

槲皮素通过 Stat3/Mcl-1 途径介导肺癌 PC9/GR 细胞凋亡的研究

王静¹ 袁媛² 彭佳¹ 潘跃银³ 张颖¹

摘要 目的 探究槲皮素(Que)对人非小细胞肺癌(NSCLC)获得性耐药细胞株 PC9/Gefitinib-Resistant(GR)细胞的凋亡的影响及作用机制。方法 MTT 法检测不同浓度 Que 对 PC9/GR 细胞增殖的影响,计算其半数抑制浓度(IC₅₀)值。光镜下观察细胞形态学改变。流式细胞术检测 Que 介导的细胞凋亡。Western blot 法检测 Stat3/Mcl-1 信号途径相关蛋白水平的改变。结果 MTT 显示 Que 可明显抑制 PC9/GR 细胞增殖,并呈浓度依赖性,IC₅₀ 值为 (74.83 ± 4.83) μmol/L。流式细胞学结果表明,与对照组相比,Que 可呈浓度依赖性地促进细胞凋亡(P < 0.05)。Western blot 表明 Que 可减弱 Stat3 蛋白的活化水平,其下游的凋亡相关蛋白 Mcl-1 表达亦减弱(P < 0.05)。结论 Que 对获得性耐药 NSCLC 细胞 PC9/GR 具有较强的抗肿瘤作用,作用机制可能与 Stat3/Mcl-1 途径介导的细胞凋亡密切相关。

关键词 非小细胞肺癌;获得性耐药;槲皮素;凋亡

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1782-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.008

肺癌是全球癌症相关性死亡的首要原因^[1],其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占 80%,其对化疗反应低。尽管表皮生

长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKIs)在治疗 NSCLC 上取得了一定的临床疗效,但绝大多数初始治疗敏感的患者在一年内相继出现耐药^[2-3]。耐药机制复杂多变,EGFR 二次突变 T790M 是获得性耐药的最主要原因,约占 60%^[3]。此外还有旁路途径的异常激活,如 HER 家族成员的变异、c-Met 基因扩增及 IL-6 的过度分泌等^[4]。槲皮素(querceetin, Que)是一种黄酮类化合物,具有非致癌性和低毒性^[5],其抗炎、抗癌、抗氧化等多种作用可使不同类型肿瘤患者受益,如胃癌^[6]、肝癌^[7]、黑色素瘤^[8]等,然而,关于 Que 介导 NSCLC 获得性耐药细胞凋亡的研究却很少。故该实验通过研究 Que 对 NSCLC 耐药细胞凋亡的影响,探讨其凋亡诱导作用及潜在机制,为克服 EGFR-TKIs 耐药提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料 PC9/Gefitinib-Resistant(GR)(吉非替尼获得性耐药的 NSCLC 细胞株)由广东省医学科学院赠予;Que、DMSO、MTT 购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;细胞凋亡试剂盒、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(100×)、胰蛋白酶、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自北京碧云天生物公司;Western blot 化学发光试剂 ECL 购自美国 Millipore 公司;抗 β-actin 抗体、抗转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription, Stat3)抗体、抗 p-Stat3 抗体、抗髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)抗体等均购自美国 CST 公司。

2017-08-28 接收

基金项目:安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号:2016zy29)

作者单位:¹安徽医科大学第三附属医院干部病房,合肥 230061

²合肥市滨湖医院中心实验室,合肥 230061

³安徽省立医院肿瘤科,合肥 230000

作者简介:王静,女,硕士研究生;

潘跃银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yueyinpan@gmail.com;

张颖,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zy650108yz@163.com

skeletal muscle AMPK protein. **Results** The results showed that the serum Irisin level and skeletal muscle AMPK phosphorylation level of obese rats decreased compared with the normal group(P < 0.01), while exercise group rats had higher serum Irisin levels and higher skeletal muscle AMPK phosphorylation level(P < 0.01), there was a positive correlation between serum Irisin level and skeletal muscle AMPK, the differences were statistically significant(P < 0.01). **Conclusion** Exercise could strengthen the serum Irisin level and skeletal muscle AMPK phosphorylation level on obese rats and there is a positive correlation between them. Irisin may be the core of the molecular mechanism of exercise effects.

