

柯里拉京对人肺癌细胞A549的抑制作用及其机制研究

张苹¹ 李鑫源² 查庆兵^{3*}

(¹暨南大学附属第一医院临床医学检验中心, 广州 510630; ²暨南大学基础医学院临床医学, 广州 510632; ³暨南大学附属第一医院胎儿医学科, 广州 510630)

摘要 该研究旨在探讨柯里拉京对人肺癌A549细胞凋亡的影响及其潜在作用机制。采用CCK-8细胞活性检测试剂盒检测柯里拉京对A549细胞活性的影响; 通过流式细胞术检测细胞凋亡; JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位; 免疫印迹法检测凋亡相关蛋白(bax、bcl-2、cleaved-caspase-3、cleaved-PARP)的表达量; 通过DCFH-DA探针标记检测细胞内ROS水平。研究结果显示, 柯里拉京处理能够剂量依赖性地抑制A549细胞的活性, 并通过上调bax的表达、下调bcl-2的表达, 破坏线粒体膜电位, 促进有活性的cleaved-caspase-3以及cleaved-PARP的形成, 诱导A549细胞凋亡。活性氧清除剂NAC能够明显逆转柯里拉京诱导的细胞凋亡。因此, 柯里拉京可能通过调节胞内ROS水平诱导人肺癌细胞A549发生凋亡。

关键词 柯里拉京; 活性氧; 细胞凋亡; 人肺癌细胞A549; bax/bcl-2; cleaved-caspase-3

Inhibitory Effects of Corilagin on Human Lung Cancer Cell A549 and the Underlying Mechanism

ZHANG Ping¹, LI Xinyuan², ZHA Qingbing^{3*}

(¹Clinical Medical Laboratory Center, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China;

²Clinical Medicine, School of Basic Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

³Department of Fetal Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract The aim of this study was to explore the influences of corilagin on the apoptosis of A549 cells and the underlying action mechanism. The cell viability of A549 cells was detected by CCK-8 assay kit. The apoptosis was analyzed by flow cytometry. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 assay kit. The expression levels of apoptotic proteins (bax, bcl-2, cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP) were detected by Western blot. The ROS levels were evaluated by DCFH-DA probe labeling. The results showed that corilagin dose-dependently inhibited cell viability, and it could up-regulate bax and down-regulate bcl-2. Then, mitochondrial membrane potential was damaged, and the formation of active cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP were promoted, finally inducing apoptosis of A549 cells. NAC (a ROS scavenger) could obviously reverse corilagin-induced apoptosis. Therefore, corilagin may induce the apoptosis of human lung cancer A549 cells by regulating intracellular ROS levels.

Keywords corilagin; reactive oxygen; apoptosis; human lung cancer cell A549; bax/bcl-2; cleaved-caspase-3

收稿日期: 2020-04-16 接受日期: 2020-06-15

广东省自然科学基金(批准号: 2017A030313782)和广东省科技计划(批准号: 2016ZC0041)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13450264639, E-mail: zhaqingbb@sina.com

Received: April 16, 2020 Accepted: June 15, 2020

This work was supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2017A030313782) and Guangdong Science and Technology Plan (Grant No.2016ZC0041)

*Corresponding author. Tel: +86-13450264639, E-mail: zhaqingbb@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5329>

肺癌是世界上最危险的癌症之一^[1]。在中国,肺癌是癌症相关死亡的主要原因之一。到目前为止,肺癌的死亡率超过6/1 000,占中国所有癌症相关死亡的1/5以上^[2]。目前,手术、化学治疗、放射治疗和靶向治疗是肺癌的主要治疗方式,而化学治疗是肺癌治疗的首选策略^[2]。但是常用的化疗药物虽然具有抗肿瘤生长作用,但其毒副作用相对较大,在长期使用过程中,容易产生耐药性。然而天然中药成分在肿瘤预防与治疗中的作用一直倍受关注,成为抗肿瘤领域中的一大热点。

