

网络出版时间:2021/12/22 16:45 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.1000.007.html

C₂-神经酰胺在 A549/PC9 细胞凋亡中的作用及影响

石伊宁^{1,2}, 刘嘉林², 刘芳芳¹, 方浩徽², 杨进¹, 陆友金¹

摘要 目的 探讨 C₂ 神经酰胺(鞘磷脂类物质之一)对非小细胞肺癌(A549 和 PC9)细胞凋亡的影响。方法 培养非小细胞肺癌细胞系(A549 和 PC9),提取总蛋白进行 Western blot,检测两种细胞中凋亡蛋白 Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 蛋白的表达情况;使用 CCK-8 比色法筛选药物浓度;Hoechst 33258 凋亡染色检查细胞凋亡情况;流式细胞化学术检测细胞凋亡比率,RT-PCR 检测凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。结果 神经酰胺在 50 μmol/L 浓度处理后细胞活力均在 70%左右;与对照组相比,神经酰胺组凋亡蛋白表达升高($P < 0.05$);流式细胞化学术及凋亡染色检测显示神经酰胺处理组凋亡率与对照组相比增加($P < 0.05$);在基因水平检测 mRNA 显示凋亡蛋白 Caspase-3 表达增加($P < 0.05$)。结论 C₂-神经酰胺可以促使非小细胞肺癌细胞凋亡,从而为临床肺癌的化疗提供新的治疗靶点。

关键词 鞘磷脂;神经酰胺;肺癌细胞;凋亡

中图分类号 R 344;R 734

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0031-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.007

肺癌是全球最常见的癌症之一。大约 85% 的肺癌是非小细胞肺癌,15% 是小细胞肺癌^[1-2]。随着科学技术的发展,目前肺癌主要以化疗来控制病情的进展,但随着其高耐药性和转移率的出现,致使患者的 5 年生存率仍然很低^[3]。这就需要探索新的治疗靶点及药物来提高患者的生存率。

神经酰胺是鞘脂代谢的核心分子,它是细胞信号转导的重要参与者,并参与细胞生长、衰老、凋亡、迁移、侵袭等生物过程^[4]。有研究^[5]表明神经酰胺可以激活丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶,从而改变线粒体膜电位诱导细胞凋亡。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在诱导巨噬细胞发生炎症时可以通过激活酸性鞘磷脂酶从而诱导细胞内神经酰胺的产生^[6],但具体的神经酰胺的作用并不完全清楚,需进一步验证。该研究将使用外源性 C₂-神经酰胺作用于非小细胞肺癌细胞系,观察其诱导癌细胞凋亡后的形态及蛋白分子变化,并为临床肺癌的化疗靶

2021-09-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81400058);安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045016)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院呼吸内科,合肥 230601

² 安徽省胸科医院呼吸内科,合肥 230022

作者简介:石伊宁,女,硕士研究生;

陆友金,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: luyougold@163.com

PI and Annexin V double staining experiment was used to observe the effect of PAQR4 overexpression on HepG2 cell apoptosis. **Results** TCGA database data analysis results showed that the expression of PAQR4 mRNA in HCC tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$), and the overall survival rate of HCC patients with PAQR4 mRNA high expression group was lower than that of low expression group ($P = 0.012$). Univariate regression analysis showed that PAQR4 mRNA expression level ($HR: 1.104$, 95% $CI: 1.051 - 1.160$, $P < 0.001$), T stage ($HR: 1.816$, 95% $CI: 1.442 - 2.287$, $P < 0.001$), M stage ($HR: 3.924$, 95% $CI: 1.230 - 12.519$, $P = 0.021$), pathological staging ($HR: 1.879$, 95% $CI: 1.466 - 2.408$, $P < 0.001$) had a significant impact on the prognosis of HCC patients. Multivariate regression analysis showed that PAQR4 mRNA expression level ($HR: 1.396$, 95% $CI: 1.081 - 1.804$, $P = 0.011$) was an independent risk factor of the prognosis of HCC patients. The results of CCK-8 assay, scratch assay and Transwell assay showed that the proliferation, migration, invasion and invasion ability of HepG2 cells in the experimental group were significantly improved compared with the control group ($P < 0.05$). Overexpression PAQR4 could inhibit HepG2 cell apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** PAQR4 is significantly up-regulated in HCC tissue and is related to the prognosis of the patients. Overexpression PAQR4 promotes the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells, and inhibits HepG2 cells apoptosis. PAQR4 maybe a new marker for the diagnosis and prognosis of HCC.

