

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.09.007

蟾蜍灵诱导人肺腺癌细胞凋亡作用及其机制

郁云龙¹, 刘云鹏², 王 锴¹, 朱志图¹, 刑永达¹, 哈敏文¹

Effect of Bufalin on Inducing Cell Apoptosis and Its Mechanisms in Human Lung Adenocarcinoma Cells

YU Yun-long¹, LIU Yun-peng², WANG Kai¹, ZHU Zhi-tu¹, XING Yong-da¹, HA Min-wen¹

1. First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of China Medical University

Corresponding Author: ZHU Zhi-tu, E-mail: zhuzhitu@hotmail.com

Abstract: Objective To study the mechanism of bufalin on inducing cell apoptosis in human lung adenocarcinoma (A549) cells. **Methods** The growth inhibition was analyzed by MTT assay; The morphological changes in the samples dyed in wright-Giemsa were observed using light microscope. Apoptosis and Mitochondrial membrane potential($\Delta\Psi_m$) was evaluated by flow cytometry, Western blot analysis was used to evaluate the level of Bcl-2 and Caspase-3 expression. **Results** (1) Bufalin inhibits cell growth, and 50% inhibitory concentrations(IC_{50}) of the agent at 48h and 72h were (56.14 ± 6.72)nmol/L, (15.57 ± 4.28) nmol/L, respectively. (2) Apoptosis of A549 cells could be efficiently induced by bufalin at different concentrations. (3) A significantly reduction in the Mitochondrial membrane potential($\Delta\Psi_m$) was induced by bufalin. (4) The expression of Bcl-2 protein was downregulated and Caspase-3 protein was activated during bufalin-induced apoptosis in A549 cells. **Conclusion** Bufalin-induced lung adenocarcinoma cells apoptosis is through mitochondria signaling pathway in A549 cells.

Key words: Bufalin; Lung adenocarcinoma cells; Apoptosis; Bcl-2

摘要:目的 研究中药蟾酥有效成分蟾蜍灵(bufalin)对人肺腺癌细胞的作用及其机制。**方法** MTT 法检测蟾蜍灵对细胞的增殖抑制作用;瑞氏-吉姆萨染色法观察细胞形态学的变化;流式细胞术分析细胞凋亡和线粒体跨膜电位;Western blot 法检测 Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达。**结果** (1) 蟾蜍灵明显抑制 A549 细胞增殖,48h 及 72h 的 IC_{50} 分别为(56.14 ± 6.72)nmol/L、(15.57 ± 4.28) nmol/L。(2) 蟾蜍灵能诱导肺癌细胞凋亡,形态学表现为出现凋亡小体及流式细胞仪检测到的亚二倍体凋亡峰。(3) 蟾蜍灵可以明显降低细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)。(4) 蟾蜍灵诱导细胞凋亡过程中,下调 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.01$),同时活化 Caspase-3。**结论** 线粒体途径是蟾蜍灵诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的主要通路之一。

关键词: 蟾蜍灵;肺腺癌;凋亡;Bcl-2

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)09-1000-04

0 引言

蟾蜍灵(bufalin)是从中药蟾酥中提取的一种毒性配基,属强心甙类物质。这种成分具有强心、麻醉、解毒、止痛等药理作用。近年来研究发现,蟾蜍灵也是抗肿瘤的有效成分^[1]。本研究探讨蟾蜍灵对

人肺腺癌细胞的增殖影响及诱导凋亡的作用,旨在为蟾蜍灵临床应用于恶性肿瘤的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 蟾蜍灵购于 Sigma 公司,用无水乙醇配成 0.01mol/L 贮存液, - 20℃ 冻存,实验时用 PBS 稀释成所需浓度。乙醇终浓度 < 0.01%, 预实验表明,该浓度乙醇对细胞增殖无影响。

1.1.2 细胞株 人肺腺癌细胞株 A549 购于中科院上海细胞库,置于含 10% 胎牛血清(56℃, 30min 灭活)的 F12K 培养液中,37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱内传代培养。所有实验均采用对数生长期细胞。

收稿日期:2009-10-23;修回日期:2009-12-16

基金项目:辽宁省教育厅 2009 年高等学校科研项目(2009A470)

作者单位:1. 121001 辽宁锦州,辽宁医学院附属第一医院肿瘤科;2. 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

通信作者:朱志图, E-mail: zhuzhitu@hotmail.com

作者简介:郁云龙(1981-),男,硕士在读,主要从事抗癌药物的研究

1.1.3 主要试剂 碘化丙锭 (PI)、RNase、DiOC6 (3) (3, 3'-dihexyloxacarbocyanine, iodide)、F12K 培养液购于 Sigma 公司;胎牛血清购于中国医学科学院血液学研究所;小鼠抗人 Bcl-2 抗体和兔抗人 Caspase-3 抗体购于 Santa Cruz 公司;四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于北京华美公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定细胞增殖抑制率

