

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.003

高良姜素诱导肺癌 A549 细胞凋亡的研究

伍俊¹, 文敏², 张海涛²

Galangin Induces Apoptosis on Lung Cancer A549 Cells

WU Jun¹, WEN Min², ZHANG Hai-tao²

1. Institute of Respiration, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College

Corresponding Author: ZHANG Hai-tao, E-mail: taohaizhang@tom.com

Abstract: Objective To investigate apoptosis induced by Galangin in lung cancer A549 cells. **Methods** Cell inhibition ratio was assayed by MTT method. Morphologic assessment of apoptosis was performed with a fluorescence microscope, and cell cycle and mitochondrial membrane potential were analyzed by flow cytometry. The expression levels of proteins were measured by Western blot. **Results** A549 cells were inhibited by Galangin in a dose-dependent manner. IC_{50} of Galangin was 30.15 mg/L. The apoptosis appeared in 24 hours after treated by Galangin. Morphologic changes including nuclear chromatin condensation fluorescence strength was observed through fluorescence microscope. Caspases were activated. The expression of Bcl-2 and Bcl-X_L decreased, while the expression of p53, Bax and Bid increased. **Conclusion** Galangin could induce A549 cell apoptosis through mitochondria pathway.

Key words: Galangin; A549 cell; Fluorescence; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

摘要:目的 研究高良姜素诱导肺癌细胞系 A549 细胞凋亡效应。**方法** MTT 法测定 A549 细胞生长抑制率, 荧光显微镜观察细胞形态学的变化, 流式细胞仪分析细胞周期和线粒体膜电位的变化。Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白的表达变化。**结果** 随高良姜素浓度增高, A549 细胞生长抑制率明显上升, IC_{50} 在 30.15 mg/L。细胞凋亡可在 10~80 mg/L 高良姜素处理后 24 h 出现, 呈浓度依赖性。高良姜素使线粒体膜电位降低。Caspases 被激活, Bcl-2、Bcl-X_L 表达下调, p53、Bax、Bid 表达呈浓度依赖性上调。**结论** 高良姜素可能是通过线粒体途径诱导 A549 细胞发生凋亡。

关键词: 高良姜素; A549; 荧光; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2011)11-1228-04

0 引言

高良姜(galangin)别名小良姜, 为姜科植物, 是一种热带多年生长的山姜, 属食药兼用植物。高良姜在我国古代的诸多药典如《本草纲目》和《图经本草》中均有记载, 为常用中药, 具有“温中、祛风、散寒、行气、止痛之功效”。高良姜素是一种天然的黄酮醇类化合物, 主要提取自中药材高良姜的根茎。高良姜素不仅具有抗氧化、抗溃疡镇痛消炎抗菌作用, 还有抗肿瘤作用^[1]。化疗是治疗晚期肺癌患者的重要手段, 临床上化疗失败的主要原因是肺癌细胞对抗肿瘤药物产生耐药。从植物中筛选有效的活性物

质用来治疗肿瘤, 因其不良反应小, 日益受到研究者的关注。本实验选用人肺腺癌细胞株 A549 作为体外模型, 观察高良姜素对肺腺癌细胞生长的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM 培养液(美国 Gibco 公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Serva 公司); 高良姜素(用 DMSO 溶解, 储备液浓度为 100 g/L), hochest 33258, 罗丹名 123, 碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司。抗体均来自 Santa Cruz Biotechnology, 发光试剂为 Amersham Biosciences 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺癌细胞系 A549 由广东医学院生物化学与分子生物学研究所馈赠。用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 37℃、5%CO₂ 培养。

1.2.2 细胞生长测定 收集生长状况良好的 A549

收稿日期: 2010-12-30; 修回日期: 2011-06-15

基金项目: 广东省科技计划资助项目(00124381120302036); 东莞市科技计划资助项目(200910815258); 广东省中医药管理局资助项目(2010190)

作者单位: 1. 524023 广东湛江, 广东医学院呼吸疾病研究所; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学教研室

