

亚麻木酚素对肺癌 A549 细胞的抑制作用及其机制

李先伟, 唐丽娟, 杨解人*

皖南医学院 药理学教研室, 安徽 芜湖 241001

摘要: **目的** 观察亚麻木酚素 (SDG) 对肺癌 A549 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响及机制。**方法** 在体外培养的肺癌 A549 细胞株中加入不同浓度的 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$), MTT 观察细胞增殖情况; Transwell 小室评价细胞侵袭能力; Hoechst 染色观察细胞凋亡情况; 比色法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 活性; Real Time PCR、Western Blotting 检测基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) mRNA 和蛋白表达。**结果** SDG 呈时间-浓度依赖性抑制 A549 细胞的增殖 ($P<0.05$)。细胞侵袭能力明显下降、凋亡比率和 Caspase-3 活性明显升高、MMP-2 mRNA 和蛋白的表达显著下降 ($P<0.05$)。**结论** SDG 呈时间和剂量依赖性抑制 A549 细胞的增殖和侵袭, 其机制可能与其促凋亡、抑制 MMP-2 的表达有关。

关键词: 亚麻木酚素; 肺癌 A549 细胞; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 基质金属蛋白酶-2; 侵袭能力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0550-05

Inhibition of secoisolariciresinol diglucoside on lung cancer cell line A549 and its mechanism

LI Xian-wei, TANG Li-juan, YANG Jie-ren

Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

Key words: secoisolariciresinol diglucoside (SDG); lung cancer cell line A549; Caspase-3; MMP-2; invasion ability

亚麻是中国重要的油料作物之一, 亚麻籽除含有丰富的油脂和蛋白质之外, 还含有丰富的亚麻木酚素 (secoisolariciresinol diglucoside, SDG)。SDG 的结构与体内雌二醇结构类似, 因而影响一些激素相关性疾病, 如 SDG 可通过抗雌激素作用发挥抑制乳腺癌、前列腺癌的效应^[1]。其抗肿瘤作用的机制可能包括诱导癌细胞分化、抑制血管新生、抗氧化作用、抑制酪氨酸激酶和 DNA 拓扑异构酶活性等^[2-3]。最新研究表明雌激素受体阻断剂他莫昔芬可以抑制非小细胞肺癌 (NSCLC) 的生长^[4], 而 SDG 也具有他莫昔芬样的抗雌激素作用, 因此, 推测 SDG 对 NSCLC 可能也具有一定的防治作用。本实验采用肺癌 A549 肿瘤细胞株为研究对象, 观察 SDG 对 A549 的抑制作用, 进一步探讨 SDG 抗肿瘤作用机制, 为开发新型的抗肿瘤中药提供理论依据。

1 材料

SDG (质量分数 73.6%, 芜湖天一绿宝科技有限公司), 肺癌细胞株 A549 (广州市十环医药科技

有限公司), DMEM 培养基 (北京索莱宝), 胎牛血清 (杭州四季青公司), MTT (Amresco), Transwell 小室 (Costar), 基质胶 (Becton Dickinson), Hoechst 染色、Caspase-3 和 BCA 蛋白定量试剂盒 (杭州碧云天生物技术有限公司), PrimeScript™ RT reagent Kit、Power SYBR Green PCR Master Mix 检测试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司], MMP-2 抗体 (ab37150, Abcam)、HRP 抗兔 (Santa Cruz)、BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (杭州碧云天生物技术有限公司), ELx-880 型酶标仪 (BIO-TEK), TE2000-E 倒置荧光显微镜 (Nikon), 荧光定量实时 PCR 仪 (Applied Biosystem)。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中传代培养。待细胞生长至 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:2 传代。

收稿日期: 2010-05-20

作者简介: 李先伟 (1979—), 男, 安徽芜湖人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为心血管药理与分子药理。

Tel: 13548986682 13866384544 E-mail: wnmclixianwei69@163.com

*通讯作者 杨解人 E-mail: wnmcyao@sina.com

2.2 MTT 试验

取对数生长期细胞,用 10% FBS 的 DMEM 培养液调整细胞数为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$,加入 96 孔培养板,每孔 0.2 mL,待细胞贴壁 70%~80%时,弃去培养液,分别加入含不同浓度 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液 0.2 mL,另设阴性对照孔和溶媒对照孔 (DMSO),每组设 8 个复孔。培养 24、36、48 h,每孔加入 MTT 10 μL ,继续培养 4 h,弃去培养液,加入 DMSO 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$,置摇床上低速振荡 10~15 min,在 492 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算抑制率。

