网络出版时间:2017 - 1 - 20 11:13 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.037.html

环孢素 A 对人胃癌 MGC80 - 3 细胞周期影响以及诱导其凋亡相关机制的研究

黄军祥[1],胡咏梅[2],石 海[3],张金坤[1],王敏红[4],杨云龙[4],莫丽亚[4],吴永华[4]

摘要 **目的** 探讨环孢素 A(CsA)对人胃癌 MGC80-3 细胞周期影响以及诱导其凋亡相关机制的研究。**方法** 采用流式细胞仪检测不同浓度 CsA 作用 MGC80-3 细胞后,细胞生长周期的变化以及细胞内活性氧(ROS)产生;吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)染色于荧光显微镜观察 CsA 处理后细胞凋亡形态学的改变;Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白的表达变化。**结果** 流式细胞仪检测结果显示 CsA 可浓度依耐性阻滞细胞周期在 G0/G1 期,与对照组比较差异有统计学意义($F=48.21$,$P<0.05$,$P<0.01$);能显著增加细胞内 ROS 含量($F=90.24$,$P<0.01$)。AO/EB 染色后细胞发生肿胀、缩小甚至碎裂等典型凋亡形态学改变。Western blot 分析结果表明 CsA 可激活细胞内 Caspase-3 蛋白的表达,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** CsA 可能通过阻滞细胞生长周期抑制 MGC80-3 细胞增殖,其诱导细胞凋亡的作用机制可能与细胞内 ROS 大量生成以及 Caspase-3 蛋白高水平的表达有关。

关键词 环孢素 A;MGC80-3 细胞;细胞周期;细胞凋亡;Caspase-3 蛋白

中图分类号 R 329.25;R 735.2;R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2017)02 - 0169 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2017.02.004

环孢素 A(CsA)作为第一代免疫抑制剂,联合其他多种化疗药物有协同抑制肿瘤细胞增殖和诱导其凋亡的作用[1-2]。在包括人胃癌细胞系和结肠癌细胞系中,有文献[3]类似报道单独应用 CsA 也同样有良好的抑制细胞增殖和诱导凋亡作用,本课题组前期实验研究[4-5]表明 CsA 可显著抑制人低分化黏液胃腺癌 MGC80-3 细胞增殖和诱导细胞凋亡,并呈现时间与浓度的依赖性。在人胃癌 BGC823 细胞系中,肿瘤细胞增殖明显被抑制与细胞生长周期 G1 期被阻滞以及诱导细胞凋亡作用存在很大的关联,BGC823 细胞发生凋亡内在途径的参与机制可能与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase-9)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)的激活有关[6]。该实验在前期研究的基础上通过检测 CsA 处理后 MGC80-3 细胞周期、细胞形态学的变化,检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量以及 Caspase-3 蛋白表达,进一步探讨 CsA 在诱导 MGC80-3 细胞凋亡作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌 MGC80-3 细胞株(中国科学院上海细胞所);CsA 标准品(中国药品生物制品检定所,批号 130495-200202,纯度为 98.8%,溶解于新鲜配制的 RMPI-1640 培养基中);0.22 μm 微孔滤膜(美国 Pall 公司),滤过除菌后现配现用;RMPI-1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);碘化丙啶(propidium iodide,PI)、AO/EB 试剂盒(美国 Sigma 公司);ROS 试剂盒(DCFH-DA)(上海碧云天生物技术研究所);Caspase-3 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);GAPDH 内参(上海康城生物制品有限公司);ECL 试剂盒(美国 Pierce 公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司);荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);CO_2 恒温培养箱(日本三洋公司);超净工作台(苏州净化设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞 MGC80-3 生长于含 10% 胎牛血清和 12 U/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液中,在 37 ℃、5% CO_2 条件下恒温、恒湿培养箱内传代培养,实验均采用对数期增殖细胞。

1.2.2 细胞周期测定 0.25% 胰酶消化收集 MGC80-3 细胞并调整细胞悬液浓度为 1×10^5/ml,分别接种于 6 孔板,每孔 2 ml。培养箱贴壁 24 h,吸

2016 - 09 - 18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金青年基金(编号:11040606Q24)

作者单位:苏州市立医院本部[1] 消化内科、[4] 老年医学科,苏州 215002

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;

张金坤,男,主任医师,责任作者,E-mail:zjk530@sina.com;

