

model of myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(5): H1558-H1565.

- [11] ZHANG X J, XIONG Z B, TANG A L, et al. Rosiglitazone-induced myocardial protection against ischaemia-reperfusion injury is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(2): 156-161.
- [12] ATREYA I, ATREVA R, NEURATH M F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease [J]. J Intern Med, 2008, 263(6):

591-596.

- [13] WANG H, ZHU Q W, YE P, et al. Pioglitazone attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of ERK and COX-2 [J]. BioSci Trends, 2012, 6(6): 325-332.
- [14] YANG D, GUO S, ZHANG T, et al. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling [J]. FEBS Lett, 2009, 583(15): 2500-2506.

收稿日期: 2013-08-06

芦荟多糖通过线粒体途径诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡

李小华¹, 董琳², 侯小燕¹, 庄英帜^{1*} (1. 南华大学附属第一医院肿瘤防治中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 观察芦荟多糖(aloe polysaccharide, AP)对人肺腺癌 A549 细胞的诱导凋亡作用, 并初步探讨其作用机制。方法 AP 作用于 A549 细胞后, 用 MTS 法检测细胞生长情况, 采用 Hoechst 荧光染色和 DNA ladder 检测 A549 细胞的凋亡情况; 用 Western blot 法检测凋亡相关分子 caspase-9, caspase-8, caspase-3 和 Bcl-2 的表达情况; 应用比色法检测 caspase 活性。结果 ①AP 可呈时间和剂量依赖性抑制 A549 细胞生长($P<0.01$)。② $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AP 可呈时间依赖性诱导 A549 细胞出现凋亡形态学改变: 核浓缩、核碎裂和 DNA 梯状条带; ③A549 细胞的 caspase-9, caspase-8 和 caspase-3 均在 AP 处理后 24 h 内被激活, 且 caspase-9 和 caspase-3 早于 caspase-8 活化($P<0.05$), Bcl-2 蛋白呈时间依赖性下调。结论 AP 能够诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡, 其作用机制可能与 AP 激活线粒体凋亡途径有关。

关键词: 肺腺癌细胞; 芦荟多糖; 凋亡; 线粒体途径

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)03-0270-05

Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Induced by Aloe Polysaccharide Through the Mitochondrial Pathway

LI Xiaohua¹, DONG Lin², HOU Xiaoyan¹, ZHUANG Yingzhi^{1*} (1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Institute of Oncology, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the induction effect of aloe polysaccharide (AP) on lung adenocarcinoma cells line A549 and to explore corresponding mechanism. **METHODS** After treatment of AP on A549 cells, MTS method was used to measure the growth curve of the cells so as to observe the effect of the AP on the proliferation of A549 cells, and the apoptosis of A549 cells were detected by Hoechst staining and DNA ladder electrophoresis. The expression of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 was examined by Western blot and the enzyme activity of these caspases was examined by using a colorimetric method. **RESULTS** AP could inhibit proliferative activity of A549 cells in a time-dependent and dose-dependent manner ($P<0.01$). AP could promote DNA non-random cut morphological changes and chromatin condensation and nuclear fragmentation of apoptosis in a time-dependent manner in A549 cells ($P<0.01$). The activation of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 of A549 cells induced by AP was observed within 24 h, and the activation of caspase-9 and caspase-3 was earlier than that of caspase-8. Expression of Bcl-2 was down-regulated in a time-dependent manner. **CONCLUSION** AP can inhibit the growth and induce apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells, the mechanism is associated with activation of the mitochondrial apoptotic pathway.

KEY WORDS: lung adenocarcinoma cell; aloe polysaccharide; apoptosis; mitochondrial pathway

基金项目: 衡阳市科技局项目(2009ks39)

作者简介: 李小华, 女, 主管护师 Tel: (0734)82821510 E-mail: lixh2001@163.com *通信作者: 庄英帜, 女, 教授, 硕士 Tel: (0734)8282761 E-mail: zhuangyz2010@163.com