Key words progesterin and adipoQ receptor family member 4; hepatocellular carcinoma; proliferation; invasion; migration; apoptosis

点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肺腺癌细胞系 A549 及 PC9 是由中国科学技术大学生命科学院提供,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中在含有 10% 胎牛血清、1% 的双抗 (50 U/ml 青霉素和 0.05 mg/ml 链霉素) 的高糖 DMEM 完全培养基中培养。待其贴壁生长后,每日更换培养基,待细胞生长至 80% ~ 90% 时用胰酶消化后传代。

1.2 主要试剂与仪器 C₂-神经酰胺购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Anti-β-actin、anti-Caspase-3、anti-cleaved Caspase-3 抗体均购自美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠、山羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥生物公司;CCK-8 比色法检测试剂盒、Hoechst 凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;AnnexinV-FITC 细胞流式化学检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司;Thermo Scientific NanoDrop 分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司;TRIzol 试剂购自日本 TaKaRa 公司;SYBR Green Master Mix Kit 购自日本 Takara Biotechnology 公司;ECL 发光显色试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 CCK-8 比色法筛选 C₂-神经酰胺的浓度 当 A549 和 PC9 细胞处于对数生长期时,分别以 3 × 10⁴ 个/ml 和 2 × 10⁴ 个/ml 接种于 96 孔板中,每孔 100 μl,于培养箱孵育 24 h 后,处理组分别加入不同浓度 (0、10、20、50、80、100、200 μmol/L) 的 C₂-神经酰胺,对照组加入等体积的完全培养基培养 24 h,每孔加入 10 μl 的 CCK-8,37 ℃ 培养箱中孵育 1 h,通过酶标仪于 450 nm 波长下,测量每孔的吸光度值。用与对照组的百分比值来表示细胞活性,从而筛选出 C₂-神经酰胺的浓度。

1.4 Hoechst 33258 凋亡染色法观察 A549 和 PC9 细胞凋亡 取洁净盖玻片在 70% 乙醇中浸泡 5 min,然后用无菌的 PBS 洗涤 3 次,再用细胞培养液洗涤 1 次,将盖玻片置于 6 孔板内。取对数生长期的细胞接种于 6 孔板,待细胞密度达到 50% ~ 80% 时,加入 C₂-神经酰胺刺激细胞发生凋亡后,吸尽培养液,加入 0.5 ml 固定液,固定 10 min。除去固定液,置于摇床上用 PBS 清洗 2 次 × 3 min,去除液体,加入 0.5 ml 的 Hoechst 33258 染色液,在摇床上染色 5 min。染色后去除染色液,置于摇床上用 PBS 洗 2 次 × 3 min,然后在盖玻片上滴 1 滴抗荧光淬灭

剂,置于载玻片上,注意避免产生气泡。置于倒置显微镜,在激发波长为 350 nm、发射波长 460 nm 左右拍摄,凋亡细胞为细胞核致密浓染者。

1.5 流式细胞仪检测 A549 及 PC9 细胞凋亡 将对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至 80% ~ 90% 时,加入 C₂-神经酰胺处理 24 h 后,使用不含 EDTA 的胰酶消化液消化细胞后,制成细胞悬液。收集细胞于 15 ml 离心管中,离心后弃上层液,使用 PBS 清洗 3 次后弃去 PBS,加入 400 μl 的结合缓冲液,然后加入 10 μl 的荧光素 FITC 标记的膜联蛋白 V (AnnexinV-FITC) 避光孵育 15 min,然后加入 10 μl 的碘化丙啶 (PI) 进行避光染色 5 min。然后立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率,重复 3 次。

