

布雷菲德菌素 A 通过线粒体凋亡途径增强顺铂抗肺癌细胞的作用

郑翔¹⁾, 耿娜娜^{2), 3)}, 杨蕾¹⁾, 吴明松^{2)*}, 李学英^{1)*}

(¹⁾ 遵义医学院医学遗传学教研室, 贵州 遵义 563006; (²⁾ 遵义医学院贵州省普通高等学校口腔
疾病研究特色重点实验室暨遵义市口腔疾病研究重点实验室, 贵州 遵义 563006;

³⁾ 遵义医学院贵州省普通高等学校微生物资源及药物开发特色重点实验室, 贵州 遵义 563006)

摘要 本研究证明了线粒体凋亡途径在布雷菲德菌素 A (brefeldin A, BFA) 联合顺铂 (cis-dichlorodiamine platinum, CDDP) 抗非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中的作用。MTT 结果显示, BFA 对肺癌 GLC-82 和 NCI-H1299 细胞的半数有效抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别是 100 ng/mL 和 400 ng/mL, CDDP 对 GLC-82 和 NCI-H1299 细胞的 IC₅₀ 分别是 4 μg/mL 和 15 μg/mL; 而分别采用半量的 BFA 和 CDDP 联合处理 GLC-82 或 NCI-H1299 细胞后, 抑制作用均进一步加强。DAPI 染色结果进一步证明了二者的协同作用——与单独用药组相比, 细胞核染色质固缩加剧, 核裂解碎片增多, 乃至形成凋亡小体, 表明细胞凋亡的发生。与单药组比较, 联合用药导致肺癌 GLC-82 细胞线粒体膜电位显著下降; q-RT-PCR 及 Western 印迹结果显示, 在联合用药早期 (24 h), GLC-82 细胞可能通过提高 Bcl2 表达以促进存活; 而在联合用药晚期 (48 h), 细胞已发生不可逆转的凋亡, Bcl2 表达受抑制, 同时二者通过促进 Bax 表达来诱导细胞色素 C 释放, 使胱天蛋白酶 3 发生剪切激活, 最终诱导细胞凋亡发生。提示线粒体凋亡途径可能是 BFA 协同 CDDP 抗非小细胞肺癌的分子机制之一, 为肺癌的临床治疗方案提供了更多的理论依据。

关键词 布雷菲德菌素 A; 顺铂; 肺癌; 协同作用; 线粒体凋亡

中图分类号 R73-36

Enhancement of Cis-dichlorodiamine Platinum Against Lung Cancer cells Through the Mitochondrial Apoptosis Pathway by Brefeldin A

ZHENG Xiang¹⁾, GENG Na-Na^{2), 3)}, YANG Lei¹⁾, WU Ming-Song^{2)*}, LI Xue-Ying^{1)*}

(¹⁾ Medical Genetics Department of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, China;

²⁾ Special Key Laboratory of Oral Diseases Research, Higher Education institutions of Guizhou province or
Key Laboratory of Oral Disease Research in Zunyi, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, China;

³⁾ Special Key Laboratory of Microbial Resources and Drug Development, Higher Education Institution in
Guizhou Province, Zunyi Medical University, Zunyi 5630006, Guizhou, China)

Abstract In this study, we investigated the involvement of mitochondrial apoptosis pathway in the

收稿日期: 2018-01-12; 修回日期: 2018-04-21; 接受日期: 2018-10-15

国家自然科学基金 (No. 81760508); 贵州省科技厅资助项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7548 号); 贵州省教育厅特色药用资源研发创新团队 (黔科合人才团队字 [2013] 15 号); 遵义医学院硕士启动基金 (No. F-841, F-827)

* 通讯作者 Tel: 86-0851-28609643, E-mail: hanyue4187@163.com; Tel /Fax: 86-0851-28609692, E-mail: leexueying4722@163.com

Received: January 12, 2018; Revised: April 21, 2018; Accepted: October 15, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81760508); Natural Science Foundation of Guizhou Province (No. LH [2014] 7548); Creative Team of Special Drug in Education Office of Guizhou Province (No. [2013] 15); Master's Scientific Fund of Zunyi Medical University (No. F-841, No. F-827)

* Corresponding author Tel: 86-0851-28609643, E-mail: hanyue4187@163.com; Tel /Fax: 86-0851-28609692, E-mail: leexueying4722@163.com

synergistic anti-cancer effect of brefeldin A (BFA) and cis-dichlorodiamine platinum (CDDP) on the non-small cell lung cancer (NSCLC). MTT assays revealed that BFA alone inhibited the proliferation of GLC-82 cells or NCI-H1299 cells with an IC_{50} of 100 ng/mL or 400 ng/mL respectively, and CDDP alone inhibited the proliferation of GLC-82 cells or NCI-H1299 cells with an IC_{50} of 4 μ g/mL or 15 μ g/mL respectively. The inhibitory effect was further strengthened with half doses of BFA and CDDP in combination. With combined exposure of drugs, more abnormal cells with chromatin condensation were observed, together with increased numbers of apoptotic bodies with nucleus and cytoplasm fragmentation. Compared to single drug exposures, the mitochondrial membrane potential of GLC-82 cells decreased significantly. qRT-PCR and Western blotting results showed that cells may improve survival by increasing the expression level of Bcl2 at the early stage (24 h), and an irreversible apoptosis at the late stage (48 h) when the expression level of Bcl2 was inhibited. At the same time, BFA and CDDP induced the release of Cyt C by promoting the expression level of Bax, which induced the shear activation of Caspase 3 and eventually induced apoptosis. These data suggested that the mitochondrial apoptosis pathway may be one of the molecular mechanisms of BFA in combination with CDDP against human lung cancer cells. Our work thus provide a more theoretical basis for the clinical treatment of NSCLC.

