

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.21.017

天花粉蛋白对肺癌 A549 细胞 JNK、Bcl-2 蛋白表达的影响

庄 静¹, 孙伟国¹, 汪丛丛², 刘瑞娟¹, 吕庆亮², 曹晓靖³, 孙长岗^{*}

(1. 潍坊市中医院, 山东省潍坊市潍州路 1055 号, 261041; 2. 潍坊医学院; 3. 山东中医药大学)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273987); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2013HQ005)

摘要 目的 观察天花粉蛋白 (TCS) 对人肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响, 并探讨其可能作用机制。方法 取对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞, 调整细胞浓度至 2×10^4 /ml, 接种于 96 孔培养板中预培养 24 h 后加入 TCS 注射液, 使每组含 TCS 最终浓度分别为: 0.04、0.08、0.12、0.16 mg/ml, 每个剂量分别设 4 个复孔, 并设正常细胞组作对照, 细胞共育 24 h。分别于 24、48、72 h 光镜下观测凋亡细胞计数, 计算凋亡指数。选用 JNK 特异抑制剂 SP600125, 实验分为空白对照组、SP600125 组 (20 nmol/L, 100 μ l)、TCS 组 (0.12 mg/ml, 100 μ l)、TCS 加 SP600125 组 (100 μ l), 采用 Western blot 法检测各组 JNK、Bcl-2 蛋白表达水平。结果 与空白对照组比较, 除 0.08 mg/ml 组 24 h 外, 0.08 mg/ml 组、0.12 mg/ml 组、0.16 mg/ml 组各时间点凋亡指数均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与本组 24 h 比较, 0.04 mg/ml 组 48 h 和 0.08 mg/ml 组、0.12 mg/ml 组、0.16 mg/ml 组 32 h、48 h 凋亡指数均明显升高 ($P < 0.05$)。与 SP600125 组比较, TCS 组、TCS 加 SP600125 组 JNK 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达下降 ($P < 0.05$); 与 TCS 组比较, TCS 加 SP600125 组 JNK 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 TCS 可能通过 JNK 信号转导通路的激活诱导肺腺癌 A549 细胞 Bcl-2 的表达下降, 从而导致细胞凋亡。

关键词 天花粉蛋白; 肺癌; 细胞凋亡; JNK; Bcl-2

天花粉为葫芦科栝楼属植物栝楼、日本栝楼或双边栝楼的根^[1]。天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 是从天花粉中提取的单链核糖体失活蛋白, 具有抗肿瘤、提高机体免疫力、抗人体免疫缺陷等功效^[2]。本课题组前期试验已证实天花粉蛋白对肺癌细胞有明显的诱导凋亡作用^[3]。细胞凋亡过程受到相关基因的调控, 目前认为与细胞凋亡相关的基因有 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 家族、Fas、p53 等, 其中 Bcl-2 是凋亡调控的中心环节^[4]。本文进一步研究了 TCS 诱导肺癌 A549 细胞凋亡过程中 C-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号转导通路在调节 Bcl-2 蛋白表达水平中的作用, 以便从细胞和分子水平上揭示 TCS 诱导 A549 细胞凋亡的机理。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肺癌细胞系 A549, 上海普林斯顿生物科技发展有限公司提供; 天花粉蛋白注射液 (1.2 mg/

ml, 上海金山制药有限公司, 批号: 091001); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号: 1285082); MTT (Amresco 公司, 批号: 3407A790); 二甲基亚砜 (DMSO, 四季青公司, 批号: 20080608); SP600125 (美国 Alexis 公司, 批号: 129566); 鼠抗人 β -actin 抗体 (Sigma 公司, 批号: A5441); 鼠抗人 JNK (批号: SC6254)、鼠抗人 Bcl-2 单抗 (批号: SC7382) 及 HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (批号: SC5276) 均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞株培养

A549 细胞采用 RPMI-1640 培养液, 加入 10% 胎牛血清、80 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和度条件下的细胞培养箱中培养, 取其对数生长期细胞待用。