将 A549 细胞浓度调整为 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 $180 \mu\text{l}$, 实验组加用不同浓度的蟾蜍灵培养细胞 48h、72h, 并设立对照组, 终止培养前 4h 每孔加入 MTT (5mg/ml) 液 $20 \mu\text{l}$, 到预定时间后加 DMSO 液 $200 \mu\text{l}$, 振荡后酶联免疫检测仪 570nm 处测定各孔吸光度值。按细胞增殖抑制率计算公式计算细胞增殖抑制率并绘制细胞增殖抑制曲线, 计算药物抑制细胞增殖 50% 的浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率 (%) = $1 - (\text{实验组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$

1.2.2 瑞氏-吉姆萨染色法观察细胞形态

100nmol/L 蟾蜍灵作用 48h 后收集细胞, 并设立对照组, 取少许细胞 $2000 \text{r}/\text{min}$ 离心机甩片 3min, 用瑞氏-吉姆萨染液染色, 光学显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 流式细胞术分析细胞周期及凋亡百分率

用不同浓度蟾蜍灵分别作用细胞 48h、72h, 胰酶消化后 $1000 \text{r}/\text{min}$ 离心 5min, 冷 PBS 洗涤, 加入 70% 的冷乙醇 4°C 过夜, PBS 再次离心洗涤, 加入 RNase ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 37°C 孵育 30min 后, 加入终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PI, 避光反应 30min 后进行流式细胞仪测定, 采用 Cell Quest 进行细胞各期的百分比分析, 判定凋亡细胞百分率。

1.2.4 流式细胞术检测线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$)

用不同浓度蟾蜍灵分别作用细胞 48h, 胰酶消化后 $1000 \text{r}/\text{min}$ 离心 5min, 冷 PBS 洗涤, 加入终浓度为 25nmol/L 的 DiOC6 (3), 于 37°C 避光孵育 30min 后进行流式细胞仪 (FL1-H) 检测。

1.2.5 Western blot 法检测蛋白的表达

将对照组和蟾蜍灵作用后的细胞加 RIPA 裂解

液在冰上裂解 40min, $12000 \text{r}/\text{min}$ 离心 20min, 取上清液, 采用 Lowry 法进行蛋白定量。与 $3 \times$ 样品缓冲液混合后, 煮沸 5min。取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白样品在 15% 的 SDS 聚丙烯凝胶中电泳约 3h, 然后转印至硝酸纤维素膜上 2h。用 5% 脱脂奶粉封闭 1h 后, 按预染 Marker 标记的分子量剪裁转印膜, 分别加入 Bcl-2 抗体 (1:400)、Caspase-3 (1:1000) 抗体及 β -Actin 抗体 (1:1000), 过夜。TTBS 洗 4 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:800) 作用 30min, ECL 法显色后 GIS 凝胶图像分析系统拍照并分析处理。

1.3 统计学方法

所有数据均为 3 次独立实验结果, 以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

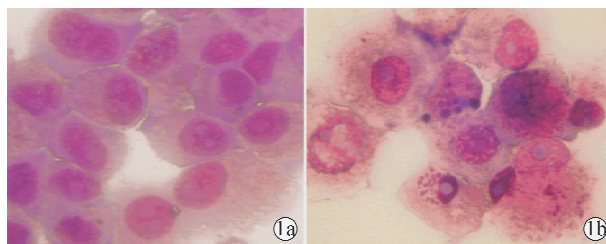
2 结果

2.1 蟾蜍灵抑制 A549 细胞增殖

用 10~200nmol/L 蟾蜍灵处理 A549 细胞, 分别计算 48h 及 72h 的细胞增殖抑制率, 结果显示, 蟾蜍灵抑制细胞增殖呈时间、剂量依赖关系。48h 及 72h 的 IC_{50} 值分别为 (56.14 ± 6.72) nmol/L 和 (15.57 ± 4.28) nmol/L, 见表 1。

2.2 蟾蜍灵作用 A549 细胞后的形态学变化

用 100nmol/L 蟾蜍灵作用 A549 细胞 48h 后, 瑞氏-吉姆萨染色, 光学显微镜下观察到细胞染色质固缩、胞核碎裂及凋亡小体等典型的凋亡形态, 见图 1。



1a: control; 1b: 100nmol/L

图 1 蟾蜍灵对 A549 细胞形态学的影响 (瑞氏-吉姆萨染色, $\times 400$)

Figure 1 Effects of bufalin on the morphological changes of A549 cells (stained by Wright-Giemsa, $\times 400$)