Key words obese rats; Irisin; skeletal muscle; AMPK

1.2 药物配制与保存 将 Que 按一定浓度溶于 DMSO 中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中长期保存,实验时用新鲜的培养基稀释至所需药物浓度。

1.3 细胞培养 PC9/GR 细胞培养于含 10% 胎牛血清及 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中,置于含 5% CO_2 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱,显微镜下观察细胞形态,1~2 d 细胞换液一次,2~3 d 细胞长至约 90% 进行胰酶消化传代。

1.4 MTT 实验 取对数生长期的细胞胰酶消化制备细胞悬液,进行实验,将 PC9/GR 细胞以 5×10^4 个/ml 密度均匀接种于 96 孔板中,设置 4 个复孔,每孔 150 μl 培养基。24 h 后对照组细胞换液,实验组细胞按 Que 浓度 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 依次加药。同时设置空白组和阴性对照组,48 h 后每孔加入 20 μl MTT,4 h 后轻轻吸尽孔内液体,每孔加入 200 μl DMSO,于酶标仪震动 10 min 后读取 490 nm、655 nm 双波长处的吸光度(optical density, OD) 值。计算各组细胞生长抑制率,抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$,实验重复至少 3 次。

1.5 光镜下观察细胞形态学改变 根据 MTT 检测结果,设置 3 个浓度梯度的 Que,实验分为 4 组,分别为:对照组、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ Que 组。待细胞密度至 60%~70% 时,对照组细胞换液,实验组分别加入含以上不同药物浓度的培养基,培养 24 h 后,置于倒置显微镜下观察细胞形态及数量变化,拍照记录。

1.6 细胞凋亡实验 取对数生长期细胞进行实验,将细胞以 7×10^5 个/ml 密度均匀接种于 6 cm 培养皿中,实验分组及处理同 1.5,24 h 后胰酶消化收集细胞,离心、PBS 洗涤,按细胞凋亡试剂说明书操作,流式细胞仪检测,FlowJo7.6.1 软件分析各组细胞凋亡率。

1.7 Western blot 实验 按照上述分组处理细胞,24 h 后胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤,蛋白 BCA 法定量,95~100 $^{\circ}\text{C}$ 细胞裂解 15 min,低温离心 10 min,12 000 r/min, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。按照电泳、转膜、封闭、一抗、二抗孵育、孵育后 TBST 洗涤、ECL 发光显影、烘干保存的步骤操作,检测相关蛋白 Stat3、p-Stat3 和 Mcl-1 的表达水平。

1.8 统计学处理 各实验至少重复 3 次,实验数据通过 SPSS 16.0 软件分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Que 对 PC9/GR 细胞的增殖抑制作用 MTT 结果显示 Que 对 PC9/GR 细胞呈现出显著的剂量依赖性的增殖抑制作用,Que 作用于 PC9/GR 细胞 48 h 后半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50}) 值为 $(74.83 \pm 4.83)\ \mu\text{mol/L}$,见图 1。

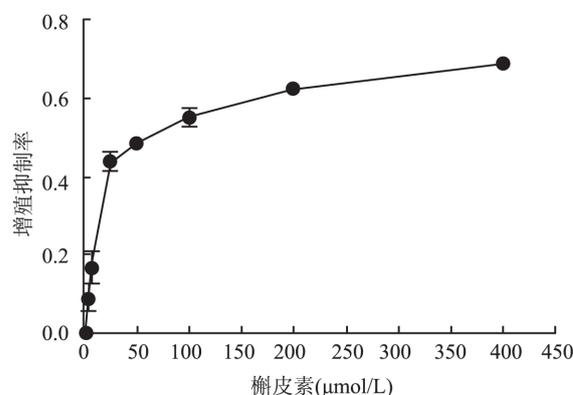


图1 MTT法检测不同浓度Que对PC9/GR细胞增殖抑制的影响

2.2 光镜下观察细胞形态学变化 随着 Que 药物浓度的增加,光镜下显示贴壁细胞数量减少,体积变大,边界模糊、变圆,细胞核皱缩,核内可见空泡及粗颗粒,细胞间隙增大,漂浮皱缩的死亡细胞数量增多,呈现出明显的凋亡特征,见图 2。

