

盐霉素增强吉非替尼诱导人肺腺癌细胞株 PC9 凋亡作用

曾霞 祝爱珍 刘成成 陈小宇 谭广销 刘革修

摘要 目的:探讨盐霉素联合吉非替尼诱导人肺腺癌细胞株 PC9 凋亡作用。方法:MTT 法检测细胞增殖活性;流式细胞仪检测细胞凋亡及线粒体膜电位(MMP);比色法检测 Caspase-3、8 和 9 酶活性;Western blot 分析细胞色素 C、bcl-2、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平。结果:盐霉素与吉非替尼单用均出现不同程度的细胞增殖抑制作用和诱导细胞凋亡作用;而两者合用则能更显著地抑制细胞增殖,且细胞凋亡显著增加($P < 0.05$)。盐霉素单独作用,细胞 MMP 显著下降,细胞内活性氧和 Ca^{2+} 在短期显著升高,胞浆细胞色素 C、Caspase-3、8 和 9 酶活性均显著增加;吉非替尼单用则抑制 p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白表达,而对胞浆细胞色素 C、Caspase-3、8 和 9 酶活性影响较少。Western 印迹检测发现,联合用药组的 Bcl-2、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白表达量明显减少。结论:盐霉素与吉非替尼联用具有较好的协同作用,提高 PC9 细胞对吉非替尼的敏感性。

关键词 细胞凋亡; 盐霉素; 肺腺癌细胞; 吉非替尼

The promotion of salinomycin on the apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line PC9 induced by gefitinib
ZENG Jia*, ZHU Ai-zheng, LIU Cheng-cheng, CHEN Xiao-yu, TAN Guang-xiao, LIU Ge-xiu. * Department of Respiratory Medicine, the 411 Hospital of People's Liberation Army, Shanghai 200081, China.

Corresponding author: LIU Ge-xiu E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of salinomycin combined with gefitinib on the apoptosis of human non-small cell lung cancer cell line PC9. **Methods** The growth of PC9 cells was tested by MTT, cell apoptosis and mitochondria membrane potential (MMP) were measured by flow cytometry, the activities of caspase-3, 8, and 9 were detected by colorimetry, and the levels of cytochrome C, bcl-2, p-EGFR, p-Akt, and p-ERK were analyzed by Western blot. **Results** Salinomycin or gefitinib alone could inhibit the growth and induce the apoptosis of PC9 cells in a dose-dependent manner; when they were combined with each other, these effects were more obvious ($P < 0.05$). Salinomycin alone could significantly reduce the MMP and increase the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), cytoplasmic cytochrome C, and cytosolic Ca^{2+} , and the activities of caspase-3, 8, and 9. Gefitinib alone could inhibit the expressions of p-EGFR, p-Akt, and p-ERK protein, and less affect the level of cytochrome C and the activities of caspase-3, 8 and 9. Western blotting showed that the expressions of Bcl-2, p-EGFR, p-Akt, and p-ERK protein were significantly decreased in combined group. **Conclusion** There exist synergism between salinomycin and gefitinib, and salinomycin can increase the sensitivity of PC9 cells to gefitinib.

【Key words】 Apoptosis; Salinomycin; Gefitinib; Lung adenocarcinoma

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinases inhibitor, EGFR-TKI)是 EGFR 基因非突变或突变的晚期非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)患者重要药物^[1],但只有部分患者从中获

益,且多在用药 9 个月左右出现耐药复发现象^[2-4]。研究 EGFR-TKIs 继发耐药的机制以克服耐药已成为目前热点。最近研究发现盐霉素(salinomycin, sal)杀死小鼠乳腺癌细胞的效力比普通抗癌药物泰克索(Taxol)高 100 倍,可以杀死肿瘤干细胞、克服耐药^[5]。本实验探讨盐霉素联合吉非替尼(gefitinib, gef)诱导人肺腺癌细胞株 PC9 凋亡的协同作用,为肺腺癌治疗探索新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 人肺腺癌细胞株 PC9 由上海市同济大学肿瘤研究所提供。盐酸吉非替尼购自湖北老百姓药业有限公司,盐霉素、PI 染料购自 Sigma 公司,

doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2012.14.006

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30670902)