抑制率 = $1 - \text{实验孔 } A \text{ 值} / \text{阴性对照孔 } A \text{ 值}$

2.3 Transwell 肿瘤细胞侵袭试验

细胞侵袭试验在 Transwell 小室中(聚碳酸酯膜孔径为 8 μm)进行。在小室滤膜的上表面铺以 10 μg 基质胶,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 4~5 h,当出现白色层时,说明胶已凝固。取指数生长期的细胞,用 10%FBS 的 DMEM 培养液配成细胞密度为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$ 悬液,加入 24 孔培养板,每孔 1 mL,分别加入不同浓度的 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),另设阴性对照孔,每组设 4 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。消化细胞,1%FBS 的 DMEM 培养液配成细胞悬液($3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$)。DMEM 培养液洗 Transwell 小室 1 次,上室加入 200 μL 细胞悬液;下室中加入 600 μL 含 20%FBS 的 DMEM 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 20 h。取出 Transwell 小室用 PBS 洗 2 次,5%多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h。加入 0.1%结晶紫 500 μL ,室温染色 30 min,PBS 洗 2 次,用棉球擦去上表面细胞,显微镜下观察滤膜下表面的细胞(200 $\times$)。随机选取 5 个视野计数细胞个数,统计分析。以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

2.4 Hoechst 染色

取对数生长期细胞,用 10%FBS 的 DMEM 培养液调整细胞数为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$,加入 12 孔培养板,每孔 1 mL,待细胞贴壁 70%~80%时,弃去培养液,分别加入含不同浓度 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液 1 mL,另设阴性对照孔。培养 48 h 后,吸尽培养液,加入 0.5 mL 固定液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。去固定液,PBS 洗两遍,每次 3 min。加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液染色 5 min。去染色液,用 PBS 洗两遍,每次 3 min。荧光倒置显微镜下任选 5 个视野观察计数并拍照。分别计数正常细胞数

(细胞膜完整,呈均匀的蓝色),凋亡细胞数(核染亮蓝色,呈均匀的致密斑块或分叶状),镜下计数细胞凋亡率。实验重复 3 次。

2.5 Caspase-3 活性检测

取指数生长期的 A549 细胞,用 10% FBS 的 DMEM 培养液配成细胞悬液 ($3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$),加入 12 孔培养板,每孔 1 mL,分别加入不同浓度的 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),另设阴性对照孔,每组设 2 个复孔。培养 48 h 后吸取细胞培养液,备用。用胰酶消化细胞,并收集至备用的细胞培养液中。 $1\,000 \times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞,小心吸除上清,每个 EP 管加入 100 μL 细胞裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、 $16\,000 \times g$ 离心 10 min。将上清转移到冰浴预冷的 EP 管中。按试剂盒步骤进行 Caspase-3 活性检测,酶标仪 405 nm 波长读取 A 值,根据标准曲线计算产物浓度。另取少量上清按 BCA 试剂盒方法测定蛋白浓度。实验重复 3 次。

2.6 RT-PCR 检测细胞 MMP-2 mRNA 表达水平

取指数生长期的 A549 细胞,用 10% FBS 的 DMEM 培养液配成细胞悬液 ($3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$),加入 6 孔培养板,每孔 2 mL,分别加入不同浓度的 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),另设阴性对照孔。培养 48 h 后用 Trizol 试剂提取总 RNA 后,按照逆转录试剂盒操作步骤进行 RT 反应。所得 cDNA 在实时荧光定量 PCR 仪 (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystem) 上进行反应。按照说明,使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒,以 1 μL cDNA 为模板, β -actin 为内参照,PCR 扩增基因片段。引物如下: β -actin 上游引物为 5-AGTGTGACGTGGACATCCGCA-3,下游引物为 5-ATCCACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3,扩增产物 243 bp;MMP-2 上游引物为 5-GGATCCGC AAGTGGTCCGTGTGAAGTAT-3,下游引物为 5-AGCTTGCTGTACCCTTGTCAGGGCAGAA-3,扩增产物 547 bp。PCR 反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 31 s,40 个循环,在延伸的过程中收集荧光信号。于每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照。将 PCR 产物做熔解曲线,以证实以上 PCR 反应产物特异性良好。用 7300 System SDS Software 相对定量分析数据,统计 $\Delta\Delta C_t$ 值以比较各组 mRNA 的相对表达水平。