吴永华,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:wuyonghua1961@sina.com

出培养液，加入 CsA 药液，使最终浓度为 5、10、20 μmol/L，并设对照组。继续培养 24 h。胰酶消化再次收集细胞置于离心管中，2 000 r/min 低速离心 5 min，冰 PBS 重悬细胞，加 PI 染液（含 10 mg PI、10 mg RnaseA、300 μl TritonX-100、1 g 柠檬酸钠，500 mg NaCl 和 1 L 去离子水），室温下避光染色 30 min，400 目筛网过滤，流式细胞仪检测细胞 DNA 含量，采用 ModFit 软件分析细胞周期，实验重复 3 次（激发波长 488 nm，发射波长 525 min）。

1.2.3　ROS 测定　常规消化收集对数生长期 MGC80-3 细胞后接种于 6 孔板中，贴壁过夜。分别加药处理 48 h，并设对照组，实验组浓度为 10、20、30 μmol/L。处理后小心吸去细胞培养液，再用胰酶消化细胞，收集细胞，调整细胞密度约为 1×10^6/ml，后加入 DCFH-DA 荧光探针，吹打混匀后 37 ℃ 恒温水浴中孵育 20 min，每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀 1 次，使荧光探针和细胞充分接触，避免光照。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次，充分去除未进入细胞的 DCFH-DA，2 000 r/min 低速离心 5 min 后收集细胞，加入预冷的工作液轻轻混匀细胞，放入冰槽保存，并在 485 nm 激发光和 525 nm 发射光下于流式细胞仪检测。

1.2.4　AO/EB 染色　接种对数生长期 MGC80-3 细胞入 6 孔板中，并先加完全培养基 1.0 ml 于 6 孔板中，细胞密度约为 5×10^5/ml，培养过夜，设对照组，实验组加入 5、10、20 μmol/L CsA 处理 MGC80-3 细胞 48 h，消化液收集细胞，PBS 洗涤后加 AO/EB 染液，荧光显微镜（510 nm 激发波长）下观察细胞形态变化，并拍照。实验重复 3 次。

1.2.5　Western blot 法检测　设对照组，实验组浓度分别为 5、10、20 μmol/L，并按上述浓度 CsA 分别处理 MGC80-3 细胞 48 h 后细胞裂解液提取细胞总蛋白，每孔取 20 μl 的蛋白上样，在 SDS-PAGE 电泳分离，并将目标蛋白转移至硝酸纤维素膜上，分别孵化一抗、二抗，洗膜，置膜于暗室中 ECL 进行显影，扫描仪采集图像，Image J 软件分析条带灰度值，计算目标蛋白与内参蛋白的比值。

1.3　统计学处理　采用 SPSS 17.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验组与对照组之间比较采用 t 检验或单因素方差分析（ANOVA）。

2　结果

2.1　CsA 对 MGC80-3 细胞周期影响　MGC80-3 细胞经 CsA 处理后 24 h 后，实验组 G0/G1 期细胞随着药物浓度的增加呈现明显递加趋势，10、20 μmol/L CsA 实验组细胞 DNA 平均含量为 62.2% 和 69.51%，与对照组（50.1%）相比差异有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$），S 期细胞比例逐渐下降，实验组与对照组相比差异无统计学意义，而 G2/M 期细胞无显著变化。见图 1。表明 CsA 可通过阻滞