作者单位:200081 上海市,中国人民解放军 411 医院呼吸内科(曾霞);510632 广州市,暨南大学医学院血液病研究所(祝爱珍,刘成成,陈小宇,谭广销,刘革修)

通信作者:刘革修 E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

RPMI 1640 培养液、胎牛血清(Gibco 美国),细胞内 ROS、Caspase-3 酶活性、Caspase-8 酶活性、Caspase-9 酶活性以及 JC-1 MMP 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司),细胞色素 C 凋亡检测试剂盒(BioVision),Fluo-3AM(Biotium 美国),Epics XL 型流式细胞仪(Beckman Coulter)。

1.2 细胞培养 以含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液进行培养,2~3 d 传代。

1.3 细胞增殖活性检测 取对数生长期细胞以每孔 180 μ L(5×10^3 细胞)接种于 96 孔板,细胞贴壁后,分别加入盐霉素(0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 和 3.20 μ mol/L)、吉非替尼(0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 μ mol/L)以及吉非替尼(0.50 μ mol/L)联合盐霉素(0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 和 3.20 μ mol/L)进行干预。另设空白对照组、溶媒对照组。设 5 个复孔。72 h 后采用 MTT 法测定细胞生长抑制率,计算药物的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})值。实验重复 3 次。

1.4 联合作用效果计算 采用 Chou-Talalay 联用指数法判定两种药物的联合作用。按中效方程式计算出不同抑制率时两药的单用和联用浓度: $D = D_m [fa / (1 - fa)]^{1/m}$; 式中 D 为药物浓度, D_m 为中效浓度, fa 为细胞增殖抑制率, m 为斜率。联用指数(combination index, CI)公式: $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + a(D)_1(D)_2 / (D_x)_1(D_x)_2$; 其中 $(D_x)_1$ 和 $(D_x)_2$ 分别为 2 种药物单用时产生某一效应值 fa 时的浓度, $(D)_1$ 和 $(D)_2$ 则是 2 种药物联用时产生相同效应 fa 时各自所需要的浓度。当 2 种药物联用为非排斥性时, $a = 1$; 当 2 种药物联用为排斥性时, $a = 0$ 。求出 CI 值, 如果 $CI < 1$, 认为两药物联用为协同作用; $CI = 1$ 为相加作用; $CI > 1$ 为拮抗作用。

1.5 Annexin V-PI 双染测定细胞凋亡 取对数生长的 PC9 细胞, 每孔 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板内, 设 (0.2 μ mol/L) 盐霉素处理组、盐霉素 (0.2 μ mol/L) 与吉非替尼 (0.50 μ mol/L) 联合处理组、单纯吉非替尼 (0.50 μ mol/L) 组, 以及溶媒对照组, 作用 48 h 收集细胞、Annexin V-FITC 和 PI 双染色并流式检测。

1.6 检测 MMP、ROS 和溶质 Ca^{2+} 的释放 取对数生长期的 PC9 细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞接种至 12 孔板, 设有上述 4 组, 在 6、12、24 h 时收集细胞, 按试剂盒操作检测 MMP、细胞内 ROS、 Ca^{2+} 浓度。

1.7 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 酶活性检测 取对数生长期的 PC9 细胞, 以每孔 2×10^5 个

细胞的密度接种至 6 孔板, 设有上述 4 组, 分别处理 6、12、24 h, 按照试剂盒说明收集细胞, 检测 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性。

1.8 Western blot 印迹法检测 处理 48 h 时收集细胞、提取总蛋白; 细胞色素 C 测定是按试剂盒说明进行。取总蛋白 50 μ g 行 10% SDS-PAGE 电泳分离、转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液 (20 mmol/L Tris pH7.6, 0.1% Tween 20) 封闭。鼠抗人细胞色素 C、Bcl-2 抗体 (Santa Cruz)、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 抗体 (Cell Signaling) 或 GAPDH (Chemicon) 4℃ 孵育过夜, HRP 标记的山羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 显色液显色。用 Image ProPlus 分析软件进行灰度值分析。