1.6 Western blot 检测凋亡蛋白表达 将对数生长期细胞接种于 6 cm 的小皿中,C₂-神经酰胺处理过后,使用 PBS 清洗 3 次,加入适当的细胞裂解液,使用 1.5 ml 的 EP 管收集细胞后冰上裂解 30 min,4 ℃、15 000 r/min 离心 15 min。收集上清液后用 BCA 法进行蛋白定量,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上;用 5% 的脱脂牛奶封闭 1.5 h,分别使用特异性的 Caspase-3 (1 : 1 000)、cleaved Caspase-3 (1 : 1 000)、β-actin (1 : 2 000) 孵育,在 4 ℃ 冰箱中过夜,第 2 天用 TBST 洗涤 3 次 × 8 min,室温孵育相对应的辣根过氧化物酶山羊抗体 1 h,使用 TBST 洗涤 3 次 × 8 min 后,采用高灵敏度的显影剂 ECL 进行发光显影。

1.7 RT-PCR 检测 A549 及 PC9 细胞 mRNA 表达 将对数生长期细胞接种于 6 cm 的小皿中,C₂-神经酰胺处理后,使用预冷的 PBS 清洗 3 次,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,用 Thermo Scientific NanoDrop 仪器进行浓度定量。使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。使用实时 PCR 系统进行 PCR 反应。每个目的基因的表达是通过 2^{-ΔΔCt} 方法统计比较 RNA 水平,引物序列见表 1。

表 1 β-actin、Caspase-3 引物序列

目的基因	引物序列 (5'-3')
β-actin	F: CCCTGGAGAAGAGCTACGAG
	R: GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT
Caspase-3	F: ATCGGACTGTGGCATTGAGA
	R: ATAACCAGGTGCTGTGGAGT

1.8 统计学处理 统计分析利用 SPSS 21.0 进行分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,不同组间的比较采用方差分析或 *t* 检验进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 C₂-神经酰胺分别对 A549/PC9 细胞的影响 不同 C₂-神经酰胺浓度 (0、10、20、50、80、100、200 μmol/L) 作用于 A549 细胞后, 浓度在 50、80、100、200 μmol/L 时差异有统计学意义 ($F = 188.4, P < 0.05$); 作用于 PC9 细胞后, 浓度在 20、50、80、100、200 μmol/L 时差异有统计学意义 ($F = 385.5, P < 0.05$)。见图 1。在一定浓度范围内, 细胞损伤程度逐渐增加, 细胞活性逐渐下降。当 C₂-神经酰胺浓度在 50 μmol/L 时, 两种细胞活力都在 60% ~ 80%, 因此, 选取 50 μmol/L 作为细胞损伤的浓度。

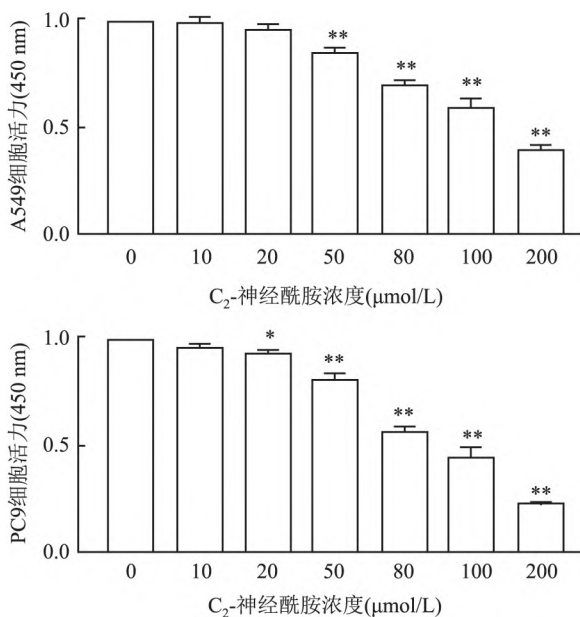


图 1 不同浓度的 C₂-神经酰胺对 A549/PC9 细胞活力的影响

与对照组 (0 μmol/L) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 Hoechst 33258 凋亡染色及流式细胞仪检测细胞凋亡 Hoechst 33258 凋亡染色结果显示, 与对照组相比, 在两种细胞 A549 和 PC9 中 C₂-神经酰胺组细胞凋亡率增加, 差异有统计学意义 ($t = 20.24, 26.354, P < 0.01$), 见图 2; 同样, 与对照组相比, 使用流式化学技术检测两种细胞 (A549 及 PC9) 的凋亡率也增加 ($t = 57.02, 78.68, P < 0.01$), 见图 3。

