

紫花牡荆素与 EGCG 联合应用对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制及凋亡作用

李霞, 应雪*, 闫荷露, 王亚华, 徐浩伦, 刘雪滢, 唐辉

(新疆石河子大学药学院植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的:**研究紫花牡荆素(casticin, CAS)与表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-Epigallocatechin gallate, EGCG]联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用。**方法:**培养肺腺癌 A549 细胞,取对数生长期细胞活性 >95% 的细胞进行实验。SRB 法考察 CAS(0.5, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合 EGCG(1, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 A549 细胞的增殖抑制作用;激光共聚焦显微镜观察 CAS + EGCG 联合用药在 A549 细胞中的分布行为;流式细胞仪检测 CAS + EGCG 联合用药对 A549 细胞的凋亡作用;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 CAS + EGCG 用药对 A549 细胞中 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的干预作用。**结果:**不同浓度各药物在 24, 48 h 对肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);各浓度 CAS + EGCG 用药对肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制率均高于同浓度 CAS 或 EGCG 单独用药($P < 0.05$)。培养至 24 h 时, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS 与 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈协同作用。培养至 48 h 时, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS 与 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS 与 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS 与 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈相加作用;通过激光共聚焦显微镜观察, CAS(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合 EGCG(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组进入 A549 细胞的数量高于同浓度 CAS 或 EGCG 单独用药。流式细胞仪检测表明, 给药后将细胞培养至 24 h 时, 各浓度 CAS + EGCG 用药对肺腺癌 A549 细胞凋亡率高于相同 CAS 或 EGCG 浓度下单独用药($P < 0.05$)。Western blot 检测显示, 与单用药组相比, CAS + EGCG 联合用药可增强 Bax 蛋白的表达量以及减少 Bcl-2 蛋白的表达量($P < 0.01$)。**结论:**与单用药相比, CAS + EGCG 联合用药能够显著增强对 A549 细胞抑制及诱导凋亡作用, 且诱导凋亡作用机制与 Bcl-2 和 Bax 蛋白相关。

[关键词] 紫花牡荆素; 表没食子儿茶素没食子酸酯; A549 细胞; 凋亡; 抗增殖作用

[中图分类号] R242; R273; R285.5; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0105-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180923

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180222.1654.006.html>

[网络出版时间] 2018-02-22 22:24

Effect of Combined Application of Casticin and EGCG in Proliferation and Apoptosis of A549 Lung Cancer Cells

LI Xia, YING Xue*, YAN He-lu, WANG Ya-hua, XU Hao-lun, LIU Xue-ying, TANG Hui

(Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-proliferative and apoptotic effects of the combined application of casticin (CAS) and (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) on A549 lung cancer cells. **Method:** A549 lung adenocarcinoma cells were incubated, and those with the activity of at least 95% during logarithmic phase were assayed. Next, the anti-proliferative effect of the combined application of CAS (0.5, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and EGCG (1, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on A549 cells was detected by sulforhodamine B

[收稿日期] 20170910(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460540, 81760421); 新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化项目(2015AD007)

