

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.013.html>

环孢素 A 诱导人胃癌 MGC80-3 细胞凋亡以及对细胞色素 C 蛋白表达的影响

黄军祥¹, 胡咏梅², 石海³, 徐雄飞¹, 周春立¹

摘要 目的 研究环孢素 A (CsA) 诱导人胃癌 MGC80-3 细胞凋亡以及对细胞色素 C (cytochrome C) 蛋白表达的影响, 探讨细胞凋亡与 cytochrome C 蛋白表达的关系。方法 利用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞仪 (FCM) 检测不同浓度 CsA 处理 MGC80-3 细胞 48 h 后细胞凋亡率, 透射电子显微镜观察细胞凋亡的形态学改变以及线粒体的损伤, Western blot 法检测细胞内 cytochrome C 蛋白的表达。结果 在 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内 CsA 可显著诱导 MGC80-3 细胞凋亡, 细胞凋亡率随 CsA 浓度依赖性增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($F=18.64$, $P<0.05$, $P<0.01$)。电镜下可见与对照组相比细胞发生核染色质固缩等典型的凋亡特征改变以及线粒体损伤。Western blot 表明 CsA 浓度依赖性上调 cytochrome C 蛋白的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 CsA 能诱导 MGC80-3 细胞凋亡, 其机制可能与线粒体损伤和上调细胞内 cytochrome C 蛋白表达有关。

关键词 环孢素 A; MGC80-3 细胞; 细胞色素 C; 细胞凋亡

中图分类号 R 329.25; R 329.28; R735.2; R979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)05-0727-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.013

胃癌 (gastric cancer, GC) 是世界范围内第五大恶性肿瘤, 也是全球由癌症引起病患死亡的三大恶性肿瘤之一^[1], 严重威胁人类健康。据报道, 接受常规化疗药物的转移性 GC 患者的总生存率 (overall survival rate, OS) 在 5 年内不到 10%^[2]; 而以曲妥单抗为代表的生物疗法被引入治疗 GC, 结果显示在人类表皮受体 2 (HER-2) GC 肿瘤患者中无进展生存期且 OS 方面均无明显优势^[3]。因此, 针对 GC 寻找较为理想的治疗方法具有重要意义。而诱导肿瘤

细胞凋亡是目前针对 GC 治疗的较为理想的方法之一, 前期研究^[4]表明 CsA 可显著诱导人胃癌 BGC823 细胞凋亡, 其机制可能与细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的大量产生和线粒体膜电位的下降 ($\Delta\Psi_m$) 有关。有研究^[5]显示线粒体在参与细胞凋亡和炎症过程中发挥积极作用, 强调靶向线粒体功能在改善癌症治疗方面有巨大的潜力。该实验利用流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 处理后 MGC80-3 细胞凋亡率, 电镜观察细胞线粒体结构变化以及细胞内细胞色素 C (cytochrome C) 蛋白的表达, 进一步探讨 CsA 诱导 MGC80-3 细胞凋亡的相关机制, 为临床针对 GC 治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃癌 MGC80-3 细胞株购自中国科学院上海细胞库。细胞生长条件: 含 10% 胎牛血清和 12 U/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱内换液传代培养, 实验采用对数生长期细胞。

1.1.2 药品、试剂和仪器 CsA 标准品冻干粉 (中国药品生物制品检定所, 批号 130495-200202, 纯度 98.8%); RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 一抗 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 内参 GAPDH (上海康城生物制品有限公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (上海贝博生物公司); 0.22 μm 微孔滤膜 (美国 Pall 公司); CO₂ 恒温培养箱 (日本 Sanyo 公司); 超净工作台 (苏州净化设备厂); 流式细胞仪 (美国贝克曼公司); 透射电子显微镜 (日本日立公司); 其他实验所需试剂 (美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 FCM 检测细胞凋亡率 选对数生长期

2019-01-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金青年科学基金项目 (编号: 11040606Q24)

作者单位: ¹ 苏州市立医院北区消化科, 苏州 215008

安徽医科大学第一附属医院² 科研处、³ 消化内科, 合肥 230022

作者简介: 黄军祥, 男, 医师, 硕士;

