

莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、 聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响

陈旭*, 王娟, 蒋晓山, 曾建红, 黄凤香
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:观察莪术醇干预后,体外培养 A549 细胞凋亡诱导因子(apoptosis induce factor, AIF)和聚 ADP 核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]的表达情况,探讨莪术醇对非半胱天冬酶(caspase)依赖细胞凋亡的分子机制。方法:以不同质量浓度的莪术醇(12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹)及阴性组处理肺癌细胞,药物作用 48 h 后提取各组蛋白;采用 Western blotting 法分别检测各组 AIF, PARP, caspase-3 蛋白表达,并进行统计学分析。结果:经莪术醇处理后,阴性组的 A549 细胞的 PARP 相对蛋白表达量为 0.545 3, AIF 的相对蛋白表达量为 0.358 6, 而 100 mg·L⁻¹ 加药组的相对蛋白表达量分别为 1.661 3 和 2.212 4, 蛋白表达均随药物浓度的增加而增多,药物组与阴性组相比差异极显著($P < 0.01$),而 caspase-3 的前体(32×10^3)表达受药物影响较小,其激活体(17×10^3)基本不表达。结论:莪术醇可能主要是通过上调 PARP 蛋白的表达,进而将 AIF 转位到细胞核而引起凋亡的非依赖 caspase 途径来介导肺癌 A549 细胞的凋亡。

[关键词] 莪术醇; 肺癌; 凋亡诱导因子; 聚 ADP 核糖聚合酶; 半胱天冬酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0157-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1704.001 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1704.001.html>

Effects of Curcumol on Apoptosis Induce Factor, Poly ADP-Ribose Polymerase and Caspase-3 in Lung Cancer Cell Line A549

CHEN Xu*, WANG Juan, JIANG Xiao-shan, ZENG Jian-hong, HUNAG Feng-xiang
(Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of curcumol on the expression of apoptosis induce factor(AIF), poly ADP-ribose polymerase (PARP) and caspase-3 protein in lung cancer cell A549. **Method:** A549 cells were treated with different concentrations(0, 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹) of curcumol for 48 hours, then the total protein was extracted from each group respectively. The expression of AIF, PARP and caspase-3 was detected by Western blotting. **Result:** The PARP and AIF protein expressions were significantly elevated in the treatment groups (1.661 3 and 2.212 4 respectively) compared with the model group(0.545 3 and 0.358 6 respectively), in a dose dependent manner ($P < 0.01$). The caspase-3 precursor (32×10^3) protein expression showed no significance difference among all the groups. **Conclusion:** Curcumol could induce apoptosis through caspase-independent pathway in human lung cancer cell A549, whose mechanism might be linked to up-regulation of the PARP protein and translocation of AIF.

[Key words] curcumol; lung cancer; apoptosis induce factor; poly ADP-ribose polymerase; caspase-3

[收稿日期] 20110120(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960498); 广西科技攻关与新产品试制(科技攻 0992003A-26); 广西自然科学基金(2010GXNSFA013252)

[通讯作者] * 陈旭, 博士, 教授, 主要从事中药资源与品质评价、抗体工学、药学教育与管理、天然药物抗肿瘤的分子机制方面的研究, Tel:0773-5893619, E-mail:chenxu@glmc.edu.cn

近年来,中草药的抗肿瘤作用越来越受到人们的重视,莪术醇(curcumol)为中药莪术中提取的有效单体,具有抗病毒、抗菌、抗炎、免疫调节等多种药理作用。近年研究发现莪术醇对多种肿瘤细胞有较强的抑制和杀伤效应,并呈现时间及剂量依赖性。进一步研究发现莪术醇可抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡而发挥抗癌活性^[1]。肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,是目前全世界癌症死因的第一名,每年发病人数都在上升,2003 年世界卫生组织(WHO)公布的死亡率是 110 万/年,发病率是 120 万/年。既往对莪术醇的抗肿瘤机制研究较少,其凋亡作用主要是通过下调环氧合酶-2(COX-2)及 Bcl-2 的表达等。AIF 是介导独立于 caspase 凋亡通路的关键分子,近来发现它本身不但具有引起凋亡的作用而且是维持线粒体活性,保持细胞生存的重要蛋白,只有在外界凋亡信号刺激下才从线粒体转移到细胞核启动细胞凋亡发生,而 PARP 在这个过程中起到了非常重要的作用。有研究表明莪术醇在 caspase 活性被抑制的条件下仍可以引起细胞凋亡,其途径是通过非依赖 caspase 介导细胞凋亡的^[2],但是具体机制并不清楚。

