



桔梗皂苷 D 诱导人肺癌细胞 A549 的凋亡及机制

代群¹, 陈哲¹, 葛宇清¹, 刘培¹, 王海兵¹, 马小琼¹, 吴葆华^{2*}

(1. 浙江中医药大学附属第一医院 国家中医临床研究基地, 浙江 杭州 310006;
2. 浙江大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的:研究桔梗皂苷 D(platycodin, PD)抑制人肺癌 A549 细胞株增殖和诱导凋亡的分子机制。方法:体外培养人肺癌细胞株 A549, PD 作用终浓度分别为 5~20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MTT 法测定 PD 对细胞的增殖抑制作用, 显微镜观察细胞的形态学变化, Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡率, JC-1 检测线粒体膜电位的变化, Western blot 方法检测 PD 对 Caspase-3, Caspase-9, PARP 的剪切片段和 Bax, Bcl-2, Bak, Bcl-xl 蛋白表达的影响。结果:PD 抑制 A549 细胞的增殖, 并随药物浓度的增加和作用时间的延长, 作用更显著; 与对照组相比, 不同浓度的 PD 作用 24 h 后, 细胞凋亡率增加, 线粒体膜电位降低, 且差异显著。蛋白电泳检测结果显示蛋白 Caspase-3, Caspase-9 均出现剪切片段, 并随着时间的增加断裂更明显。PD 处理 A549 细胞后, Bax 和 Bak 蛋白表达升高, Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表达下降。结论: PD 具有明显的细胞毒作用, 能诱导 A549 细胞凋亡, 通过对 Bax, Bak 和 Bcl-2, Bcl-xl 表达的调控, 导致线粒体膜电位的下降, 进而激活 Caspase 最终导致肺癌细胞死亡。

[关键词] 桔梗皂苷 D; A549; 线粒体膜电位; 细胞凋亡

肺癌已成为世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 2003 年世界卫生组织 WHO 公布的死亡率是每年 110 万。世界各国特别是工业发达国家, 肺癌的发病率和病死率均迅速上升。目前肺癌发病机制未完全阐明, 但从肿瘤学角度分析, 肺癌发生本质在于细胞增殖与凋亡的调控。近年来中药的抗癌研究尤其对中药抑制肿瘤细胞增殖与诱导细胞凋亡的研究取得很大进展。中药桔梗主要功效宣肺、祛痰排脓、抗炎, 近年国内外的研究发现中药桔梗的有效成分桔梗皂苷对角质细胞^[1]、人白血病细胞株^[2-4]、卵巢癌细胞株 SKOV3^[5]、乳腺癌细胞 MCF-7^[6]等具有抑制增殖和诱导凋亡作用, 但机制未完全明了。本研究拟探讨中药单体桔梗皂苷 D 对人肺癌细胞株 A549 的作用及其机制, 为进一步阐明桔梗皂苷 D 抗肿瘤作用机制提供更多的实验依据。

1 材料

1.1 试剂 胎牛血清购自 Hyclone 公司; RPMI1640 培养液培养基购自吉诺公司; 噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司; Apoptosis Assay 细胞凋亡试剂盒 (批号

71926) 和 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 74141) 均购自 BD 公司; Bax (2772S), Bcl-2 (2870S), Bak (3814S), Bcl-xl (2764S), cleaved Caspase-9 (9505S), cleaved PARP (9542S), cleaved Caspase-3 (9661S), β -actin (4970P) 及抗兔和抗鼠的二抗均为 Cell Signal 公司产品; 桔梗皂苷 D (PD) 购自中国食品药品检定研究院。

1.2 细胞株及细胞培养 人肺癌细胞株 A549 购自上海中国科学院肿瘤细胞研究所, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养, 细胞呈悬浮生长, 达 90% 左右时传代。

2 方法

2.1 细胞增殖抑制试验 收集对数生长期的 A549 细胞, 以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 加入终浓度为 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PD, 每个浓度设平行孔 6 个, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中继续培养 24, 48 h, 每孔加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后, 离心弃上清, 加入 150 μL DMSO 溶解, 酶标仪 490 nm 处检测吸光度, 计算药物的体外生长抑制率 $\text{IR} = (1 - A_{\text{给药孔}}/A_{\text{对照孔}}) \times 100\%$, 试验重复 4 次。

2.2 细胞凋亡试验 取对数生长期的 A549 细胞, 以 5×10^4 个/mL 接种于 6 孔板, 每孔 1 mL。实验组加入 PD, 浓度分别为 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 空白

[稿件编号] 20111018005

[基金项目] 浙江省卫生厅科研基金项目 (2010KYA072)

[通信作者] * 吴葆华, E-mail: baohuawu@126.com

[作者简介] 代群, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药抗肿瘤分子机制研究, Tel: (0517)56620280