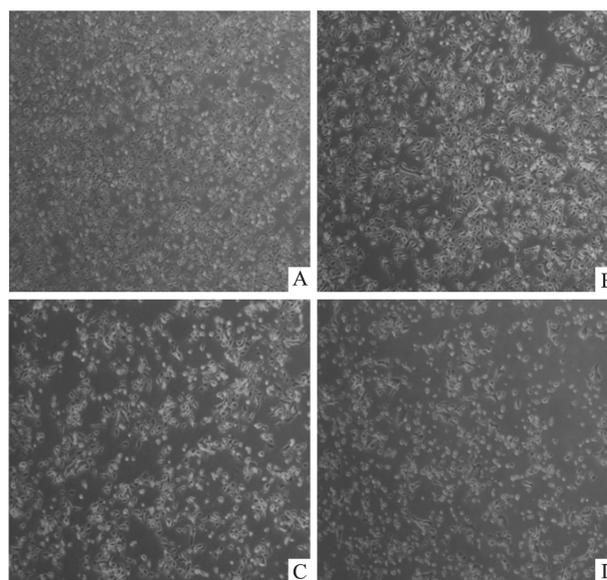


图2 不同处理组细胞形态学的改变(光镜) $\times 40$

A:对照组;B:25 $\mu\text{mol/L}$ 组;C:50 $\mu\text{mol/L}$ 组;D:100 $\mu\text{mol/L}$ 组

2.3 流式细胞学检测细胞凋亡 Que 对 PC9/GR 细胞有明显的凋亡诱导作用,且随着浓度的升高,细胞的早期和晚期凋亡率都明显增加。25、50、100

μmol/L 的 Que 作用 24 h 后细胞总的凋亡率分别为 (8.37 ± 0.49) % 、 (13.94 ± 0.56) % 、 (33.12 ± 0.84) % , 与对照组相比 , 差异有统计学意义 (F = 1 885.00 P < 0.01) , 见图 3 。

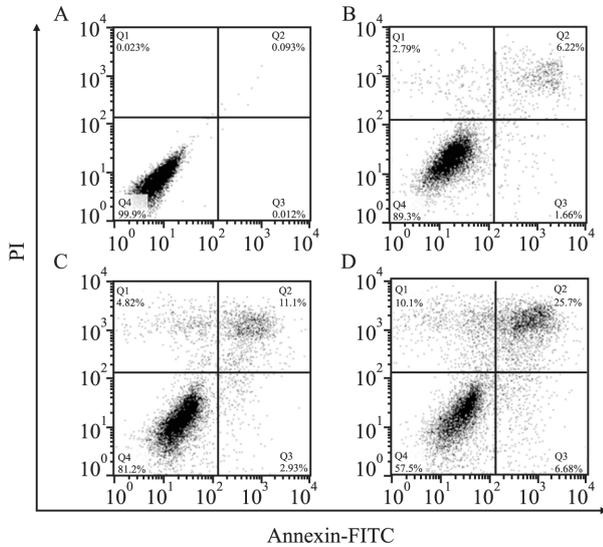


图 3 流式细胞术检测不同浓度 Que 对 PC9/GR 细胞凋亡的影响 A: 对照组; B: 25 μmol/L 组; C: 50 μmol/L 组; D: 100 μmol/L 组