Key words brefeldin A (BFA); cis-dichlorodiamine platinum (CDDP); lung cancer; synergistic effect; mitochondrial apoptosis

肺癌 (lung cancer) 是最常见的癌症之一,也是癌症死亡的首要原因。其中,非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是其最常见的病理类型^[1]。2017 年全国肿瘤登记中心收集并汇总了 2014 年全国肿瘤登记处的统计资料,预测结果显示,2014 年中国新发恶性肿瘤病例约 380.4 万例,死亡病例 229.6 万例。其中,肺癌每年发病病例约为 78.1 万,死亡病例约为 62.6 万;另据估计,2015 年中国肺癌发病病例约为 73.3 万,死亡病例约为 61.0 万,其发病率及死亡率均居全国恶性肿瘤的首位^[2-3]。顺铂 (cis-dichlorodiamine platinum, CDDP) 是首先应用于临床抗肿瘤的铂络合物,也是治疗肺癌的一线化疗药物,但是其对机体具有较强的毒副作用,如耳毒性、肾毒性、听神经毒性和消化道反应等。近年来,随着癌细胞对化疗药物耐药性的增强,铂类治疗的效果并不理想。因此,寻找一种既能够促进肺癌细胞凋亡,同时又能够减少 CDDP 剂量的低毒性、辅助性治疗药物,具有十分重要的研究意义。天然产物具有结构和功能的多样性,是开发和研究疾病治疗新药物的重要材料,其中真菌产生的次生代谢产物被认为是新药主要结构的重要来源^[4-5]。布雷菲德菌素 A (brefeldin A, BFA) 是一种大环内酯类抗生素,是真菌中重要的次生代谢产物,具有多种生物活性,包括抗肿瘤、抗菌、抗病毒活性等^[6]。已有研究表明,BFA 对人前列腺癌、白血病和结肠癌均具有一定的抑制作用,此外还可协同增强吉他西滨对人胰腺癌 MIA PaCa-2 细胞的抑制作用^[7-8]。细胞凋亡主要包括 3 条途径,即线粒体凋亡途径、内质网

应激凋亡途径和细胞死亡受体途径^[9]。研究表明,BFA 可通过激活线粒体凋亡途径,诱导卵巢癌细胞和乳腺癌细胞凋亡的发生^[10-11]。本课题组前期的研究表明,BFA 可协同 CDDP 增强对肺癌 GLC-82 细胞的抑制作用,且与内质网应激凋亡途径中 IRE1-XBP1 和 PERK-ATF4 通路的激活有关^[12-14],但二者协同抗肺癌的作用是否也与其线粒体凋亡途径的激活有关,尚未阐明。因此,本研究探讨了线粒体凋亡途径标志性分子 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 蛋白 (B-cell lymphoma/leukemia, Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白 (bcl2-associated X, Bax) 和细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 在 BFA 协同 CDDP 抗肺癌中的作用,为肺癌的临床治疗方案提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌 GLC-82 细胞系,由中科院昆明动物所曹毅研究员惠赠。人肺癌 NCI-H1299 细胞系,由中国科学院细胞库提供。

布雷菲德菌素 A 购自 Cell Signaling Technology 公司,顺铂注射液 ($Cl_2 (NH_3)_2 Pt$) 购自山东齐鲁制药公司,胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司,PCR 引物由上海生工生物公司合成,M-MLV 逆转录酶和 RNase 抑制剂购自 Promega 公司,dNTP Mix (10mM) 购自上海生工生物公司, RNAiso TM Plus 购自 TaKaRa Biotechnology 公司,q-RT-PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司,兔抗人 β 肌动蛋白单抗、兔抗人 Bcl2 多抗、兔

抗人 Bax 多抗及二抗均购自 Protein-Tech Group 公司,兔抗人细胞色素 C 单抗购自 Abcam 公司。

二氧化碳培养箱 (Gold-Sim) 购自西盟国际公司,生物洁净工作台 (BCM-1300 A) 购自安泰空气技术公司,倒置荧光显微镜 (IX73) 购自 Olympus 公司,程序降温盒 (5100-0001) 购自 Nalgene 公司,流式细胞仪 (Gallios) 购自 Beckman Coulter 公司,PCR 仪 (CFX Connect™ Optics Module) 和电泳仪 (PowerPac Basic) 均购自 Bio-Rad 公司,凝胶成像系统 (Gel Doc XR) Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养

人肺癌 GLC-82、NCI-H1299 细胞系培养于 RPMI-1640 培养基中,培养基含有 10 % 胎牛血清、2.0 g/L NaHCO₃、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素,置于 37 ℃、95 % 空气、5 % CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。细胞为贴壁生长,每 2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.3 MTT 检测

取对数期细胞培养 24 h,对于 GLC-82 细胞:分别设置 0、25、50、75、100、125、150 ng/mL BFA 及 0、1、2、3、4、5、6 μg/mL CDDP 为实验组;对于 NCI-H1299 细胞:分别设置 0、100、200、300、400、500 ng/mL BFA 及 0、6、9、12、15、18、21 μg/mL CDDP 为实验组。药物处理 24 h,加入 MTT,孵育 4 h 后弃上清,加入 DMSO,于 570 nm 波长下测定各孔的吸光值(A)。细胞生长抑制率计算公式如下:抑制率 (%) = 1 - (实验组 A 值 - 调零组 A 值) / (对照组 A 值 - 调零组 A 值)。

1.4 DAPI 染色

调整细胞浓度为 3 × 10⁵ 个/mL,将细胞接种于 6 孔板 (板底放置有无菌盖玻片) 中静置培养 24 h,对于 GLC-82 细胞:分别设置 50 ng/mL BFA 组,2 μg/mL CDDP 组,50 ng/mL BFA + 2 μg/mL CDDP 组为实验组,对照组加入等体积生理盐水;对于 NCI-H1299 细胞:分别设置 200 ng/mL BFA 组,7.5 μg/mL CDDP 组,200 ng/mL BFA + 7.5 μg/mL CDDP 组为实验组,对照组加入等体积生理盐水。继续培养 24 h,经丙酮固定后,用 DAPI 溶液染色 5 min,于荧光显微镜下观察细胞核的变化,并采集图像。