1.3 MTT 法测定 TCS 对人肺腺癌 A549 细胞的凋亡作用

取对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞, 调整细胞浓度至 2×10^4 /ml, 接种于 96 孔培养板中预培养

* 通讯作者: zhongliuyike@163.com, (0536) 8060165

24 h 后加入 TCS 注射液, 使最终每组合 TCS 浓度分别为: 0.04、0.08、0.12、0.16 mg/ml, 每个剂量分别设 4 个复孔, 并设正常细胞组作对照, 与细胞共育 24 h。分别于 24、48、72 h 进行 MTT 比色实验: 每次于实验结束前每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光培养 4 h, 使 MTT 还原为三苯基甲脂。每孔加 DMSO 150 μ l, 震荡并混匀, 使三苯基甲脂充分溶解, 10 min 后置于酶标仪 570 nm 检测吸光度 A 值, 以空白对照组平均值调零。光镜下观测凋亡细胞计数, 凋亡指数 = (凋亡细胞数 $\div$ 总细胞数) $\times$ 100%。

1.4 Western blot 法检测 A549 细胞内 JNK 蛋白表达
张铎等^[8]研究发现, TCS 能够激活肿瘤细胞的 JNK 通路, 同时被证实可以在不同细胞系中诱发细胞凋亡。因此, 我们选用 JNK 特异抑制剂 SP600125 阻断 JNK 通道的磷酸化。常规培养 A549 细胞 48 h, 调整细胞数为 1×10^5 /ml, 每孔加入 200 μ l 细胞悬液, 且每组设 3 个复孔。实验分为空白对照组、SP600125 组 (20 nmol/L, 100 μ l)、TCS 组 (0.12 mg/ml, 100 μ l)、TCS 加 SP600125 组 (100 μ l) 共 4 组, 用 Western blot 法分别检测各自的 JNK 蛋白表达水平 (相对表达量)。

1.5 Western blot 法检测 A549 细胞内 Bcl-2 蛋白的表达

取对数生长期 A549 细胞, 选用 JNK 通道特异性抑制剂 SP600125 阻断 JNK 通道的磷酸化, 实验分组及给药方法同上, Western blot 法检测抑制剂加入前后 Bcl-2 蛋白表达变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用方差分析 (LSD 法)。

2 结果

2.1 不同浓度 TCS 对 A549 细胞凋亡的影响

光镜下, 经 TCS 处理后 A549 细胞凋亡数明显增加, 棕褐色染色颗粒定位于细胞核内。染色阳性的 A549 细胞出现细胞核碎裂, 核质固缩, 细胞膜突出形成质膜小泡等凋亡细胞形态学变化。表 1 示, 随着 TCS 作用时间的延长, 细胞凋亡发生率明显增高。与空白对照组比较, 除 0.08 mg/ml 组 24 h 外, 0.08 mg/ml 组、0.12 mg/ml 组、0.16 mg/ml 组各时间点凋亡指数均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与本组 24 h 比较, 0.04 mg/ml 组 48 h 和 0.08 mg/ml 组、0.12 mg/ml 组、0.16 mg/ml 组

32 h、48 h 凋亡指数均明显升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组肺癌 A549 细胞凋亡指数比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	32 h	48 h
空白对照组	5	2.12 $\pm$ 1.56	2.49 $\pm$ 2.14	2.67 $\pm$ 1.76
0.04 mg/ml 组	5	3.28 $\pm$ 1.21	4.25 $\pm$ 1.32	4.45 $\pm$ 1.08 $^{\Delta}$
0.08 mg/ml 组	5	6.10 $\pm$ 2.33	8.22 $\pm$ 2.10 $^{* \Delta}$	9.18 $\pm$ 2.34 $^{* \Delta}$
0.12 mg/ml 组	5	6.63 $\pm$ 1.32 *	9.01 $\pm$ 1.89 $^{* * \Delta}$	9.57 $\pm$ 2.21 $^{* * \Delta}$
0.16 mg/ml 组	5	7.25 $\pm$ 1.88 *	9.38 $\pm$ 1.23 $^{* * \Delta}$	10.25 $\pm$ 1.88 $^{* * \Delta}$