2.4 Western blot 法检测 Stat3/Mcl-1 信号通路相关蛋白表达水平 与对照组相比 , Que 可以明显减弱 Stat3 的磷酸化水平及 Stat3 下游的凋亡相关蛋白 Mcl-1 的表达水平 , 且呈浓度依赖性 , 差异有统计学意义 (F = 158.10、2 516.00 P < 0.01) , 而 Stat3 蛋白表达水平变化差异无统计学意义 , 见图 4 。

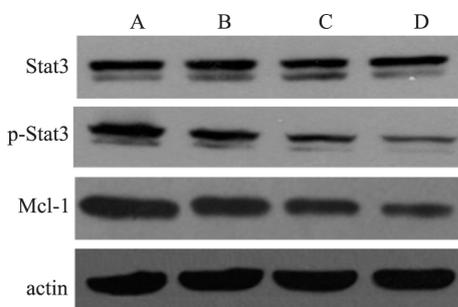


图 4 Western blot 法检测各组细胞 Stat3/Mcl-1 信号通路相关蛋白的表达水平

A: 对照组; B: 25 μmol/L 组; C: 50 μmol/L 组; D: 100 μmol/L 组

3 讨论

肺癌是世界上发生率和死亡率最高的肿瘤之一 , 并且其 5 年生存率低 , 复发及转移率高。根据其临床及病理特点 , 治疗方式多样化 , 手术治疗是早期

肺癌最根本的治疗手段 , 然而大多数患者就诊时已处于癌症晚期。其他治疗方式主要有化疗、放疗、分子靶向治疗以及综合治疗等 , 虽然化疗在晚期 NSCLC 的治疗中发挥重要作用 , 但其治疗效果已达平台期。EGFR-TKIs 的出现明显提高了 EGFR 敏感突变晚期 NSCLC 患者的无进展生存期 , 并且不良反应的发生率也显著低于化疗 , 成为晚期 NSCLC 的一线治疗药物 , 但因继发性耐药的发生 , 治疗的有效性达到瓶颈^[9]。

近年来 , EGFR-TKIs 的继发性耐药机制成为国内外研究的热点 , 研究^[10-11]表明 , Stat3 在细胞的增值、分化、存活、炎症反应和血管生成等多个进程中发挥着关键作用 , Stat3 的活化与耐药密切相关 , 与敏感细胞相比 , 耐药细胞中 Stat3 的活性更强 , 抑制 Stat3 的活性可使耐吉非替尼的 NSCLC 细胞致敏。Stat3 是 Jak/Stat 下游信号通路的关键因素 , 其活化受许多细胞因子和生长因子的调节 , 如: 表皮生长因子、白细胞介素-5、白细胞介素-6、肝细胞生长因子等^[12]。在许多血液和实体瘤中 , Stat3 的持续激活能上调凋亡抑制因子 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、Mcl-1 等的表达 , 刺激细胞增殖阻碍凋亡 , 介导对多种化疗药物的耐药^[13]。

鉴于 Stat3 活化在耐药研究中的价值 , 推测抑制 Stat3 的活化可在一定程度上克服耐药。本实验选取 T790M 突变的 NSCLC 继发性耐药细胞株进行研究 , 通过实验探究 Que 对肺癌耐药细胞株的作用及其对 Stat3 信号通路的调节 , 结果显示 , 随着 Que 药物浓度的增加 , 细胞的增殖抑制及促进凋亡的作用显著增加 , Western blot 结果证明 Que 作用后其 Stat3 的磷酸化水平明显减弱 , 下游的抗凋亡相关蛋白 Mcl-1 表达亦减弱 , 表明 Que 促进 PC9/GR 细胞凋亡与 Stat3/Mcl-1 通路有关。Stat3 的持续磷酸化已经在 22% ~ 65% 的 NSCLC 中显示^[12] , 研究^[14]显示在 EGFR-TKIs 治疗一段时间后 Stat3 磷酸化水平明显增高 , 这种现象存在于多种类型的 EGFR 突变肺癌细胞中 , 瞬时的 Stat3 敲除可充分抑制厄洛替尼耐药细胞的克隆形成 , 并进一步证实了早期 Stat3 的负反馈激活是导致肺癌耐药的原因。Mcl-1 蛋白质于 2010 年被美国达纳-法伯癌症研究所证实能帮助肿瘤细胞躲过药物攻击继续生长 , 致使肿瘤细胞耐药^[15]。本研究证明了 Que 可通过抑制 Stat3/Mcl-1 通路促进 NSCLC 耐药细胞株凋亡。由于 Que 对 NSCLC 耐药细胞株的显著抗肿瘤效果 , 本研究期望通过 Que 的应用为克服耐药提供新的治疗方案 , 但