对照组加入等体积的 DMSO,于药物作用细胞 24 h 离心收集各浓度实验组与对照组的细胞。按试剂盒说明书进行操作,冷 PBS 缓冲液洗 2 次,重悬于 $1 \times$ 结合缓冲液,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。取 100 μL 细胞悬液加 5 μL Annexin V-FITC 标记液和 5 μL PI($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)混匀,室温避光孵育 15 min 后,加 400 μL $1 \times$ 结合缓冲液,流式细胞仪检测,分析细胞凋亡的百分比。

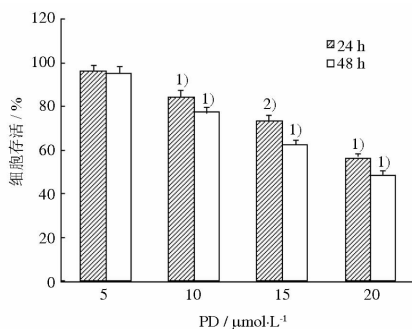
2.3 线粒体膜电位的测定 收集 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD 作用 24 h 后的细胞,设不加药为对照组, PBS 洗细胞 3 次,取 500 μL $10 \times$ 缓冲液加 4.5 mL 灭菌去离子水稀释成 $1 \times$ incubation buffer, 混匀并预热至 37°C ,吸取 2.5 mL $1 \times$ 缓冲液,加入 5 μL JC-1 存储液,涡旋混匀配成 JC-1 存储液,取 500 μL JC-1 存储液将细胞均匀悬浮, 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中孵育 15 min,室温离心收集细胞,用 $1 \times$ 缓冲液洗 2 次,吸取 500 μL $1 \times$ 缓冲液重新悬浮细胞,流式细胞仪检测检测线粒体膜电位。

2.4 Western blot 检测蛋白表达 取处于对数生长期的细胞,5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD 处理 24 h 后,收集细胞, PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液 100 μL , $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,蛋白定量,取 30 μg 蛋白,加入上样缓冲液, 100°C 下变性 10 min。10% 的聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭后依次加入第一、二抗体,在室温下孵育 2 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,过氧化物酶法显色,凝胶纤维摄像系统处理。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计,各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用 t 检验进行处理,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PD 对 A549 细胞的生长抑制作用 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 PD 处理细胞 24 h,对肿瘤细胞增殖的抑制率分别为 $(5.9 \pm 0.04)\%$, $(15.8 \pm 0.04)\%$, $(26.3 \pm 0.05)\%$, $(43.6 \pm 0.06)\%$, PD 作用 48 h 对 A549 细胞的增殖抑制率分别为 $(9.4 \pm 0.05)\%$, $(23.1 \pm 0.06)\%$, $(48.7 \pm 0.04)\%$, $(52.6 \pm 0.05)\%$,较对照组有显著差异,说明 PD 对肺癌细胞株 A549 的增殖有抑制作用,并且该抑制作用呈现明显的时间剂量依赖性(图 1)。



与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 桔梗皂苷对 A549 细胞增殖的抑制作用

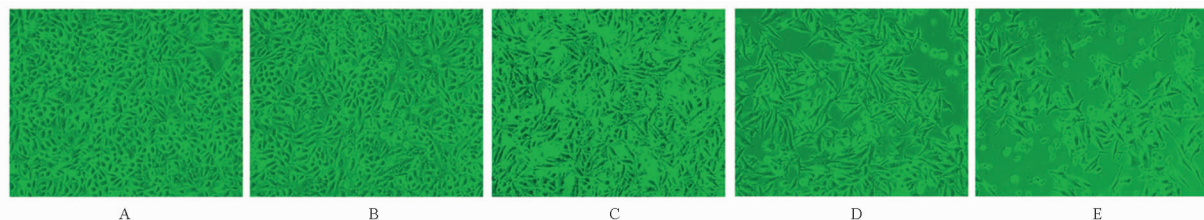
Fig. 1 Growth inhibition of PD in A549 cells

3.2 细胞形态学改变 相差显微镜下观察细胞,正常 A549 贴壁生长,分布均匀,细胞接触紧密,生长迅速(图 2)。PD 作用细胞 24 h 后,细胞增殖变慢,细胞皱缩,细胞间隙增大,脱壁细胞增多漂浮在培养基中,细胞周围碎片增多;并且随着药物浓度的增加,上述变化愈加明显。

3.3 细胞凋亡的检测 磷脂酰丝氨酸外翻(PS)是早期细胞凋亡的重要特征之一, AnnexinV 是检测细胞表面 PS 的敏感探针。AnnexinV FITC/PI 双染后流式细胞术检测结果显示,以 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD 作用 A549 细胞 24 h 后, A549 细胞的凋亡率逐步增加,从 6.9% 增至 14.8%, 23.6%, 34.7%, 不仅比对照组细胞凋亡率 2.9% 均有显著增加,而且呈现一定的剂量效应关系。