2.3 C₂-神经酰胺诱导 A549/PC9 凋亡中蛋白的表达 Western blot 结果显示, 在 A549 中与对照组相比, C₂-神经酰胺组 Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 表达水平上升, 因此, 增加 C₂-神经酰胺水平可以导致细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($t = 9.873, 2.908, P < 0.05$), 在 PC9 细胞中 Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 表达水平也升高 ($t = 4.798, 4.057, P < 0.05$), 见图 4。

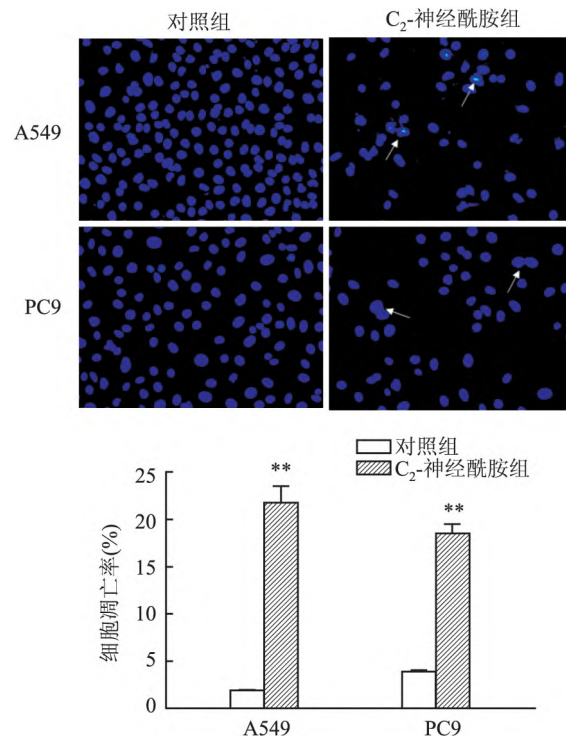


图 2 Hoechst 33258 检测 A549/PC9 细胞凋亡 ×200

与对照组比较: ** $P < 0.01$

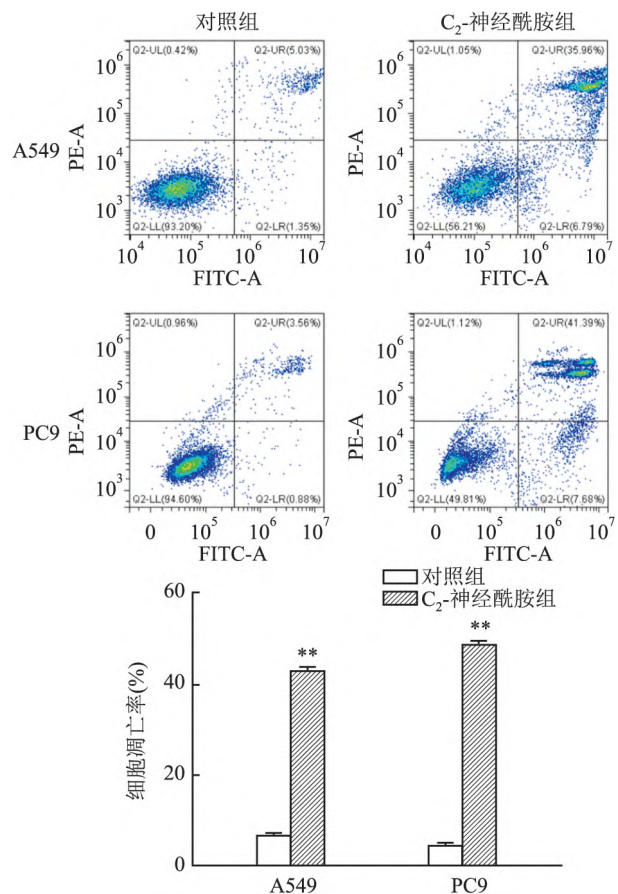


图 3 流式细胞术测定 A549/PC9 细胞凋亡的情况

与对照组比较: ** $P < 0.01$

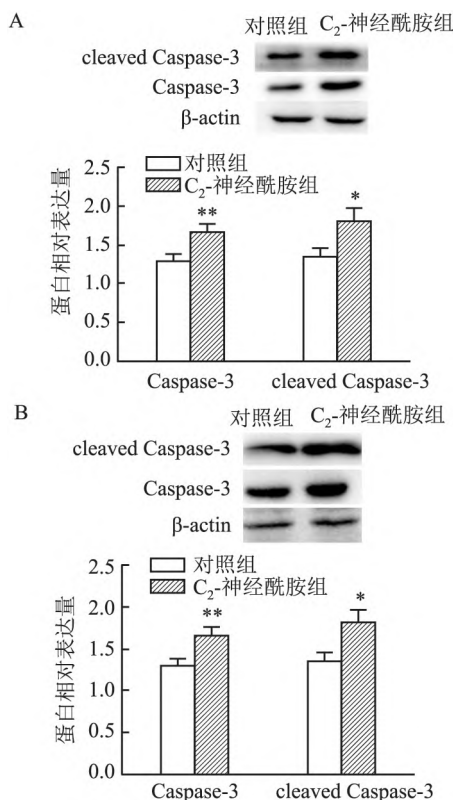


图4 Caspase-3及cleaved Caspase-3蛋白的表达情况

A: A549 细胞; B: PC9 细胞; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 C_2 -神经酰胺诱导 A549/PC9 凋亡中 Caspase-3 蛋白基因水平的表达 RT-PCR 结果显示,在两种细胞中,与对照组相比, C_2 -神经酰胺组 Caspase-3 表达水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

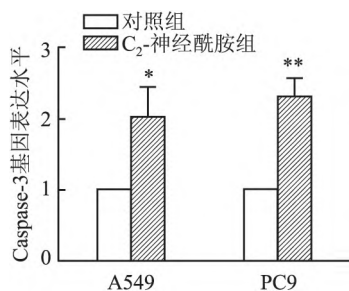


图5 Caspase-3 蛋白在 A549/PC9 细胞中基因表达水平

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

