值

A



B

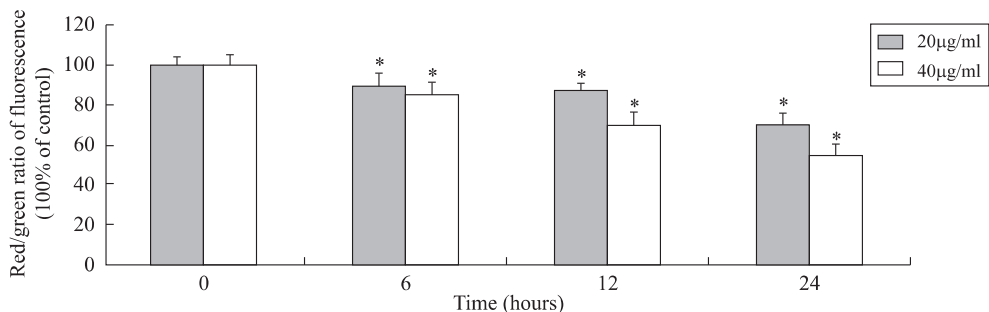


图3 激光共聚焦显微镜观察ELE作用6h A549/DDP细胞内线粒体膜电位的荧光强度($\times 400$,A)和ELE作用不同时间细胞内红/绿荧光强度比率(B)

Fig.3 Results of the mitochondrial membrane potential detection by the laser confocal scanning microscopy ($\times 400$) by 20,40 $\mu\text{g/ml}$ ELE treated for 6h (A) and red/green rate of fluorescence of A549/DDP cells by 20,40 $\mu\text{g/ml}$ ELE treated for different time (B)

* P<0.05,vs control group.

2.7 Cyclosporine A和DEVD-CHO对ELE诱导A549/DDP细胞凋亡的影响

增加,为对照组的(1.39 \pm 0.12)倍($\chi^2 = 2.1134, P < 0.05$)和(1.72 \pm 0.14)倍($\chi^2 = 2.3516, P < 0.05$); Bcl-2灰度值降低,为对照组的(0.55 \pm 0.10)倍($\chi^2 = 3.9442, P < 0.05$)和(0.32 \pm 0.13)倍($\chi^2 = 4.0142, P < 0.05$); Bad灰度值增加,为对照组的(1.51 \pm 0.11)倍($\chi^2 = 1.9641, P < 0.05$)和(1.82 \pm 0.15)倍($\chi^2 = 1.8746, P < 0.05$);且均呈剂量依赖性,表明20和40 $\mu\text{g/ml}$ ELE都会损伤线粒体膜,使线粒体释放Cyto C到胞质使其表达增加,同时通过活化Caspase-3,上调促凋亡蛋白Bcl-2,减低抑凋亡蛋白Bad表达而启动凋亡途径来逆转耐药(图5)。

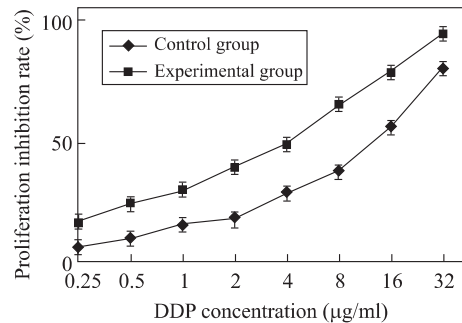


图2 20 $\mu\text{g/ml}$ ELE对不同DDP浓度下孵育24h的A549/DDP细胞的增殖抑制作用

Fig.2 Inhibition A549/DDP cells proliferation when 20 $\mu\text{g/ml}$ ELE in combination with different concentration DDP on A549/DDP cells for 24h

Elemene ($\mu\text{g/ml}$)

线粒体膜通透性转运孔抑制剂Cyclosporine A和Caspase-3抑制剂DEVD-CHO共同作用于加了40 $\mu\text{g/ml}$

ELE 的 A549/DDP 细胞 24h 结果发现:40 μ g/ml ELE 组灰度值较对照组增加,为对照组的(1.72 \pm 0.13)倍,差异有统计学意义($\chi^2=1.9652 P<0.05$),而 40 μ g/ml ELE + Cyclosporine A 和 40 μ g/ml ELE + DEVD-CHO 组 Caspase-3 灰度值