3.4 PD 对 A549 细胞 $\Delta\psi_m$ 的影响 JC-1 是一种阳离子荧光染料,由于线粒体内膜的负电性而聚集在活细胞线粒体内形成多聚体,呈鲜红色荧光,但在凋亡细胞内,由于 $\Delta\psi_m$ 的破坏,不能聚集到线粒体内,以单体的形式存在于胞质发绿色荧光,以其荧光强度变化表示线粒体膜电位变化。流式细胞仪用红色荧光降低的百分比表示 $\Delta\psi_m$ 的降低。A549 细胞经 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD 作用 24 h 后,线粒体膜电位降低,分别是 92.1%, 87.6%, 64.6%, 55.2%, 比对照组细胞 94.3% 有所降低,提示线粒体膜电位发生去极化。

3.5 PD 对 A549 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白剪切的影响 完整的 Caspase-3 和 Caspase-9 没有活性,当其发生剪切后激活,细胞凋亡执行阶段时 PARP 被 Caspase 降解, Caspase-3 是降解 PARP 的最有效的酶。PD 作用 24 h 后, Western blot 检测显示



A. 0.1% DMSO; B. 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD; C. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD; D. 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD; E. 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD(图 3,4 同)。

图 2 相差显微镜观察 A549 细胞形态学变化

Fig. 2 The effect of PD on morphological changes of A549 cells under phase contrast microscopy

Caspase-3 出现 17 kDa 的剪切片段, Caspase-9 出现 35 kDa 的剪切片段(图 3)。结果表明 Caspase-3 和 Caspase-9 已被活化,进而降解底物 PARP 从而参与细胞凋亡的发生。

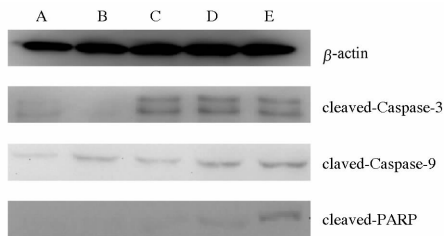


图 3 PD 对 A549 细胞 Caspase 蛋白的影响

Fig. 3 Changes of caspase family members induced by PD in A549 cells

3.6 PD 对 A549 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bak 和 Bax 表达的影响 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PD 作用 24 h 后, Western blot 方法检测结果显示 Bax 和 Bak 蛋白表达随药物浓度的增加而增加, 而 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白表达逐渐降低(图 4)。

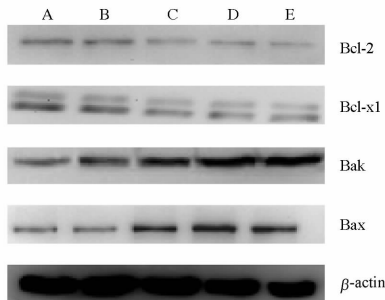


图 4 PD 对 A549 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 家族蛋白的影响

Fig. 4 Changes of Bcl-2 family members induced by PD in A549 cells

4 讨论

桔梗皂苷 D 是从桔梗中提取的三萜皂苷, 近年实验表明 PD 诱导 hTERT 的磷酸化及核转位^[4], 加强细胞微管的聚合^[2]和形成多倍体细胞发挥抑制细胞增殖的作用; PD 可以促进细胞释放活性氧自由基, 诱导 Egr-1 基因转录改变线粒体膜电位^[3], 以及通过调控 Bcl-2 家族蛋白的表达, 激活 Caspase 家族蛋白, 通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[5-6], PD 调控 NF- κ B 信号通路上调 Fas 和 FasL 的表达诱导细胞凋亡^[1]。本研究发现, PD 对人肺腺癌细胞株 A549 有抑制生长的作用, 且呈时间和浓度依赖性, 相差显微镜下可以观察到 PD 处理的细胞皱缩, 细胞间隙增大, 脱壁细胞漂浮在培养基中, 流式检测结果证实 PD 有诱导 A549 凋亡的作用。

本实验应用 JC-1 染色, 通过流式细胞仪检测 $\Delta\psi_m$ 的变化, 发现 $\Delta\psi_m$ 随 PD 药物浓度的增加而下降。 $\Delta\psi_m$ 下降可以引起线粒体膜通透性改变, 释放出 cytochrome c, 释放的 cytochrome c 与凋亡蛋白酶活化因子 (apoptotic protease-activating factor-1, Apaf-1) 和 Caspase-9 形成多聚复合体, 激活 Caspase-3 并使其自我剪切活化并启动 Caspase 级联反应, 完成其相应底物的剪切, 引起细胞凋亡^[7-8]。本实验中, PD 作用 A549 细胞 24 h 出现剪切活性的 Caspase-3 和 Caspase-9 表达增高, 表明 PD 通过线粒体途径诱导肺癌细胞 A549 凋亡。