1 材料

1.1 药品与试剂 莪术醇(100185-200506)购于中国药品生物制品检定所,纯度 99%,RPMI-1640 培养基(870532)购于 Gibico 公司,胎牛血清(090901)购自杭州四季青公司。蛋白提取试剂盒(210003-50)购自上海贝博生物技术公司、BCA 蛋白含量测定试剂盒(P0010S-1)碧云天生物技术公司。Caspase-3(sc-7148, B2150)兔多抗、PARP(sc-7150)兔多抗购自 Santa Cruz 公司,AIF(BS2407)兔多抗一抗购自 BIO-RAD 公司,对应的二抗均购自北京中杉金桥生物技术公司,内参 Actin(AA128-1)购自碧云天生物技术公司,超敏化学发光试剂 ECL 购自上海博奥森公司。

1.2 细胞株 肺癌 A549 细胞株,购自上海生物细胞库。

1.3 仪器 Thermo 超低温冰箱,Thermo CO₂ 培养箱,Olympus 倒置相差显微镜,Thermo 低温超速离心机,超净工作台,BIO-RAD Mini-PROTEAN 电泳仪。

2 方法

取 20 mg 莪术醇溶于 2 mL 无水乙醇,使其质量浓度为 10 g·L⁻¹,再用细胞培养液稀释成 12.5,25,

50,100 mg·L⁻¹莪术醇药物组,空白对照组为 1% 的无水乙醇培养基。肺癌 A549 细胞用含 10% 胎牛血清(56 ℃, 30 min 灭活)的 RPMI 1640 培养液,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养,2~3 d 传代 1 次,1~2 d 换液 1 次。传代 2~3 次后,取对数生长期细胞,调整密度为 4 × 10⁴/mL,接种于 100 mL 培养瓶,每瓶 10 mL,待细胞贴壁后,弃掉上清,加入莪术醇处理组(12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹)及阴性对照组各 10 mL 分别进行干预。药物作用 48 h 后,收集上清离心,每组加入 300 μL 的裂解液于冰上裂解 30 min。收集全部裂解液经低温高速离心,提取上清液即为总蛋白,-80 ℃ 保存蛋白。采用 Western blotting 法检测各组 caspase-3, AIF 及 PARP 蛋白的表达,方法按参考文献^[3]提供的方法进行。BCA 法测定蛋白含量,配制 8% 及 10% 分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,4 ℃ 电转移,封闭后加一抗孵育 2 h,予 TBST 漂洗后,加二抗孵育 1 h。TBST 漂洗后,化学发光法曝光,显影,定影。实验重复 3 次,GENE GENIUS 凝胶成像系统扫描各电泳条带的吸光度(A)并计算 caspase-3, AIF 及 PARP 与相应内参 Actin 条带 A 比值的平均值。

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

Western blotting 法检测显示,莪术醇处理(≥ 25 mg·L⁻¹)PARP 蛋白表达随着浓度的增加而增多,与对照组比较,差异有显著性意义($P < 0.01$);PARP 的激活体(85×10^3)表达也是随着药物浓度的增加而增加,加药组与阴性组相比有显著性意义($P < 0.05$)。莪术醇处理组 AIF 蛋白表达随着药物浓度的增加而增多,与对照组比较,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。莪术醇处理肺癌细胞 A549 后,各组 caspase-3 的前体蛋白(32×10^3)表达受药物影响较小,其激活体(17×10^3)基本不表达。

4 讨论

细胞凋亡是多细胞生物都具有的一种基本特性,有重要的生理意义。凋亡途径主要有死亡受体途径和线粒体途径,两个途径最后都导致效应性 caspases-3 活化,进而激活内切核酸酶,使链断裂,最终细胞凋亡^[4-6]。但是,有学者发现 caspases 的抑制却不能阻止细胞凋亡的发生,从而揭示了非

表 1 莪术醇处理 48 h 后 A549 细胞 PARP 及 AIF 蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	PARP 蛋白	AIF 蛋白
0	0.545 3 \pm 0.001 6	0.358 6 \pm 0.003 8
12.5	0.126 1 \pm 0.002 4 ¹⁾	0.863 5 \pm 0.012 3 ¹⁾
25	1.422 8 \pm 0.058 0 ¹⁾	0.870 5 \pm 0.024 6 ¹⁾
50	1.580 4 \pm 0.006 0 ¹⁾	1.203 8 \pm 0.070 2 ¹⁾
100	1.661 3 \pm 0.029 0 ¹⁾	2.212 4 \pm 0.047 4 ¹⁾