柯里拉京(corilagin)是一种从民族药理植物中提取的多酚单宁酸,其具有多种生物学和药理学作用,包括抗病毒、抗炎、抗氧化、降血脂、降压、抗凝血等^[3]。以往研究表明,柯里拉京在肿瘤治疗中具有潜在的作用。柯里拉京可以通过调节不同肿瘤的各种细胞信号通路来控制癌细胞的生长,如胶质瘤^[4-5]、肝癌^[6]和卵巢癌^[7]。而且柯里拉京可通过减少囊性纤维化支气管IB3-1细胞中IL-8(interleukin-8)、MCP1(monocyte chemotactic protein 1)和RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor)的分泌,进而显著性减轻炎症反应^[8]。另外,柯里拉京可通过阻断卵巢癌中典型Smad(signal transduction molecule)和非典型ERK/AKT(extracellular signal-regulated kinase/protein kinase B)通路的激活,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[9]。此外,也有研究报道,柯里拉京通过诱导细胞自噬以及细胞凋亡的发生而抑制乳腺癌细胞的增殖^[10],以及通过PI3K/Akt(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B)信号诱导人恶性黑色素瘤细胞A375发生凋亡并抑制其增殖^[11]。虽然柯里拉京具有抗癌等药理学活性,但是目前其在肺癌细胞中的作用及潜在作用机制仍不清楚。因此,本研究拟探讨柯里拉京对人肺癌细胞A549增殖的影响,以及其是否通过损伤线粒体诱导A549细胞发生凋亡而发挥抗肿瘤作用,以促进其在肿瘤治疗中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

肺癌细胞A549购自ATCC(American Type Culture Collection)。柯里拉京(corilagin)购自Sigma-Aldrich公司。细胞培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自Thermo

Fisher公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Sigma-Aldrich公司。Anti-bax-antibody、anti-bcl-2-antibody、anti-cleaved-caspase-3-antibody、anti-PARP-antibody、anti- β -actin-antibody以及HRP-linked goat anti-rabbit IgG购自CST公司。CCK-8细胞活性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。活性氧清除剂N-乙酰-L-半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞凋亡(Annexin-V/PI双染)检测试剂盒、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司。

1.2 细胞活性检测

将人肺癌细胞A549接种于96孔板中,过夜培养;用柯里拉京处理24 h或48 h后,孔板中每孔加入10 μ L CCK-8试剂于37 $^{\circ}$ C进一步孵化1 h,置于酶标仪中于490 nm波长下测量吸光值(D值)并记录分析数值。

1.3 细胞凋亡检测

将人肺癌细胞A549接种于6孔板;第2天,用柯里拉京(50、100、150 μ mol \cdot L⁻¹)处理细胞24 h,冷PBS洗2次,接着用Annexin-V在室温下孵育15 min;然后去除Annexin-V染液,将细胞于PI染液中孵育5 min;最后通过流式细胞术进行检测,并进行数据采集和分析。

1.4 线粒体膜电位检测

将A549细胞接种于6孔板,过夜后,用柯里拉京(150 μ mol \cdot L⁻¹)处理24 h,采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测处理后的细胞内线粒体的膜电位。通过LEICA ATCSP8显微镜拍照,并用Leica分析软件进行分析并记录数据。

1.5 免疫印迹检测

将A549细胞接种于6孔板,过夜后,用柯里拉京(50、100、150 μ mol \cdot L⁻¹)处理24 h,提取细胞中的总蛋白,并对细胞裂解液中的蛋白进行定量;随后通过SDS-PAGE电泳将蛋白分离,接着通过转膜装置将蛋白质转移至PVDF膜上,接下来加入封闭液(含30 mL \cdot L⁻¹ FBS和1 mL \cdot L⁻¹ Tween-20)封闭1 h;然后加入一抗置于4 $^{\circ}$ C摇床上孵育过夜;第2天,加入二抗于室温下孵育1 h;最后加入化学发光液进行显影并拍照记录结果。

1.6 ROS水平检测

将A549细胞按适当比例及密度接种于6孔板中,培养过夜后,用活性氧清除剂(NAC, 5 mmol \cdot L⁻¹)预处理或不加NAC处理1 h,然后用柯里拉京(150 μ mol \cdot L⁻¹)处理24 h,采用活性氧检测试剂盒-DCFH-DA法检测处理后细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)

水平,最后通过流式细胞术进行分析并记录数据。

1.7 统计与分析

实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行单因素方差分析,以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用 Tukey 检验,两组之间采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柯里拉京诱导 A549 细胞发生细胞凋亡

