

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001590

小白菊内酯对人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞增殖及凋亡作用研究

刘 捷, 徐 玲

(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究小白菊内酯(parthenolide, PTL)对人小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)细胞株 NCI-H446 增殖及凋亡作用的影响及其可能的分子机制。**方法:**NCI-H446 细胞株由武汉大学细胞库提供, PTL 购于 Gene Operation 公司, 将 NCI-H446 细胞株分为对照组和实验组(1.5 $\mu\text{g/mL}$ 组、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 组、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组和 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 组), 向实验组细胞培养基中加入对应浓度 PTL 处理细胞, 对照组中加入等体积无血清培养基。MTT 比色法观测不同浓度 PTL 对 NCI-H446 细胞增殖的影响; Hoechst 33258 染色后, 荧光显微镜下观察细胞核形态学变化; 流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析细胞凋亡率; RT-PCR 分别检测不同浓度组 PTL 处理 48 h 后细胞中 NF- κB 、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 基因的表达状态, Western blot 检测 NF- κB 、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白的表达状态。**结果:**PTL 抑制小细胞肺癌 NCI-H446 细胞增殖并呈浓度依赖性; Hoechst 33258 染色结果显示, PTL 作用 NCI-H446 细胞 48 h 后, 细胞数量减少, 细胞核固缩碎裂, 形成凋亡小体, 导致细胞凋亡; 流式细胞术检测显示, PTL 处理 NCI-H446 细胞后, 细胞凋亡率与药物浓度梯度呈浓度依赖性, 差异有统计学意义($P<0.05$); RT-PCR 及 Western blot 结果显示, 与对照组比较, 经 PTL 处理的 NCI-H446 细胞中 NF- κB mRNA 及蛋白表达下调, 同时 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 mRNA 及蛋白表达上调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**PTL 能抑制 NCI-H446 细胞的增殖并诱导其发生凋亡, PTL 的作用机制可能与抑制 NF- κB 信号通路及活化 Caspase 系统有关。

【关键词】小白菊内酯; 小细胞肺癌 H446; 细胞增殖; 细胞凋亡

【中图分类号】R347

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-03-18

Effects of parthenolide on the proliferation and apoptosis of small cell lung cancer cell line NCI-H446

Liu Jie, Xu Ling

(Department of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of parthenolide (PTL) on the proliferation and apoptosis of human proliferation and apoptosis of human small cell lung cancer cell line NCI-H446 and its mechanisms. **Methods:** Cell line provided by the cell library of Wuhan University. PTL was bought in company of gene operation. NCI-H446 cells were divided into control group and treatment group (1.5 $\mu\text{g/mL}$, 2.0 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 3.0 $\mu\text{g/mL}$). Treatment group were treated with different concentrations of PTL by adding corresponding concentration of PTL into culture medium, while control group was added equal volume culture medium without fetal calf serum. The cellular proliferative activity was determined by MTT assay. Morphologic changes were observed by fluorescence microscope. The apoptosis rates of cell were examined by flow cytometry. The expression of NF- κB , Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 genes of NCI-H446 cells was detected by RT-PCR assay. The expression of NF- κB , Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 proteins of NCI-H446 cells was evaluated by Western blot. **Results:** Parthenolide inhibited the proliferation of NCI-H446 cells in a dose-dependent manner. Fluorescent microscopy showed that the number of NCI-H446 cells was reduced under Hoechst 33258 staining; the nucleus pycnosis fracture and apoptotic bodies were observed. Flow cytometry showed that the cell apoptosis rate was positively correlated with the concentration of PTL, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with those of control group, RT-PCR and Western blot revealed that the expressions of mRNA and protein of NF- κB in NCI-H446 cells were reduced, at the same time, the expressions of Caspase-3, -8, -9 mRNA and proteins were increased with statistically significant differences ($P<0.05$).

Conclusion: PTL could repress cellular proliferation activity and induce apoptosis of NCI-H446 cells. The mechanisms could relate to inhibition of NF- κB signaling pathway and activation of caspases system.

