

华蟾素抗肺癌细胞的实验研究

盛 凯¹, 惠萍萍^{2△}, 陆佳欢² (1. 上海同济大学医学院, 上海 200092; 2. 上海市同仁医院消化科 200332)

【摘要】 目的 探究华蟾素的抗肺癌活性。**方法** 培养肺癌 A549 细胞, 对华蟾素、环孢素-A(CsA)、萨菲菌素 A(SfA) 作用于肺癌 A549 细胞后的细胞存活率、细胞死亡率、细胞凋亡率以及线粒体膜电位(MMP) 进行检测; 建立小鼠移植瘤模型, 对华蟾素作用于小鼠移植瘤模型后的肿瘤体积以及小鼠存活率进行检测, 并整理数据进行统计学对比分析。**结果** 通过小鼠移植瘤模型, 该研究发现华蟾素抑制了 A549 肺癌细胞在体内生长。研究结果表明亲环蛋白 D(Cyp-D) 依赖的线粒体通透性转换孔(mPTP) 开放可调节由华蟾素诱导的肺癌细胞的非凋亡性死亡。Cyp-D 的抑制剂环孢素-A(CsA), mPTP 的阻断剂萨菲菌素 A(SfA) 极明显地阻碍了由华蟾素诱导的线粒体膜电位(MMP) 的下降和 A549 细胞的死亡(非凋亡)。**结论** 华蟾素可以诱导肺癌细胞死亡, 值得进一步研究, 有望成为一种新型的抗肺癌药物。

【关键词】 肺癌; 华蟾素; 亲环蛋白 D; 线粒体通透性转换孔; 细胞死亡

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 14. 019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)14-2023-03

Experiment study of cinobufagin anti-cancer effect on lung cancer cells SHENG Kai¹, HUI Ping-ping^{2△}, LU Jia-huan² (1. Medical College, Shanghai Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Gastroenterology, Shanghai Tongren Hospital, Shanghai 200332, China)

【Abstract】 Objective Explore the potential of Huachan element resistance to lung cancer. **Methods** Cultivate the A549 lung cancer cells. After HuaChan element and cyclosporine A(CsA), safi rhzomorph A (SfA) role in the A549 lung cancer cells, testing cell survival and cell death, cell apoptosis rate and mitochondrial membrane potential (MMP). Establish the mice transplanted tumor model, After HuaChan element role in the mice transplanted tumor model, testing the tumor volume and the survival rate of mice. And collates data for statistical analysis. **Results** By mice transplanted tumor model, Data show that cyclophilin D (Cyp, cyclophilin D-D) rely on mitochondrial permeability transition pore (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) open the adjustable by Huachan induced lung cancer non apoptotic cell death. Cyp inhibitors-D part of spore element-A (cyclosporine A, CsA), the blocker mPTP safi rhzomorph A (sanglifehrin A, SfA) extremely significantly hindered by Huachan induced mitochondrial membrane potential (mitochondrial membranepotential, MMPs) fall and A549 cell death (apoptosis). **Conclusion** The study found that Huachan inhibit the growth of the A549 lung cancer cells in the body. Research results show that HuaChan element is worth further study, as a new type of lung cancer drug resistance.

【Key words】 lung cancer; Huachan element; cyclophilin D; mitochondrial permeability transition pore