1.9 统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS15.0 统计软件处理, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盐霉素与吉非替尼对 PC9 细胞增殖的抑制作用 盐霉素与吉非替尼分别单独作用于 PC9 细胞, 均显示增殖抑制作用, 且在一定浓度范围内呈浓度依赖性 (表 1), 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。盐霉素的 IC_{50} 值为 (0.37 ± 0.06) μ mol/L, 而吉非替尼的 IC_{50} 值为 (1.27 ± 0.13) μ mol/L。根据合用指数计算公式计算出它们合用在不同效应 (0.90、0.80、0.75、0.70、0.65、0.60、0.50、0.40) 时的合用指数 (CI) 分别为 0.439、0.442、0.591、0.683、0.754、0.856、0.943、0.930。结果显示当 fa 为 0.90、0.80、0.75、0.65、0.60、0.50、0.40 时两药作用为协同。

2.2 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞凋亡的影响 盐霉素 (0.2 μ mol/L) 或吉非替尼 (0.50 μ mol/L) 分别单独作用 PC9 细胞 72 h 后, 细胞凋亡率分别为 $(13.73 \pm 2.34)\%$ 和 $(8.45 \pm 2.32)\%$, 显著高于溶媒对照组 $(4.99 \pm 2.30)\%$ ($P < 0.05$); 而盐霉素 (0.2 μ mol/L) 和吉非替尼 (0.50 μ mol/L) 联合作用 PC9 细胞的凋亡率为 $(27.98 \pm 3.81)\%$, 高于单独用药组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见, 联合应用盐霉素可增强吉非替尼诱导 PC9 细胞凋亡。

2.3 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞 MMP、ROS 和细胞内 Ca^{2+} 的影响 0.2 μ mol/L 盐霉素作用 PC9 细胞, MMP 在 6 h 时已显著下降, 24 h 时降至最低, 为对照组的 $(29.6 \pm 3.5)\%$; ROS 在 6 h 时显著升高, 24 h 时仍然高于对照组水平; 细胞内 Ca^{2+} 在 6 h 时显著升高, 为对照组的 $(154.9 \pm 5.6)\%$, 24 h 时降至对照组水平。0.5 μ mol/L 吉非替尼单

表 1 不同浓度盐霉素与吉非替尼单用或合用对 PC9 细胞的生长抑制率 ($n=5$) $\bar{x} \pm s, \%$

药物 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制率
盐霉素	
0.05	7.74 ± 0.65
0.10	12.43 ± 1.62
0.20	38.18 ± 2.56
0.40	59.71 ± 3.49
0.80	72.96 ± 4.60
1.60	74.84 ± 4.61
3.20	77.62 ± 4.62
吉非替尼	
0.25	5.47 ± 1.69
0.50	19.86 ± 2.85
1.00	43.75 ± 3.40
2.00	61.78 ± 4.76
4.00	77.79 ± 4.91
8.00	83.94 ± 5.10
16.00	89.23 ± 5.13
盐霉素 + 吉非替尼	
0.50 + 0.05	$34.96 \pm 3.21^*$
0.50 + 0.10	$48.52 \pm 4.07^*$
0.50 + 0.20	$59.08 \pm 4.16^*$
0.50 + 0.40	$80.41 \pm 4.63^*$
0.50 + 0.80	$87.93 \pm 4.71^*$
0.50 + 1.60	$93.59 \pm 4.79^*$
0.50 + 3.20	$94.50 \pm 4.77^*$

注:与盐霉素相应浓度组比较, $*P < 0.05$

独作用对 PC9 细胞 MMP、ROS 和细胞内 Ca^{2+} 没有影响。两者合用则更显著改变 MMP、ROS 和细胞内 Ca^{2+} 的变化,见表 2。

2.4 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 酶的活性 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 盐霉素处理 PC9 细胞后,随着时间的增加, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 酶的活性增加,呈时间-效应关系,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 参与了盐霉素的凋亡途径,见表 3。

2.5 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞 Bcl-2、细胞色素 C、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平影响 盐霉素 ($0.2 \mu\text{mol/L}$) 单独作用 PC9 细胞, Bcl-2 表达下调,胞浆细胞色素 C 显著增加, p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平显著下降;吉非替尼 ($0.50 \mu\text{mol/L}$) 单独作用,不仅 Bcl-2 表达下调,而且 p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平下降更明显,胞浆细胞色素 C 增加量少;盐霉素与吉非替尼联合作用,则 Bcl-2、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平进一步下降,而且胞浆细胞色素 C 上升更高,见图 1。