通信作者: 张海涛, E-mail: taohaizhang@tom.com

作者简介: 伍俊(1973-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事肺癌的基础和临床研究

细胞,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养,细胞浓度 1.0×10^5 个/毫升,加入用培养液稀释至相应浓度的高良姜素,使之终浓度为 0、5、10、20、40、80 mg/L,每一浓度重复四孔,用 96 孔培养板 37°C 、5% CO_2 培养箱中分别培养 24 h,用 MTT 法测细胞生长,记录各组细胞的吸光度值。

1.2.3 荧光染色 用不同浓度高良姜素 37°C 、5% CO_2 环境中处理 A549 细胞 24h,按文献提供的方法进行荧光染色^[2],荧光显微镜观察。

1.2.4 细胞周期分析^[3] A549 细胞用不同浓度高良姜素 37°C 、5% CO_2 作用 24 h,用磷酸缓冲液洗细胞,75% 预冷乙醇固定过夜,1 000 r/min 离心弃乙醇,用含 PI 100 mg/L、0.5% Triton-x100、RNase 200 mg/L 培养 15 min,流式细胞仪检测。

1.2.5 线粒体膜电位的检测^[4] A549 细胞用不同浓度的高良姜素 37°C 、5% CO_2 作用 24 h,加入罗丹名 123(10 mg/L) 染色,流式细胞仪检测。

1.2.6 Western blot 检测蛋白质表达变化 用不同浓度高良姜素 37°C 、5% CO_2 环境中处理 A549 细胞 24 h,收集细胞,细胞用裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% NP40, 0.05% phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin (Sigma, USA), 和 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin (Sigma, USA), pH 8.0) 处理。按前述方法进行 Western blot 检测^[5],抗体均来自 Santa Cruz Biotechnology,发光试剂用 Amersham Biosciences 公司产品。

1.2.7 细胞质中细胞色素 C(cytC)水平检测 高良姜素处理后,细胞用冰冷的 PBS 漂洗干净,然后用 5 倍体积冰冷的抽提缓冲液(20 mmol/L Hepes-KOH, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 和 0.1 mmol/L PMSF, pH 7.5) 悬浮,将细胞破碎,750 $\times g$, 4°C 离心 10 min,去细胞碎片,悬浮液 13 000 $\times g$, 4°C 离心 15 min,弃沉淀,悬液为细胞质成份。用 Western blot 检测细胞色素 C 含量变化^[6]。

1.3 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验数据采用

SPSS13.0 统计软件分析,对照组与各处理组之间比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高良姜素对 A549 细胞生长的影响

高良姜素处理 A549 细胞 24 h, IC_{50} 约为 30.15 mg/L,见图 1。

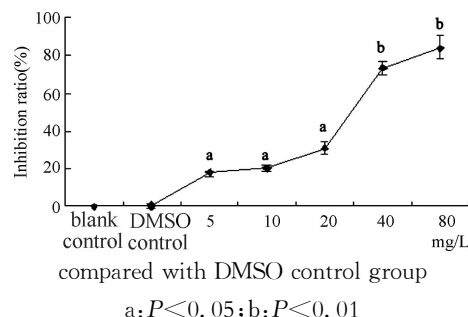


图 1 高良姜素对 A549 细胞的抑制率

Figure 1 Inhibition ratio of Galangin to A549 cells

2.2 荧光染色观察结果

Hoechst33258 是一种 DNA 结合荧光染料,细胞凋亡时,由于核固缩,染色质凝集,结合染料后,紫外激发下可产生亮蓝色块状或点状荧光。

10 mg/L 可见少量凋亡细胞,40、80 mg/L 高良姜素处理 A549 细胞 24 h,可见大量典型凋亡细胞,见图 2。

2.3 高良姜素对 A549 细胞周期的影响

高良姜素对 A549 细胞周期的影响比较复杂,不同浓度的高良姜素对细胞周期影响效果有差异。10 mg/L 高良姜素作用细胞后,虽然出现 G_1 期细胞上升, S 期细胞减少, G_2 期细胞下降的趋势,但与对照组相比均无统计学意义;20 mg/L 高良姜素作用细胞后发现, G_1 、 G_2 期细胞显著增加, S 期细胞显著减少;40 mg/L 高良姜素作用细胞发现, G_1 期细胞与对照组比较变化不显著,而处于 S 期细胞显著增加, G_2 期细胞降低;80 mg/L 高良姜素作用细胞发现,与对照组比较 G_1 期细胞显著增加, S 期细胞变化不显著, G_2 期细胞显著下降。此外观察到随高良姜素浓度升高,亚二倍体峰升高,提示细胞凋亡比率增加,见图 3。