华蟾素是一种强心甙类固醇或蟾蜍二烯羟酸内酯, 提取于传统中药蟾蜍皮肤表面分泌的油脂^[1-2]。华蟾素可用作强心剂、利尿剂和止血剂应用于临床。尽管很多研究都表明, 多种癌细胞中的蟾蜍二烯羟酸内酯(如蟾蜍灵)有抗肿瘤活性和增强化疗效果的特性^[3], 但华蟾素潜在的抗肿瘤活性还未得到广泛研究, 且关于其内在机制的探讨尚浅。线粒体通透性转换孔(mPTP)在细胞死亡中扮演着关键的角色^[4]。mPTP 是一个通道复合体, 由外膜中的电压依赖性阴离子通道(VDAC)、内膜中的腺嘌呤核苷酸转运体(ANT)和线粒体基质中的亲环蛋白 D(Cyp-D) 构成^[5-6]。通过细胞毒素的刺激, Cyp-D 和内膜中的 ANT 联合, 促进 mPTP 开放, 从而导致线粒体去极化、线粒体肿胀和钙的释放, 最终导致细胞死亡。本研究发现 Cyp-D 和 mPTP 是华蟾素诱导肺癌细胞死亡的重要调节者因素。故设计本实验, 对华蟾素抗肿瘤活性进一步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 A549、H460、HTB-58 及 HEK-293 人肺癌细胞系购自上海中国医学科学院细胞库。

1.2 仪器与试剂 华蟾素、萨菲菌素 A(SfA) 和环孢霉素 A

(CsA) 由美国 Sigma 公司制备; Z-VAD-fmk(ZVAD) 购自上海 Calbiochem 公司; Cyp-D 抗体和微管蛋白购自美国 Santa Cruz 生物制药公司。培养基为含 10% 胎牛血清(FBS, 购自上海 Hyclone 公司)的 DMEM, 加入抗生素, 在 37℃, 体积分数为 5% 的 CO₂ 温育箱中培养。

1.3 方法

1.3.1 细胞存活率检测 用四唑染色法(MTT 法)检测细胞存活率。将细胞接种于 96 孔板中处理, 每孔中加入 5 mg/mL 的 MTT(溶于磷酸缓冲液 PBS), 然后培养 3 h。待介质通气后, 每孔中加入 150 μL 的 DMEM。轻摇孔板至呈色反应均匀, 且酶标仪测出 OD 值为 OD 490。只由介质处理的细胞存活率为 100%, 细胞存活率 = 试验组吸光度值/对照组吸光度值 × 100%。

1.3.2 细胞死亡率检测 细胞经过处理后, 再计量死亡细胞数(用台盼蓝染色, 死细胞呈蓝色阳性反应)。细胞死亡率 = 经台盼蓝染色后呈蓝色阳性反应的细胞数/总细胞数 × 100%。细胞总数由细胞计数器自动记录。

1.3.3 细胞凋亡率检测 将细胞接种于 6 孔板中, 当细胞生

长至 70%~80% 时进行实验。每孔加入被测试剂,培养至指定时间点。用 Trypsin-EDTA 消化法收集细胞。在 70% 冷乙醇固定细胞后,在 37℃ 下,用 5 mg/mL 碘化丙啶(PI)和 1 mg/mL Annexin V 将细胞染色 30 min。之后在流式细胞仪上对样本进行检测,每个样本中含 10 000 个细胞。Annexin V 百分比反应细胞凋亡率。Annexin V 阳性、PI 阴性以及 Annexin V 阳性、PI 阳性的细胞合为凋亡细胞。

1.3.4 MMP 的检测 用 JC-1 染色法测量 MMP。JC-1 染料聚集在线粒体膜内,在正常静息细胞中发出橘色荧光。当膜电位降低时,JC-1 单体在胞液内形成,发出绿色荧光。因此,通过检测绿色荧光强度来检测 MMP 的降低程度^[7]。简而言之,经过处理后,在黑暗中,用 5.0 μg/mL JC-1 染色 A549 细胞。用温和的 PBS 冲洗细胞两次,在新鲜的培养基中再次悬浮细胞,再立即用含 485 nm 感光滤光片的酶标仪读取 OD 数值。试验组的 OD 数值规范化为介质对照组的 OD 数值。

在接受 1 μmol/L 华蟾素刺激之前,先将 A549 细胞用 0.1 μmol/L CsA 或 SfA 培育 1 h,再分别用 MTT 法和台盼蓝染色法分析细胞活性和凋亡情况。用 JC-1 染色法检测 MMP 降低情况。用 1 μmol/L 华蟾素刺激 A549 细胞内 scramble shRNA、Cyp-D shRNA-1 及 Cyp-D shRNA-2 的稳定表达。用 1 μmol/L 华蟾素或含 0.1 μmol/L CsA 的华蟾素处理 HEK-293 细胞表达对照组或 0.5 μg/每孔的 Cyp-D 载体 72 h。