【Key words】 parthenolide; lung cancer NCI-H446 cell line; cell proliferation; cell apoptosis

作者介绍: 刘 捷, Email: 510087043@qq.com,

研究方向: 呼吸系统肿瘤。

通信作者: 徐 玲, Email: 529212240@qq.com。

基金项目: 重庆市卫生和计生委中医药科技资助项目(编号: zy201402106)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1431.022.html>

(2018-04-08)

肺癌是当前世界上最常见的恶性肿瘤之一。小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)占肺癌确诊病例的 15%~20%^[1],临床常分为局限期和广泛期 2 种类型。SCLC 具有癌细胞分化差、增殖速度快、倍增时间短及侵袭性强的生物学特征。此外, SCLC 是具有高度化疗敏感性的肿瘤,以依托泊苷联合顺铂的化疗方案(EP 方案)是其最基础的治疗方式。尽管 SCLC 治疗策略不断发展,但由于其较高的复发率和复发后对抗肿瘤药物产生的耐药性,其治疗方法及效果仍然有限。据统计,局限期和广泛期 SCLC 患者 5 年生存率仅分别为 10% 和 2%^[2-3]。

小白菊内酯(parthenolide, PTL)是从植物药野甘菊中提取的一种倍半萜内酯化合物,可用于治疗偏头痛、风湿性关节炎及感染等疾病^[4]。近年来研究发现 PTL 对肝癌、结肠癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、白血病等^[5-9]具有较强抗肿瘤活性,它能抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡。此外,有研究表明 PTL 对某些化疗药物具有增敏效应^[10]。但 PTL 对小细胞肺癌的作用研究较少。本研究以人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞为研究对象,旨在观察 PTL 对 NCI-H446 细胞增殖和凋亡的影响,并进一步探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞株由武汉大学细胞库提供,重庆医科大学附属第一医院实验研究中心保存,传代培养,贴壁生长。

1.1.2 主要试剂 小白菊内酯(INK1018-50MG)购于美国 Gene Operation 公司,纯度 $\geq 99.9\%$ 。RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司。胎牛血清由天津康源生物技术有限公司生产。PCR 引物、逆转录试剂盒、Trizol Reagent 均为 TaKaRa 公司产品。NF- κ B、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 一抗单克隆兔抗人抗体均购自美国 Abcam 公司,二抗为购自美国 RockLand 公司过氧化物酶标记鼠抗兔抗体。Hoechst 33258 试剂盒购于江苏碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 药物配制 小白菊内酯以二甲基亚砜溶液溶解配制成 50 mg/mL 的储存液,避光保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用,根据药物说明书及参考文献^[11],实验前以无血清 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度(1.5、2.0、2.5、3.0 $\mu\text{g/mL}$)。

1.2.2 细胞培养 小细胞肺癌 NCI-H446 细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中(常规加入青霉素 100 U/

mL,链霉素 100 $\mu\text{g/L}$),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中,常规胰酶消化传代。倒置显微镜下观察,处于对数生长期的细胞生长旺盛,细胞数量逐日增加并将接触和融合,渐次铺满培养瓶底。低倍镜下观察,细胞折光性好,细胞壁较亮,细胞饱满无褶皱,连续观察可见细胞因接触而停止运动、密度抑制而细胞停止分裂。含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养基所培养的各组细胞在实验前,均以无血清培养基进行同质化处理,避免血清中有关成分对实验结果所产生干扰。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 收集对数生长期细胞,制成浓度为 5×10^4 个/mL的单细胞悬液,取 96 孔板,每孔接种 200 μL 细胞悬液。细胞贴壁后加入含不同浓度 PTL 的新鲜 RPMI1640 培养基,PTL 终浓度为 1.5、2.0、2.5 及 3.0 $\mu\text{g/mL}$,同时设置对照组,每组设 6 个复孔。细胞孵育 48 h 后,各孔分别加入 5 mg/mL 的 MTT 试剂 20 μL ,继续培养 4 h 后,终止培养。加入二甲亚砜(DMSO)150 μL ,避光摇床震荡 10 min。于 570 nm 波长下测量各孔吸光度(absorbance, A)值,实验重复 3 次。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡 收集对数生长期细胞,制成浓度为 2.5×10^4 个/mL的单细胞悬液,取 96 孔板,每孔加入 200 μL 细胞悬液。细胞贴壁后,分别加入含不同浓度 PTL(1.5、2.0、2.5 及 3.0 $\mu\text{g/mL}$)的新鲜 RPMI1640 培养基,同时设置对照组,每组设 3 个复孔。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 48 h 后,吸去上清,4%预冷多聚甲醛固定 30 min, Hoechst 33258 染色液染色 5 min,荧光显微镜下观察拍照。实验重复 3 次。