周春立, 男, 本科, 主任医师, 责任作者, E-mail: zhouchunli079@163.com

MGC80-3 细胞接种于 6 孔培养板,设对照组,实验组采用浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 CsA 作用细胞 48 h,经胰酶消化收集细胞,浓度调整至 $5 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$,冰 PBS 洗涤 2 次,离心后加入 400 μl 缓冲液重悬细胞。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,加入 5 μl AnnexinV-FITC 试剂混匀后,放置于培养箱中避光孵育 15 min,再加 PI 10 μl 避光染色 5 min,FCM 检测细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.2.2 电镜观察 MGC80-3 细胞凋亡形态 方法同上,CsA 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后,胰酶消化收集各约 5×10^6 个细胞,吸管将细胞转移至离心管中,加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 轻轻吹打均匀,1 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 ~ 20 min,轻轻吸弃上清液。吸管沿管壁缓慢加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2.5% 戊二醛溶液 2 ml,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h。室温下丙酮脱水处理,包埋、修块、制备半薄切片,定位后制备超薄切片,经枸橼酸铅染色,Hitachi-600 型透射电镜观察和摄片。

1.2.3 Western blot 检测细胞蛋白的表达 设对照组,实验组 CsA 浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$,按上述浓度分别处理 MGC80-3 细胞 48 h 后用细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒行细胞蛋白定量。每孔吸取 20 μl 蛋白上样,预先配置 SDS-PAGE 电泳分离,并将目的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,分别孵育一抗、二抗,5% 的脱脂奶粉孵育,PBS 洗膜 3 次,置膜于暗室中 ECL 试剂盒显影,扫描仪采集图像,Image J 软件系统分析 Western blot 检测结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组与对照组之间采用 t 检验或单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CsA 诱导 MGC80-3 细胞凋亡 MGC80-3 细胞经不同浓度 CsA 处理后,FCM 检测结果如图 1 所示,CsA 可浓度依赖性诱导 MGC80-3 细胞发生凋亡,10 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组凋亡率为 $(16.57 \pm 2.53)\%$,20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 组凋亡率为 $(24.33 \pm 1.31)\%$,与对照组相比,差异均有统计学意义($F = 18.64$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 MGC80-3 细胞凋亡形态学的改变 结果如图 2 所示,电镜观察显示,CsA 作用人胃癌 MGC80-3 细

胞后,细胞发生典型凋亡特征变化,如核染色质固缩、核碎裂成碎片等;线粒体也出现损伤,线粒体膜的破裂、肿胀、空泡样变性等现象(图 2C、2D 中箭头所示)。而对照组细胞线粒体形态正常,清晰完整(图 2A 中箭头所示)。

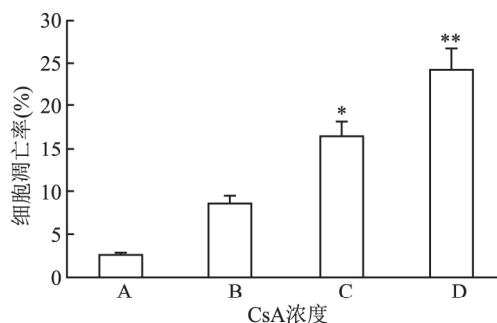


图 1 CsA 对 MGC80-3 细胞凋亡影响

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; D: 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

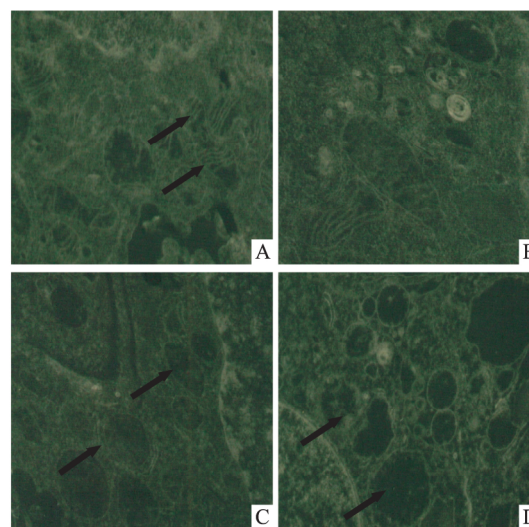


图 2 电镜观察 MGC80-3 细胞发生凋亡特征性改变

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; D: 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组

2.3 CsA 影响 MGC80-3 细胞内 Cytochrome C 蛋白的表达 在 CsA 处理 MGC80-3 细胞 48 h 后,细胞内 Cytochrome C 蛋白表达量随着药物作用浓度的增加而明显增加。实验结果如图 3 所示,CsA 浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞内蛋白表达水平与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