芦荟多糖(aloe polysaccharide, AP)是芦荟凝胶中除去水分以外的主要成分^[1]。现代药理学研究发现, AP 具有抗肿瘤、抗氧化损伤^[2]和抗菌等作用。近年来, AP 的抗肿瘤作用逐渐受到众多学者的关注。众多研究发现 AP 对黑色素瘤细胞、Heps 和 S180 等肿瘤细胞均有抑制作用^[3-5]。本研究组前期已报道 AP 在肿瘤裸鼠移植瘤模型上对肺腺癌的抑制作用^[5], 然而 AP 介导的肿瘤消退的机制仍不明确。本研究拟检测 AP 在体外对 A549 细胞生长的影响, 观察其凋亡表型; 通过检测 caspase 活性和运用蛋白印迹等方法分析 AP 诱导 A549 细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药品及试剂

人肺腺癌 A549 细胞株由南华大学肿瘤研究所保存提供, A549 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱常规培养。AP 是按照文献^[6]方法从中华芦荟 [*Aloe vera* var. *chinensis* (Haw.) Berg.] 中提取, 并按紫外分光光度法鉴定纯度为 99.8%。重均分子量约为 45 000 Da。MTS 试剂盒购自 promega 公司; caspase-9、caspase-8、caspase-3 单克隆抗体购自 cell signaling 公司; Hoechst 33258 染色液, DNA Ladder 抽提试剂盒; caspase-9(批号: C1157)、caspase-8(批号: C1151)、caspase-3(批号: C1115) 活性检测试剂盒和兔抗人 PARP、Bcl-2 抗体购于碧云天生物技术研究所以。

1.2 MTS 法检测 A549 细胞生长

将汇合度为 90% 的 A549 肺腺癌细胞培养瓶内培养基吸弃, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 0.25% 胰酶消化、计数, 按 10⁴ 个细胞·孔⁻¹ 加入 96 孔板, 再加入 200 μL RPMI-1640 培养基, 供 MTS 法检测。AP 用 PBS 缓冲液溶解, 并加入 96 孔板, 使终浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹, 以 PBS 组为阴性对照, 每组设 4 个复孔。各药物浓度组又分别设 24, 48, 72 h 时间组。待 AP 处理完毕后, 按照 MTS 试剂盒说明先后加入细胞裂解液及显色底物, 置 37 °C 培养箱 2 h, 最后放入 490 nm 酶标仪检测吸光度。

1.3 Hoechst 染色检测

细胞置于 6 孔板培养, 待 AP 处理后吸弃培养基, PBS 洗涤 1 次并消化细胞, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 遍, 每孔加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min。再用 PBS 洗涤残余染

液, 吸取 100 μL 细胞悬液涂于载玻片上, 置于荧光显微镜检测(激发波 350 nm, 发射波 460 nm)。

1.4 DNA ladder 检测

A549 细胞常规培养并用 AP 分组处理, 处理完成后按照 DNA ladder 试剂盒说明抽提 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳并照相分析。

1.5 Western blot 检测

①制备蛋白样品: A549 细胞常规培养并用 AP 分组处理, PBS 洗涤 2 遍, 加细胞裂解液冰上裂解 30 min; 将所得细胞提取液于 4 °C, 11 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清; 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取等量蛋白样品立即用于 PAGE 凝胶电泳; ②Western blot 法: 取等量蛋白样品加入 6 倍上样缓冲液, 煮沸 5 min, 冷却后在 80~120 V 电压下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的缓冲液封闭过夜(4 °C); 加入一抗, 室温孵育 2 h, 洗膜; 加入二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜; ECL 化学发光, X 光片曝光并显影、定影。胶片用 Canon LIDE 100 扫描仪扫描成 JPG 格式图片, 然后导入 Image J(Version 1.42), 计算每个条带的积分光密度值并进行统计学分析。

1.6 Caspase 活性检测

将 A549 细胞分为 PBS 组, 40 μmol·L⁻¹ AP 3 h 组、6 h 组、12 h 组和 24 h 组, 共 5 组。各组细胞经 AP 处理后, 用胰酶消化收集, PBS 洗涤 2 遍。按照每 200 万细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰上裂解 15 min; 4 °C 12 000 r·min⁻¹ 离心 10~15 min。把上清转移到冰浴预冷的离心管中, 用 Bradford 法测定上清蛋白浓度并用裂解液调整各组蛋白浓度至 2.0 mg·mL⁻¹。各组分别取 10 μL 上清在 96 孔板中进行测定, 体系如下: 检测缓冲液 80 μL, 待测样品 10 μL, 检测底物 10 μL, 总体系: 100 μL; 以检测缓冲液 80 μL 加检测底物 10 μL 为空白对照。其中检测缓冲液和检测底物由试剂盒提供, 检测 caspase-3、9、8 的底物分别是 Ac-DEVD-pNA, Ac-LEHD-pNA 和 Ac-IETD-pNA。37 °C 孵育 60 min 后置酶标仪中检测 A405, 每组设 3 个复孔, 共进行 3 次平行试验。