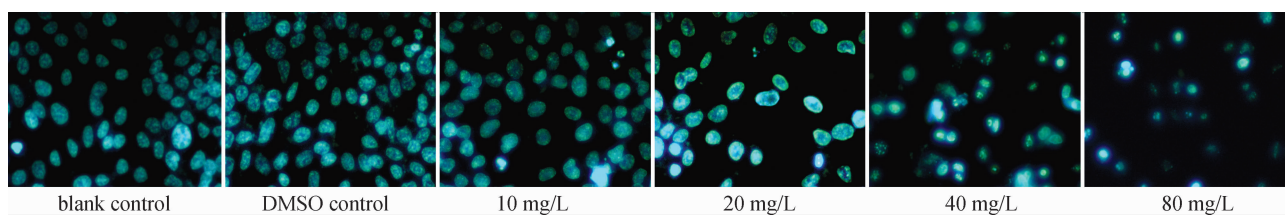
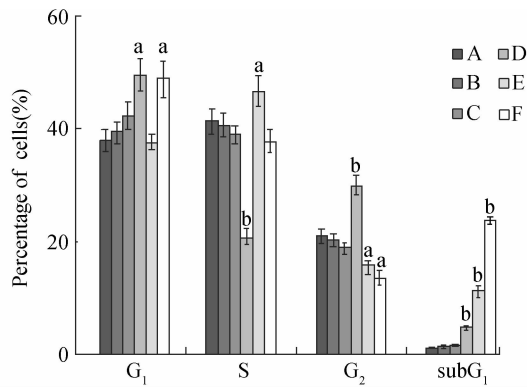


图 2 Hoechst 33258 染色观察 A549 细胞凋亡($\times 400$)

Figure 2 Observation of A549 cells apoptosis staining with Hoechst 33258($\times 400$)



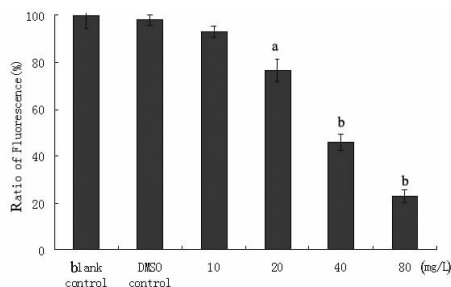
A: control; B: DMSO control; C: 10 mg/L Galangin; D: 20 mg/L Galangin; E: 40 mg/L Galangin; F: 80 mg/L Galangin; A549 cells treated with different concentrations Galangin vs. DMSO control cells (multiple comparison), a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

图 3 高良姜素对 A549 细胞周期的影响 ($n = 4$)

Figure 3 Effect of Galangin on A549 cell cycle ($n = 4$)

2.4 高良姜素对线粒体膜电位的影响

随着高良姜素浓度增加, 细胞线粒体膜电位下降, 见图 4。



A549 cells treated with different concentrations Galangin vs. DMSO control cells (multiple comparison), a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

图 4 高良姜素对线粒体膜电位的影响 ($n = 4$)

Figure 4 Effect of Galangin on mitochondrial membrane potential ($n = 4$)

2.5 高良姜素对蛋白表达的影响

数据显示, 高良姜素能浓度依赖性地上调 p53、Bid 和 Bax 蛋白水平, 同时浓度依赖性下调 Bcl-2 和 Bcl-X_L 的蛋白水平。结果还显示高良姜素能浓度依赖性地上调细胞色素 c 在细胞质中的水平。同时分析了高良姜素对 procaspase-3、pro-caspase-8、procaspase-9 和 PARP 水平变化及对切割的影响。结果显示, procaspase-3、procaspase-9 的激活和 PARP 切割水平呈浓度依赖性。80 mg/L 高良姜素使 caspase-8 和 Bid 切割片段显著增加, 见图 5。