1.3.5 动物 公裸鼠 4~6 周大,为 BALB/c 小鼠,购自上海中国医学科学院实验动物研究所。所有试验根据作者所隶属的实验动物研究委员会之实验动物护理和使用指南实施。

1.3.6 肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型 如先前研究所述,公裸鼠被用来建立肺癌 A549 移植瘤模型。在小鼠的右股皮下注射 A549 细胞(0.1 mL 培养基中含 500 万个细胞),当肿瘤达到 200~300 mm 的平均量时进行实验。将 22~25 g、6~8 周大的裸小鼠贴上耳标,小鼠被随机分为 3 组,每组含 10 只小鼠,每组分别加入:(1)载体;(2)1.0 mg/kg 华蟾素;(3)5.0 mg/kg 华蟾素。再在皮下接种 0.1 mL 培养基中的 2×10⁶ 个 A549 细胞。接种 6 d 后开始实验。小鼠腹腔注射华蟾素,每天 2 次,连用 1 周。每天对小鼠进行检查,确定与实验相关的不良反应和死亡率。用卡尺测量肿瘤体积,每周 1 次,连测 5 周。在第 5 周时,也要测量小鼠的体质量和存活率。肿瘤体积(按 mm³ 计)按以下公式计算:体积=(短径²×长径)/2。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,多组比较采用方差分析(单向方差分析)。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度华蟾素诱导肺癌细胞的毒性作用 0.1 μmol/L 的华蟾素作用于 A549 细胞 72 h 后,测出的细胞存活率、细胞死亡率以及细胞凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);0.5 μmol/L 的华蟾素的细胞存活率低于对照组,细胞死亡率以及细胞凋亡率高于对照组,各项指标与对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

2.2 华蟾素对肺癌细胞 A549 的毒性作用与 Cyp-D 抑制剂 CsA 和 mPTP 阻断剂 SfA 的关系 华蟾素诱导经 CsA 和 SfA 处理过的肺癌细胞 A549 后,细胞存活率均低于对照组,与对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05),细胞死亡率均高于对照组,与对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05),MMP 降低均高于对照组,与对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 不同浓度华蟾素作用于 A549 细胞后的结果[($\bar{x} \pm s$), %]

组别	细胞存活率	细胞死亡率	细胞凋亡率
Ct	100	2.3±0.2	2.0±0.2
0.1 μmol/L	99.2±9.1	2.4±0.3	2.1±0.2
0.5 μmol/L	65.9±6.0*	6.8±1.2*	2.9±0.3*
1.0 μmol/L	44.8±3.5	22.8±2.3*	3.8±0.7*
5.0 μmol/L	34.8±5.0	26.8±2.7*	5.1±1.1*
10.0 μmol/L	23.5±3.3	25.4±2.6*	6.2±1.2*

注:Ct 代表介质处理的对照组,与对照组比较,**P*<0.05。

表 2 华蟾素作用于经 CsA 和 SfA 处理后肺癌细胞 A549 的结果[($\bar{x} \pm s$), %]

组别	细胞存活率	细胞死亡率	MMP 降低情况
Ct	100.0±7.2	2.0±0.2	100.0±1.2
CsA	81.0±5.3*	6.0±1.2*	119.0±20.6*
SfA	79.0±9.6*	8.0±1.1*	122.0±26.7*

注:Ct 代表介质处理的对照组,与对照组比较,**P*<0.05。

2.3 华蟾素抑制活体内肺癌 A549 细胞的生长 用小鼠肺癌 A549 细胞移植瘤模型检测体内华蟾素的抗癌活性,使用 1、5 mg/kg 华蟾素,第 5 周时小鼠体内的肿瘤体积小于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),且 5 mg/kg 组小于 1 mg/kg 组,见图 1。使用 1、5 mg/kg 华蟾素的肿瘤小鼠第 5 周存活率均高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),且 5 mg/kg 组高于 1 mg/kg 组,见图 2。