1.5 流式细胞术检测线粒体膜电位的变化

取对数期 GLC-82 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 3 × 10⁵ 个细胞,静置培养 24 h,分别设置 50 ng/mL BFA 组、2 μg/mL CDDP 组和 50 ng/mL BFA

+ 2 μg/mL CDDP 组为实验组,对照组加入等体积生理盐水。继续培养 12 h 和 24 h,收集细胞,用 PBS 溶液漂洗 2 次,800 r/min 离心 5 min,用 JC-1 染料进行染色,具体步骤详见说明书 (碧云天, C2006),用流式细胞仪检测分析。

1.6 实时荧光定量 PCR

药物处理细胞 24 h 或 48 h,裂解 GLC-82 细胞后提取其总 RNA,超微量分光光度计检测总 RNA 纯度并测定其浓度,琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,根据 q-RT-PCR 试剂盒法逆转录合成 cDNA。引物:β-Actin, F: 5'-CGGGAAATCGTCCGTG AC-3', R: 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3'; Bcl2, F: 5'-GGTGGGTCATGTGTGTGG-3', R: 5'-CGG TTCAGGTACTCAGTCATCC-3'; Bax, F: 5'-CCCGAG AGGTCTTTTCCGAG-3', R: 5'-CCAGCCCATGATGG TTCTGAT-3'; Cyt C, F: 5'-CTTTGGGCGGAAGA CAGGTC-3', R: 5'-TTATTGGC GGCTGTGTAAGAG-3'。将 cDNA 按 1:10 稀释后作为模板,建立以下反应体系:总体积 10 μL,包括 1 μL cDNA,5 μL Sso Fast Eva Green supermix,0.5 μL 3' 引物,0.5 μL 5' 引物,3 μL 无菌水。PCR 反应程序为:94 ℃ 60 s, 95 ℃ 20 s,56 ℃ (β-Actin 和 Bax) 或 60.3 ℃ (Bcl2) 或 57.6 ℃ (Cyt C) 30 s,40 个循环周期。每个样品设 3 管重复。用 β 肌动蛋白作为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 的方法,以 3 管重复的平均值计算基因的相对表达量。

1.7 Western 印迹

药物处理细胞 24 h 或 48 h,裂解 GLC-82 细胞后提取总蛋白质,BCA 法测定蛋白质的浓度,取一定量蛋白质样品,进行蛋白质变性、上样、电泳、转膜、脱脂牛奶封闭、一抗孵育 (Bcl2 1:1 000; Bax 1:2 000; Cyt c 1:10 000; β-肌动蛋白 1:10 000)、二抗孵育 (1:2 000)、曝光显影和拍照。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,IPP 软件分析 Western 印迹条带的灰度值,两组间比较采用独立样本 *t* 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BFA 和 CDDP 抑制 GLC-82、NCI-H1299 细胞的生长

药物处理后,采用 MTT 法测定细胞的存活率。

本研究显示, BFA 和 CDDP 均能抑制 GLC-82 和 H1299 细胞的生长, 且均呈剂量性依赖。对于 GLC-82 细胞, BFA 和 CDDP 的 IC_{50} 分别是 100 ng/mL (Fig. 1 A) 和 4 μ g/mL (Fig. 1B)。选择 IC_{50} 各一半的浓度联合处理细胞, BFA、CDDP 及联合用药对 GLC-82 细胞生长的抑制率分别为 $(23.6 \pm 2.7)\%$ 、 $(21.6 \pm 1.8)\%$ 和 $(59.8 \pm 1.2)\%$ ($P < 0.01$, Fig. 1C), 表明二者联合用药能够增强对 GLC-82 细胞生

长的抑制作用。

对于 NCI-H1299 细胞, BFA 和 CDDP 的 IC_{50} 分别是 400 ng/mL (Fig. 1D) 和 15 μ g/mL (Fig. 1E)。选择 IC_{50} 各一半的浓度联合处理细胞, BFA、CDDP 及联合用药对 NCI-H1299 细胞生长的抑制率分别为 $(31.4 \pm 0.6)\%$ 、 $(32.1 \pm 1.2)\%$ 和 $(53.2 \pm 0.9)\%$ (Fig. 1F), 表明 BFA 和 CDDP 联合用药能够增强对 H1299 细胞生长的抑制作用。