1.7 统计学处理

计量资料数据采用 SPSS for Windows 软件 version 15.0, 单因素方差分析(One-way ANOVA) 进行样本均数间多重比较, 两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AP 对 A549 细胞生长增殖的影响

用 MTS 比色法检测了 5 种 AP 浓度(2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 3 个时间点(24, 48, 72 h)对 A549 细胞增殖的影响。在各时间点上, AP 均呈浓度依赖性抑制 A549 细胞的生长; 在 20.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组中, AP 呈较明显的时间依赖性抑制 A549 细胞增殖。最大抑制率在 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 作用 72 h 后出现, 为 60.1%。72 h 组 IC_{50} 值为 24.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 故后续实验中选择 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 为处理浓度。结果见图 1。

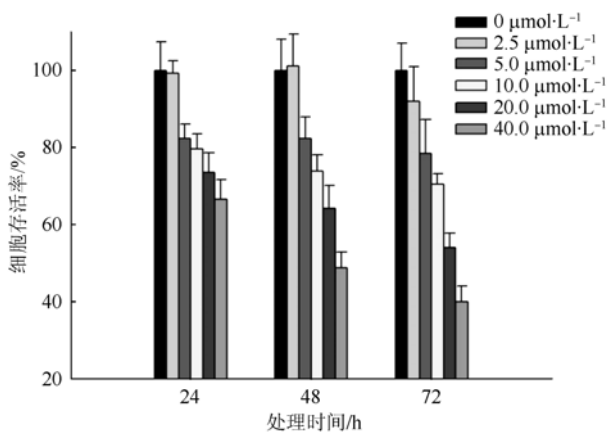


图 1 AP 对 A549 细胞体外生长的影响

Fig 1 Effects of AP on the growth of A549 cells *in vitro*

2.2 AP 对 A549 细胞系凋亡细胞形态学的影响

40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 分别孵育 A549 细胞 24, 48,

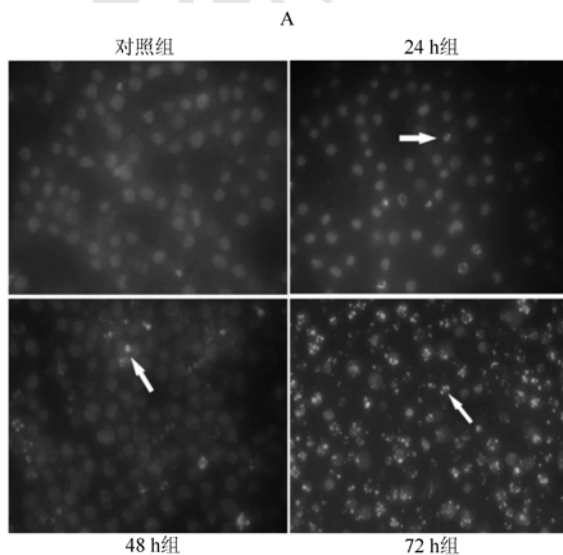


图 2 AP 对 A549 细胞凋亡的形态学影响

A-40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 处理 A549 细胞荧光成像, 白色箭头显示细胞核碎裂情况(200 \times); B-对 A 图的统计学柱图; 与对照组比较, $^{1)}P<0.01$

Fig 2 Morphological effects of AP on apoptosis of A549 cells

A-fluorescence imaging of A549 cells treatment with 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP, white arrow show nuclear fragmentation(200 \times); B-statistical column chart of A; compare with control group, $^{1)}P<0.01$