表 1 蟾蜍灵对 A549 细胞的增殖抑制作用

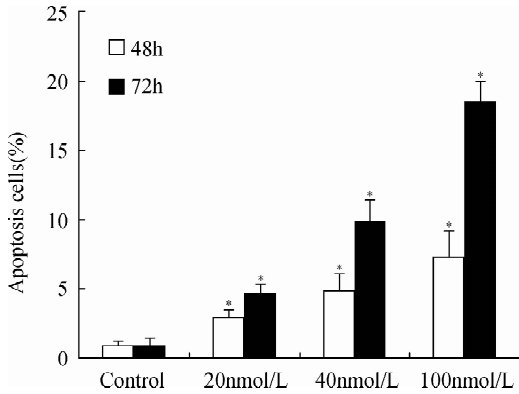
Table 1 Effects of bufalin on proliferation inhibition in A549 cells

Groups	Proliferation inhibition rate (%)					
	Control	10nmol/L	20nmol/L	50nmol/L	100nmol/L	200nmol/L
48h	0.00	$30.30 \pm 7.14^\#$	$43.65 \pm 4.25^*$	$51.24 \pm 6.61^*$	$56.62 \pm 7.27^*$	$61.36 \pm 9.12^*$
72h	0.00	$45.43 \pm 4.21^*$	$53.46 \pm 5.73^*$	$61.56 \pm 6.02^*$	$67.51 \pm 6.26^*$	$76.28 \pm 7.18^*$

Note: compared with control group, $^\#$: $P < 0.05$, * : $P < 0.01$

2.3 蟾蜍灵诱导 A549 细胞凋亡

20、40、100nmol/L 蟾蜍灵分别作用细胞 48h 及 72h 后,流式细胞术检测显示因凋亡形成的亚二倍体细胞 48h 分别为(2.93 ± 0.67)%、(4.86 ± 1.26)% 及(7.34 ± 1.85)%;72h 分别为(4.64 ± 0.74)%、(9.86 ± 1.63)%及(18.05 ± 1.58)% ,与对照组比较差异有统计学意义(P 均 <0.01),见图 2。



Compared with control group, * : $P < 0.01$

图 2 流式细胞仪检测蟾蜍灵诱导的凋亡细胞

Figure 2 Analysis of apoptosis induced by bufalin in A549 cells detected by flow cytometry

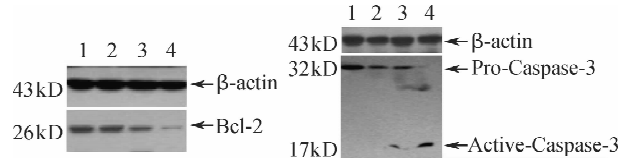
2.4 蟾蜍灵降低 A549 细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)

实验结果显示蟾蜍灵各处理组细胞线粒体膜电位明显降低,表现为弱荧光部分(M1 部分)细胞百分率增高(30.94 ± 4.21)%~(69.04 ± 5.86)% ,与对照组比较其差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 3。

2.5 蟾蜍灵对 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响

用 20、40、100nmol/L 蟾蜍灵分别作用细胞 48h,Western blot 检测结果显示,Bcl-2 蛋白表达分别下调至作用前的(84.90 ± 4.76)%、(58.88 ± 4.63)%及(16.17 ± 5.02)% ,其差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$);20nmol/L 蟾蜍灵作用细胞 48h 只检测到非激活状态的 Caspase-3 前体,而 40、100nmol/L 可检测到 Caspase-3 的活化亚

基(17kD),且随浓度增大活化程度更明显,见图 4。



1: control; 2: 20nmol/L; 3: 40nmol/L; 4: 100nmol/L

图 4 Western blot 检测 Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达
Figure 4 The expression of Bcl-2 and Caspase-3 protein by Western blot

3 讨论

肺癌是目前全球发病率和死亡率最高的肿瘤,其中约 80% 为非小细胞肺癌(NSCLC)。近一半多的患者在就诊时已属中晚期,5 年生存率只有 15% 左右。目前,化疗仍是 NSCLC 的主要治疗手段,但化疗药物带来的较大不良反应以及由耐药导致的化疗失败成为困扰临床医生的难题。因此,寻求高效低毒的治疗药物成为近年来的研究热点。

国内外研究表明蟾蜍灵在体外能抑制多种肿瘤细胞生长,诱导其凋亡。有学者报道低浓度蟾蜍灵可引起 HL-60、U937、K562 等白血病细胞分化,高浓度时可诱导其凋亡,其作用机制与 *survivin*、*c-myc*、*WT1* 等基因调节相关,但其诱导凋亡的确切机制尚未阐明^[2-3]。另外,目前的研究已经在胃癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等实体肿瘤中展开^[4],但对于肺癌的研究国内外罕见报道。