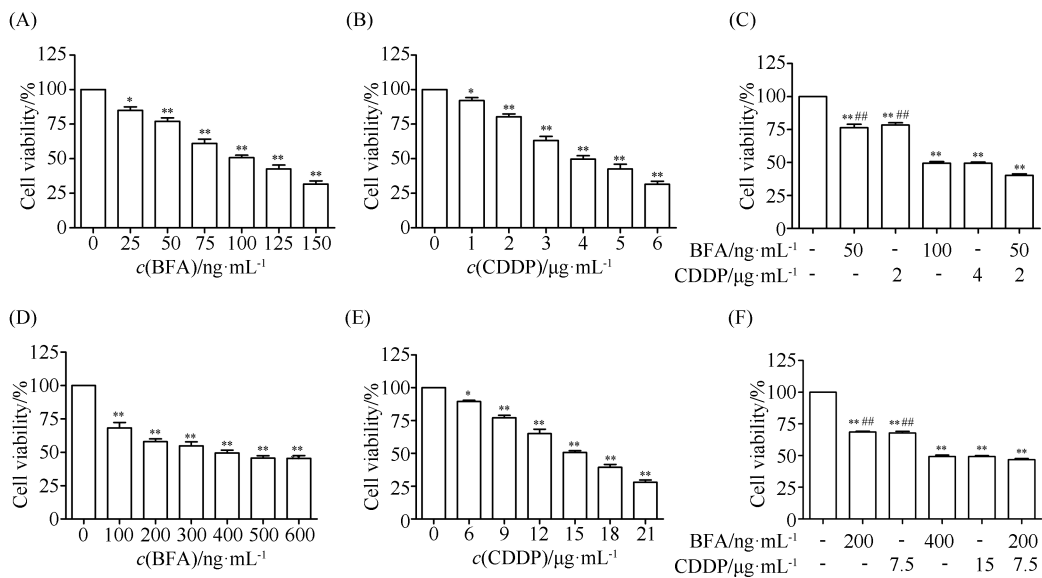


Fig. 1 Inhibitory effects of BFA and CDDP on the growth of GLC-82 and NCI-H1299 cells *in vitro* GLC-82 cells were treated with BFA (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ng/mL) (A), CDDP (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 μ g/mL) (B), as well as BFA and CDDP (C) for 24 hours. NCI-H1299 cells were treated with BFA (0, 100, 200, 300, 400, 500 ng/mL) (D), CDDP (0, 6, 9, 12, 15, 18, 21 μ g/mL) (E), as well as BFA and CDDP (F) for 24 hours. The MTT method was used to test cell proliferation. The absorbance at 570 nm was measured using a microtiter plate reader (SpectraMax 2e). The data were presented as mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the control group without BFA and CDDP; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, compared with the group of BFA + CDDP

2.2 BFA 协同 CDDP 促进 GLC-82、NCI-H1299 细胞核固缩和裂解

DAPI 染料能够穿透活细胞膜, 与核 DNA 相结合, 产生蓝色荧光, 可用于检测细胞核的变化及细胞凋亡情况。本研究显示, 对于 GLC-82 细胞, 对照组细胞核较为完整, 呈圆形或者椭圆形, 染色质均匀, 呈淡蓝色 (Fig. 2A)。BFA 组和 CDDP 组的部分细胞核发生固缩, 产生部分蓝色荧光 (Fig. 2B, 2C)。BFA + CDDP 组出现大小不等的凋亡小体 (核裂解的碎片) (箭头所示), 具有典型的细胞凋亡核形态特征 (Fig. 2D)。

对于 NCI-H1299 细胞, DAPI 染色结果与 GLC-82 细胞基本一致, 对照组细胞核完整, 呈圆形或者椭圆形, 染色质均匀, 呈淡蓝色 (Fig. 2E)。BFA 组和 CDDP 组的部分细胞核发生固缩、裂解, 产生部分

蓝色荧光 (Fig. 2F, 2G)。联合用药组细胞核固缩严重、且为致密浓染, 亦呈现出典型的细胞凋亡核形态学变化 (Fig. 2H)。

2.3 BFA 协同 CDDP 促进 GLC-82 细胞线粒体膜电位下降

上述实验结果表明, BFA 和 CDDP 对非小细胞肺癌 GLC-82、NCI-H1299 细胞均具有生长抑制作用和促凋亡作用。在此基础上, 本研究选择其中一种代表细胞系 GLC-82 细胞, 通过检测其线粒体膜电位和线粒体凋亡途径标志性分子 Bcl2、Bax 和 Cyt C 表达的变化, 以进一步探讨二者协同促进非小细胞肺癌细胞凋亡的作用。

本研究采用 JC-1 试剂盒, 用于检测细胞线粒体膜电位。当线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中, 形成聚合物, 呈现红色荧光; 当线粒体膜

电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,呈现绿色荧光。JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变,可作为细胞早期凋亡的一个检测指标。结果显示,药物处理 12 h 时,BFA 组、CDDP 组和 BFA + CDDP 组细胞线粒体膜电位下降率分别为 $(11.9 \pm 0.7)\%$ 、 $(17.0 \pm 0.5)\%$ 和 $(42.8 \pm 0.8)\%$,均显著高于对照组 $(2.5 \pm 0.3)\%$ ($P < 0.01$);此外,BFA + CDDP 组线粒体膜电位下降率亦显著高于 BFA 组和 CDDP 组 ($P < 0.01$) (Fig. 3A,3B)。药物处理 24 h 时,BFA 组、CDDP 组和 BFA + CDDP 组细胞线粒体膜电位下降率分别为 $(6.1 \pm 0.2)\%$ 、 $(8.4 \pm 0.2)\%$ 和 $(28.3 \pm 0.7)\%$,均显著高于对照组 $(3.7 \pm 0.2)\%$ ($P < 0.01$);此外,BFA + CDDP 组线粒体膜电位下降率亦显著高于 BFA 组和 CDDP 组 ($P < 0.01$) (Fig. 3C,3D)。

2.4 BFA 与 CDDP 对 GLC-82 细胞 Bcl2 表达的影响

q-RT-PCR 及 Western 印迹结果显示,药物处理细胞 24 h 时,与对照组相比,BFA 组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 显著升高 ($P < 0.05$),*Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 有所降低 ($P > 0.05$);CDDP 组和 BFA + CDDP 组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 和 *Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。药物处理细胞 48 h 时,与对照组相比,BFA 组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 和 *Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 均有所升高 ($P < 0.01$, $P > 0.05$);CDDP 组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 有所升高 ($P > 0.05$),*Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 显著降低 ($P < 0.01$);BFA + CDDP 组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 有所升高 ($P < 0.01$),*Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 显著降低 ($P < 0.01$)。

药物处理细胞 24 h 时,与 BFA 组、CDDP 组相比,联合用药组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 和 *Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 均显著升高 ($P < 0.01$)。药物处理细胞 48 h 时,与 BFA 组相比,联合用药组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 和 *Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.01$);与 CDDP 组相比,联合用药组 *Bcl2* mRNA 水平 (Fig. 4A) 和 *Bcl2* 蛋白水平 (Fig. 5A,5B) 均有所升高 ($P < 0.01$, $P > 0.05$)。表明联合用药 24 h 时,BFA 与 CDDP 协同促进了 *Bcl2* 的表达;联合用药 48 h 时,二者协同抑制了 *Bcl2* 的表达。