1.2.5 FCM 检测细胞凋亡 收集对数生长期细胞,不同浓度 PTL 处理 NCI-H446 细胞 48 h,同时设置对照组,收集各组细胞,制成浓度为 1×10^6 个/mL的单细胞悬液,各取 1 mL,离心后,弃上清,磷酸盐缓冲液充分洗涤 3 次, FITC-Annexin V/PI 标记液重悬细胞,室温下避光孵育 15 min,离心后,弃上清, PBS 洗涤 1 次,加入荧光溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下继续避光孵育 20 min,由流式细胞仪检测荧光信号。实验重复 3 次。

1.2.6 RT-PCR 检测基因表达 收集对数生长期细胞,收集不同浓度 PTL 处理 48 h 后的 NCI-H446 细胞及对照组细胞, Trizol 提取各组细胞 RNA。采用 TaKaRa 试剂盒进行逆转录,以逆转录产物为模板,按照 Bio-Rad CFX Manager(admin)说明书进行扩增。NF- κ B 上游引物序列:5'-GCGGTGACA-GGAGACGTGAA-3', NF- κ B 下游引物序列:5'-CAAGTTG-AGAATGAAGGTGGATGAT-3', Caspase-3 上游引物序列:5'-GGAAGCGAATCAATGGACTCTG-3', Caspase-3 下游引物序列:5'-TGAGGTTTGCTGCATCGACAT-3', Caspase-8 上游引物序列:5'-GAATGTTGGAGGAAAGCAATCTG-3', Caspase-8 下游引物序列:5'-TTGAGCCCTGCCTGGTGTCT-3', Caspase-9 上游引物序列:5'-CGAACTAACAGGCAAGCAGCAA-3', Caspase-9 下游引物序列:5'-CGACATCACCAATCCTCC-AGAA-3'。扩增反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共约 40 个循环。PCR 结果以 C_t 值表示,代表反应管内荧光

信号达到阈值的循环数。 ΔC_t 为同一样本目的基因与内参基因 C_t 值之差,基因表达水平用 $2^{-\Delta C_t}$ 表示。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 收集不同浓度 PTL 处理 48 h 后的 NCI-H446 细胞及对照组细胞,加入 RIPA 裂解液,冰浴提取细胞总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒蛋白定量。以 50 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,兔抗人 NF- κB p65 单克隆抗体(1:3 000)、兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体(1:2 000)、兔抗人 Caspase-8 单克隆抗体(1:2 000)、兔抗人 Caspase-9 单克隆抗体(1:2 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜 30 min;辣根过氧化物酶标记鼠抗兔 IgG 二抗(1:1 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 30 min,采用 FusionCapt Advance 软件显影。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Turkey 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 MTT 检测 PTL 对 NCI-H446 细胞增殖的影响

MTT 结果显示 PTL 处理各组 [1.5 $\mu\text{g/mL}$ 组 (1.586 ± 0.187)、2.0 $\mu\text{g/mL}$ (1.400 ± 0.201)、2.5 $\mu\text{g/mL}$ (1.125 ± 0.204)、3.0 $\mu\text{g/mL}$ (0.672 ± 0.165)] 组细胞 A 值均低于对照组 (1.875 ± 0.101),差异具有统计学意义 ($F=27.213, P=0.000$),提示细胞增殖受到不同程度抑制。这种抑制作用与药物浓度呈依赖性。随着 PTL 浓度增大,A 值明显减少,增殖受抑制程度明显增高。