3 讨论

本研究结果显示,盐霉素与吉非替尼联用具有协同作用,盐霉素可提高 PC9 细胞对吉非替尼

表 2 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞 MMP、ROS 和细胞内 Ca^{2+} 的影响 ($n=5$) $\bar{x} \pm s, \%$

组别	MMP vs 对照组			ROS vs 对照组			Ca^{2+} vs 对照组		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
盐霉素	80.9 ± 6.2	55.7 ± 4.3	29.6 ± 3.5	147.2 ± 5.8	133.7 ± 5.7	124.6 ± 5.6	154.9 ± 5.6	98.7 ± 5.7	101.6 ± 5.7
盐霉素 + 吉非替尼	$76.4 \pm 6.1^{*\Delta}$	$44.6 \pm 4.1^{*\Delta}$	$18.9 \pm 3.4^{*\Delta}$	$154.9 \pm 5.9^{*\Delta}$	$126.8 \pm 5.5^{*\Delta}$	$113.4 \pm 5.4^{*\Delta}$	$154.9 \pm 5.6^{\Delta}$	$98.7 \pm 5.7^{\Delta}$	$101.6 \pm 5.7^{\Delta}$
吉非替尼	100.9 ± 5.7	98.7 ± 5.7	101.6 ± 5.7	99.8 ± 5.2	99.6 ± 5.2	101.1 ± 5.2	100.9 ± 5.7	98.7 ± 5.7	101.6 ± 5.7

注:与盐霉素组比较, $*P < 0.01$,与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.01$ **表 3** 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞 Caspase-3、Caspase-8 或 Caspase-9 酶活性的影响 ($n=5$) $\bar{x} \pm s, \%$

组别	Caspase-3 vs 对照组			Caspase-8 vs 对照组			Caspase-9 vs 对照组		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
盐霉素	112.4 ± 5.1	129.6 ± 5.2	135.7 ± 5.3	154.1 ± 5.9	162.5 ± 5.9	159.6 ± 5.9	136.2 ± 5.3	147.0 ± 5.3	153.8 ± 5.3
盐霉素 + 吉非替尼	$126.7 \pm 5.3^{*\Delta}$	$156.5 \pm 5.3^{*\Delta}$	$164.9 \pm 5.3^{*\Delta}$	$165.2 \pm 5.9^{*\Delta}$	$186.3 \pm 5.9^{*\Delta}$	$173.4 \pm 5.9^{*\Delta}$	$157.2 \pm 5.3^{*\Delta}$	$164.3 \pm 5.3^{*\Delta}$	$178.1 \pm 5.3^{*\Delta}$
吉非替尼	104.8 ± 5.1	116.7 ± 5.1	120.5 ± 5.1	107.4 ± 5.7	120.5 ± 5.8	113.4 ± 5.7	106.7 ± 5.2	116.5 ± 5.3	122.8 ± 5.3

注:与盐霉素组比较, $*P < 0.01$,与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.01$

的敏感性。这与它们各自药理特性有关。盐霉素属于聚醚类一元羧酸,是典型的离子载体抗生素,对细胞中的阳离子,尤其 K^+ 、 Na^+ 、 Rb^+ 的亲合力特别强,增强了它们的细胞脂质屏障浸透性,妨碍细胞内外阳离子的传递,使细胞内外离子浓度发生变化,从而影响细胞内生命活动,可以诱导氧化应激

和线粒体凋亡途径、诱导癌细胞凋亡^[6-7]。本研究结果与文献报道具有一致性,盐霉素能增加细胞内 ROS、降低 MMP、促进线粒体细胞色素 C 释放、使 Caspase-3 和 Caspase-8 以及 Caspase-9 酶激活,诱导细胞凋亡。吉非替尼属于小分子的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂,抑制 EGFR 酪氨酸激酶磷酸化,阻

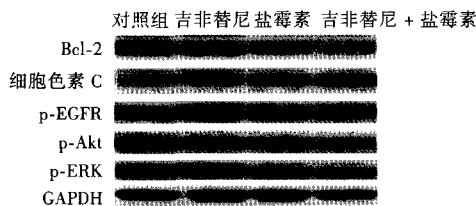


图1 盐霉素与吉非替尼单用及合用对 PC9 细胞中 Bel-2、细胞色素 C、p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白水平的影响