2.5 BFA 协同 CDDP 促进 GLC-82 细胞 Bax 的表达

q-RT-PCR 及 Western 印迹结果显示,药物处理

细胞 24 h 时,与对照组相比,BFA 组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 有所升高 ($P < 0.05$),*Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 有所降低 ($P > 0.05$);CDDP 组和 BFA + CDDP 组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 和 *Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。药物处理细胞 48 h 时,与对照组相比,BFA 组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 有所升高 ($P < 0.05$),*Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 有所降低 ($P < 0.05$);CDDP 组和 BFA + CDDP 组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 和 *Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

药物处理细胞 24 h 时,与 BFA 组、CDDP 组相比,联合用药组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 和 *Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 均显著升高 ($P < 0.01$);药物处理细胞 48 h 时,与 BFA 组相比,联合用药组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 和 *Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),与 CDDP 组相比,联合用药组 *Bax* mRNA 水平 (Fig. 4B) 和 *Bax* 蛋白水平 (Fig. 5A,5C) 均有所升高 ($P < 0.01$, $P > 0.05$)。表明联合用药 24 h 和 48 h 时,BFA 协同 CDDP 促进了 *Bax* 的表达。

2.6 BFA 协同 CDDP 促进 GLC-82 细胞 Cyt C 的表达

q-RT-PCR 及 Western 印迹结果显示,药物处理细胞 24 h 时,与对照组相比,BFA 组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 显著升高 ($P < 0.01$),*Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 有所降低 ($P > 0.05$);CDDP 组和 BFA + CDDP 组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 和 *Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。药物处理细胞 48 h 时,与对照组相比,BFA 组 CDDP 组和 BFA + CDDP 组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 和 *Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 均显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

药物处理细胞 24 h 时,与 BFA 组、CDDP 组相比,联合用药组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 和 *Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 均显著升高 ($P < 0.01$);药物处理细胞 48 h 时,与 BFA 组相比,联合用药组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 和 *Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),与 CDDP 组相比,联合用药组 *Cyt C* mRNA 水平 (Fig. 4C) 和 *Cyt C* 蛋白水平 (Fig. 5A,5D) 均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)。表明用药 24 h 和 48 h 时,BFA 协同 CDDP 促进了 *Cyt C* 的表达。

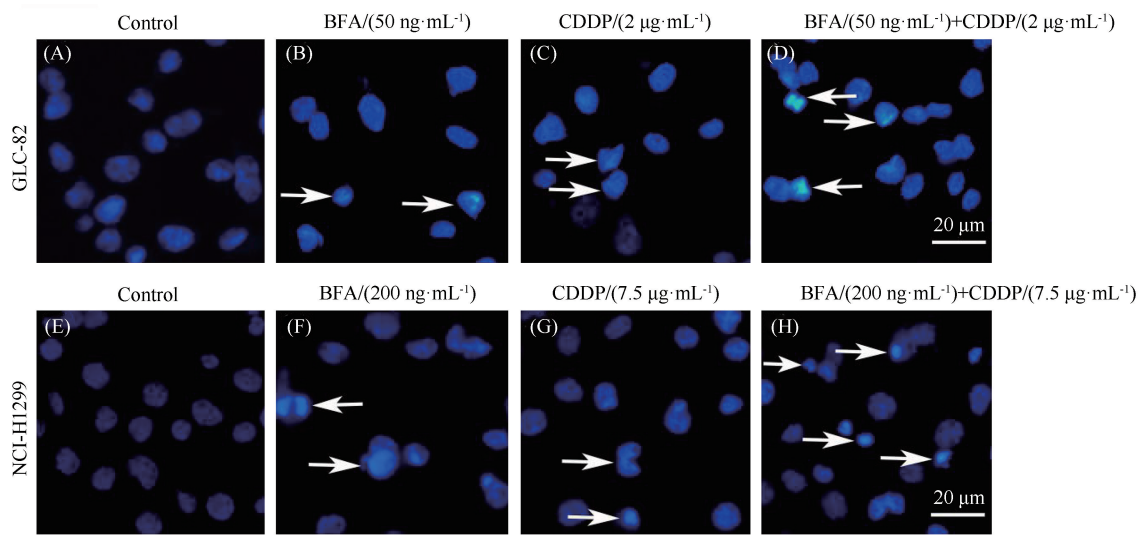


Fig. 2 Combined treatment of BFA and CDDP induced GLC-82 and NCI-H1299 cell nucleic changes The cells were treated with BFA or/and CDDP for 24 hours , then stained with DAPI and imaged by inverted fluorescence microscopy. The arrow indicated apoptotic bodies or nuclear fragments