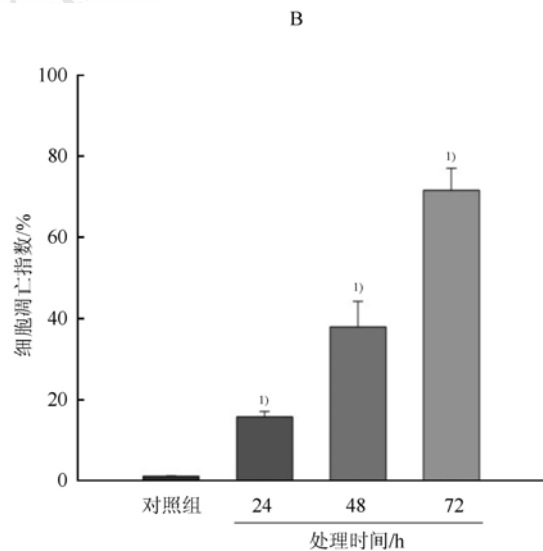
72 h, 以 PBS 处理作为空白对照, 用 Hoechst 33258 染色, 荧光显微镜下各组细胞形态学改变情况见图 2。Hoechst 33258 可穿过细胞膜, 可结合于活细胞或固定细胞, 与 DNA 双链中的小沟结合, 在紫外光激发下发出蓝色荧光。凋亡的细胞核染色增强, 荧光明亮, 呈均匀一致的固缩状圆形或碎片状结构。高倍镜下计数 200 个细胞, 按下式计算细胞凋亡指数: 细胞凋亡指数=有核碎片状细胞数/200 \times 100%。空白对照组, 24 h 组, 48 h 组和 72 h 组的细胞抑制率分别为(1.1 \pm 0.03)%, (15.7 \pm 1.33)%, (37.9 \pm 6.3)%, (71.6 \pm 5.4)%。

2.3 AP 对 A549 细胞 DNA 非随机性剪切的影响

为进一步证实 AP 诱导 A549 细胞凋亡的作用, 采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳法。结果 AP 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 A549 细胞 48 h 后, A549 细胞发生 DNA 非随机性剪切, 琼脂糖凝胶电泳表现出凋亡细胞的典型 DNA “梯形” 条带, 而对照组和 24 h 组均未见明显的 DNA 随机剪切条带。说明 AP 较长时间处理才可能具有明显诱导 A549 细胞凋亡作用, 结果见图 3。

2.4 AP 对凋亡相关蛋白表达的影响

40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 处理 6 h 后线粒体途径凋亡信号蛋白 caspase-9 出现剪切条带, 提示 caspase-9 被激活; 凋亡执行分子 caspase-3 自 6 h 之后剪切条带逐渐增加, 说明 AP 处理的 A549 细胞群凋亡细胞比例逐渐升高。而外源性凋亡信号途径的启



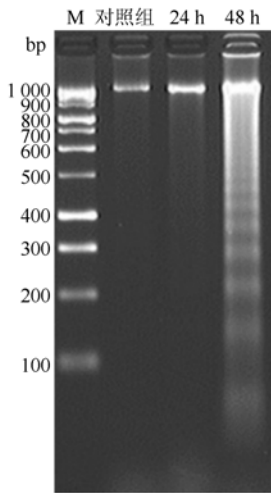


图3 AP对A549细胞DNA非随机剪切的影响

Fig 3 Effect of AP on A549 cells of DNA non-random cut

示分子 caspase-8 直到 AP 作用后 24 h 才检测到明显剪切条带。caspase-3 在 3 h 时间点出现的微弱剪切带为其基础活性。抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 AP 作用后呈时间依赖性下调。结果见图 4。

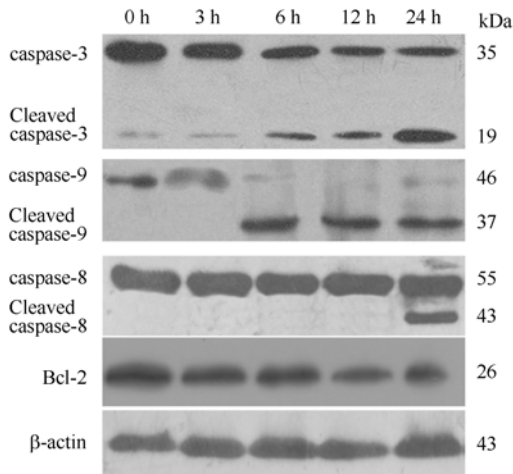


图4 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达

Fig 4 Expression of caspase-3, 8, 9 and Bcl-2 in different time

2.5 AP对细胞 caspase-3、8、9 活性的影响

40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AP 处理后检测不同时间点的 A549 细胞内 caspase-3、8、9 的活性, 结果显示 caspase-9 活性在 6 h 时间点上开始增强, 为对照组的 3.1 倍, 至 24 h 达到最高点, 为对照组的 4.1 倍; 同时 caspase-3 活性也在 6 h 开始增强, 至 24 h 达到高峰, 为对照组的 4.8 倍, caspase-3 活性的变化趋势与 caspase-9 的活性变化同步; 而 caspase-8 的活性直到 24 h 才开始增高。这些结果与 Western blot 结果吻合并可相互印证。结果见图 5。