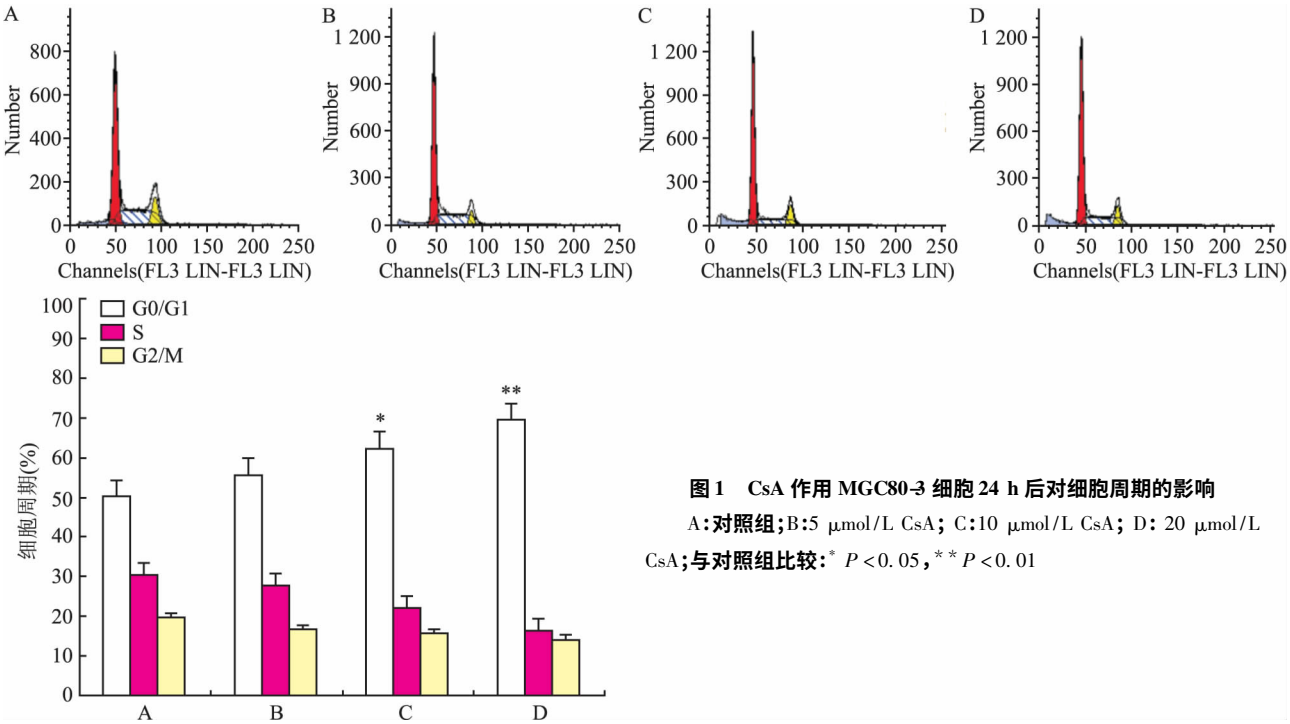

图 1　CsA 作用 MGC80-3 细胞 24 h 后对细胞周期的影响

A：对照组；B：5 μmol/L CsA；C：10 μmol/L CsA；D：20 μmol/L CsA；与对照组比较：* $P < 0.05$，** $P < 0.01$

MGC80-3 细胞 G0/G1 期进入 S 期，抑制细胞增殖。

2.2 MGC80-3 细胞内 ROS 的测定 流式细胞仪检测结果显示 10 μmol/L CsA 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后，与对照组比较细胞内 ROS 水平增加不明显，而 20、30 μmol/L CsA 作用后细胞内 ROS 含量则明显增加，与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。见图 2。实验结果表明随着 CsA 浓度增加，ROS 的产生呈递增趋势。

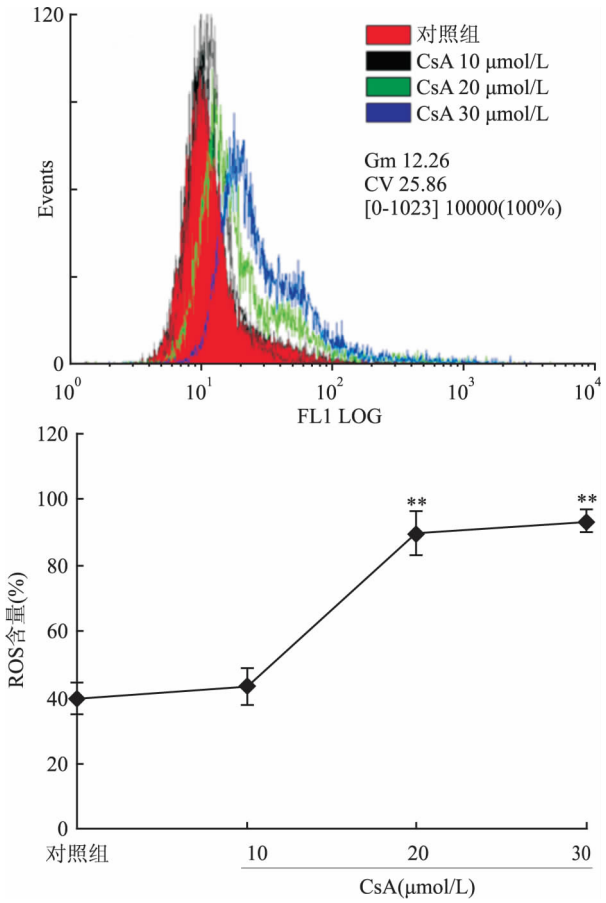

图 2 CsA 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后细胞内 ROS 的变化

与对照组比较：** $P<0.01$

2.3 AO/EB 观察细胞形态变化 CsA 处理细胞后 48 h，荧光显微镜下显示对照组染色成均匀的绿色；实验组凋亡细胞核染色质部分呈现固缩变圆，细胞发生肿胀、缩小甚至碎裂等形态改变，并发出强烈的橘红色或者橘黄色荧光；随着药液浓度的增加，细胞密度逐渐减少，橘红色或者橘黄色荧光明显增强。见图 3。