3 讨论

高良姜素具有明显的抗癌、抗氧化、抗病毒、抗

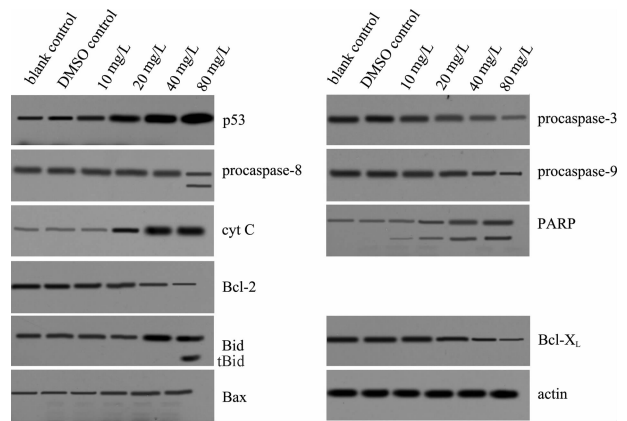


图 5 高良姜素对蛋白质表达的影响

Figure 5 Effect of Galangin on protein expression

致畸等作用, 目前日益得到关注, 是一种亟待开发的新药物^[1]。本研究结果表明高良姜素可以抑制人肺癌细胞株 A549 细胞生长, 24 h 时的 IC_{50} 对应浓度约在 30.15 mg/L 左右。细胞生长曲线表明高良姜素对 A549 细胞抑制作用呈浓度依赖性的。

细胞色素 c 是线粒体内促进细胞凋亡的蛋白因子, 它从线粒体内膜释放到细胞质中被认为是凋亡过程中的关键事件。细胞色素 c 是一种重要的电子传递链蛋白, 影响线粒体膜电位和 ATP 合成。释放到细胞质中的细胞色素 c 能结合在细胞质中的 Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), 通过改变构型结合 dATP 或 ATP 形成凋亡复合体。凋亡复合体招募 caspase-9 酶原 (procaspase-9), 最终激活 caspase-9 和 caspase-3。caspase 激活的级联放大作用导致关键的蛋白酶水解激活, 裂解基因组 DNA 的核小体成 180 bp 倍数的 DNA 片段。caspase-3 是凋亡的执行蛋白, 它能水解许多细胞内重要的底物导致染色质凝聚, 形成 DNA 片段, 核膜降解, 磷脂酰丝氨酸外露, 形成凋亡小体^[7]。本结果显示高良姜素诱导细胞色素 c 释放和降低线粒体膜电位。本数据同样显示, 高良姜素处理后, A549 细胞内的 caspase-9、caspase-3 被激活和 PARP 切割水平增加。显然线粒体凋亡途径参与高良姜素诱导 A549 细胞凋亡。

Bcl-2 家族蛋白涉及影响线粒体凋亡途径, Bcl-2 家族蛋白可以根据 Bcl-2 同源结构域 (BH1 - 4 domains) 分为三类。Bcl-2、Bcl-w、Bcl-x_L 和 Mcl-1 均含有 BH1-4 结构域定位在线粒体外膜, 他们是抗凋亡的蛋白^[8]。这些蛋白可以通过与 Bcl-2 家族中促进细胞凋亡的成员结合抑制线粒体凋亡途径。促进细胞凋亡的 Bcl-2 家族成员按照他们的功能分为两类: 一类是效应分子, 包括 Bak 和 Bax, 这类蛋白分子可以改变线粒体膜的通透性促进细胞色素 c 释放到细胞质中; 另一类是仅含有 BH3 结构域的蛋

白,包括 Bad、Bid、Bik、Bim、Bmf、bNip3、Hrk、Noxa 和 Puma。本研究显示,高良姜素下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 的蛋白水平,同时上调促进细胞凋亡的 Bax 和 Bid 的水平升高。最终造成 Bax 蛋白与 Bcl-2、Bcl-X_L 分离,Bax 转移到线粒体膜上并形成同源聚合体,增加线粒体膜的通透性,细胞色素 c 被释放到细胞质中。Bid 的切割与线粒体凋亡途径密切相关。以往研究显示,Bid 是 caspase-8 的底物,激活的 caspase-8 切割 Bid 可以放大线粒体凋亡途径,促使细胞凋亡增加^[9]。