在本研究中,如图 1A 所示,用柯里拉京处理 A549 细胞 24 h 或 48 h 后,发现柯里拉京能够明显抑制 A549 细胞的活性,并呈剂量依赖性。另外,通过 Annexin-V/PI 双染后,流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,柯里拉京能够明显地呈剂量依赖性诱导人肺癌细胞 A549 发生细胞凋亡(Annexin-V⁺/PI⁻以及 Annexin-V⁺/PI⁺)(图 1B)。以上研究结果显示,柯里拉京能够有效地抑制 A549 细胞的活性并且诱导细胞凋亡的发生。

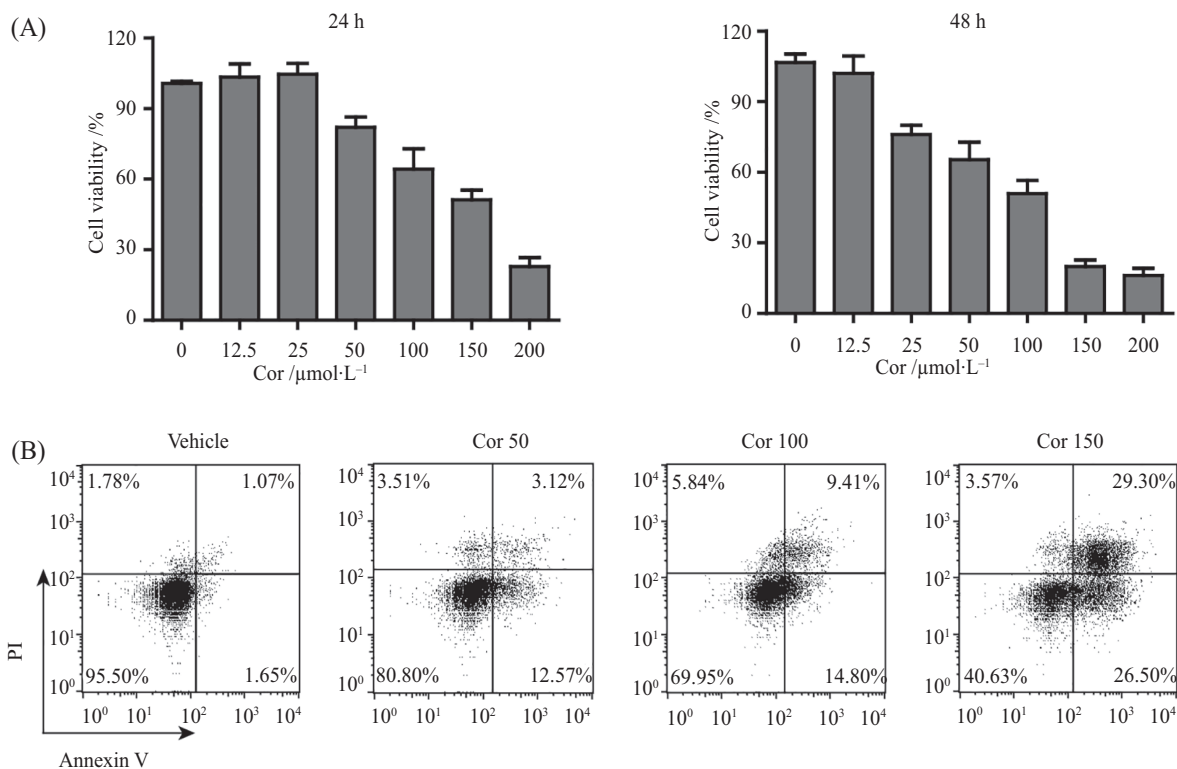
2.2 柯里拉京激活 A549 细胞中线粒体内源性凋亡途径

相关研究报道,柯里拉京能够诱导卵巢癌与乳

腺癌细胞发生凋亡并且能够明显地增加癌细胞的凋亡比例^[7,10]。而诱导细胞凋亡常见的途径为线粒体途径与死亡受体途径。因此,我们探索了柯里拉京是否可以通过损伤线粒体来诱导肺癌细胞发生凋亡。首先,通过 JC-1 检测试剂盒检测线粒体膜电位,结果显示,柯里拉京能够损伤线粒体膜电位(图 2A 和图 2B)。