我国是 GC 的高发地区,研究^[6]显示在河北省

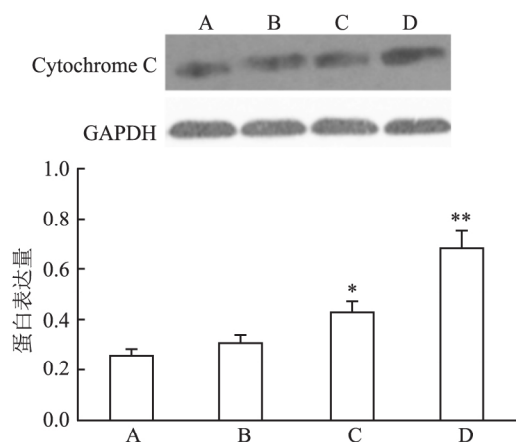


图3 CsA作用MGC80-3细胞Cytochrome C蛋白表达

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; D: 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

GC 发病率和死亡率分别居各类癌症第二位和第三位,成为当地的主要疾病负担。因此,针对GC寻找理想的治疗手段成为当务之急。CsA作为一种强效免疫制剂,是具有广泛前景的抗肿瘤药物,其有抗肿瘤细胞谱广、毒性低的特点,联合多种化疗药物能显著诱导如神经胶质瘤、慢性髓性白血病等肿瘤细胞凋亡,并有协同增加化疗药物的抗肿瘤作用^[7-8]。已越来越引起人们的关注。

本研究结果显示CsA作用48h后能浓度依赖性诱导MGC80-3细胞凋亡,电镜也观察到细胞发生典型凋亡形态学改变,细胞线粒体膜出现破裂、肿胀、嵴变短或消失;线粒体出现空泡样变性,可能存在功能失活,表明其诱导凋亡的机制可能与线粒体受损有关。由于线粒体膜受损可改变线粒体通透性,会使 $\Delta\Psi_m$ 下降,致线粒体基质肿胀,释放促凋亡因子,如Cytochrome C,形成被称为凋亡体的多聚体复合物,并启动Caspase家族蛋白激活级联反应,最终细胞发生凋亡^[9]。研究^[10]表明:通过激活caspase-3、caspase-9和Cytochrome C蛋白表达可诱导人胃癌BGC-823细胞的凋亡。

本实验前期研究^[11]显示CsA诱导MGC80-3细胞凋亡与激活caspase-3蛋白表达有关。而Cytochrome C作为细胞线粒体凋亡路径重要信号蛋白,是否也参与了CsA诱导MGC80-3细胞凋亡过程,本实验利用Western blot法检出了细胞内Cytochrome C蛋白表达变化,结果显示CsA可促进细胞Cytochrome C蛋白表达;结合FCM结果,笔者推测CsA诱导MGC80-3细胞凋亡可能与上调Cytochrome C

蛋白表达有关联。关于CsA是否通过线粒体凋亡信号通路诱导MGC80-3细胞凋亡具体机制还有待于后续的研究进一步证实。

由于为线粒体细胞凋亡途径在癌症、糖尿病、肥胖、缺血/再灌注损伤等各种病理状况中扮演着重要角色^[9],所以本实验通过研究CsA靶位GC细胞线粒体功能,探讨CsA诱导MGC80-3细胞凋亡的相关机制,这对于今后开发CsA作为免疫抑制剂在治疗胃恶性肿瘤中的重要作用提供科学而有价值的信息。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer 2015, 136(5): 359-86.
- [2] Lordick F, Allum W, Carneiro F, et al. Unmet needs and challenges in gastric cancer: the way forward [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 692-700.
- [3] Meulendijks D, Beerepoot L V, Boot H, et al. Trastuzumab and bevacizumab combined with docetaxel, oxaliplatin and capecitabine as first-line treatment of advanced HER2-positive gastric cancer: A multicenter phase II study [J]. Invest New Drugs 2016, 34(1): 119-28.
- [4] 黄军祥, 胡咏梅, 石海, 等. 环孢素A对人胃癌BGC823细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(11): 1605-10.
- [5] Giampazolias E, Tait S W. Mitochondria and the hallmarks of cancer [J]. FEBS J 2016, 283(5): 803-14.
- [6] Liang D, Liang S, Jin J, et al. Gastric cancer burden of last 40 years in North China(Hebei Province): a population-based study [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(2): e5887.
- [7] Han X, Yoon S H, Ding Y, et al. Cyclosporin A and sanglifehrin A enhance chemotherapeutic effect of cisplatin in C6 glioma cells [J]. Oncol Rep 2010, 23(4): 1053-62.
- [8] de Souza P S, da Cunha Vasconcelos F, Silva L F, et al. Cyclosporine A enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells [J]. Tumour Biol 2012, 33(4): 943-56.
- [9] Gupta S, Kass G E, Szegezdi E, et al. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(6): 1004-33.
- [10] Lu X, Li Y, Li X, et al. Luteolin induces apoptosis *in vitro* through suppressing the MAPK and PI3K signaling pathways in gastric cancer [J]. Oncol Lett 2017, 14(2): 1993-2000.
- [11] 黄军祥, 胡咏梅, 石海, 等. 环孢素A对人胃癌MGC80-3细胞周期的影响以及诱导其凋亡机制的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(2): 169-73.