注: 与空白对照组同时时间点比较, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组人肺腺癌 A549 细胞 JNK 蛋白、Bcl-2 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白对照组比较, SP600125 组和 TCS 组 JNK、Bcl-2 蛋白表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 SP600125 组比较, TCS 组、TCS 加 SP600125 组 JNK 蛋白表达明显升高, Bcl-2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 与 TCS 组比较, TCS 加 SP600125 组 JNK 蛋白表达明显降低, Bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组肺癌 A549 细胞 JNK、Bcl-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	JNK 蛋白	Bcl-2 蛋白
空白对照组	5	0.46 $\pm$ 0.018	0.47 $\pm$ 0.016
SP600125 组	5	0.28 $\pm$ 0.025 *	0.53 $\pm$ 0.021 *
TCS 组	5	0.64 $\pm$ 0.021 $^{* \Delta}$	0.35 $\pm$ 0.018 $^{* \Delta}$
TCS 加 SP600125 组	5	0.38 $\pm$ 0.015 $^{\Delta \Delta}$	0.43 $\pm$ 0.200 $^{\Delta \Delta}$

注: 与空白对照组比较, $^* P < 0.05$; 与 SP600125 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 TCS 组比较, $\Delta \Delta P < 0.05$

3 讨论

TCS 是我国传统中药天花粉的有效成分, 已被临床证实有良好的抗肿瘤作用^[9]。既往研究证实, 诱导肿瘤细胞凋亡是部分抗癌化疗药物的作用机制之一^[10]。TCS 可诱导细胞凋亡过程中微丝、微管的改变, 使肌动蛋白和微管蛋白基因的表达受到了不同程度的抑制, 诱导细胞凋亡^[11]。本研究结果显示, 经 TCS 处理后, 在 0.04 ~ 0.16 mg/ml 浓度范围内, 细胞凋亡率逐渐升高, 提示 TCS 可以诱导 A549 细胞的凋亡, 并且这种作用呈时间依赖性。

JNK 信号通路属于促分裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 家族成员之一, 参与调节细胞骨架、细胞增殖与分化、细胞凋亡等多种生物学行为。既往研究发现, 一些常见的抗肿瘤药物能够通过激活 JNK 信号通路诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡, 并伴有 Bcl-2 蛋白表达水平下降^[12-14]。本研究中, 空白对

照组 JNK 表达呈弱阳性, 而 TCS 作用于肺癌 A549 细胞后被激活的 JNK 增加, 说明 TCS 可以激活 JNK 信号转导通路。Bcl-2 是一种抗凋亡基因, 在细胞凋亡调节的途径上起着决定性作用。本实验观察 TCS 组 Bcl-2 蛋白表达较空白对照组下降; SP600125 组加入 JNK 通道特异性抑制剂 SP600125 后, Bcl-2 表达上升, 但经 TCS 干预后, Bcl-2 表达又下降, 说明 TCS 通过活化 JNK 通路调节 Bcl-2 的表达达到抗肿瘤的目的。