降低,为 40 μ g/ml ELE 组的(0.68 \pm 0.14)倍($\chi^2=1.6641 P<0.05$)和(0.72 \pm 0.16)倍($\chi^2=1.7654 P<0.05$),差异有统计学意义(图 6)。

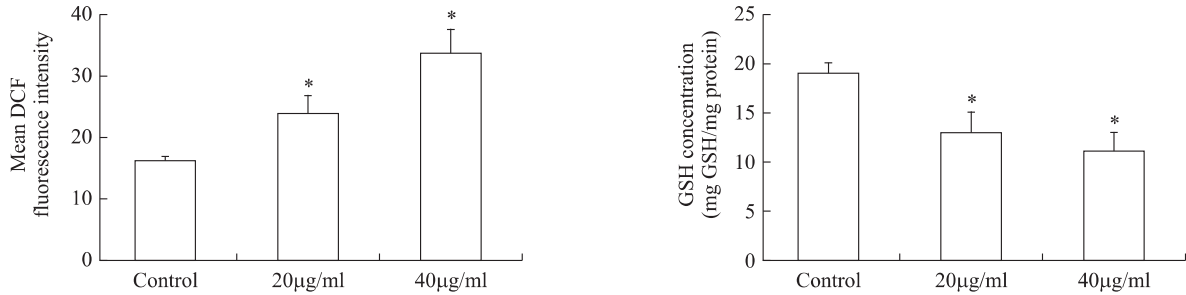


图 4 ELE 增加 A549/DDP 细胞内 ROS 浓度、降低 GSH 的含量

Fig.4 Elemene increases ROS concentration and decrease GSH expression in A549/DDP cells

* $P<0.05$, vs control group.

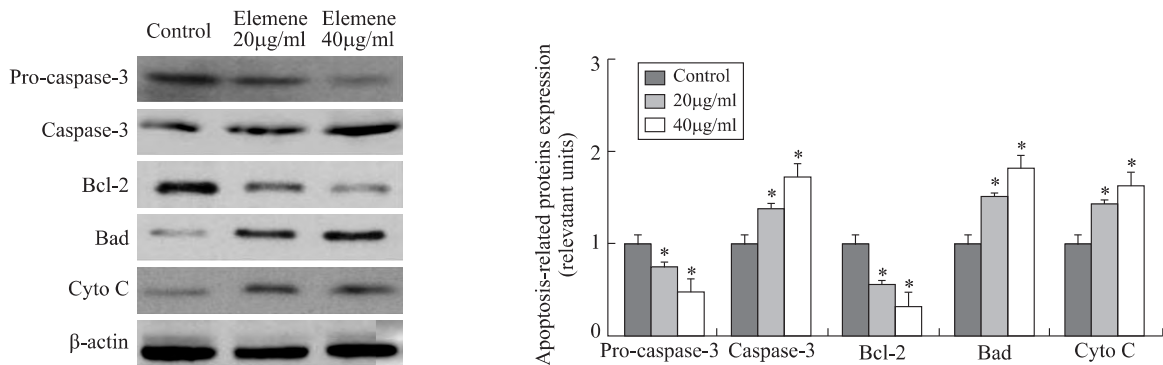


图 5 不同浓度榄香烯乳(20,40 μ g/ml)作用 A549/DDP 细胞 24h 后对 Cyto C、Pro-caspase-3、Caspase-3、Bad 和 Bcl-2 蛋白表达的影响
Fig.5 The Cyto C, Caspase and Bcl-2 family protein expressions when different concentration ELE acted at A549/DDP cells for 24h

* $P<0.05$ vs. control group.