(下转第734页)

ing 12 mice as normal control group from 34 male mice of clean grade, the rest 22 mice for high-fat diet (HFD) group. Feeding the 22 mice with HFD for 12 weeks, then, 11 mice were randomly selected from the HFD group to be used as high-fat-diet + liraglutide group (liraglutide group), while the remaining 11 mice were used as the HFD control group. Mice in the two groups were injected with liraglutide and normal saline, respectively. At the end of 12th week, serological, urinalysis indexes and kidney tissue were collected. ELISA was performed to determine serum TNF- α levels. The expression levels of TNF- α and c-Jun N-terminal kinase (JNK), signal regulating kinase (ERK) protein in the mitogenactivated protein kinases (MAPK) pathway were detected by Western blot. The morphology and the structure of glomerular podocytes were observed using electron microscopy. **Results** ① The body weight, wet weight of right kidney, 24 hour urine albumin excretion and blood lipids in HFD control group were obviously increased ($P < 0.05$ vs control), and glomerular podocyte nuclear chromatin aggregated, nuclear membrane gap broadened, mitochondrial appeared vacuolar degeneration, foot process fused and structure became unclear in HFD control group. ② The above indicators of liraglutide group were obviously reduced ($P < 0.05$ vs HFD control), and podocyte lesions of liraglutide group significantly palliated. ③ The serum TNF- α level and the expression of TNF- α , JNK and ERK in kidney tissues were obviously raised in HFD control group ($P < 0.05$ vs control). These indicators in liraglutide group were significantly lower compared to those in HFD control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Liraglutide can reduce urinary albumin excretion and improve the degree of podocyte morphological and structural damage in ORG mice induced by high-fat-food, the mechanisms may be partly related to its inhibition of TNF- α mediated JNK and ERK pathways.

Key words obesity-related glomerulopathy; liraglutide; podocyte; MAPK

(上接第 729 页)

Effect of cyclosporin A on apoptosis and protein expression of cytochrome C in human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells

Huang Junxiang¹, Hu Yongmei², Shi Hai³, et al

(¹ Dept of Gastroenterology, North Area of Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008; ² Dept of Research,

³ Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To study the effect of cyclosporine A (CsA) on apoptosis of human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells and the protein expression of cytochrome C, and further explore the relationship between them. **Methods** Annexin V-FITC/PI double staining was employed to detect cell apoptosis rate by flow cytometry (FCM) after different concentration of CsA treating with MGC80-3 cells for 48 h, and utilizing transmission electron microscope to observe the morphological changes and mitochondrial damage; Western blot was applied to examine protein expression of cytochrome C. **Results** FCM analysis showed that cell apoptosis rate was increased with the concentration of CsA in a dose-dependent manner from the range of 0 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ and had significant difference compared with the control group ($F = 18.64$, $P < 0.05$, $P < 0.01$). Under electron microscope, typical apoptotic changes such as nuclear chromatin condensation and mitochondrial damage were observed in the cells compared with the control group. Western blot also showed that the expression of cytochrome C protein was up-regulated in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** CsA may induce the apoptosis in MGC80-3 cells, and its mechanism of apoptosis may be related to up-regulation of cytochrome C protein expression and mitochondrial damage in cells.

Key words cyclosporin A; MGC80-3 cells; cytochrome C; apoptosis