本研究显示,当高良姜素浓度为 80 mg/L 时,caspase-8 切割明显增加,同时 Bid 切割增加,Western blot 结果显示明显的切割片段 tBid,同时细胞凋亡率显著增加。推测 10~40 mg/L 的高良姜素诱导激活 caspase-3、caspase-9,诱导细胞凋亡,此时 Bid 和 caspase-8 不参与这一过程,当高良姜素浓度为 80 mg/L 时,大量激活的 caspase-3 足以激活 caspase-8,激活的 caspase-8 大量切割 Bid,Bid 切割片段 tBid 被棕榈酰化后转移到线粒体膜上,进一步促进线粒体通透性增加,放大线粒体凋亡途径,显著增加细胞凋亡的比率。

流式细胞仪分析发现,不同浓度的高良姜素对细胞周期影响效果不同可能与高良姜素诱导 A549 细胞 p53 和 Bid 表达变化有关。研究表明 A549 细胞 p53 的表型是野生型^[10]。结合 Bid 和 p53 的表达变化对高良姜素诱导细胞周期的变化进行分析发现 10 mg/L 高良姜素作用细胞后,细胞周期变化不显著,相应的 Bid、p53 表达变化不显著;20 mg/L 高良姜素作用细胞发现,G₁ 期细胞显著增加,S 期细胞显著减少,相应的 p53 表达上调,Bid 上调不明显。说明 p53 上调抑制细胞周期,阻滞细胞于 G₁ 期。

40 mg/L 高良姜素作用细胞发现,细胞阻滞在 S 期,此时 p53 和 Bid 表达显著增加,细胞内无 Bid 切割片段 tBid 被检测到,Bid 表达显著上调可能受 p53 的调控^[11]。40 mg/L 高良姜素诱导细胞周期阻滞在 S 期可能与 Bid 表达显著上调密切相关。有研究表明,全长 Bid 对细胞周期 S 期检验点起调控作用,当细胞 DNA 受到损伤时,Bid 被 p53 转运到细胞核,在核内 Bid 第 78 位氨基酸被 DNA 损伤酶 ATM 磷酸化,执行周期检验的功能,参与细胞周期的调控,促进细胞周期停滞在 S 期^[12]。

80 mg/L 高良姜素作用细胞发现,p53 表达显著上调,Bid 切割片段显著增加;此时,caspase-8 的

切割片段明显增加,说明 caspase-8 大量激活,作为 caspase-8 底物的 Bid 不再转运到细胞核中参与细胞周期 S 期的调控,而是在细胞质中直接被 caspase-8 切割成 tBid,参与细胞凋亡。因而此时细胞周期的调控主要表现为 p53 影响,结果表现为 G₁ 期细胞增加。本实验为高良姜的开发利用及肺癌的治疗提供了新的依据。

参考文献:

- [1] Zhang HT, Luo H, Wu J, et al. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(27): 3377-3384.
- [2] Wu J, Hu CP, Gu QH, et al. Trichostatin A sensitizes Cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1): 93-101.
- [3] 张海涛, 冯哲玲, 梁念慈, 等. 丁酸钠诱导 Raji 细胞表达 DAPK 的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(12): 1438-1441.
- [4] Zhang HT, Wu J, Zhang HF, et al. Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by Tachyplesin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(10): 1367-1374.
- [5] Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, et al. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, 45(3): 199-206.
- [6] Tungtekkhun SS, Filippova M, Fodor N, et al. The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain [J]. *J Virol*, 2010, 84(3): 1453-1463.
- [7] Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11549-11556.
- [8] Chipuk JE, Green DR. How do bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4): 157-164.
- [9] Roy J, Palapati P, Bettaieb A, et al. Acrolein induces apoptosis through the death receptor pathway in A549 lung cells: role of p53 [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 353-368.
- [10] O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(19): 4285-4300.
- [11] Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule is at the cross road of life and death [J]. *Gene*, 2006, 369: 7-19.
- [12] Song G, Chen GG, Chau DK, et al. Bid exhibits S phase checkpoint activation and plays a pro-apoptotic role in response to etoposide-induced DNA damage in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(5): 693-701.

[编辑:周永红;校对:刘红武]