综上所述, 本实验证实 TCS 可以明显诱导肺癌 A549 细胞的凋亡, 且这种诱导作用是通过激活 JNK 信号转导通路以调节 Bcl-2 的表达完成的。

参考文献

- [1] 沈映君. 中药药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 186.
- [2] Wang BL, Su H, Chen Y, et al. A role for trichosanthin in the expansion of CD4CD25 regulatory T cells [J]. Scand J Immunol, 2010, 71(4): 258-266.
- [3] 庄静, 孙长岗, 汪丛丛, 等. 天花粉蛋白对肺癌 A549 细胞凋亡及细胞骨架微管结构改变的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(11): 1-4.
- [4] Xiao Y, Zheng Y, Tan P, et al. Overexpression of nuclear distribution protein (hNUDC) causes pro-apoptosis and differentiation in Dami megakaryocytes [J]. Cell Prolif, 2013, 46(5): 576-585.
- [5] 张铎, 陶磊, 路丽明. 天花粉蛋白(TCS)诱导肿瘤细胞凋亡及其抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(6): 663-667.
- [6] Kang M, Ou H, Wang R, et al. Effect of trichosanthin on apoptosis and telomerase activity of nasopharyngeal carcinomas in nude mice [J]. J Buon, 2013, 18(3): 675-682.
- [7] Chen J, Zhao X, Ye Y, et al. Estrogen receptor beta-mediated proliferative inhibition and apoptosis in human breast cancer by calycosin and formononetin [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(6): 1790-1797.
- [8] Wang P, Li JC. Trichosanthin-induced specific changes of cytoskeleton configuration were associated with the decreased expression level of actin and tubulin genes in apoptotic Hela cells [J]. Life Sci, 2007, 81(14): 1130-1140.
- [9] Su JC, Lin KL, Chen CM, et al. Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in A549 cells through JNK/p38 MAPK signaling activation [J]. Life Sci, 2009, 85(13-14): 505-516.
- [10] 黄川, 袁铿. JNK、p38MAPK 信号通路与肿瘤细胞凋亡 [J]. 实验与检验医学, 2012, 30(5): 447-452.

Effects of Trichosanthin on the Expressions of JNK and Bcl-2 in Lung Cancer Cell Line A549

ZHUANG Jing¹, SUN Weiguo¹, WANG Congcong², LIU Ruijuan¹, LÜ Qingliang², CAO Xiaojing³, SUN Changgang¹

(1. TCM Hospital of Weifang, Shandong Province, 261041; 2. Weifang Medical College; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the effect of trichosanthin (TCS) on cell apoptosis of lung cancer cell line A549 and explore its possible mechanism of action. **Methods** The human lung adenocarcinoma cell line A549 in exponential growth period was selected. The cell concentration was adjusted to 2×10^4 /ml and inoculated in 96-well plate. After pre-culture for 24 hours, TCS injection was added. Finally, the concentration of TCS in each group was adjusted to 0.04 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.12 mg/ml and 0.16 mg/ml respectively. Each dosage was made in quadruplicate and the normal cell group was set as control. The cells were cultured for 24 hours. The apoptosis cells were counted under light microscope and the apoptotic index was calculated at 24 h, 48 h and 72 h. The JNK specific inhibitor SP600125 was chosen and four groups such as blank control group, SP600125 group (20 nmol/L, 100 μ l), TCS group (0.12 mg/ml, 100 μ l) and TCS and SP600125 group (100 μ l) were set. The expressions of JNK and Bcl-2 in each group were detected with Western blot method. **Results** Comparing with the control group, the apoptotic index was significantly increased in 0.08 mg/ml, 0.12 mg/ml and 0.16 mg/ml groups at each time point except 0.08 mg/ml group at 24 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with at 24 h, the apoptotic index was significantly increased at 48 h in 0.04 mg/ml group ($P < 0.05$). Comparing with 0.04 mg/ml group at 24 h, the apoptotic index was significantly increased in 0.08 mg/ml group, 0.12 mg/ml group and 0.16 mg/ml group at 32 h and 48 h ($P < 0.05$). Comparing with SP600125 group, the JNK expression of A549 cell was significantly increased but the Bcl-2 expression was significantly decreased in TCS group and TCS and SP600125 group ($P < 0.05$). Comparing with TCS group, the JNK expression of A549 cell was significantly decreased but Bcl-2 expression was significantly increased in TCS and SP600125 group ($P < 0.05$). **Conclusion** TCS may induce the decrease of Bcl-2 expression of lung adenocarcinoma cell line A549 by activating JNK signaling pathway to cause cell apoptosis.

Keywords trichosanthin; lung cancer; cell apoptosis; JNK; Bcl-2

(收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-05-16)

编辑: 邓 媛