注:与 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比¹⁾ $P < 0.01$ 。

Caspases 依赖的凋亡途径的存在。AIF 是近年来由 Susin^[7] 等发现的一种凋亡效应分子,定位于线粒体 67×10^3 的蛋白,具有维持线粒体正常结构和诱导细胞凋亡的双重作用。当死亡信号出现时,AIF 从线粒体内释放出来并转位到细胞核,在核内 AIF 使染色体发生凝集和 DNA 片段化^[8]。近期有报道指出 AIF 的转位需要活性 PARP^[9-11],DNA 的损伤激活 PARP,大量激活的 PARP 则会触发细胞凋亡信号,刺激线粒体释放凋亡诱导因子(AIF),使 DNA 断裂导致细胞凋亡^[12-13]。在本研究中,我们发现莪术醇诱导细胞凋亡的机制与 AIF 及 PARP 蛋白表达密切相关,随着莪术醇药物浓度的增加,PARP 及 AIF 的蛋白表达增加,与阴性组相比有显著性意义($P < 0.01$),PARP 与 AIF 的蛋白表达随着药物的浓度升高而表达增加,二者显示出一定的相关性。

caspase-3 是 caspases 家族中重要的成员之一,大多数触发细胞凋亡的因素最终均需通过 caspase-3 的活化来引导信号途径的传导。众多研究表明在 caspase 依赖的凋亡途径中,caspase-3 的活化起到至关重要的最用。本实验结果显示只能检测到 caspase-3 的前体(32×10^3),而未见 caspase-3 的活化体(17×10^3),且各组 caspase-3 的蛋白表达差异较小,差异无显著性。这与 Zhang W^[2] 的实验结果相吻合。

当凋亡发生时,116 kD 的 PARP 断裂成 31×10^3 和 85×10^3 的两个片段, 85×10^3 的 PARP 可以使 DNA 修复功能的丧失。本实验结果表明在 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上引起 85×10^3 的 PARP 蛋白表达增加, 85×10^3 的 PARP 又可引起 AIF 的释放,导致早期的染色体凝聚及大范围的 DNA 片段化,最终导致细胞凋亡,这是莪术醇诱导细胞凋亡非依赖 caspase 途径的机制之一,而也可能是其主要的凋亡机制。

[参考文献]

- [1] 曾建红,陈旭,潘艳薇,等,莪术醇的研究进展[J]. 中药材,2008,31(1):168
- [2] Zhang W, Wang Z, Chen T. Curcumin induces apoptosis via caspases-independent mitochondrial pathway in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells [J]. Med Oncol,2011,28(1):307.
- [3] 张前德,魏睦新,林青,丹芪颗粒干预干燥综合征模型大鼠颌下腺水通道蛋白-5 的表达研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):105.
- [4] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature,2000,407(6805):770.
- [5] Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspase stoalter native mechanisms [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2001, 2(8):589.
- [6] Jaattela M, Tscho P P J. caspase-independent cell death in lymphocytes[J]. Nat Immunol,2003, 4(5):416.
- [7] Susin S A, Lorenzo H K, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. Nature, 1999, 397(6718):441.
- [8] Moubarak R S, Yuste V J, Artus C, et al. Sequential activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis inducing factor mediated programmed necrosis[J]. Mol Cell Biol,2007, 27(13):4844.
- [9] Molnár A, Tóth A, Bagi Z, et al. Activation of the poly (ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure [J]. Mol Med,2006,12(7/8):143.
- [10] Yu S W, Wang H, Poitras M F, et al. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis inducing factor [J]. Science, 2002, 297(5579):259.
- [11] Chen M, Zsengeller Z, Xiao C Y, et al. Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 [J]. Cardiovasc Res, 2004,63(4):682.
- [12] Heeres J T, Hergenrother P J. Poly(ADP-ribose) makes a date with death [J]. Curr Opin Chem Biol,2007, 11(6):644.
- [13] Yu S W, Andrabi S A, Wang H, et al. Apoptosis inducing factor mediates poly (ADP-ribose) (PAR) polymer induced cell death [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(48):18314.

[责任编辑 聂淑琴]