断其信号传导,从而抑制细胞周期进程,诱导细胞凋亡^[4]。EGFR 属于 I 型生长因子家族,具有酪氨酸激酶活性,可通过下游多种信号通路调节细胞活性,如有促分裂原活化蛋白激酶/ERK、PI3K/Akt 及 Janus 激酶/信号转导与转录激活子信号通路等。许多研究证实 EGFR 信号通路参与了肿瘤细胞浸润、血管生成、细胞增殖和凋亡抵抗等。本研究结果证实,吉非替尼抑制 p-EGFR、p-Akt 和 p-ERK 蛋白表达以及抑制细胞增殖、诱导凋亡作用,但对胞浆细胞色素 C、Caspase-3、8 和 9 酶活性影响较少。所以,盐霉素与吉非替尼合用具有协同作用。该结果为改善肺腺癌临床治疗方法提供新的依据。但如何应用盐霉素于肺腺癌临床治疗

还有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] Goldstraw P, Ball D, Jett J R, et al. Non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet*, 2011, 378(9804):1727-1740.
- [2] Stella G M, Luisetti M, Inghilleri S, et al. Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer: lessons, experiences, strategies [J]. *Respir Med*, 2012, 106(2):173-183.
- [3] 黄雪琴,张为民,谢波,等. Gefitinib 治疗晚期耐药非小细胞肺癌的疗效及不良反应 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(14):2639-2641.
- [4] 罗琼. 沙利度胺联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(06):1080-1082.
- [5] Zhi Q M, Chen X H, Ji J, et al. Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2011, 65(7):509-515.
- [6] Ketola K, Hilvo M, Hyötyläinen T, et al. Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(1):99-106.
- [7] Kim K Y, Yu S N, Lee S Y, et al. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(1):80-86.

(收稿:2012-05-13 编辑:吴淑金)

石英对人胚肺成纤维细胞 TrxR/Trx 表达的影响

郭伟 田琳 曹建彪 朱钟慧 吴惠慧 高艾 牛丕业

摘要 目的:观察石英粉尘诱导的 RAW264.7 上清液对 HELF TrxR 和 Trx 表达的影响。方法:MTT 法测定 HELF 的增殖能力,TBA 显色法测定 MDA,DCFH-DA 探针检测 ROS,Real time-qPCR 法和 Western Blot 法分别测定 TrxR 和 Trx 的 mRNA 和蛋白表达。结果:石英粉尘刺激的 RAW264.7 上清液可以促进 HELF 增殖,引起 HELF 内 MDA 和 ROS 的含量升高($P < 0.05$);HELF 的 Trx mRNA 表达量随着石英浓度的升高呈现下降趋势;低剂量组 TrxR mRNA 表达量无明显改变,高剂量组的 TrxR mRNA 和蛋白表达则均明显下降($P < 0.05$)。结论:石英粉尘可能通过下调 Trx 系统表达 Trx 和 TrxR mRNA,导致 HELF 内氧化产物 ROS 和 MDA 堆积,从而加重 HELF 的氧化损伤。

关键词 氧化损伤; 石英; 硫氧还蛋白还原酶; 硫氧还蛋白

硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)、硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)共同组成硫氧还

蛋白系统(Trx 系统)。该系统是调节活性氧(ROS)水平的主要酶系统,其作为机体重要的抗氧化防御系统,近年来越来越受到广泛重视^[1]。然而,Trx 系统在石英致肺纤维化中的研究尚未见报道。本研究采用离体实验观察石英粉尘诱导小鼠巨噬细胞(RAW264.7)的上清液对人胚肺成纤维细胞(HELF)TrxR 和 Trx 表达的影响,为探讨石英所致氧化损伤的机制开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 制备石英诱导的小鼠巨噬细胞上清液 体外培养 RAW264.7,用终浓度分别为 0、25、50、100、

doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2012.14.007

基金项目:北京市自然科学基金项目(编号:7112015);高等学校博士学科点专项科研基金项目(编号:20111107110016)

作者单位:100069 北京市,首都医科大学公共卫生与家庭医学学院劳动卫生与环境卫生学系(郭伟,田琳,朱钟慧,吴惠慧,高艾,牛丕业);100013 北京市疾病预防控制中心职业卫生所(曹建彪)

通信作者:田琳 E-mail:tianlin@ccmu.edu.cn