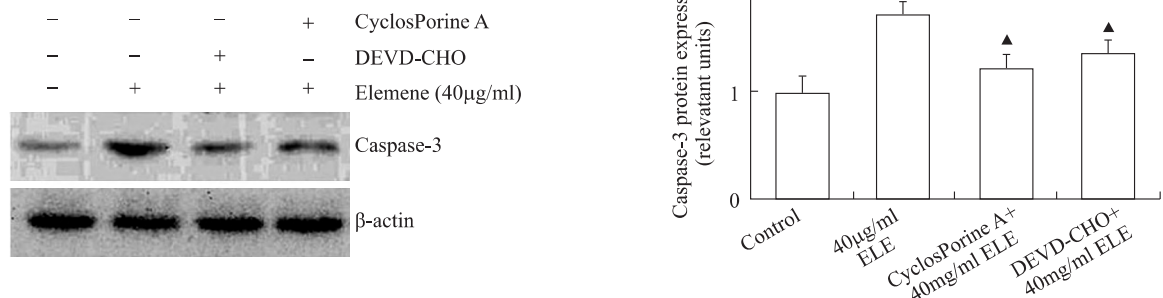


图 6 Cyclosporine A 和 DEVD-CHO 抑制 Caspase-3 蛋白表达

* $P<0.05$ 表示与对照组比较,▲ $P<0.05$ 表示与 40 μ g/ml ELE 组比较。

Fig.6 Cyclosporine A and DEVD-CHO inhibited Caspase-3 protein expression of A549/DDP cells

* $P<0.05$ vs. control group, ▲ $P<0.05$ vs. 40 μ g/ml ELE group.

3 讨论

过去认为,凋亡主要是由细胞核的改变引起,现在研究显示线粒体才是细胞凋亡的控制中心。而线粒体损伤造成膜电位($\Delta\Psi_m$)下降是细胞启动凋亡的一个特征性标志。JC-1 荧光探针多用于检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位改变。当线粒体 $\Delta\Psi_m$ 较高时,JC-1 以聚合物形式聚集在线粒体基质中,产生红色荧光;当线粒体 $\Delta\Psi_m$ 较低时,JC-1 为单体,不能聚集在线粒体基质中,产生绿色荧光,这样就可以非常方便地通过荧光颜色的改变来检测线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的变化^[8]。我们的研究结果显示:20,40 μ g/ml ELE 作用 A549/

DDP 细胞 6h,部分细胞显示绿色荧光、细胞呈固缩状、细胞破裂且细胞内容物外流,进一步分析发现细胞的红色/绿色荧光光密度比值降低,且具有时间-剂量效应关系,说明 ELE 逆转 A549/DDP 细胞耐药与其损伤线粒体膜,使其膜电位下降有关。

线粒体在产能过程中,氧化呼吸链电子传递如受到抑制或破坏将会导致线粒体内 ROS 的增加,而 ROS 可以活化氧自由基,使其攻击线粒体膜,引起线粒体膜损伤、 $\Delta\Psi_m$ 下降,造成通透性增加^[9]。而细胞内 GST 则是氧自由基的清除剂,它能很好地清除胞内的 ROS,抑制细胞的损伤。本研究发现

20、40 $\mu\text{g/ml}$ ELE 作用 A549/DDP 细胞 24h,与对照组比较,细胞内 DCF 荧光强度增加,说明胞内 ROS 含量增加;GSH/(GSSG + GSH) 比值降低,说明 GSH 含量减少,ELE 逆转 A549/DDP 细胞耐药与其增加细胞内 ROS 含量,降低细胞内 GSH 含量有关,而这反过来又进一步加重了线粒体膜的损伤,造成 $\Delta\Psi_m$ 进一步下降,产生恶性循环。这与 Yang 等^[10]发现墨角藻聚糖通过提高肝癌 SMMC-7721 细胞株内的 ROS,降低 GSH,使线粒体膜去极化,诱导凋亡相一致。