2.2 PTL 对 NCI-H446 细胞凋亡的影响

不同浓度的 PTL 处理 48 h 后,对照组 NCI-H446 细胞核界限清晰,呈圆形或椭圆形,染色较浅,呈均匀蓝色荧光;PTL (1.5、2.0、2.5 及 3.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理组可见细胞核染色较深,呈亮蓝色,细胞核固缩,偶有核碎裂,有凋亡小体形成。荧光显微镜观察发现细胞凋亡程度与 PTL 作用的浓度呈剂量依赖性,高浓度药物作用后细胞凋亡程度加剧(图 1)。

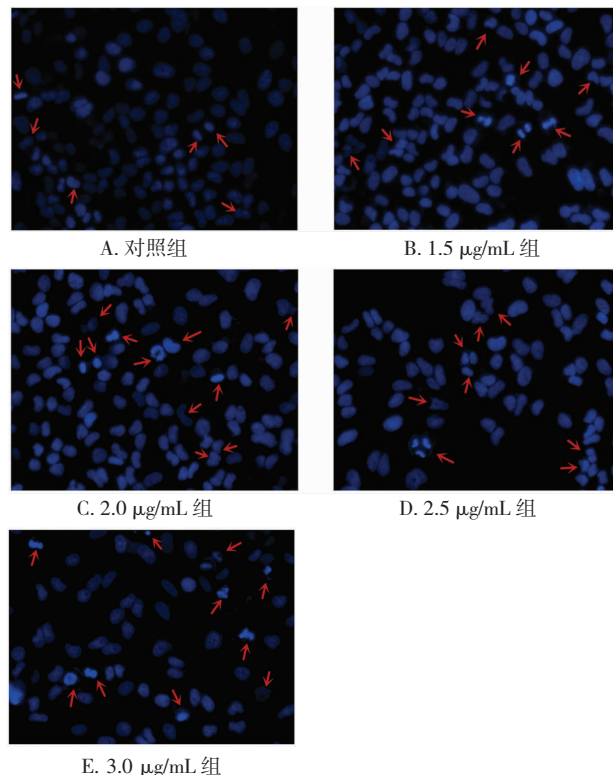
2.3 流式细胞术检测 PTL 对 NCI-H446 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡率结果显示,经不同浓度 PTL 处理 48h 各组的凋亡率均高于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),见表 1。提示 PTL 能够诱导 NCI-H446 细胞发生凋亡,随着药物浓度增高,此种诱导凋亡作用增强,差异具有统计学意义(图 2)。

2.4 RT-PCR 法检测 PTL 对 NCI-H446 细胞凋亡相关基因表达的影响

RT-PCR 结果显示,不同浓度 PTL 作用 NCI-H446 细胞 48 h 后,各组细胞凋亡相关基因表达与对照组相比,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。各凋亡相关基因表达受到影响,NF- κB 基因表达下调,而 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-

9 基因的表达上调,呈浓度依赖性,证实 PTL 能够调节上述凋亡相关基因的表达。



红色箭头所示为凋亡细胞细胞核及凋亡小体

图 1 PTL 对 NCI-H446 细胞凋亡形态学改变(200 $\times$)

Fig.1 Morphologic changes detected by fluorescence microscope(200 $\times$)

表 1 不同组别 NCI-H446 细胞凋亡率 ($n=3, \%$)

Tab.1 Apoptosis rate of NCI-H446 cells in different groups ($n=3, \%$)

组别	凋亡率
对照组	2.20 ± 0.86
1.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	4.80 ± 0.24^a
2.0 $\mu\text{g/mL}$ 组	8.00 ± 0.23^a
2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	17.10 ± 0.32^a
3.0 $\mu\text{g/mL}$ 组	21.20 ± 0.94^a
F 值	902.584
P 值	0.000

注:a, 4 种浓度处理组凋亡率与对照组相比,均 $P<0.01$

2.5 Western blot 检测 PTL 对 NCI-H446 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

收集不同浓度 PTL 处理 48 h 后的细胞,Western blot 检测结果显示,PTL 可明显下调 NCI-H446 细胞中 NF- κB p65 蛋白表达,而增高 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 蛋白表达,并呈浓度依赖性,不同浓度组之间差异具有统计学意义 ($P<0.05$),如图 3、图 4、表 3 所示。