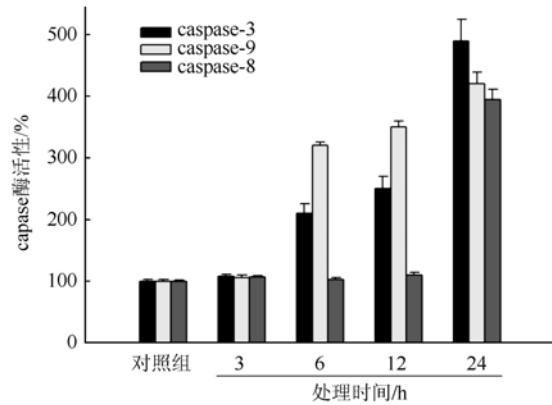


图5 caspase-3、8、9 在 AP 处理后不同时相的活性

Fig 5 Activity of caspase-3, 8, 9 in different time

3 讨论

研究显示, 许多植物多糖具有众多生物活性, 包括免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗菌抗病毒、保护肝脏等作用^[7]。其中 AP 已被证明具有抗肿瘤活性^[5]。然而, AP 产生的抗肿瘤作用机制仍然未知。本研究首先采用 MTS 比色法检测了不同浓度 AP 作用不同时间后对人肺腺癌细胞系 A549 细胞生长的影响, 结果显示 AP 能以浓度依赖性和时间依赖性抑制 A549 细胞的生长增殖。

凋亡是细胞死亡的主要形式, 是机体正常发育和稳态维持的主要调控手段。目前的抗肿瘤治疗: 化疗和放射治疗, 主要是通过促使细胞凋亡, 因此这个过程具有明显的治疗意义。在细胞凋亡过程中会发生某些形态学改变如核浓缩、核碎裂、细胞收缩和生物化学变化, 如 DNA 断裂。本研究观察到 AP 可诱导人肺腺癌细胞系 A549 细胞 DNA 断裂(DNA 梯状条带)和核碎裂(Hoechst 33258 染色)。由上述结果可看出, AP 诱导 A549 细胞凋亡的形态变化比较典型。但是, 这种由 AP 引起的凋亡时相较晚, 在 48 h 后才有较明显的形态学变化。

经典的细胞凋亡的信号途径主要有死亡受体途径(又称受体依赖途径)和线粒体途径(又称非受体依赖途径)^[8]。线粒体是非受体依赖的细胞凋亡的调控核心, 各种物理或化学刺激导致线粒体释放凋亡相关因子, 如细胞色素 C, smac 等, 并进而通过 Apaf-1 剪切激活 caspase-9 及下游的凋亡执行分子, 如 caspase-3, 6, 和 7, 从而引发凋亡程序。死亡受体依赖途径是外源性死亡配体如 TNF、TRAIL 和 FasL 等与其相应死亡受体结合, 使受体三聚化并活化, 活化的受体通过死亡结构域募集

衔接蛋白[FADD 和(或)TRADD]和 pro-caspase-8 形成死亡诱导信号复合物。pro-caspase-8 被激活发生自我剪切形成活化的 caspase-8 并释放到胞浆, 顺次激活 caspase 级联, 从而诱导凋亡^[9]。因此, caspase-8 和 caspase-9 分别是上述 2 类细胞凋亡信号途径中 caspase 级联的始动分子^[8]。本研究同时应用免疫印迹法和 caspase 酶活性法从蛋白表达和蛋白活性两个角度检测上述凋亡分子, 结果发现: AP 处理 A549 细胞 6 h 即可观察到 caspase-9 的激活并持续活化到 24 h, 与其同时活化的还有凋亡执行分子的“枢纽”——caspase-3, 而 caspase-8 的激活直到 AP 处理后 24 h 才被观察到。这些数据说明 AP 首先是通过线粒体途径而不是通过死亡受体途径启动 A549 细胞凋亡。此外, 抗凋亡分子 Bcl-2 也是线粒体凋亡途径的重要调节分子^[10], 它可通过稳定线粒体膜、阻止细胞色素 C 的释放来抑制凋亡, 在细胞发生凋亡时, caspase-3 能酶解 Bcl-2, 破坏 Bcl-2 的抗凋亡活性^[11]。本研究发现的 caspase-9/caspase-3 的持续激活可呈时间依赖性下调 bcl-2 的表达, 此结果与本课题组前期发现的 AP 可引起 A549 细胞裸鼠移植瘤组织内 Bcl-2 的下调相符^[5]。