肺癌是世界上第二大常见的癌症,病死率占有所有癌症的 25%。研究^[7-9]表明,在过去的几十年中,肺癌的 5 年生存率低于 20%,其中非小细胞肺癌预后很差,诊断时出现转移的患者约占 50%。尽管近年来在多项随机临床试验中研究了新的化疗方

案和新的细胞毒性组合,但肺癌患者的预后并未获得明显改善,非小细胞肺癌的患者的 5 年生存率仍约为 15%。虽然目前手术是唯一可能的治疗方法,但一般患者在确诊时已丧失了最佳的手术时机,只能使用化疗或放疗的方式延缓病情的进展,延长患者生命。该实验使用非小细胞肺腺癌细胞系细胞(A549/PC9)作为研究对象,验证了鞘磷脂类物质 C_2 -神经酰胺对其影响,为临床鞘磷脂类物质应用于癌症治疗提供帮助。

神经酰胺为调节细胞代谢的核心分子,在细胞膜稳定方面发挥着不可替代的作用,常被认为是调节细胞增殖、细胞周期停滞、分化和凋亡的第二信使^[10]。当然,神经酰胺的活性主要取决于它的分子链的长短,短链(C_2 、 C_6 、 C_8)和长链(C_{16} 、 C_{18})会促进凋亡,而超长链分子的神经酰胺(C_{24})无相同作用。实验^[11]表明 C_2 -神经酰胺可促使头颈部鳞状细胞癌细胞发生保护性自噬,以抑制神经胶质瘤浸润^[12];同样 C_8 -神经酰胺可降低肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)的活力并诱导细胞凋亡^[13]。尽管神经酰胺在糖尿病、阿尔茨海默病、抑郁症、多发性硬化症及乳腺癌等病理变化中的调节作用已经报道,但对非小细胞肺腺癌细胞的研究还很少。该研究表明非小细胞肺腺癌细胞(A549 及 PC9)的细胞活性可随 C_2 -神经酰胺浓度的增加而呈下降的趋势。Caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶家族成员,又称细胞凋亡因子,它可通过多种途径促进细胞的凋亡,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的最直接的效应因子。与对照组相比,神经酰胺还能使凋亡蛋白 Caspase-3 的表达升高。这些结果显示, C_2 -神经酰胺治疗以剂量反应方式对人非小细胞肺腺癌细胞发挥抗生长潜力。