2.7 Western blotting 检测 MMP-2 蛋白表达

取指数生长期的 A549 细胞, 用 10% FBS 的 DMEM 培养液配成细胞悬液 ($3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$), 加入 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 分别加入不同浓度的 SDG (5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$), 另设阴性对照孔。低温提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 50 μg 蛋白, 12%SDS-PAGE 分离样品, 转膜, 封闭, 将膜与溶于封闭液中的一抗 (1:800), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗膜, 将膜浸入以 1:2 000 稀释的二抗稀释液中, 室温孵育 1 h。加入 ECL 试剂, 曝光, 显影, 定影, 分析。

2.8 统计分析

表 1 SDG 对肺癌 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of SDG on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	$C/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制率/%		
		24 h	36 h	48 h
对照	—	2.34 ± 0.31	3.78 ± 0.48	5.93 ± 0.84
SDG	5	$15.47 \pm 3.96^{\Delta}$	$20.62 \pm 4.53^{\Delta*}$	$29.60 \pm 4.43^{\Delta* \Delta}$
	10	$20.43 \pm 5.03^{\Delta \#}$	$26.29 \pm 5.58^{\Delta* \#}$	$34.49 \pm 5.01^{\Delta* \Delta \#}$
	20	$28.16 \pm 4.46^{\Delta* \# \star}$	$35.94 \pm 6.33^{\Delta* \# \star}$	$44.36 \pm 6.15^{\Delta* \Delta \# \star}$
	40	$45.06 \pm 5.91^{\Delta* \# \star \star}$	$57.62 \pm 7.87^{\Delta* \# \star \star}$	$64.67 \pm 6.82^{\Delta* \Delta \# \star \star}$

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 24 h 比较: $* P < 0.05$; 与 36 h 比较: $\Delta P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: $\# P < 0.05$

与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: $\star P < 0.05$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: $\star \star P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$ vs control group; $* P < 0.05$ vs 24 h group; $\Delta P < 0.05$ vs 36 h group; $\# P < 0.05$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ group

$\star P < 0.05$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ group; $\star \star P < 0.05$ vs 20 $\mu\text{mol/L}$ group

3.2 SDG 对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响

基质胶能在聚碳酸滤膜表面形成类似天然基底膜的结构, 细胞侵袭穿过重建基质胶的能力反映该细胞的侵袭能力。用 SDG 处理 A549 细胞 48 h 后, 随着浓度增加, 细胞穿透基底膜的能力明显受到抑制, 侵袭至滤膜下表面的细胞数分别降低至对照组的 (79.6 $\pm$ 7.4) %、(62.2 $\pm$ 5.9) %、(50.2 $\pm$ 4.6) %、(39.8 $\pm$ 2.9) %, 表明 SDG 可明显降低肺癌 A549 细胞的侵袭能力, 见图 1。

3.3 SDG 诱导肺癌 A549 细胞凋亡的形态学变化

对照组细胞呈正常的生长状态, 可见细胞核为圆形, 染色均匀。凋亡细胞阳性染色定位于细胞核,

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析进行统计学处理, 组间差异采用 Student-Newman-Keuls 多重比较 t 检验。数据用 SPSS11.5 统计软件包统计处理。

3 结果

3.1 SDG 对肺癌 A549 细胞增殖的影响

SDG 呈明显的时间-浓度依赖性抑制肺癌细胞的增殖。随着 SDG 作用时间延长, SDG 对 A549 细胞的抑制作用逐渐加强, 24、36、48 h 之间相比差异均显著 ($P < 0.05$); 不同浓度 SDG 对 A549 细胞抑制率较对照组均明显提高 ($P < 0.05$), 40 $\mu\text{mol/L}$ SDG 作用 48 h 抑制率最高, 结果见表 1。

呈蓝紫色颗粒。与对照组比较, 用 SDG 处理细胞 48 h 后, 给药组细胞的结构形态发生明显的改变, 部分细胞呈典型的凋亡表现, 细胞变小、核固缩或边缘化或破碎, 出现凋亡小体。细胞凋亡率均明显升高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 SDG 可促进肺癌 A549 细胞的凋亡, 见图 2 和 3。

3.4 SDG 对肺癌 A549 细胞 Caspase-3 活性的影响

用 SDG 处理细胞 48 h 后, 随着 SDG 浓度的增加, Caspase-3 活性显著增高。药物处理组与对照组比较, Caspase-3 活性均明显升高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 SDG 可增强肺癌 A549 细胞的 Caspase-3 活性, 见图 4。