2.4 Caspase-3 蛋白表达 Western blot 结果显示经 CsA 处理 MGC80-3 细胞 48 h 后，随着药物作用浓度的增加，细胞内 Caspase-3 蛋白的含量明显增加，其中 10、20 μmol/L CsA 实验组细胞内蛋白表达水平与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.01$），5 μmol/L CsA 实验组 Caspase-3 蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义。见图 4。

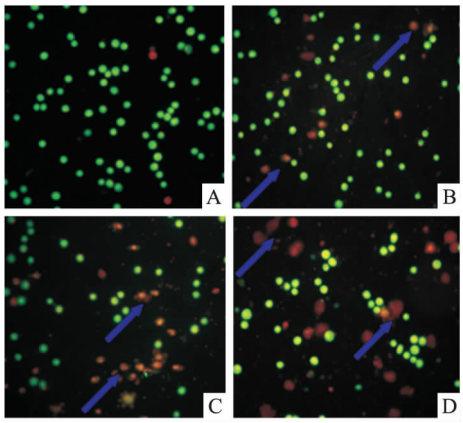

图 3 AO/EB 荧光染色观察 CsA 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后细胞形态的变化 ×200

A：对照组；B：5 μmol/L CsA；C：10 μmol/L CsA；D：20 μmol/L CsA

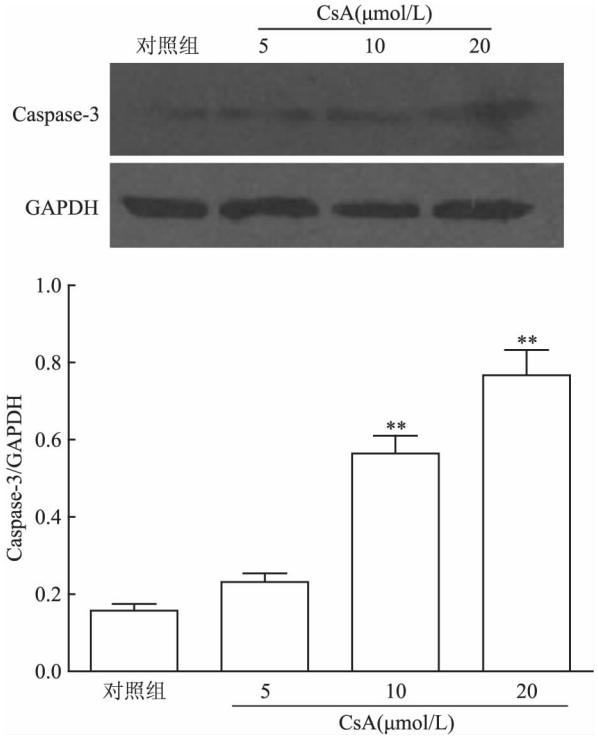

图 4 CsA 对 MGC80-3 细胞内 Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组比较：** $P<0.01$

3 讨论

胃癌是全球癌症导致人体死亡的主要原因之一，几乎所有的胃癌患者最初化疗时对顺铂皆可产生耐药性，多药耐药性（MDR）的产生是胃癌化疗治疗失败的一个重要方面[7]。其中，P 糖蛋白（P-gly-

coprotein,P-gp)的过表达是肿瘤细胞产生 MDR 的主要因素。特别是对于不能手术治疗的晚期胃癌患者,如何克服 MDR,下调细胞内 P-gp 表达,增强化疗药物抗肿瘤功效,显得尤为重要。CsA 有明显抑制 MGC80-3 细胞增殖和诱导凋亡作用,并逆转 P-gp 的表达,其诱导细胞作用与抑制 P-gp 的表达有相关性[4]。同时,CsA 通过逆转胃癌肿瘤细胞内 P-gp 的表达,协同发挥增强化疗药物(多柔比星等)抗肿瘤功效,值得临床予以推广[8]。因此,通过诱导凋亡发挥抑制肿瘤细胞增殖作用,是临床上应用于肿瘤治疗的理想手段和未来发展的方向[9]。