[第一作者] 李霞, 在读硕士, 从事药物新剂型的研究, E-mail: 515765186@163.com

[通信作者] * 应雪, 博士, 副教授, 从事药物新剂型的研究, E-mail: yingxue2011@qq.com

(SRB) method. After that, the intracellular distribution of CAS and EGCG was observed under confocal laser scanning microscope. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of A549 lung cancer cells. Protein expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in A549 cells were detected by Western blot. **Result:** The inhibitory rates of these two drugs with different concentrations against A549 cells were statistically different ($P < 0.05$) at 24, 48 h. Additionally, the inhibitory rates of the combined application of CAS + EGCG were significantly higher than the single application of CAS or EGCG with the same concentration ($P < 0.05$). When the cells were incubated for 24 hours after the treatment with $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, the drugs showed an anti-proliferative effect on A549 cells with synergy. Moreover, at 48 hour after the treatment, the combined application of $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS and $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG, as well as $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAS and $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG showed an increased effect on the inhibitory rates on A549 adenocarcinoma cells. According to the observation under laser confocal microscope, the number of the group of CAS ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and EGCG ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) entering A549 cells was obviously higher than the single application of CAS or EGCG with the same concentration. Meanwhile, after the cells were treated for 24 h, the apoptotic rate of the combined application of CAS and EGCG were obviously higher than that of the single application of CAS or EGCG with the same concentration ($P < 0.05$). The expressions of Bax protein of EGCG were obviously higher than that of the single application of CAS or EGCG with the same concentration, while the expression of Bcl-2 was lower than that of the single application of CAS or EGCG with the same concentration ($P < 0.05$). **Conclusion:** The inhibitory and apoptotic effects of co-administrated with CAS and EGCG on A549 lung cancer cells were significantly enhanced compared with those of the single administration, which may be related to Bcl-2 and Bax proteins.

[**Key words**] casticin; (-)-Epigallocatechin gallate; A549 lung cancer cell; apoptosis; anti-proliferation

肺癌是目前世界上发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,严重威胁着人类的生命健康。多数患者在诊断时已处于相对晚期而失去最佳治疗机会。临床治疗采用的放疗和化疗为主的综合治疗,虽有一定成效,但效果并不理想^[1]。由于化疗的无选择性以及放疗很难做到完全去除转移的肺癌细胞,使得药物在杀伤癌细胞的同时也对正常细胞造成伤害。因此,寻找预防和治疗肺癌的天然药物具有重要意义。

紫花牡荆素(casticin, CAS)为 5,3'-二羟基-3,6,7,4'-四甲氧基黄酮,是多甲氧基黄酮类化合物,纯品为淡黄色晶体。近年来,国内外的研究表明,紫花牡荆素对人结肠癌^[2],乳腺癌^[3],宫颈癌^[4],肝癌^[5],胶质瘤^[6],肺癌^[7]以及胃癌^[8]等多种细胞株的增殖有明显抑制作用,但对正常细胞的增殖无影响或影响很小^[9]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin 3-gallate, EGCG)是绿茶提取物儿茶酚中主要成分之一,生物活性最强。有研究报道,EGCG 通过上调人类胶质瘤干细胞的促凋亡蛋白 Bax 的表达,下调抑制凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)蛋白的表达,并增加了下游 DNA 修复酶 (PARP)切割底物的裂解,从而诱导脑胶质瘤干细胞的凋亡,亦有研究发现 EGCG 能通过多种方式

诱导肿瘤细胞凋亡从而抑制细胞的生长^[10-13]。最近临床前研究证明紫杉醇和 EGCG 的组合可以减少乳腺癌细胞的活力^[14-15]。近年来研究表明 CAS 和 EGCG 分别对多种肿瘤细胞的的生长均有抑制作用,但是对 CAS 联合 EGCG 用药诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的研究鲜有报道。因此本实验通过 CAS + EGCG 联合用药作用于 A549 细胞,并观察细胞的生长抑制、细胞内药物分布、细胞的凋亡变化及相关凋亡蛋白表达水平的变化,旨在通过联合应用 CAS 和 EGCG,增强药物对肺腺癌 A549 细胞的抑制作用及诱导其凋亡的能力,降低给药剂量,为日后肺肿瘤的研究提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 试剂和仪器 CAS(成都普瑞法科技开发有限公司,批号 13100805);磺酰罗丹明 B 蛋白(美国 Sigma 公司,批号 1001271699);EGCG(中国植标化纯生物技术有限公司,批号 140916);DMEM F12 培养基,0.25% 胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 8117153,1737903);胎牛血清(杭州四季青生物公司,批号 20160324); β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体,山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 1E9A3,127655);Bcl-2, Bax 单克隆

抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为196841,13CM400A);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20151226);山羊抗兔(天津市光复科技发展有限公司,批号129256);Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒(中国康为世纪公司,批号15082017)。

Sunrise A-5082型酶标免疫测定仪(瑞士Tecan公司),FACSAria III型流式细胞仪(美国BD公司),LSM 510型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司),DYCZ-40D型电泳仪及转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 细胞株及培养条件 肺腺癌A549细胞株购自中国科学院上海细胞库。细胞培养条件为DMEMF12培养基(含10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素),37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱。取对数生长期活性>95%的细胞进行实验。

2 方法

2.1 体外抗增殖检测 取对数生长期的A549细胞3 000个/孔,190 μL/孔接种于96孔板中,37℃ 5% CO₂条件下培养。24 h后,加入用无血清培养液配制的CAS(0.5,1,5,10,15,20 μmol·L⁻¹),EGCG(1,5,10,15,20,25 μmol·L⁻¹),CAS+EGCG用药各10 μL至细胞培养孔中,空白组加入等量的无血清培养液,每种药物设3个复孔,另设溶剂组3个复孔。分别孵育24,48 h后,吸弃培养液,每孔加入4℃预冷的10%三氯乙酸100 μL,静置5 min后移入4℃冰箱中固定1 h后,取出用去离子水冲洗5次,室温晾干。每孔加入0.4% SRB染液100 μL,室温下染色15 min,弃去各孔内染液,用1%乙酸冲洗5次,室温晾干后,用非缓冲Tris-base碱液(10 mmol·L⁻¹,pH 10.5)溶解,在平板振荡器上振荡20 min,采用酶标仪在540 nm波长处测定每孔吸光度A,计算各孔肺腺癌A549细胞的抑制率,根据公式计算各孔A549细胞的存活率。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{给药组 } A_{540 \text{ nm}}}{\text{溶剂组 } A_{540 \text{ nm}}}\right) \times 100\%$$

2.2 药物联合作用评价^[16] 参照公式 $Q = E_{e+i} / (E_e + E_i - E_e \times E_i)$ 评价CAS+EGCG体外联合作用对肺腺癌A549细胞毒性是否具有协同作用,其中 E_{e+i} 为联合用药抑制率, E_e 和 E_i 分别为CAS,EGCG的抑制率, E_{e+i} 代表“实测合并效应”, $E_e + E_i - E_e \times E_i$ 是“期望合并效应”。 Q 0.86~1.15为单纯相加作用(+), Q 1.16~2.00为协同作用(++), Q

0.55~0.85为拮抗作用(-), $Q < 0.55$ 为明显拮抗作用(- -)。

2.3 激光共聚焦显微镜观察药物在肺腺癌A549细胞内分布 将A549细胞以 2×10^4 个/孔接种于12孔板中,待细胞贴壁生长,将CAS,EGCG,CAS+EGCG分别加入各孔(CAS终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,EGCG终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),置CO₂培养箱中,37℃培养2 h,依次用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,4%多聚甲醛固定10 min,Hoechst33258细胞核染色5 min后,PI染色5 min。激光共聚焦显微镜以480 nm波长的激光束激发CAS,以346 nm波长的激光束激发Hoechst33258,然后用Aim Image Examiner软件进行图像分析。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 取A549细胞接种于6孔板中, 2×10^5 个/孔。24 h后,将CAS组,EGCG组,CAS+EGCG用药组各10 μL加入到各孔中(CAS终浓度分别为0.5,1,5 μmol·L⁻¹,EGCG终浓度分别为1,5,10 μmol·L⁻¹)。给药24 h后,用预冷PBS进行清洗,无EDTA的胰酶进行消化,4℃,1 000 r·min⁻¹离心3 min,用PBS洗涤细胞2次,依次加入Binding Buffer 400 μL,Annexin V/FITC 5 μL,20 mg·L⁻¹PI溶液10 μL,室温避光染色,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 将对数生长的A549细胞,以 2×10^5 个/孔接种于6孔板,24 h后弃去培养液,将CAS组,EGCG组,CAS+EGCG用药组各10 μL加入到各孔中(CAS终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,EGCG终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组加入等量的无血清培养液,作用细胞24 h后,收集蛋白,BCA法测定蛋白浓度。每组样品取总蛋白20 μg,经电泳分离,电转移至PVDF膜。含5%脱脂奶粉制成的封闭液,封闭90 min,弃去封闭液,加入相应浓度一抗(1:300),室温摇床孵育30 min后,4℃孵育过夜,以 $1 \times \text{TBST}$ 缓冲液10 min/次,洗涤3次后,加入二抗(1:1万)孵育1 h。洗膜后,平放于分子影像化学发光系统成像槽内,滴入化学发光液,使用Image Lab显影成像,用Image J进行数据分析。