凋亡是程序性细胞死亡的一种形式,是一个必不可少的稳态过程。在肿瘤细胞中,促进肿瘤细胞凋亡是一种抑制肿瘤细胞生长的方式,许多化疗药物发挥作用依赖其促进细胞凋亡的发生。近年来神经酰胺与化疗药物合用,加强化疗药物的作用及降低药物耐药性已被广泛应用。Jiang et al^[14]研究表明 C_2 -神经酰胺增强索拉非尼诱导的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞毒性和细胞周期阻滞。Zhang et al^[15]研究表明神经酰胺有诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的作用,却没有使用其他细胞或其他类型的细胞进一步研究,但在该实验中使用了多种细胞均显示神经酰胺有促进肺腺细胞凋亡的作

用且具有剂量依赖,表明 C₂-神经酰胺可能成为肺癌治疗或辅助治疗的试剂。

参考文献

- [1] Liu G, Pei F, Yang F, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 367.
- [2] Skříčková J, Kadlec B, Vencelíček O, et al. Lung cancer [J]. *Cas Lek Cesk*, 2018, 157(5): 226–36.
- [3] Petsri K, Chamni S, Suwanborirux K, et al. Renieramycin T induces lung cancer cell apoptosis by targeting mcl-1 degradation; a new insight in the mechanism of action [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(5):301.
- [4] Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(1): 33–50.
- [5] Ruvo P P, Deng X, Ito T, et al. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation *via* a mechanism involving mitochondrial PP2A [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(29): 20296–300.
- [6] 蒋建军, 杨进, 金永梅, 等. 丙咪嗪经酸性鞘磷脂酶/神经酰胺通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NLRP3 炎症小体的激活 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(7): 1042–6.
- [7] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87–108.
- [8] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7–30.
- [9] 汪超, 彭万仁, 童斯浩, 等. 橙皮素通过内质网应激通路诱导人肺癌细胞 PC9 发生凋亡 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 11–6.
- [10] Morad S A, Cabot M C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 51–65.
- [11] Zhu W, Wang X, Zhou Y, et al. C2-ceramide induces cell death and protective autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 3336–55.
- [12] Jung J S, Ahn Y H, Moon B I, et al. Exogenous C2-ceramide suppresses matrix metalloproteinase gene expression by inhibiting ROS production and MAPK signaling pathways in PMA-stimulated human astrogloma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 477.
- [13] 刘辉, 杨进, 汪影, 等. C8-神经酰胺诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2015, 38(6): 445–50.
- [14] Jiang S, Wang Q, Feng M, et al. C2-ceramide enhances sorafenib-induced caspase-dependent apoptosis *via* PI3K/AKT/mTOR and Erk signaling pathways in HCC cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(4): 1535–46.
- [15] Zhang T H, Liu J F, Zhang Y, et al. Ceramide induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through mitogen-activated protein kinases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(3): 439–45.

The role and influence of ceramide in A549/PC9 cell apoptosis

Shi Yining^{1,2}, Liu Jialin², Liu Fangfang¹, Fang Haohui², Yang Jin¹, Lu Youjin¹

(¹Dept of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Respiratory Medicine, Anhui Chest Hospital, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of C₂-ceramide, one of the sphingomyelin substances, on apoptosis of non-small cell lung cancer cells (A549 and PC9). **Methods** Non-small cell lung cancer cell lines (A549 and PC9) were cultured, total proteins were extracted and Western blot was performed to detect the expression of apoptotic protein Caspase-3 and cleaved Caspase-3 in the two cells. CCK-8 colorimetric method was used to screen drug concentration. Hoechst 33258 apoptosis staining was used to detect apoptosis. The apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the expression of apoptotic protein Caspase-3 was detected by RT-PCR. **Results** The cell viability was about 70% when ceramide was treated at 50 μmol/L. Compared with the control group, the expression of apoptotic proteins increased in the ceramide group ($P < 0.05$). Flow cytometry and apoptosis staining showed that the rate of apoptosis increased in the ceramide treatment group compared with the control group ($P < 0.05$). mRNA detection at gene level showed increased the expression of apoptotic protein Caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion**

C₂-ceramide can promote the apoptosis of non-small cell lung cancer cells, thus providing a new therapeutic target for clinical lung cancer chemotherapy.

Key words sphingomyelin; ceramide; lung cancer cell; apoptosis