当细胞的生长被阻滞在某个阶段,细胞就会对损伤的 DNA 进行修复,如果修复失败,则会发生凋亡,细胞的增殖必然受影响。本实验结果表明 CsA 作用细胞后,将细胞周期阻滞于 G0/G1 期,与对照组相比,G0/G1 期细胞 DNA 明显增加,且呈浓度依赖性,从而抑制肿瘤细胞增殖。同样,AO/EB 染色结果显示,随着 CsA 浓度增加,凋亡细胞逐渐增加,细胞数量逐渐减少,细胞发生了肿胀、缩小甚至碎裂等凋亡形态的改变。以上实验结果表明 CsA 能引起 MGC80-3 细胞内 DNA 损伤以及发生凋亡。

线粒体诱导细胞凋亡途径是细胞凋亡的重要途径之一,往往伴有大量的 ROS 释放。本实验研究结果显示 CsA 作用 MGC80-3 细胞 48 h 后,细胞内产生大量 ROS,且随着 CsA 作用浓度的增加,实验组细胞内 ROS 含量与对照组相比显著增加。初步推测在 CsA 诱导 MGC80-3 细胞系凋亡的相关机制中可能也与 ROS 介导的线粒体依赖性通路有关,有待进一步研究加以证实。

Caspase-3 广泛分布于不同细胞之中,是 Caspase 家族中介导细胞凋亡最主要的成员之一,激活的 Caspase-3 可使许多与肿瘤细胞周期以及 DNA 复制、转录、损伤修复等相关蛋白或激酶失活[10],从而诱导细胞凋亡。本研究通过 Western blot 法将 CsA 作用人胃癌 MGC80-3 细胞 48 h 后,明显激活 Caspase-3 蛋白的表达,与 CsA 作用浓度成正比。

综上所述,推测 CsA 抑制 MGC80-3 细胞增殖可能与阻滞细胞生长周期有关;CsA 诱导 MGC80-3 细胞凋亡的作用机制除了与抑制该细胞内 P-gp、NF-κB p65 过表达有关之外[4-5],还可能与细胞内 ROS 生成增加以及激活 Caspase-3 蛋白高表达关系密切。

参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] Muñoz M, Rosso M, González A, et al. The broad-spectrum antitumor action of cyclosporine A is due to its tachykinin receptor antagonist pharmacological profile [J]. Peptides, 2010,31(9):1643-8.

[4] 黄军祥,胡咏梅,石 海,等. 环孢素 A 诱导人胃癌 MGC80-3 细胞凋亡以及对 P 糖蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报,2012,28(11):1156-70.

[5] 黄军祥,胡咏梅,石 海,等. 环孢素 A 诱导人胃癌 MGC80-3 细胞凋亡以及对 NF-κB p65 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报,2013, 48(7):759-63.

[6] Zhao X, Yang W, Shi C, et al. The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-823 gastric carcinoma cells [J]. Tumour Biol,2011,32(2):335-46.

[7] Tang T,Song X,Liu Y F,et al. PEITC reverse multi-drug resistance of human gastric cancer SGC7901/DDP cell line [J]. Cell Biol Int,2014,38 (4):502-10.

[8] Qadir M, O'Loughlin K L, Fricke S M, et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator [J]. Clin Cancer Res,2005,11(6):2320-6.

[9] Mahalingam D, Oldenhuis C N, Szegezdi E, et al. Targeting TRAIL towards the clinic [J]. Curr Drug Targets,2011,12(14):2079-90.

[10] Kim H S, Lee J H, Park H S, et al. Schizandra chinensis extracts induce apoptosis in human gastric cancer cells *via* JNK/p38 MAPK activation and the ROS-mediated/mitochondria-dependent pathway [J]. Pharm Biol,2015,53(2):212-9.