2.6 统计学分析 所有资料经SPSS 17.0统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间参数比较采用独立样本t检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对A549细胞增殖抑制的影响 药物作用24,

48 h 后,与 CAS 和 EGCG 单用药组比较,各浓度 CAS + EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制率均高于相同 CAS 或 EGCG 浓度下单独用药 ($P < 0.05$)。CAS, EGCG, CAS + EGCG 在 24, 48 h 时对 A549 细胞的抑制作用均随着浓度的升高而增大,表明 CAS, EGCG 单用及 CAS + EGCG 用药均对 A549 细胞的抑制率呈时间和浓度依赖。见表 1。

表 1 CAS, EGCG 对肺腺癌 A549 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Comparison of effect of CAS, EGCG on proliferation inhibition rate of lung adenocarcinoma A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%	
		24 h	48 h
CAS	0.5	5.55 ± 1.37	7.78 ± 0.14
	1	6.90 ± 0.42	13.02 ± 0.56
	5	18.10 ± 0.24	33.25 ± 0.13
	10	38.57 ± 0.41	56.19 ± 0.24
	15	52.30 ± 0.14	67.45 ± 0.15
	20	65.32 ± 0.14	76.84 ± 0.06
EGCG	1	3.04 ± 0.16	5.00 ± 0.86
	5	9.29 ± 0.24	15.40 ± 0.36
	10	23.04 ± 0.08	35.71 ± 0.24
	15	48.37 ± 0.27	60.48 ± 0.24
	20	58.46 ± 0.03	69.76 ± 0.41
	25	70.80 ± 0.04	80.00 ± 0.23
CAS + EGCG	0.5 + 1	10.24 ± 1.45 ^{1,2)}	12.97 ± 0.12 ^{1,2)}
	1 + 5	17.05 ± 0.03 ^{1,2)}	23.26 ± 0.49 ^{1,2)}
	5 + 10	35.48 ± 0.24 ^{1,2)}	44.21 ± 0.14 ^{1,2)}
	10 + 15	58.02 ± 0.36 ^{1,2)}	67.76 ± 0.03 ^{1,2)}
	15 + 20	73.97 ± 0.14 ^{1,2)}	81.82 ± 0.13 ^{1,2)}
	20 + 25	82.62 ± 0.02 ^{1,2)}	90.48 ± 0.05 ^{1,2)}

注:与同浓度 CAS 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与同浓度 EGCG 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 CAS 与 EGCG 对肺腺癌 A549 细胞的联合作用 培养 24 h 时, 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈相加作用, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈拮抗作用, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈协同作用。

培养 48 h 时, 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈相加作用; 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAS 和 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 联合用药对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率呈拮抗作用。见表 2。

表 2 CAS 与 EGCG 对肺腺癌 A549 细胞的联合作用

Table 2 Effect of combined application of CAS and EGCG on lung adenocarcinoma A549 cells