总之, 本研究表明 AP 可通过诱导人肺腺癌 A549 细胞发生凋亡来抑制细胞生长增殖。这种凋亡诱导作用首先是通过线粒体死亡途径激活 caspase-9 和 caspase-3; 此外, AP 诱导的 A549 细胞发生凋亡的晚期也有 caspase-8 的激活参与。然而, AP 是通过何种机制或作用于哪些分子激活了线粒体凋亡通路, 还有待于进一步探索研究。

REFERENCES

- [1] DANG X L, LIU X Y, WANG Q W, et al. Isolation, purification, determination of relative molecular mass and content in polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller [J]. Her Med(医药导报), 2012, 31(1): 67-70.
- [2] LIU Y P, LUO W, XIA H, et al. Aloe gel prevents and cures doxorubicin-induced extravasation injury in rats by up-regulating expression of bfgf and down-regulating expression of ICAM-1 [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(4): 294-299.
- [3] WEI L Y, ZHANG J, HOU H F. Experimental study of antitumor function of aloe polysaccharid [J]. Chin Foreign Med Treat(中外医疗), 2008, 27(23): 69-69.
- [4] LI M M, SHENG Y H, JIN X L, et al. Antitumor effects of aloe polysaccharide from *A. barbadensis* and *A. arborescens* in vivo [J]. J Qiqihar Med Coll(齐齐哈尔医学院学报), 2009, 30(21): 2617-2618.
- [5] LIU X H, DONG L, HOU X Y, et al. Inhibitory effects of aloe polysaccharide enhances cisplatin on growth of lung adenocarcinoma in nude mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(12): 1080-1084.
- [6] HUANG J, YANG A P, JIANG G S. Study on extraction of polysaccharide from Chinese aloe [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2004, 18(2): 58-59.
- [7] XU Z, CHEN X, ZHONG Z, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities [J]. Am J Chin Med, 2011, 39(1): 15-27.
- [8] ZHAN Q M. Molecular Oncology(分子肿瘤学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 403-413.
- [9] LEE E W, SEO J, JEONG M, et al. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis [J]. BMB Rep, 2012, 45(9): 496-508.
- [10] YAN C, OH J S, YOO S H, et al. The targeted inhibition of mitochondrial Hsp90 overcomes the apoptosis resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B cells via necroptosis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 266(1): 9-18.
- [11] KURANAGA E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo [J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 83-97.

收稿日期: 2013-05-04

缬沙坦对 IgA 肾病大鼠血清 IgA1 异常糖基化的影响

包自阳¹, 朱彩凤¹, 李建秋², 朱斌¹ (1. 杭州市中医院, 杭州 310007; 2. 温岭市中医院肾内科, 浙江 温岭 317500)

摘要: 目的 观察 IgA 肾病(IgAN)大鼠血清 IgA1 异常糖基化的程度及缬沙坦对其影响。方法 将 ♂ SD 大鼠随机分为正常对照组、IgAN 组、缬沙坦组、泼尼松组, 每组 12 只。采用口服牛血清白蛋白(BSA)和尾静脉注射 BSA 和葡萄球菌肠毒素(SEB)的方法建立 IgAN 大鼠模型, 缬沙坦组给予缬沙坦 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 泼尼松组给予泼尼松 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 灌胃给药。分别于 1, 8, 12 周测 24 h 尿蛋白量; 12 周处死大鼠取血, ELISA 法测血清 IgA 含量, 凝集素亲和 ELISA 法检测血清 IgA 异常糖基化的程度; 肾组织切片观察病理学改变。结果 造模 8 周后 IgAN 组、缬沙坦组、泼尼松组大鼠尿蛋白

基金项目: 杭州市医药卫生科技计划项目(2008A022)

作者简介: 包自阳, 男, 硕士, 主治医师 Tel:0571-85827521 E-mail: baozycn@sina.com