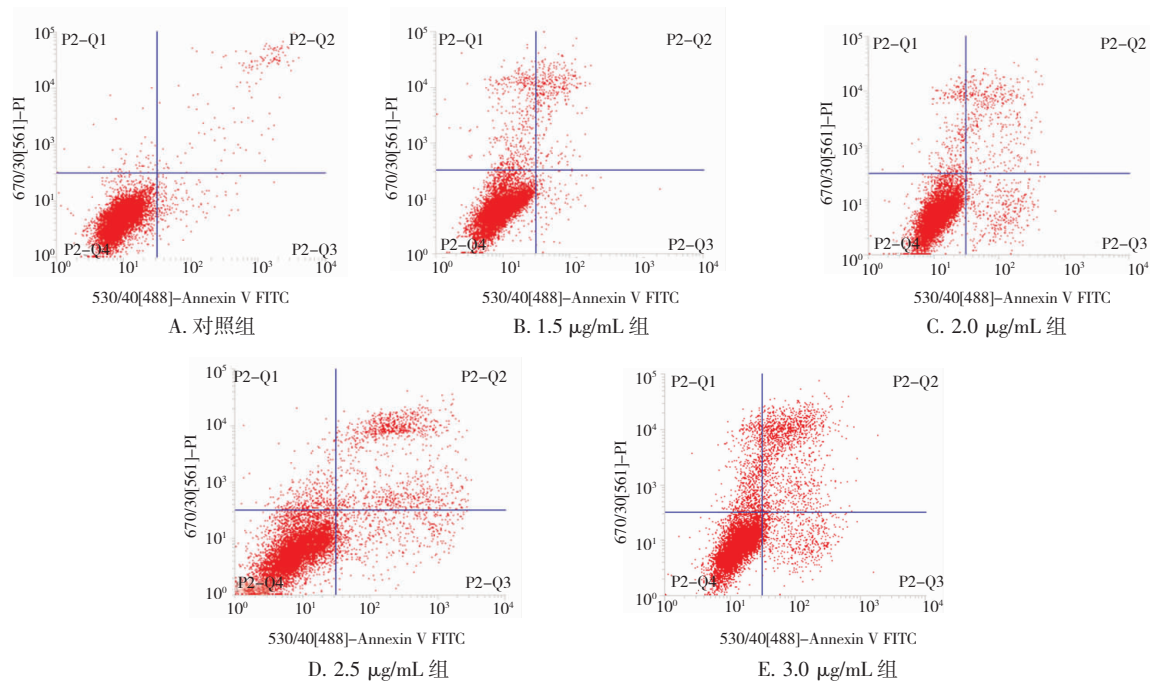


图 2 PLT 对 NCI-H446 细胞凋亡率影响

Fig.2 Apoptosis rates of cell detected by flow cytometry

表 2 RT-PCR 检测 NF-κB、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 基因的表达 (n=3)

Tab.2 Expression of genes detected by qRT-PCR (n=3)

组别	NF-κB	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
对照组	0.993 ± 0.006	0.990 ± 0.010	1.019 ± 0.042	0.981 ± 0.017
1.5 μg/mL 组	0.884 ± 0.010 ^a	1.190 ± 0.016 ^a	1.283 ± 0.042 ^b	1.179 ± 0.090 ^b
2.0 μg/mL 组	0.773 ± 0.010 ^d	1.465 ± 0.013 ^d	1.685 ± 0.108 ^c	1.433 ± 0.043 ^d
2.5 μg/mL 组	0.526 ± 0.011 ^e	1.618 ± 0.013 ^e	1.898 ± 0.041 ^e	1.598 ± 0.026 ^e
3.0 μg/mL 组	0.374 ± 0.011 ^f	1.831 ± 0.010 ^f	2.019 ± 0.068 ^f	1.898 ± 0.044 ^f
F 值	1 944.806	2 100.307	123.119	138.435
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 1.5 μg/mL 组 NF-κB、Caspase-3 基因表达与对照组相比, $P < 0.01$; b, 1.5 μg/mL 组 Caspase-8 与 Caspase-9 基因表达与对照组相比, $P < 0.05$; c, 2.0 μg/mL 组 Caspase-8 基因表达与对照组相比, $P < 0.05$; d, 2.0 μg/mL 组 NF-κB、Caspase-3、Caspase-9 基因表达与对照组相比, $P < 0.01$; e, 2.5 μg/mL 组 NF-κB、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 基因表达各与对照组相比, $P < 0.01$; f, 3.0 μg/mL 组 NF-κB、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 基因表达与对照组相比, $P < 0.01$