本实验为体外实验,具体的临床应用还需通过进一步的体内实验以及相关临床试验。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5–29.
- [2] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947–57.
- [3] Kim T M, Song A, Kim D W, et al. Mechanisms of acquired resistance to AZD9291: a mutation-selective, irreversible EGFR inhibitor [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(12): 1736–44.
- [4] Huang L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 390–401.
- [5] Kelly G S. Quercetin. Monograph [J]. *Altern Med Rev*, 2011, 16(2): 172–94.
- [6] Kim M C, Lee H J, Lim B, et al. Quercetin induces apoptosis by inhibiting MAPKs and TRPM7 channels in AGS cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1657–63.
- [7] Ren K W, Li Y H, Wu G, et al. Quercetin nanoparticles display antitumor activity *via* proliferation inhibition and apoptosis induction in liver cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4): 1299–311.
- [8] Cao H H, Tse A K, Kwan H Y, et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(3): 424–34.
- [9] Wu Y L, Zhou C, Liang C K, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(9): 1883–9.
- [10] Zhang X, Xiao W, Wang L, et al. Deactivation of signal transducer and activator of transcription 3 reverses chemotherapeutics resistance of leukemia cells *via* down-regulating P-gp [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20965.
- [11] Chiu H C, Chou D L, Huang C T, et al. Suppression of Stat3 activity sensitizes gefitinib-resistant non small cell lung cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(11): 1263–70.
- [12] Harada D, Takigawa N, Kiura K. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(2): 708–22.
- [13] Helbig G, Bober G, Seweryn M, et al. Occurrence of secondary malignancies in chronic myeloid leukemia during therapy with imatinib mesylate—single institution experience [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2015, 7(1): e2015003.
- [14] Lee H J, Zhuang G, Cao Y, et al. Drug resistance *via* feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(2): 207–21.
- [15] Stewart M L, Fire E, Keating A E, et al. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(8): 595–601.

Quercetin promotes apoptosis of lung cancer PC9/GR cell *via* Stat3/Mcl-1 pathway

Wang Jing¹, Yuan Yuan², Peng Jia¹, et al

(¹Dept of Cadres Ward, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

²Central Laboratory of Binhu Hospital, Hefei 230061)

Abstract Objective To investigate the effect of Que on the apoptosis of acquired resistant NSCLC PC9 / GR cells and to explore its potential mechanism. **Methods** The anti-proliferative effect of Que on PC9/GR cells was assessed by MTT assay and the half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The morphological alterations about groups of different concentrations of Que were observed by microscope. The apoptosis ratios were detected by flow cytometry analysis. And the protein expression of Stat3 / Mcl-1 signal pathway was detected by Western blot. **Results** MTT assay showed that Que could significantly inhibit the proliferation of PC9 / GR cells in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of (74.83 ± 4.83) μmol/L. Flow cytometry showed that Que could promote the apoptosis in a dose-dependent manner compared with the control group (*P* < 0.05). Western blot showed that Que could decrease the activation level of Stat3 protein, and the expression of apoptosis-related protein Mcl-1 was also decreased (*P* < 0.05). **Conclusion** Que has a strong antitumor effect on acquired resistant NSCLC PC9 / GR cells, and the mechanism may be closely related to Stat3/Mcl-1 pathway mediated apoptosis.

Key words NSCLC; acquired drug resistance; quercetin; apoptosis