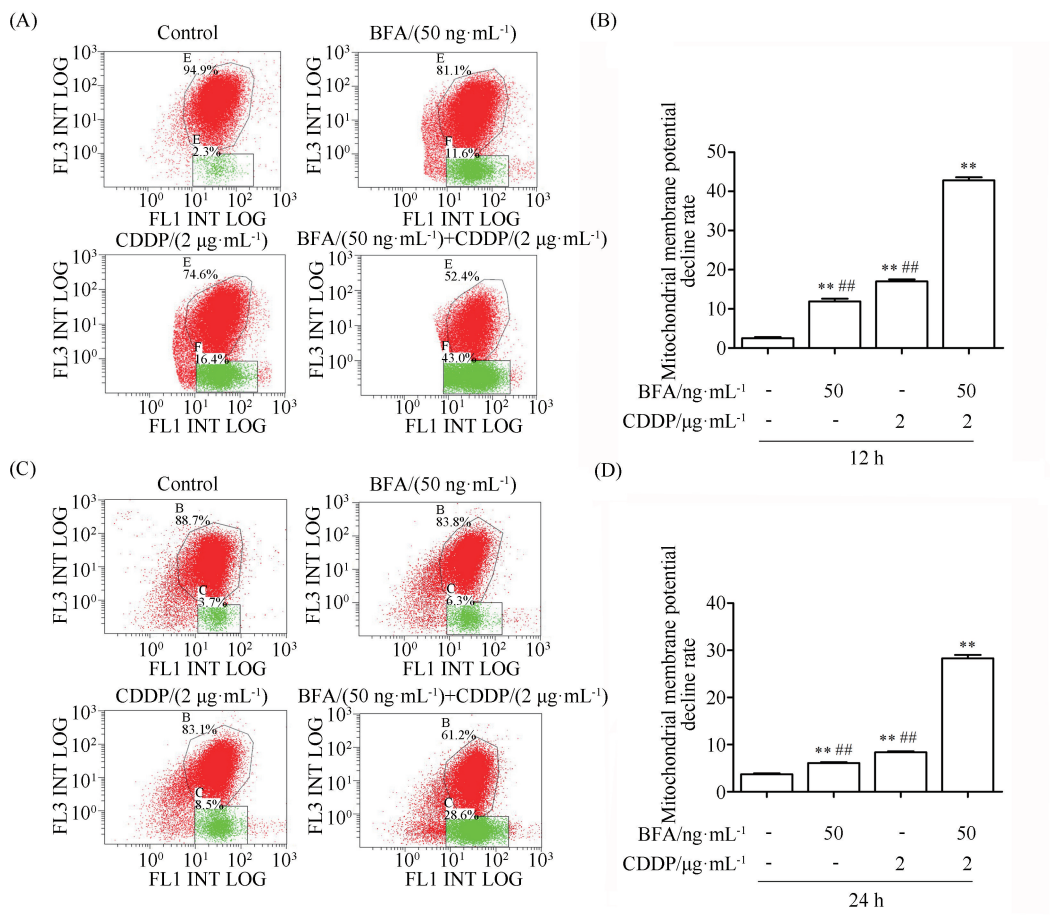


Fig. 3 Effects of BFA and CDDP on mitochondrial membrane potential by cell flow cytometry After GLC-82 cells were treated with BFA in combination with CDDP for 12 or 24 hours, the mitochondrial membrane potentials were tested by flow cytometry using JC-1 staining. The results showed the rate decline of every independent experiment. The data were presented as mean ± SD of three determinations from independent experiments. **P < 0.01, compared with the control group without BFA and CDDP; ##P < 0.01, compared with the group of BFA + CDDP. (A-B) Cells were treated with BFA or/and CDDP for 12 hours; (C-D) Cells were treated with BFA or/and CDDP for 24 hours

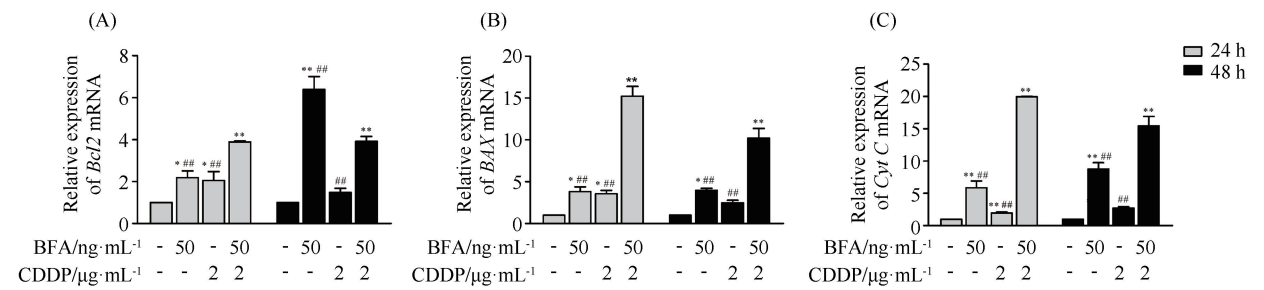


Fig. 4 Effects of combination of BFA (50 ng/mL) and CDDP (2 μg/mL) on the expression of *Bcl2*, *Bax* and *Cyt C* mRNA After GLC-82 cells were treated with BFA combined CDDP for 24 hours, total RNA was isolated using the TRIzol reagent and treated with DNase I to remove genomic DNA. The levels of *Bcl2* (A), *Bax* (B), *Cyt C* (C) were quantified by real-time PCR and normalized with β-Actin by a CFX Connect using a commercial kit. The data were presented as means ± SD of three determinations from independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the control group without BFA and CDDP; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, compared with the group of BFA + CDDP