表 3 Western blot 检测 NF-κB、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 蛋白表达

Tab.3 Expression of genes detected by Western blot

组别	NF-κB	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
对照组	0.779 ± 0.073	0.133 ± 0.011	0.210 ± 0.021	0.120 ± 0.056
1.5 μg/mL 组	0.672 ± 0.042	0.378 ± 0.030	0.308 ± 0.029	0.213 ± 0.020
2.0 μg/mL 组	0.550 ± 0.052 ^a	0.403 ± 0.038 ^b	0.524 ± 0.050 ^c	0.519 ± 0.049 ^c
2.5 μg/mL 组	0.388 ± 0.036 ^a	0.686 ± 0.065 ^b	0.625 ± 0.051 ^c	0.610 ± 0.048 ^c
3.0 μg/mL 组	0.209 ± 0.062 ^a	0.848 ± 0.097 ^b	0.691 ± 0.065 ^c	0.754 ± 0.060 ^c
F 值	51.770	72.659	60.399	91.250
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 2.0 μg/mL 组、2.5 μg/mL 组、3.0 μg/mL 组 NF-κB p65 蛋白表达与对照组相比, $P < 0.01$; b, 2.0 μg/mL 组、2.5 μg/mL 组、3.0 μg/mL 组 Caspase-3 蛋白表达与对照组相比, $P < 0.01$; c, 2.0 μg/mL 组、2.5 μg/mL 组、3.0 μg/mL 组 Caspase-8 蛋白表达与对照组相比, $P < 0.01$; d, 1.5 μg/mL 组 Caspase-9 蛋白表达与对照组相比, $P < 0.05$; e, 2.0 μg/mL 组、2.5 μg/mL 组、3.0 μg/mL 组 Caspase-9 蛋白表达与对照组相比, $P < 0.01$

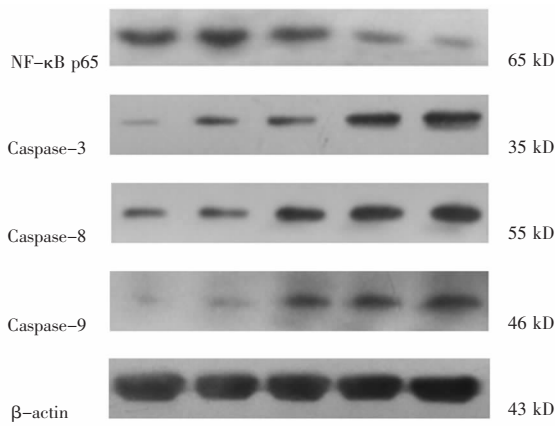


图3 Western blot 检测 NF-κB p65、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 蛋白表达

Fig.3 Expression of NF-κB p65, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 detected by Western blot

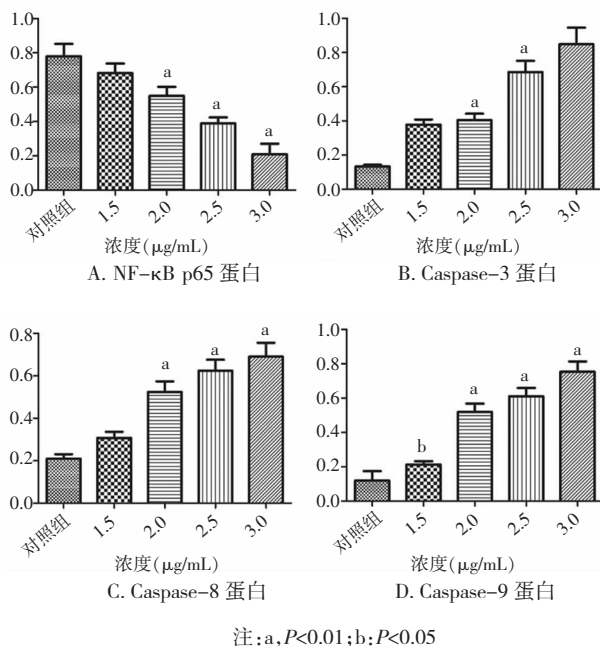


图4 Western blot 检测 NF-κB p65、Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 蛋白表达