Effects of cyclosporin A induced cell line arrest and related mechanism of apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells

Huang Junxiang[1], Hu Yongmei[2], Shi Hai[3], et al

([1]*Dept of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou* 215002; [2]*Dept of Research*, [3]*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects of cyclosporin A(CsA) induced cell arrest and related mechanism

网络出版时间:2017 - 1 - 20 11:13 **网络出版地址**:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.038.html

NGF 和 CgA 对 RWPE-1 细胞内钙离子浓度变化的影响及其在慢性前列腺炎中的作用

丁华洋[1],樊 松[1,2],张 力[1,2],郝宗耀[1,2],周 骏[1,2],张翼飞[1,2],梁朝朝[1,2]

摘要 **目的** 探讨神经生长因子(NGF)和嗜铬颗粒蛋白 A(CgA)处理后前列腺上皮细胞系 RWPE-1 细胞内钙离子浓度([Ca^{2+}]$_i$)的差异及 NGF 和 CgA 在慢性前列腺炎(CP)发病中的作用。**方法** 不同浓度的 NGF 和 CgA(50、200 ng/ml)刺激 RWPE-1 细胞,用激光共聚焦显微镜观察不同浓度的 NGF 和 CgA 刺激后细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 变化,加入 TRPV1 受体拮抗剂后继续观察细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 变化。然后,将正常细胞外液换成 D-PBS,再加入 NGF 和 CgA 观察细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 变化。**结果** 50 ng/ml NGF 和 CgA 刺激细胞后,细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 未见明显变化。200 ng/ml NGF 和 CgA 刺激细胞后,细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 明显增加,加入 TRPV1 受体拮抗剂后,细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 未见明显变化。将正常细胞外液换成 D-PBS,用 NGF 和 CgA 刺激后,细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 未见明显改变。**结论** CP 的发生可能是通过分泌和释放 NGF 和 CgA,引起前列腺上皮细胞膜 TRPV1 通道开放,促使细胞内钙离子浓度增加,导致前列腺上皮分泌功能下降所致。

2016 - 09 - 09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170698、81400757);安徽省自然科学基金(编号:1508085QH171);卫生部国家临床重点专科建设项目(2012)

作者单位:[1] 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022
[2] 安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230032

作者简介:丁华洋,男,硕士研究生;
梁朝朝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: liang_chaozhao@163.com

关键词 前列腺炎;神经生长因子;嗜铬颗粒蛋白 A;RWPE-1 细胞;钙离子

中图分类号 R 697.33

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2017)02 - 0173 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2017.02.005

慢性前列腺炎(chronic prostatitis, CP)是一种常见的泌尿系统疾病,多发生于青壮年男性,发病率约为 4.5% ~ 9.0%[1]。然而,CP 的发病机制至今尚不清楚,治愈率低、复发率高,严重影响患者的身心健康。研究[2-3]表明神经内分泌机制在 CP 的发生、发展中发挥重要作用以及神经内分泌细胞与 CP 的进展密切相关。神经生长因子(nerve growth factor,NGF)和嗜铬颗粒蛋白 A(chromogranin A,CgA)是神经内分泌细胞重要的标志蛋白,在炎症的发展中发挥重要作用[4-5]。研究[6]表明,瞬时受体电位通道亚型 1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)调控 NGF 所介导的相关级联反应。Zhu et al[7]研究认为 NGF 灵敏地调控 TRPV1 的活动,但是介导此效应的机制尚未可知。细胞内钙离子浓度([Ca^{2+}]$_i$)可能与 NGF 和 CgA 所介导的信号通路有关。因此,定量或者定性分析细胞内[Ca^{2+}]$_i$ 可能对于研究 NGF 和 CgA 与 CP 的神经内分泌机制之间的关系提供有价值的信息。该实验使用 Ca^{2+}

in human gastric adenocarcinoma MGC80-3 cells. ***Methods*** Cell cycle arrest and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation were detected by utilizing flow cytometry analysis after treatment with different concentrations of CsA on MGC80-3 cells. Morphological changes of apoptotic cells were observed under fluorescent microscope through acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining method. Western blot was performed to measure Caspase-3 protein expression. ***Results*** Flow cytometry indicated that CsA could arrest the cell cycle in G0/G1 phase ($F = 48.21$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) and significantly increased intracellular ROS content in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the difference was statistically significant ($F = 90.24$, $P < 0.01$). After being treated with CsA, AO/EB staining results showed that the cells of apoptosis were characterized by typical morphological changes such as swelling, shrinking and fragmentation. Western blot analysis also showed that CsA obviously increased the expression of Caspase-3 protein ($P < 0.01$). ***Conclusion*** CsA may inhibit proliferation of MGC80-3 cells by blocking cell growth cycle, and the mechanism of CsA induced apoptosis may be correlated with high levels of intracellular ROS generation and increasing expression of Caspase-3 protein.

Key words cyclosporin A; MGC80-3 cells; cell cycle; apoptosis; Caspase-3 protein