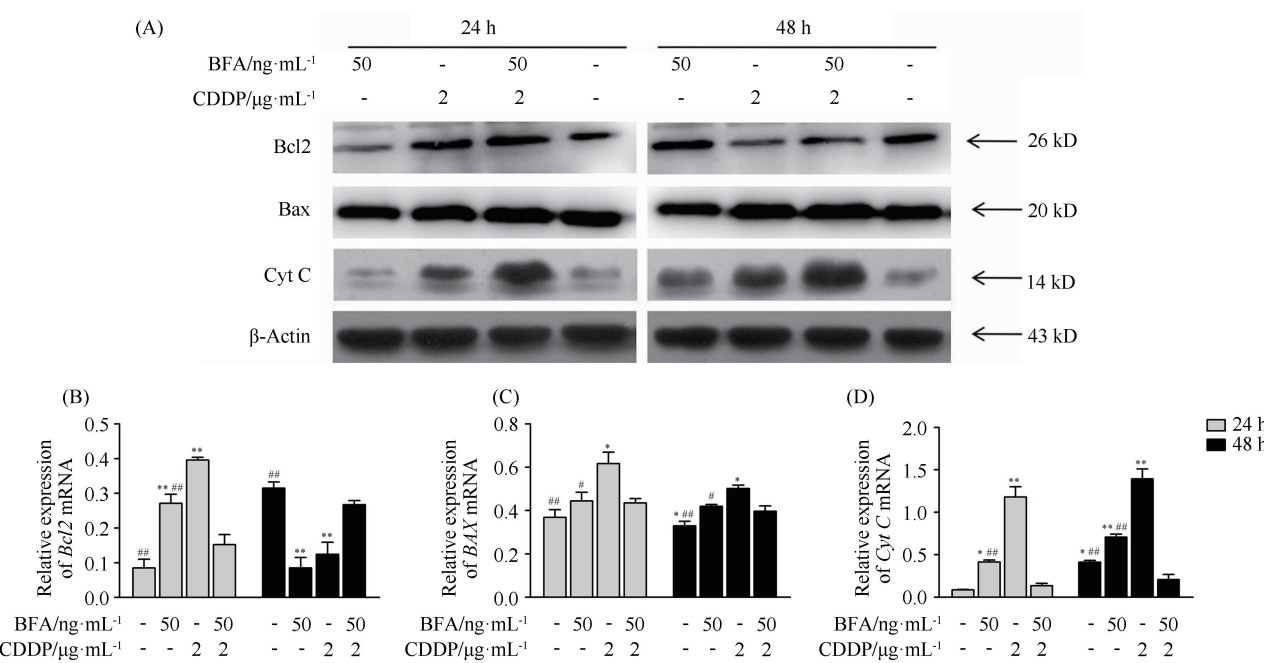


Fig. 5 Effects of combination of BFA (50 ng/mL) and CDDP (2 μg/mL) on expression of *Bcl2*, *Bax* and *Cyt C* proteins After GLC-82 cells were treated with BFA in combination with CDDP for 24 hours, cell lysates were prepared. The proteins were separated by 10 % SDS-PAGE. After transferring onto the PVDF membrane, the blots were probed with anti-β-Actin, anti-Bcl2, anti-Bax and anti-Cyt C antibodies (A). β-Actin was used for normalization. The amount of Bcl2 (B), Bax (C), Cyt C (D) proteins were quantified by the integrated density (Image-Pro Plus) of each band. The data were presented as mean ± SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the control group without BFA and CDDP; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, compared with the group of BFA + CDDP

3 讨论

本研究结果显示,BFA 和 CDDP 均能够抑制非小细胞肺癌 GLC-82 细胞和 NCI-H1299 细胞的生长,且均呈剂量性依赖。选择 IC_{50} 各一半的浓度联合处理细胞,细胞生长的抑制作用进一步增强。此外,联合用药导致 GLC-82 细胞和 NCI-H1299 细胞的细胞核固缩严重、且为致密浓染,出现大小不等的

凋亡小体,呈现出典型的细胞凋亡核形态学特征,表明细胞凋亡的发生。在此基础上,选用其中一种代表细胞系 GLC-82 细胞,进一步探讨了二者协同抑制细胞生长及促进细胞凋亡的作用,是否与其线粒体凋亡途径的激活有关。

线粒体是真核细胞中能量代谢的中心,其正常生理功能的丧失会导致细胞凋亡的发生,其担负着细胞凋亡信号的传导和放大。线粒体凋亡途径主要

有外源性凋亡途径和内源性凋亡途径,两种途径的信号均集中在线粒体上,并通过 Bcl2 蛋白家族来调控细胞凋亡。Bcl2 蛋白家族在线粒体凋亡途径的调控中发挥重要的作用。一方面,线粒体中的抗凋亡蛋白 Bcl2 释放 Ca^{2+} ,诱导线粒体膜上通透性转换孔开放,改变线粒体膜的通透性,从而启动细胞的外源性凋亡程序^[15]。另一方面,Bcl2 与 Bcl2 家族的其他成员如促凋亡蛋白 Bax 松散地结合于线粒体外膜,使 Bax 从细胞质向线粒体移位而发生寡聚化,促使线粒体外膜上形成离子通道,膜通透性增加,导致线粒体跨膜电位降低,从而释放 Cyt C 蛋白^[16-18]。Cyt C 是线粒体凋亡途径的一个关键性分子,Cyt C 主要位于线粒体内膜上,不能自由通过线粒体外膜,Cyt C 的释放是线粒体内源性凋亡途径启动的标志性事件。其从由线粒体向细胞质发生移位,与凋亡蛋白酶激活因子(apoptosis protease-activating factor, Apaf-1)形成复合物,诱导胱天蛋白酶 9 与其结合形成凋亡小体,激活后的胱天蛋白酶 9 能够进一步激活下游的胱天蛋白酶 3 等分子,从而引发胱天蛋白酶家族级联反应,最终启动细胞内源性凋亡的程序^[19-21]。

本研究结果显示,BFA 与 CDDP 联合处理 GLC-82 细胞 12 h 和 24 h,细胞线粒体膜电位均显著下降,且与 24 h 时相比,12 h 时膜电位下降更为显著,表明联合用药引起了细胞凋亡早期线粒体功能的改变。二者联合处理细胞 24 h 时,Bcl2、Bax 和 Cyt C 的表达水平均有所上调;联合处理细胞 48 h 时,Bcl2 的表达水平显著下调,而 Bax 和 Cyt C 的表达仍维持在较高水平,表明在 BFA 与 CDDP 联合用药的早期,GLC-82 细胞可能通过提高 Bcl2 的表达来促进细胞的存活;而在联合用药的晚期,细胞发生不可逆转的凋亡,从而 Bcl2 的表达受到抑制,同时二者通过促进 Bax 的表达来诱导 Cyt C 的释放,促使胱天蛋白酶 3 发生剪切而激活,最终诱导细胞凋亡的发生。本课题组前期的研究结果也表明,BFA 联合 CDDP 促进了 GLC-82 细胞中胱天蛋白酶 3 前体发生裂解激活^[13],进一步佐证了本研究结果。有研究显示,BFA 可通过激活线粒体凋亡途径,下调 Bcl2 水平、上调 Bax 和 Cyt C 的水平,来诱导卵巢癌细胞 OVCAR-3 凋亡的发生^[10];BFA 还能够下调乳腺癌细胞 MDA-MB-231 抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达水平,从而对乳腺癌细胞产生毒性和促凋亡作用^[11],本研究结果与其具有一致性。因此,BFA 协同增强 CDDP 诱导 GLC-82 细胞凋亡的另一种主要机制可