接下来,探讨了柯里拉京对 A549 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响,包括 bax、bcl-2、cleaved-caspase-3 以及 cleaved-PARP。Western blot 结果显示,柯里拉京能够明显地上调 bax 的表达并下调凋亡抑制蛋白 bcl-2 的表达(图 2A~图 2C)。同时,柯里拉京处理能够促进下游凋亡执行蛋白 caspase-3 加工并剪切形成活化的 cleaved-caspase-3,伴随着其作用底物聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]同样被加工并活化形成具有活性的 cleaved-PARP,标志着凋亡通路的启动(图 2A、图 2D 和图 2E)。以上结果表明,柯里拉京通过募集 bax 破坏线粒体从而诱导 A549 细胞发生凋亡。

2.3 柯里拉京上调 ROS 水平诱导细胞凋亡

以往研究表明,ROS 对于胞内信号转导以及维

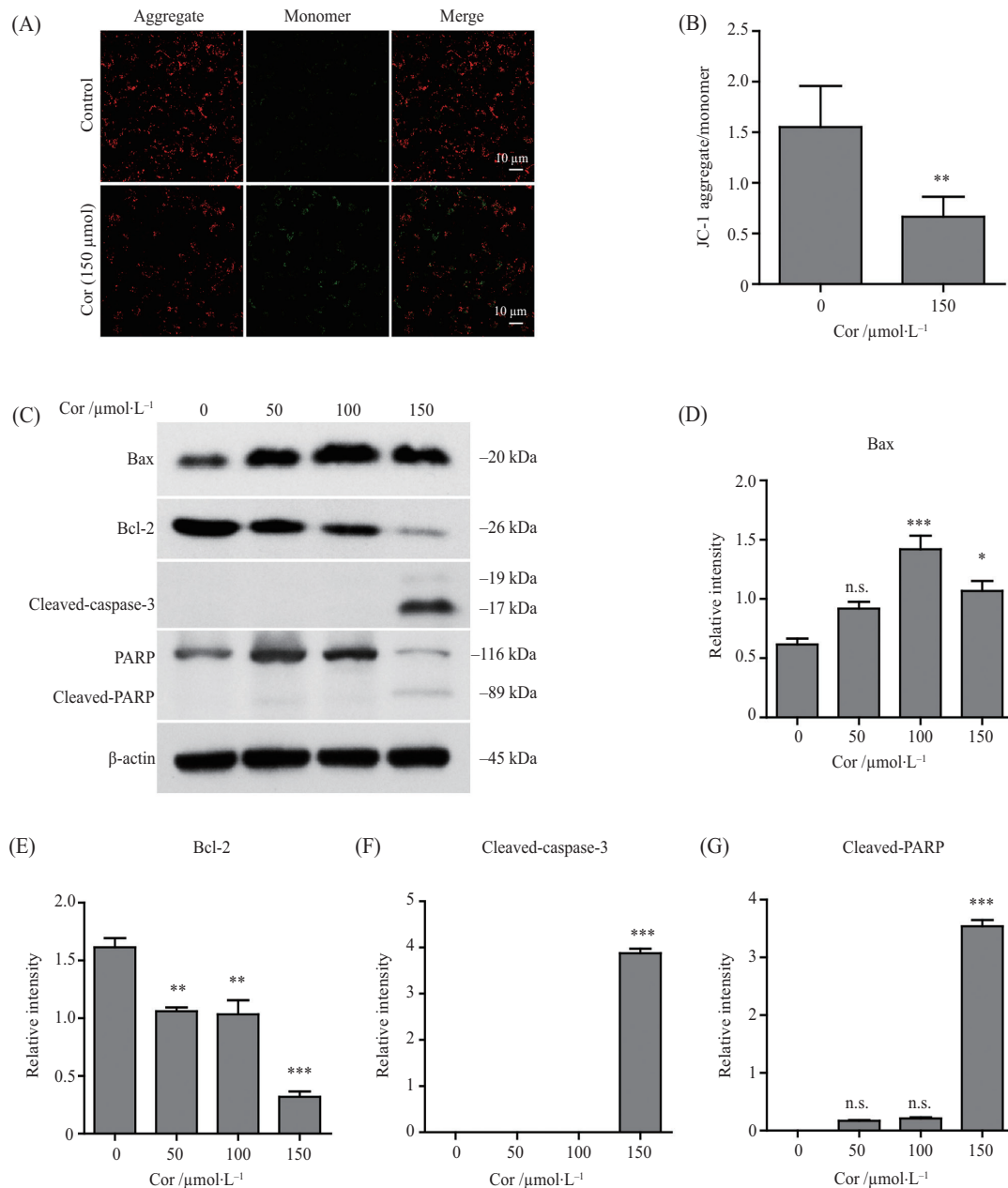


A: CCK-8检测细胞活性; B: Annexin-V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡。Cor: corilagin。