Fig.4 Expression of NF-κB p65, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 detected by Western blot

3 讨论

随着现代分子生物学的发展,从植物药中提取新型抗肿瘤药物已成为当前研究的热点。小白菊内酯是野甘菊的主要有效成分,属于倍半萜烯内酯化合物。小白菊内酯对多种^[12-14]肿瘤细胞产生抑制增殖和诱导凋亡的作用。但其是否对小细胞肺癌细胞

也存在上述作用,国内外可参阅文献尚不多见。本实验首先采用 MTT 法观察 PTL 对 NCI-H446 细胞生长的作用,实验结果表明,当 PTL 浓度为 1.5 μg/mL 时即能够明显抑制 NCI-H446 细胞增殖 ($P = 0.000$),且随着 PTL 浓度递增,NCI-H446 细胞增殖显著下降,提示 PTL 能够呈浓度依赖性抑制小细胞肺癌细胞增殖。

本研究采用 Hoechst 33258 荧光染色法进一步了解 PTL 是否还存在诱导细胞凋亡的作用。细胞凋亡时,细胞膜完整性遭破坏,染色体固缩、碎裂,染料更易与 DNA 结合,故细胞核着色较深,呈亮蓝色,尚可见细胞核边集,凋亡细胞核呈分叶状、碎片状,可见凋亡小体。本研究发现,经不同浓度的药物处理 NCI-H446 细胞 48 h 后,凋亡细胞数目增多,且随着 PTL 浓度上升而增加。荧光显微镜下可见某些凋亡细胞的核染色较深、分叶、有凋亡小体散在分布,进一步采用了流式细胞术检测细胞的凋亡率,发现 PTL 不但具有诱导细胞凋亡的效应,并证实了 PTL 诱导 NCI-H446 凋亡作用呈浓度依赖性。

小白菊内酯是 NF-κB 特异性抑制剂^[15],NF-κB 是 1986 年由宋祖军等^[16]从 B 淋巴细胞核提取物中检测出的一种核蛋白因子。Dutta 等^[17]研究证实,活化后的 NF-κB 与细胞凋亡关系密切,并且参与了多种凋亡相关基因的转录与调控。正常生理状态下,NF-κB 与阻遏蛋白 IκB 结合,以非活性复合物形式滞留在细胞质中保持沉默。IκB 可被 IκB 激酶(IKK 复合物)磷酸化,进而经泛素-蛋白酶体途径降解。NF-κB 和 IκB 解聚后,其核定位序列被暴露,从而被转运到细胞核内与 NF-κB 依赖基因结合^[18-19]。为了解 PTL 是否是通过调节 NF-κB 活性而发挥抑制 NCI-H446 细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用,本实验采用了 RT-PCR 及 Western blot 两种方法分别检测了 NF-κB 基因及蛋白的表达。实验结果表明,PTL 能够使 NF-κB 的基因及蛋白表达下调,此种下调表达的作用与药物表现出一种浓度依赖性,提示 NF-κB 在 PTL 诱导 NCI-H446 细胞的凋亡中可能发挥了重要作用。然而本研究仅探讨了 PTL 对 NF-κB 表达量的影响,是否对信号转导过程中磷酸化 NF-κB 表达也有以上调控作用,需待进一步深入探究,以更好地揭示 PTL 与 NF-κB 通路关系及可能调控机制。