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Q	
	24 h	48 h
0.5 + 1	1.16 ⁺	1.03 ⁺
1 + 5	1.01 ⁺	0.89 ⁺
5 + 10	1.94 ⁺⁺	0.77 ⁻
10 + 15	0.85 ⁻	0.82 ⁻
15 + 20	0.92 ⁺	0.91 ⁺
20 + 25	0.92 ⁺	0.95 ⁺

注: ++. 协同作用; +. 相加作用; -. 拮抗作用。

3.3 不同药物在肺腺癌 A549 细胞内分布 CAS 和 EGCG 经肺腺癌 A549 细胞内吞后主要分布在细胞核中,与 CAS, EGCG 单用药组相比, CAS + EGCG 组作用后 A549 细胞的各组荧光强度最强,显示其在 A549 细胞内分布量最多,说明联合用药可增强 A549 细胞对药物的内吞作用。由于 EGCG 自身没有荧光,不能用激光共聚焦显微镜进行定位实验, A2 无荧光画面。经 PI 染色后,与单用药组相比,联合用药组中 PI 染色明显变深,结合流式细胞仪检测 CAS + EGCG 对 A549 细胞凋亡率的结果可知, CAS + EGCG 组诱导 A549 细胞的凋亡能力强于 CAS 组和 EGCG 组。见图 1。

3.4 CAS + EGCG 对 A549 细胞凋亡的影响 与同浓度 CAS 组和 EGCG 组比较, CAS + EGCG 用药组对 A549 细胞的早期凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 CAS + EGCG 对 A549 细胞相关蛋白表达的影响 与空白组,同浓度下 CAS 组, EGCG 组比较, CAS + EGCG 组可增加对 Bax 蛋白表达,同时可减少 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 2,表 4。

4 讨论

肺癌是目前世界上恶性肿瘤死亡的首要原因,

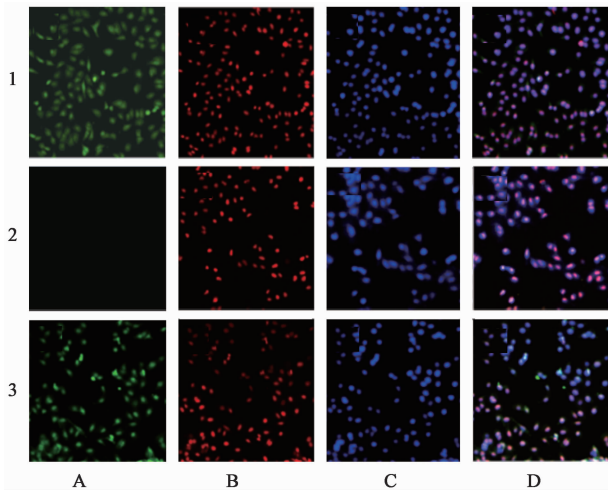


图 1 CAS, EGCG 及其联合用药在 A549 细胞中的分布 (Hoechst33258/PI, $\times 200$)

Fig. 1 Distribution of CAS or EGCG alone and CAS + EGCG in lung adenocarcinoma A549 cells under laser scanning confocal microscopy (Hoechst33258/PI, $\times 200$)

表 3 CAS, EGCG 及其联合用药对肺腺癌 A549 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Comparison of effect of CAS or EGCG alone and CAS + EGCG on apoptosis rate of lung adenocarcinoma A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
CAS	0.5	6.40 \pm 0.57
	1	8.48 \pm 0.24
	5	9.96 \pm 0.52
EGCG	1	7.54 \pm 0.11
	5	8.15 \pm 0.10
	10	11.01 \pm 0.35
CAS + EGCG	0.5 + 1	9.72 \pm 0.15 ^{1,2)}
	1 + 5	14.84 \pm 0.17 ^{1,2)}
	5 + 10	15.66 \pm 0.67 ^{1,2)}