A: cell viability was analyzed using CCK-8 assay; B: Annexin-V-FITC/PI double staining was used to detect cell apoptosis. Cor: corilagin.

图1 柯里拉京诱导人肺癌细胞A549发生凋亡

Fig.1 Corilagin induces the apoptosis of human lung cancer cell A549



A、B: JC-1检测试剂盒检测线粒体膜电位; C: Western blot检测细胞裂解液中细胞凋亡相关蛋白的表达水平; D~G: 细胞凋亡相关蛋白表达水平的灰度统计。Cor: corilagin; n.s.: 无显著性差异。 $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与柯里拉京未处理组相比。

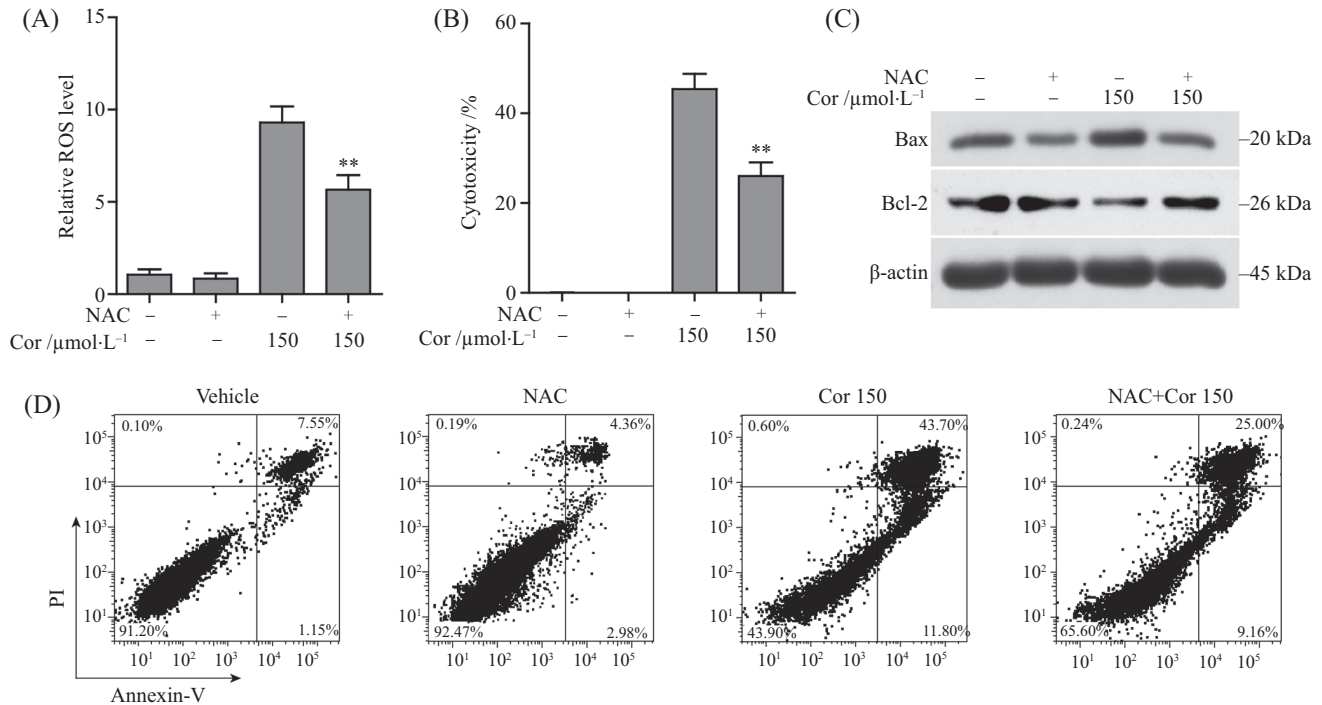
A,B: the mitochondrial membrane potential was determined by JC-1 detection kit; C: Western blot was used to assess the expression levels of apoptotic proteins in cell lysates; D-G: the relative gray values of apoptotic proteins were quantified. Cor: corilagin; n.s.: no significant difference. $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with Cor untreated group.