实验研究表明许多抗癌药物作用于肿瘤细胞,在低浓度、短时间时表现为周期阻滞,高浓度、长时间表现为凋亡。但关于蟾蜍灵引起细胞周期阻滞的报道不一^[5-6]。在本研究中,流式细胞仪分析显示蟾蜍灵作用于 A549 细胞后并未观察到明显的周期阻滞,而是出现明显的亚二倍体凋亡峰,直接诱导细胞凋亡,故推测蟾蜍灵作用于不同的细胞系可能引起不同的细胞周期分布。

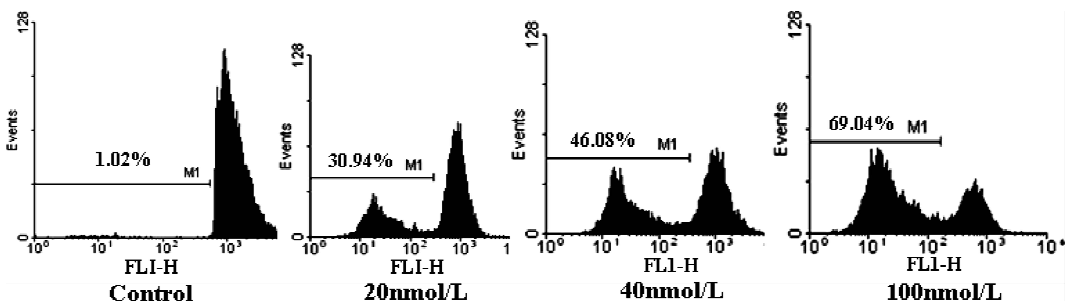


图 3 流式细胞仪检测 A549 细胞线粒体膜电位变化

Figure 3 Analysis of A549 cells mitochondrial transmembrane potential detected by flow cytometry

由细胞色素 C 和 Caspases 等组成的线粒体途径在细胞凋亡中发挥重要作用, Bcl-2 家族成员可通过调节线粒体途径影响凋亡的发生。Watabe 等^[7]报道 Bcl-2 蛋白过度表达可抑制蟾蜍灵诱导的细胞凋亡作用。我们的实验结果显示, 蟾蜍灵可明显下调 Bcl-2 蛋白的表达, 同时使凋亡增加。越来越多的研究表明, 在凋亡信号的刺激下, 线粒体膜电位会丢失, 线粒体的通透性会发生变化, 各种凋亡因子会从线粒体释放到细胞质中, 它们或激活 Caspases, 或独立地破坏核染色质, 从而表现出凋亡细胞的各种形态特征, 最后细胞膜内陷形成凋亡小体^[8]。本实验中可以观察到剂量组凋亡细胞的特征性凋亡小体, 同时随着蟾蜍灵药物浓度的增加线粒体膜电位逐渐下降, Caspase-3 蛋白被活化, 与 Sun 等^[9]学者的报道较一致。这些研究结果提示线粒体途径可能是蟾蜍灵诱导肺癌细胞凋亡的主要机制之一, 但是蟾蜍灵是如何引发线粒体膜电位降低, 还有哪些其他信号通路参与进而诱导细胞的凋亡尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 韩鸿彬, 陈嘉勇. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J].

中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(2): 160-162.

[2] 刘云鹏, 曲秀娟, 王萍萍, 等. 蟾蜍灵诱导 K562 细胞分化和凋亡过程中 WT1 表达的下调[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(7): 356-359.

[3] 朱志图, 金波, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵增强全反式维甲酸对 NB₄ 细胞的诱导分化作用[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(4): 314-317.

[4] Takai N, Ueda T, Nishida M, et al. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2008, 21(5): 637-643.

[5] Nasu K, Nishida M, Ueda T, et al. Bufalin induces apoptosis and the G0/G1 cell cycle arrest of endometriotic stromal cells; a promising agent for the treatment of endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(11): 817-823.

[6] Li D, Qu X, Hou K, et al. PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(1): 59-64.

[7] Watabe M, Kawazoe N, Masuda Y, et al. Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells [J]. Cancer Res, 1997, 57(15): 3097-3100.

[8] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.

[9] Sun L, Chen T, Wang X, et al. Bufalin induces reactive oxygen species dependent bax translocation and apoptosis in ASTC-a-1 cells[J]. eCAM, 2009. doi: 10. 1093/ecam/nep082

[编辑: 杨 卉; 校对: 贺 文]

(上接第 999 页)

[16] 王芳, 王汉渝, 胡伟汉, 等. 调强放疗联合西妥昔单抗及顺铂治疗晚期鼻咽癌[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(5): 489-491.

[17] Takaoka S, Iwase M, Uchida M, et al. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma

cells[J]. Int J Oncol, 2007, 30 (6): 1469-1476.

[18] Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: Inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(6): 2166-2174.

[编辑: 周永红; 校对: 贺 文]