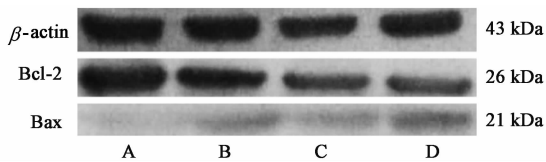


图 2 CAS, EGCG 及其联合用药作用于肺腺癌 A549 细胞后 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平电泳

Fig. 2 Electrophoresis of CAS or EGCG alone and CAS + EGCG on A549 Bcl-2 and Bax protein expressions

表 4 CAS, EGCG 及其联合用药对肺腺癌 A549 细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of CAS or EGCG alone and CAS + EGCG on A549 Bcl-2 and Bax protein expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
空白	-	0.98 \pm 0.03	0.07 \pm 0.002
CAS	5	0.87 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01
EGCG	10	0.71 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02
CAS + EGCG	5 + 10	0.59 \pm 0.05 ^{1,2,3)}	0.24 \pm 0.01 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 CAS 组比较²⁾ $P < 0.01$;与 EGCG 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

由于化疗药物的耐药性及毒副作用,使得临床采取的放疗和化疗为主的综合治疗效果并不理想。肿瘤的发生与细胞增殖和凋亡的调节失控有关,寻找能提高肿瘤细胞耐药的同时毒副作用又小的抗癌药物是目前研究的一个热点。近几年国内外研究表明,CAS 对人肺癌^[7],食管癌^[17],乳腺上皮癌^[3],人结肠癌^[2]等细胞株的增殖有明显抑制作用,但对正常细胞的增殖无影响或影响很小^[9]。而对于 CAS 联合其他药物是否可提高肿瘤细胞耐受性的研究报道甚少。

本研究显示 CAS 组,EGCG 组及 CAS + EGCG 组对 A549 细胞增殖生长均具有抑制作用,其中与单用药组相比,联合用药组能够显著抑制肺癌 A549 细胞的增殖活力。联合用药评价结果中发现,当细胞培养至 24 h 时,CAS ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 EGCG ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合用药对 A549 细胞的增殖抑制表现为协同增强作用。激光共聚焦显微镜观察发现联合用药组较 CAS,EGCG 组药物进入细胞的数量明显增多,且药物主要进入到 A549 细胞核中。流式细胞仪检测发现,当 CAS 与 EGCG 联合用药时,细胞的早期凋亡率明显提高,原因可能是 EGCG 作为诱导凋亡剂,增强了 CAS 对细胞的凋亡作用。CAS 与 EGCG 联合用药后可增强肺腺癌 A549 细胞的早期凋亡率。有研究 EGCG 诱导肿瘤细胞凋亡的原因为 EGCG 通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路中的 Akt 的磷酸化过程,活化含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 和 Bax,下调 Bcl-2 的表达,导致细胞内 Bax/Bcl-2 升高,从而发挥了诱导细胞凋亡的作用^[18-19]。也有研究报道,CAS 是通过诱导 p21 表达,上调 Bax,活化 Caspase-3,使细胞周期停滞在 G₂/M 期;CAS 作用于肺癌后,通过降低 A549 细胞线粒体跨膜电位,使细胞内 Bax 蛋白表达增加,而 Bax 蛋白对细胞凋亡起促进作用,当 Bax 蛋白高表达时,Bax/Bcl-2 增大,

促进细胞凋亡^[20-22]。据此,在验证了CAS + EGCG联合用药可增强肺腺癌A549细胞的早期凋亡率的基础上,本研究进一步对CAS + EGCG诱导肿瘤细胞凋亡的原理进行了探讨。Western blot结果显示,与单用药组相比,CAS + EGCG联合用药可增强Bax蛋白的表达及减少Bcl-2蛋白的表达。

本研究探讨了CAS与EGCG联合用药对肺腺癌A549细胞的增殖抑制及诱导凋亡细胞的作用,同时进一步探究了与细胞凋亡相关的蛋白表达水平,当CAS与EGCG联合用药后可增强药物对A549细胞的增殖抑制能力,且诱导细胞凋亡的能力与增加Bax蛋白和减少Bcl-2蛋白的表达相关。基于此,在后续实验中将会进一步对联合用药抗肿瘤的具体分子信号通路进行深入研究,以便为临床治疗提供更多的实验和理论依据。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[2] QU L, LIU F X, CAO X C, et al. Activation of the apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun N-terminal kinase pathway is involved in the casticin-induced apoptosis of colon cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5): 1494-1500.