图2 柯里拉京影响人肺癌A549细胞中凋亡相关蛋白的表达

Fig.2 Corilagin affects the expression of apoptotic proteins in human lung cancer cell A549

持氧化还原稳态具有重要作用^[12]。在本研究中, 观察到柯里拉京能够上调A549细胞内的ROS水平(图3A)。为了进一步揭示ROS在柯里拉京诱导A549细胞发生凋亡中的作用, 本研究选用NAC进行处理, 以此来阻断ROS积累对细胞产生的危害。结果显示, NAC预处理能够逆转柯里拉京上调ROS水平的作

用, 并且能够有效地逆转柯里拉京诱导的细胞凋亡, 同时, 与对照组相比, NAC单独处理不会诱导细胞死亡(图3A和图3B)。另外, Western blot检测结果显示, NAC预处理同样能够逆转柯里拉京对bax和bcl-2表达的影响(图3C), 并且抑制柯里拉京诱导的细胞凋亡(图3D)。上述结果表明, 柯里拉京可能通过上调



A: DCFH-DA探针标记检测A549细胞内ROS水平; B: CCK-8检测细胞毒性; C: Western blot检测细胞裂解液中bax和bcl-2表达水平。“-”表示不加药,“+”表示添加药物; D: Annexin-V-FITC/PI双染法检测细胞细胞凋亡。 $n=3$; ** $P<0.01$, NAC+柯里拉京处理组 vs 柯里拉京单独处理组; Cor: corilagin。

A: the ROS levels in A549 cells were measured by DCFH-DA probe labeling; B: cytotoxicity was detected by CCK-8 assay; C: Western blot was used to assess the expression levels of bax and bcl-2 in cell lysates. “-” represents no medicine, and “+” represents adding medicine; D: Annexin-V-FITC/PI double staining was used to detect cell apoptosis. $n=3$; ** $P<0.01$, NAC+Cor group vs Cor treatment group; Cor: corilagin。

图3 NAC抑制柯里拉京诱导的人肺癌细胞A549凋亡

Fig.3 NAC inhibits corilagin-induced apoptosis in human lung cancer cell A549

ROS水平诱导细胞凋亡。

3 讨论

肺癌是常见的恶性肿瘤之一,而化学治疗依然是晚期肺癌综合治疗的首选治疗方式^[2]。但是化学治疗的总效率不理想,且容易出现药物耐受。因此,寻找新的、毒副作用小的治疗方法或药物以有效治疗肺癌成为近年来研究的热点。

程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)通路在所有多细胞生物的生长、存活、体内平衡以及先天免疫等方面具有重要的生理作用^[13]。根据其表型差异,PCD可被分为细胞凋亡和细胞坏死2种重要形式。而细胞凋亡主要通过4种途径介导,目前在肿瘤研究中,Fas(tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6)/FasL(Fas ligand)介导的外源性凋亡途径和Mitochondria内源性凋亡途径是被研究较多的2个核心通路^[13]。Caspase蛋白家族和bcl蛋白家族是参与细胞凋亡级联反应的主要调节因子^[13]。在线粒体内源性通路介导的细胞凋亡中,通过上调bax

蛋白的表达,并募集bax蛋白至线粒体上,破坏线粒体膜电位平衡并导致细胞色素C释放至胞质内,从而活化caspase-9,进而切割caspase-3/7并形成有活性的cleaved-caspase-3/7,导致其底物PARP被加工并活化形成cleaved-PARP,最终导致细胞凋亡的发生^[13]。

在本研究中发现,柯里拉京处理能够剂量依赖性地抑制人肺癌细胞A549的增殖并诱导细胞凋亡。研究进一步发现,柯里拉京处理能够破坏线粒体膜电位,并且上调bax的表达,下调凋亡抑制蛋白bcl-2的表达,进而促进有活性的cleaved-caspase-3以及cleaved-PARP的形成。这些结果提示,柯里拉京能够促进人肺癌细胞A549发生细胞凋亡。这些结果也表明,柯里拉京对人肺癌细胞A549具有一定的治疗作用。