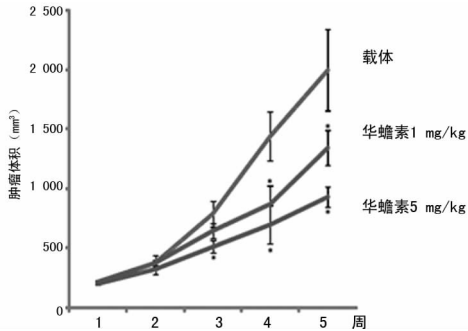


图 1 不同时间不同浓度华蟾素作用于肿瘤模型小鼠后的肿瘤体积

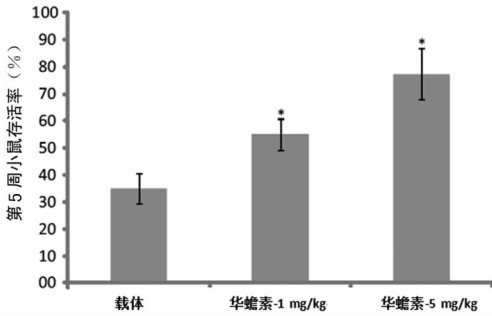


图 2 不同浓度华蟾素作用于肿瘤模型小鼠 5 周后小鼠的存活率

3 讨 论

长期以来,细胞坏死性死亡被认为是非程序性的,但最近细胞坏死被证明和细胞凋亡一样,也是一个程序化过程。与缺

血再灌注损伤、氧化应激、化疗药物和紫外线诱导细胞死亡一样,程序性细胞坏死也是导致细胞死亡的重要原因^[8-9]。有研究表明,阿霉素诱导细胞死亡主要是因为细胞程序性坏死,而不是细胞凋亡。另有研究显示,Cyp-D 及其调节的 mPTP 开放可能在细胞程序性坏死过程中扮演着重要角色。大部分研究提示,Cyp-D 转移到线粒体内膜后,和线粒体内膜中蛋白质 ANT 形成复合体,指导 mPTP 开放,导致线粒体去极化,最终导致细胞坏死。

所以作者在前期通过华蟾素诱导肺癌细胞产生毒性作用后,测试了 Cyp-D 对华蟾素诱导肺癌细胞产生毒性作用的重要性。本研究结果显示 Cyp-D 抑制剂 CsA 和 mPTP 阻断剂 SfA 严重抑制了 Dox 诱导的 A549 细胞活性的降低和死亡,华蟾素诱导的细胞毒作用受到了 CsA 和 SfA 的阻碍。而且华蟾素降低了 A549 细胞中的 MMP,使 mPTP 得到开放。以上结果表明,Cyp-D 能调节由华蟾素诱导的 mPTP 开放和随后肺癌细胞的非凋亡性死亡。所以华蟾素很有可能成为一种新型抗肺癌药物,但仍需进一步研究证实。

参考文献

[1] Son MB,Gauvreau K,Burns JC,et al. Infliximab for intravenous immunoglobulin resistance in Kawasaki disease: a retrospective study[J]. J Pediatr,2011,158(4):644-649.
[2] Emam H,Zhao QL,Furusawa Y,et al. Apoptotic cell death by the novel natural compound, cinobufotalin[J]. Chem Biol Interact,2012,199(3):154-160.
[3] Yin PH,Liu X,Qiu YY,et al. Anti-tumor activity and ap-