细胞凋亡主要存在 2 条通路: 线粒体通路和死亡受体通路。线粒体通路由含 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员激活。 Bcl-2 家族包括抑制和促进细胞凋亡 2 类功能相反的蛋白质, 如 Bcl-2, Bcl-xl 抑制凋亡, Bax, Bak 促进凋亡。 Bcl-2 家族蛋白成员间的相互作用对线粒体介导的细胞凋亡起重要调控作用。抗凋亡蛋白 Bcl-2 与结合在线粒体外膜面或存在于



胞浆的促凋亡蛋白 Bax, Bak 等相互作用,引起线粒体膜通透性改变和跨膜电位丢失^[9]。本研究结果显示 PD 上调 Bax 和 Bak 蛋白表达的同时,下调 Bcl-2 和 Bcl-xl 蛋白的表达,表明 PD 可能通过 Bcl-2, Bax 蛋白表达改变而引起线粒体膜电位的下降,激活 Caspase 导致细胞凋亡。

本研究结果显示桔梗皂苷 D 具有杀伤肺癌细胞作用,其作用机制是通过影响 Bcl-2 家族蛋白表达水平而降低线粒体跨膜电位,继而激活 Caspase 系统,诱导细胞凋亡。

[参考文献]

[1] Ahn K S, Hahn B S, Kwack K, et al. Platycodin D-induced apoptosis through nuclear factor-kappaB activation in immortalized keratinocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2006,537(1/3):1.
[2] Kim M O, Moon D O, Choi Y H, et al. Platycodin D induces mitotic arrest *in vitro*, leading to endoreduplication, inhibition of proliferation and apoptosis in leukemia cells[J]. Int J Cancer, 2008, 122(12):2674.
[3] Shin D Y, Kim G Y, Li W, et al. Implication of intracellular ROS

formation, caspase-3 activation and Egr-1 induction in platycodin D-induced apoptosis of U937 human leukemia cells[J]. Biomed Pharmacother, 2009,63(2):86.
[4] Kim M O, Moon D O, Choi Y H, et al. Platycodin D induces apoptosis and decreases telomerase activity in human Leukemia cells [J]. Cancer Lett, 2008,261(1):98.
[5] Hu Q, Pan R, Wang L, et al. Platycodon grandiflorum induces apoptosis in SKOV3 human ovarian cancer cells through mitochondrial-dependent pathway[J]. Am J Chin Med, 2010,38(2):373.
[6] Yu J S, Kim A K. Platycodin D induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells[J]. J Med Food, 2010,13(2):298.
[7] Chen L H, Fang J, Li H, et al. Enterolactone induces apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells via mitochondrial-mediated, caspase-dependent pathway[J]. Mol Cancer Ther, 2007,6: 2581.
[8] Chen M, Guerrero A D, Huang L, et al. Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members[J]. J Biol Chem, 2007,282:33888.
[9] Cory S, Adams J M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nat Rev Cancer, 2002,2(9):647.

Mechanism of platycodin D-induced humane long cancer cells A549 apoptosis

DAI Qun¹, CHEN Zhe¹, GE Yu-qing¹, LIU Pei¹, WANG Hai-bing¹, MA Xiao-qiong¹, WU Bao-hua^{2*}

(1. National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine,

First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;

2. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of platycodin D showing the inhibitory effect on proliferation and induced apoptosis of humane long cancer cells A549. **Method:** Humane long cancer cells A549 were cultured *in vitro*, with the final PD concentration of 5-20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. PD's inhibitory effect on cell proliferation was examined by MTT assay. Morphological changes in cells were observed with microscope. The cell apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. The change of mitochondrial membrane potential was detected by JC-1. The protein expressing of leaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, cleaved PARP, Bcl-2, Bcl-xl, Bak and Bax were detected by Western blot analysis. **Result:** PD could inhibit the proliferation of A549 cells and show stronger effect with the increase of concentration and over time. Compared with the control group, PDs of different concentration showed significant increase in the cell apoptosis rate, decrease in mitochondrial membrane potential after 24 h. Protein electrophoresis inspection showed cut segments in both protein Caspase-3 and Caspase-9 and notable fractures with time. Further study found that PD decreased Bcl-2, Bcl-xl proteins and increased Bax, Bak proteins after processing A549 cells. **Conclusion:** PD shows notable effect on cytotoxicity and can induce A549 cell apoptosis. It causes decrease in mitochondrial membrane potential by regulating Bax, Bak, Bcl-2 and Bcl-xl expressions, and thus activating caspase and finally causing long cancer cell apoptosis.

[Key words] platycodin D; A549; mitochondrial membrane potential; apoptosis

doi:10.4268/cjcmm20121725

[责任编辑 张宁宁]