细胞凋亡是一个多基因、多通路调控的细胞程

序性死亡过程。除 NF- κ B 参与调节外,本实验还检测了 Caspase-3、Caspase-8 以及 Caspase-9 的基因及蛋白表达。Caspase 家族激活所引起的级联反应是细胞凋亡过程中的重要环节。Caspase 家族是一组存在于细胞质中的结构相关的半胱氨酸蛋白酶,根据 Caspase 家族在级联反应中的作用和活化的先后顺序可分为启动性和效应性 Caspase^[20],启动性 Caspase 在细胞凋亡信号及调节因子刺激下活化,继而激活效应性 Caspase,活化后的效应性 Caspase 最终导致蛋白底物裂解和细胞破裂,细胞发生凋亡^[21]。本实验 RT-PCR 及 Western blot 结果显示,经 PTL 处理后,在低浓度条件下,NCI-H446 细胞中 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达已经增加,随着药物浓度的增加,对应基因及蛋白表达明显上调,提示 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 也可能是 PTL 调节 NCI-H446 细胞增殖及凋亡作用的机制之一。

综上所述,PTL 可通过降低 NF- κ B 活性及 Caspase-3、Caspase-8 及 Caspase-9 活化抑制 NCI-H446 细胞增殖,诱导细胞凋亡,本研究为 PTL 应用于小细胞肺癌体外研究提供了一定实验依据,为后续研究奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Felip E, Stahel RA, Pavlidis N. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of non-small-cell lung cancer(NSCLC)[J]. Ann Oncol, 2005, 16(s1): i28-29.
- [2] 王欢, 胡毅. 小细胞肺癌治疗进展[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(4): 422.
- [3] 程颖. 小细胞肺癌治疗研究进展[J]. 中国处方药, 2010, 9(8): 44-47.
- [4] Pozarowski P, Halicka DH, Darzynkiewicz Z. NF- κ B inhibitor sesquiterpene parthenolide induces concurrently atypical apoptosis and cell necrosis; difficulties in identification of dead cells in such cultures [J]. Cytometry A, 2003, 54(2): 118-124.
- [5] Park JH, Liu L, Kim IH, et al. Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(7): 2804-2814.
- [6] Zhang S, Ong CN, Shen HM. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells[J]. Cancer Lett, 2004, 208(2): 143-153.
- [7] Liu JW, Cai MX, Xin Y, et al. Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 108.
- [8] Wang W, Adachi M, Kawamura R, et al. Parthenolide-induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity[J]. Apoptosis, 2006, 11(12): 2225-2235.
- [9] 马武开, 李玉莹, 姚学明, 等. 白血病 K562/A02 细胞 MDR1, NF- κ B 的表达及解毒化瘀中药的调控作用研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 1031-1032.
- [10] Yip-Schneider MT, Nakshatri H, Sweeney CJ, et al. Parthenolide and sulindac cooperate to mediate growth suppression and inhibit the nuclear factor- κ B pathway in pancreatic carcinoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(4): 587-594.
- [11] Jin X, Qiu L, Zhang D, et al. Chemosensitization in non-small cell lung cancer cells by IKK inhibitor occurs via NF- κ B and mitochondrial cytochrome c cascade[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(11-12): 4596-4607.
- [12] Li CJ, Guo SF, Shi TM. Culture supernatants of breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with parthenolide inhibit the proliferation, migration, and lumen formation capacity of human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(12): 2195-2199.
- [13] Kim YR, Eom JI, Kim SJ, et al. Myeloperoxidase expression as a potential determinant of parthenolide-induced apoptosis in leukemia bulk and leukemia stem cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 335(2): 389-400.
- [14] Czyz M, Lesiak-Mieczkowska K, Koprowska K, et al. Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(5): 1144-1157.
- [15] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death - a new approach to cancer therapy[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2625-2632.
- [16] 宋祖军, 王少波, 王琦, 等. NF- κ B 的研究进展[J]. 世界急危重病医学杂志, 2007, 4(1): 1693-1696.
- [17] Dutta J, Fan Y, Gupta N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B [J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6800-6816.
- [18] Ting AY, Endy D. Signal transduction. Decoding NF- κ B signaling [J]. Science, 2002, 298(5596): 1189-1190.
- [19] Lawrence T, Beben M, Liu GY, et al. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation[J]. Nature, 2005, 434(7037): 1138-1143.
- [20] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(6): 25.
- [21] Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1387(1-2): 17-31.

(责任编辑: 方 济)