optosis-regulation mechanisms of bufalin in various cancers: new hope for cancer patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(11):5339-5343.
[4] Javadov S,Kuznetsov A. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin D[J]. Front Physiol,2013,11(4):76.
[5] Lu JH,Shi ZF,Xu H. The mitochondrial cyclophilin D/p53 complexation mediates doxorubicin-induced non-apoptotic death of A549 lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem,2014,389(1/2):17-24.
[6] Zhen YF,Wang GD,Zhu LQ,et al. P53 dependent mitochondrial permeability transition pore opening is required for dexamethasone-induced death of osteoblasts[J]. J Cell Physiol,2014,229(10):1475-1783.
[7] Vaseva AV,Marchenko ND, Ji K, et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis[J]. Cell,2012,149(7):1536-1548.
[8] Chen B. Cisplatin-induced non-apoptotic death of pancreatic cancer cells requires mitochondrial cyclophilin-D-p53 signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 437(4):526-531.
[9] Ji C. Ultra-violet B (UVB)-induced skin cell death occurs through a cyclophilin D intrinsic signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,425(4):825-829.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-03-18)

(上接第 2022 页)

尿功能 I ~ III 级者分别占 51.35%、37.84% 和 10.81%;保留盆腔自主神经的患者性功能 I ~ IV 级者分别占 53.85%、33.33%、10.26% 和 2.56%,而没有保留盆腔自主神经的患者则分别占 37.84%、35.14%、13.51% 和 13.51%。保留盆腔自主神经对患者的排尿功能和性功能均有积极的保护意义。

在对结肠癌进行切除的同时又要保留盆腔的自主神经,解剖层次清晰,手术视野干净是手术成功的关键。作为医生应十分熟悉各个神经的分布和走形以及结肠癌常见淋巴转移的规律。也有人提出可以在手术过程中使用刚果红、白美蓝等物质进行神经染色,从而更为清晰的辨认神经纤维^[10],并提出在对神经周围的结缔组织进行清扫时尽量避免使用高频电刀,通过这样的方法更好地保护神经的功能。作者认为在进行手术操作时应坚持生命第一的原则,首先要保证根治的前提,其次尽可能地保护盆腔神经,保留功能。

总之,行腹腔镜下结肠癌根治术,既要保证原发灶彻底切除、充分清扫淋巴结,又要尽可能地保护患者的盆腔内脏神经,兼顾患者的生活质量。

参考文献

[1] Feuerlein S,Grimm LJ,Davenport MS,et al. Can the localization of primary colonic tumors be improved by staging CT without specific bowel preparation compared to optical colonoscopy[J]. Eur J Radiol,2012,81(10):2538-2542.
[2] 白洪祥,刘现立. 腹腔镜下结肠癌根治术安全性及对患者术后胃肠道功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2014(14):

4039-4040.
[3] 赵汎,施培友. 直肠癌 TME 术中保留盆腔自主神经对男性性功能及排尿功能的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志,2011,18(2):191-195.
[4] 何芳,张光全,李静. 腹腔镜结肠癌根治术与开腹手术的对比分析[J]. 结直肠肛门外科,2013,19(6):349-351.
[5] 任乐华,王世伟. 腹腔镜保留盆腔自主神经直肠癌根治术对性功能影响的临床研究[J]. 中国医药指南,2012,4(10):542-544.
[6] 郑逸川. 盆腔自主神经的保留对局部进展期直肠癌患者术后排尿功能及性功能影响的研究[J]. 河北医学,2013,19(10):1523-1526.
[7] 陶飞雪,周圆,潘留久,等. 两种不同放尿方法对留置导尿的胃结肠癌根治术患者膀胱功能的影响[J]. 护士进修杂志,2014(11):973-974.
[8] 杨孟选,可妮. 直肠癌直肠全系膜切除术中保留盆腔自主神经探讨[J]. 中国现代医学杂志,2011,21(34):4300-4302.
[9] 付建成,阎涛,李聪,等. 保留盆腔自主神经对男性直肠癌术后排尿功能和性功能的影响[J]. 中国综合临床,2011,27(8):865-867.
[10] 梁天伟,卢永刚,莫春连,等. 基于 TME 技术的直肠癌根治术中保留植物神经的临床体会[J]. 中国医药导报,2011,8(20):90-92.

(收稿日期:2015-01-20 修回日期:2015-03-15)