那么,柯里拉京是如何诱导人肺癌细胞A549发生细胞凋亡的呢?以往研究表明,细胞内ROS水平与细胞凋亡密切相关,且有助于bax被募集至线粒体上并破坏膜电位,进而活化caspase-3诱导细胞凋亡^[14]。在本研究中,结果显示柯里拉京能够上调人肺癌细胞

胞A549中的ROS水平, 而NAC预处理能够逆转柯里拉京对胞内ROS水平的上调作用。同时NAC预处理可以降低柯里拉京诱导的细胞凋亡, 也能够逆转柯里拉京对bax和bcl-2蛋白表达的影响。这些结果提示, 柯里拉京可能通过调节胞内ROS水平, 从而诱导人肺癌细胞A549发生细胞凋亡。

总之, 本研究发现, 柯里拉京可能通过调节胞内ROS水平诱导人肺癌细胞A549发生细胞凋亡, 提示柯里拉京具有治疗肺癌的潜在价值, 并且值得进一步探索验证。此外, 虽然本研究显示ROS可能介导了柯里拉京诱导的细胞凋亡, 但柯里拉京是否能够通过其他方式发挥抗肿瘤作用, 需要进一步的研究阐明。

参考文献 (References)

- [1] 黎媛, 赵嘉璐, 蓝秀, 等. 伊曲康唑通过激活AMPK诱导内质网应激凋亡途径抑制A549细胞增殖的实验研究[J]. 中国药理学杂志(LI Y, ZHAO J L, LAN X, et al. Inhibition effects of itraconazole on A549 cells proliferation via AMPK mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis *in vitro* [J]. Chin Pharm J), 2019, 54(7): 558-62.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] LI X, DENG Y, ZHENG Z, et al. Corilagin, a promising medicinal herbal agent [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 43-50.
- [4] YANG W T, LI G H, LI Z Y, et al. Effect of corilagin on the proliferation and NF-kappaB in U251 glioblastoma cells and U251 glioblastoma stem-like cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 1418309.
- [5] 陈俊, 周佳彬, 李根华, 等. 柯里拉京对神经胶质瘤U373MG细胞增殖和迁移能力的影响[J]. 济宁医学院学报 (CHEN J, ZHOU J B, LI G H, et al. The influence of corilagin on the NF-kappaB in glioma U251 cell and stem cell [J]. Journal of Jining Medical College), 2019, 42(3): 158-61.
- [6] MING Y, ZHENG Z, CHEN L, et al. Corilagin inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing G₂/M phase arrest [J]. Cell Biol Int, 2013, 37(10): 1046-54.
- [7] ATTAR R, CINCIN Z B, BIRELLER E S, et al. Apoptotic and genomic effects of corilagin on SKOV3 ovarian cancer cell line [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1941-6.
- [8] GAMBARI R, BORGATTI M, LAMPRONTI I, et al. Corilagin is a potent inhibitor of NF-kappaB activity and downregulates TNF-alpha induced expression of IL-8 gene in cystic fibrosis IB3-1 cells [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(3): 308-15.
- [9] JIA L, JIN H, ZHOU J, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF-beta signaling pathways [J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 33.
- [10] TONG Y, ZHANG G, LI Y, et al. Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(8): 3795-807.
- [11] 黄海潮, 周捷, 郑公铭, 等. 柯里拉京对人恶性黑色素瘤细胞抑制作用机制的研究[J]. 中国药理学通报 (HUANG H C, ZHOU J, ZHENG G M, et al. Inhibitory effect of corilagin on human malignant melanoma cells [J]. Chin Pharm Bulletin), 2018, 34(11): 1577-82.
- [12] LI Y, LIU B, YANG F, et al. Lobaplatin induces BGC-823 human gastric carcinoma cell apoptosis via ROS- mitochondrial apoptotic pathway and impairs cell migration and invasion [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 1239-46.
- [13] OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. Cell Prolif, 2012, 45(6): 487-98.
- [14] ZHOU B, ZHANG J Y, LIU X S, et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis [J]. Cell Res, 2018, 28(12): 1171-85.