[3] LIU L P, CAO X C, LIU F, et al. Casticin induces breast cancer cell apoptosis by inhibiting the expression of forkhead box protein M₁ [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5): 1711-1717.

[4] CHEN D, CAO J, TIAN L, et al. Induction of apoptosis by casticin in cervical cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1287-1294.

[5] HE G, CAO X, HE M, et al. Casticin inhibits self-renewal of liver cancer stem cells from the MHCC97 cell line [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(6): 2023-2028.

[6] LIU E, KUANG Y, HE W, et al. Casticin induces human glioma cell death through apoptosis and mitotic arrest [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(6): 805-814.

[7] LIU F, CAO X, LIU Z, et al. Casticin suppresses self-renewal and invasion of lung cancer stem-like cells from A549 cells through down-regulation of pAkt [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46(1): 15-21.

[8] ZHOU Y, TIAN L, LONG L, et al. Casticin potentiates TRAIL-induced apoptosis of gastric cancer cells through endoplasmic reticulum stress [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58855.

[9] Kobayakawa J, Sato-Nishimori F, Moriyasu M, et al. G₂-M arrest and antimetabolic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex rotundifolia*

Linne fil.) [J]. *Cancer Lett*, 2004, 208(1): 59-64.

[10] TANG S N, FU J, Shankar S, et al. EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer. [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31067.

[11] FANG C Y, WU C C, HUIYU H, et al. EGCG inhibits proliferation, invasiveness and tumor growth by up-regulation of adhesion molecules, suppression of gelatinases activity, and induction of apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 2530-2558.

[12] WANG H, BIAN S, YANG C S. Green tea polyphenol EGCG suppresses lung cancer cell growth through upregulating miR-210 expression caused by stabilizing HIF-1 α [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(12): 1881-1889.

[13] GU J W, Makey K L, Tucker K B, et al. EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF- κ B, and VEGF expression [J]. *Vasc Cell*, 2013, 5(1): 1-10.

[14] LI X Y, ZHAO Y, SUN M G, et al. Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(21): 5591-5604.

[15] Bio M, Rajaputra P, Lim I, et al. Efficient activation of a visible light-activatable CA4 prodrug through intermolecular photo-unclick chemistry in mitochondria [J]. *Chem Commun*, 2017, 53(11): 1884-1887.

[16] 孟腾腾, 魏虹, 管东方, 等. 姜黄素对人早幼粒白血病细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18(23): 2800-2804.

[17] SONG Y B, ZHOU S H, CUI H S, et al. Casticin treatment inhibits squamous cell carcinoma cell proliferation and arrests cell cycle in S phase [J]. *Bangl J Pharmacol*, 2016, 11(1): 206-211.

[18] 林镇海. 表没食子儿茶素没食子酸酯通过PI3K-Akt信号通路诱导腺癌细胞凋亡的研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2011.

[19] 周薇, 戴奇刚, 利华, 等. EGCG通过下调Bcl-2、NF- κ B(p65)表达, 活化Caspase-3诱导人胃癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(4): 530-534.

[20] Lee Y C, CHENG T H, Lee J S, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1/2): 103-115.

[21] 梁策, 高慧, 张腾. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平和卵巢Bcl-2/Bax表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(19): 100-104.

[22] SONG X, ZHANG Y, WANG X, et al. Casticin induces apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest in gallbladder cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1): 9-18.

[责任编辑 张丰丰]