能是,BFA 与 CDDP 联合诱导细胞线粒体膜上通透性转换孔开放,促进膜通透性增加,导致线粒体跨膜电位降低;同时通过降低抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达和增加促凋亡蛋白 Bax 的表达,进一步促进了 Cyt C 的释放,最终激活了胱天蛋白酶 3,从而启动细胞线粒体内源性凋亡程序。此外,研究表明 BFA 可通过线粒体介导的细胞凋亡途径,来激活 NT2 神经元样细胞内质网应激凋亡途径,并最终激活胱天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 6^[22]。研究表明,内质网应激途径的标志性分子 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)的高表达能够抑制 Bcl2 的表达,诱导 Bax 由细胞质移位至线粒体,同时触发 Bax/Bad 系统,激活胱天蛋白酶 9、胱天蛋白酶 3 等,从而启动胱天蛋白酶家族发生级联反应,促进细胞凋亡的发生^[23]。而本课题组前期研究结果表明,BFA 联合 CDDP 能够促进 GLC-82 细胞中 CHOP 的表达^[11],因此我们推测在 BFA 联合 CDDP 诱导 GLC-82 细胞凋亡的过程中,线粒体凋亡途径可能与内质网应激凋亡途径相互调控、协同发挥作用,但其具体的分子机制有待进一步深入研究。

综上所述,BFA 协同增强了 CDDP 诱导非小细胞肺癌 GLC-82 和 NCI-H1299 细胞凋亡的作用,且可能与细胞线粒体凋亡途径的激活密切相关,为肺癌的靶向治疗及临床化疗方案提供了新的方向和思路。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(1): 7-30
- [2] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤(Chen WQ, Sun KX, Zheng RS, et al. Report of Cancer Incidence and Mortality in Different Areas of China, 2014[J]. Chin Cancer), 2018, **27**(1): 1-14
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132
- [4] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, **1830**(6): 3670-3695
- [5] Demain AL, Martens E. Production of valuable compounds by molds and yeasts[J]. J Antibiot (Tokyo), 2017, **70**(4): 347-360
- [6] Raekiansyah M, Mori M, Nonaka K, et al. Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses[J]. Trop Med Health, 2017, **45**: 32
- [7] Togawa A, Ito H, Kimura F, et al. Establishment of gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells and effect of brefeldin-a on the resistant cell line[J]. Pancreas, 2003, **27**(3): 220-224
- [8] Rajamahanty S, Alonzo C, Aynehchi S, et al. Growth inhibition of androgen-responsive prostate cancer cells with brefeldin A targeting cell cycle and androgen receptor[J]. J Biomed Sci, 2010, **17**: 5
- [9] Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2014, **5**: e996

- [10] Lee SA, KimYJ, Lee CS. Brefeldin A induces apoptosis by activating the mitochondrial and death receptor pathways and inhibits focal adhesion kinase-mediated cell invasion[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, **113**(5): 329-338
- [11] Tseng CN, Hong YR, Chang HW, *et al.* Brefeldin A reduces anchorage-independent survival, cancer stem cell potential and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. *Molecules*, 2014, **19**(11): 17464-17477
- [12] 吴明松, 郑翔, 耿娜娜, 等. Brefeldin A 通过内质网应激途径协同增强顺铂抗肺癌细胞 GLC-82 作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Wu MS, ZX, Geng NN, *et al.* The Synergistic Anti-cancer Effect of BFA and CDDP on Human Lung Cancer GLC-82 Cells[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, **32**(5): 587-593
- [13] 吴明松, 郑翔, 耿娜娜, 等. 布雷菲德菌素 A 通过激活 IRE1-XBP1 信号通路增强顺铂诱导的人肺癌 GLC-82 细胞凋亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Wu MS, Zheng X, Geng NN, *et al.* Brefeldin A Enhances Cisplatin-induced Apoptosis of Human Lung Cancer GLC-82 Cells by Activating IER1-XBP1 Signaling[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, **32**(6): 672-677
- [14] 吴明松, 郑翔, 耿娜娜, 等. 布雷菲德菌素 A 联合顺铂增强肺癌 GLC-82 细胞 PERK-ATF4 通路的激活水平[J]. *实用医学杂志* (Wu MS, Zheng X, Geng NN, *et al.* Enhanced activation of PERK-ATF4 pathway by Brefeldin A and cisplatin in human lung cancer GLC-82 cells[J]. *J Pract Med*), 2016, **32**(14): 2302-2305
- [15] Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, *et al.* Many players in BCL-2 family affairs[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, **39**(3): 101-111
- [16] Yang J, He F, Meng Q, *et al.* Inhibiting HIF-1 α Decreases Expression of TNF- α and Caspase-3 in Specific Brain Regions Exposed Kainic Acid-Induced Status Epilepticus [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, **38**(1): 75-82
- [17] Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, *et al.* Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1817**(4): 598-609
- [18] Ng KB, Bustamam A, Sukari MA, *et al.* Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin A isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, **13**: 41
- [19] Al Sinani SS, Eltayeb EA, Coomber BL, *et al.* Solamargine triggers cellular necrosis selectively in different types of human melanoma cancer cells through extrinsic lysosomal mitochondrial death pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2016, **16**: 11
- [20] Cho SY, Lee JH, Ju MK, *et al.* Cystamine induces AIF-mediated apoptosis through glutathione depletion[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1853**(3): 619-631
- [21] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, *et al.* The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, **942**: 157-183
- [22] Arduino DM, Esteves AR, Domingues AF, *et al.* ER-mediated stress induces mitochondrial-dependent caspases activation in NT2 neuron-like cells[J]. *BMB Rep*, 2009, **42**(11): 719-724
- [23] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, **11**(4): 381-389