Cyto C 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,特别是线粒体内外膜间的通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)破坏,线粒体膜通透性增高,使不能通过线粒体外膜的 Cyto C 穿过外膜释放到胞质中,使 Pro-caspase-3 活化,进一步激活 Caspase-3 而诱导凋亡途径^[11]。同时 Bcl-2 家族蛋白中抗凋亡蛋白(如 Bcl-2、Bcl-xL)表达降低,促凋亡蛋白(如 Bax、Bad)表达增高,又进一步促使 Cyto C 释放到胞质,触发 Caspase 级联放大,诱发更大的细胞凋亡^[12-20]。本研究显示,20、40 $\mu\text{g/ml}$ 浓度榄香烯作用 A549/DDP 细胞 24h,胞质中 Cyto C 高表达、Pro-caspase-3 表达减低,Caspase-3 表达增加,Bcl-2 表达降低,Bad 表达增加且均呈剂量依赖性,说明 ELE 造成线粒体膜损伤,使线粒体释放 Cyto C 到胞质,活化 Pro-caspase-3,激活 Caspase-3 而执行细胞凋亡。同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 低表达、促凋亡蛋白 Bad 高表达进一步促使 Cyto C 释放,诱导更大的细胞凋亡,形成放大效应。进一步研究发现,当我们在 40 $\mu\text{g/ml}$ 浓度榄香烯中加入线粒体 PTP 抑制剂 Cyclosporine A 和 Caspase-3 抑制剂 DEVD-CHO 时,Caspase-3 表达减低,说明 Cyclosporine A 能阻止 PTP 的通透性,DEVD-CHO 能抑制 Caspase-3 的激活,从而抑制 A549/DDP 细胞凋亡。这从反面说明 ELE 逆转 A549/DDP 细胞耐药与 Cyto C 释放、Caspase 激活及抗凋亡蛋白 Bcl-2 低表达、促凋亡蛋白 Bad 高表达有关,这可能就是其逆转机制之一。

【参考文献】

[1] 鞠建峰,于维萍,傅春升,等. β -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] Qingdi Quentin Li, Rebecca X Lee, Liang HS, et al. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by β -elemene in resistant human

ovarian cancer cells[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 424-444.

[7] Ye Zhang, Xiao-Dong Mu, En-zhe Li, et al. The role of E3 ubiquitin ligase Cbl proteins in β -elemene reversing multi-drug resistance of human gastric adenocarcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5): 10075-10089.

[8] Chen Q, Liu S, Chen J, et al. Luteolin induces mitochondria-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma cell[J]. Nat Prod Commun, 2012, 7(1): 29-32.

[9] Prosperini A, Juan-García A, Font G, et al. Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells[J]. Toxicol Lett, 2013, 222(2): 204-211.

[10] Yang L, Wang P, Wang H, et al. Fucoidan derived from Undaria pinnatifida induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway[J]. Mar Drugs, 2013, 11(6): 1961-1976.

[11] 任伟,杨帆,杜双宽,等. β -榄香烯对人膀胱癌 5637 细胞凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(4): 703-706.

[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] 张晔,赵明芳,曲秀娟,等. β -榄香烯联合紫杉醇诱导胃癌细胞凋亡的体外研究[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(5): 965-968.

[15] Kuan-Beng Ng, Ahmad Bustamam, Mohd Aspollah Sukari, 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 G₂/M phase cell cycle arrest[J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13(1): 41-68.

[16] Yanxia Ning, Rebecca B Riggins, Jennifer E Mulla, et al. Interferon gamma restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IRF1, NF- κ B, Bcl-2 family members and signaling to caspase-dependent apoptosis[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(5): 1274-1285.

[17] Yanhua Liang, John P Sundberg. SHARPIN regulates mitochondria-dependent apoptosis in keratinocytes[J]. J Dermatol Sci, 2011, 63(3): 148-153.

[18] Sanket Joshi, Antony W Braithwaite, Sanket Joshi, 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(1): 78-103.

[19] B Favaloro, N Allocati, V Graziano, et al. Role of apoptosis in disease[J]. Aging(Albany NY), 2012, 4(5): 330-349.

[20] Faten Merhi, Ruoping Tang, Mario Piedfer, 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): e25963-25964.

(编校:徐萌)