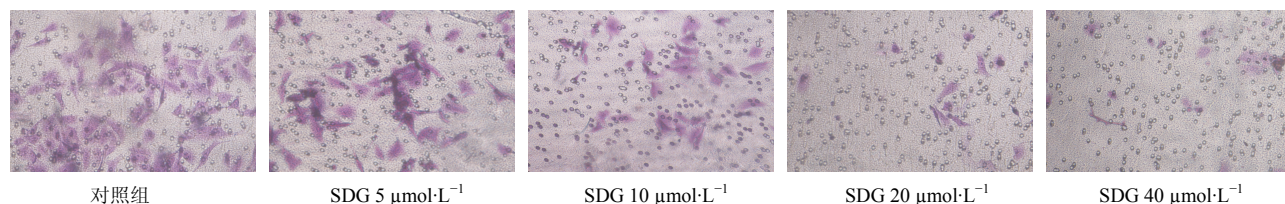


图 1 SDG 对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响

Fig. 1 Effect of SDG in different concentration on invasion ability of A549 cells

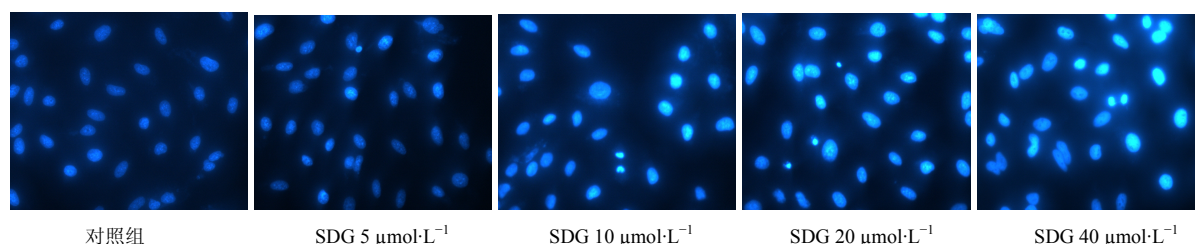
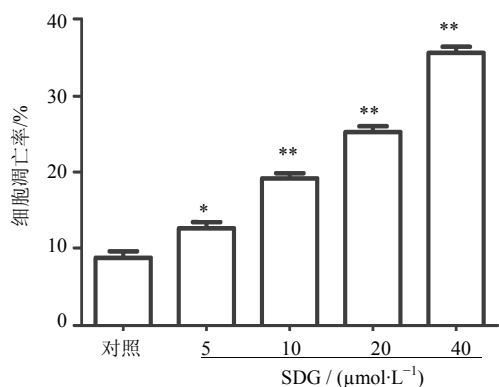


图 2 Hoechst 33258 荧光染色观察肺癌 A549 细胞凋亡的形态学变化

Fig. 2 Morphological change of A549 cell apoptosis observed by Hoechst 33258 staining



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 3 SDG 对肺癌 A549 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Effect of SDG in different concentration on apoptosis rate of A549 cells

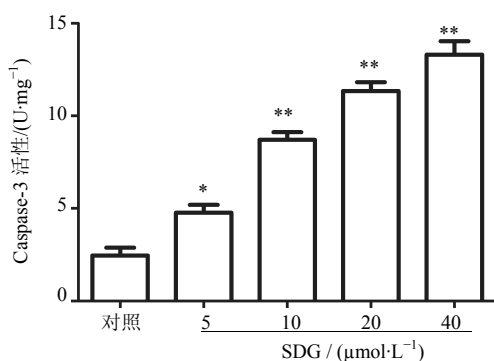


图 4 SDG 对肺癌 A549 细胞 Caspase-3 活性的影响

Fig. 4 Effect of SDG in different concentration on Caspase-3 activity of A549 cells

3.5 SDG 对肺癌 A549 细胞 MMP-2 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 用 SDG 处理细胞 48 h 后, 随着 SDG 浓度的增加, MMP-2 mRNA 的表达显著降低, 具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示 SDG 能降低肺癌 A549 细胞 MMP-2 mRNA 表达。目的

基因 MMP-2 和内参基因 β -actin 的 PCR 产物通过熔解曲线分析发现均只有一个峰, 说明在该反应条件下, 各基因的扩增具有特异性, 见图 5。

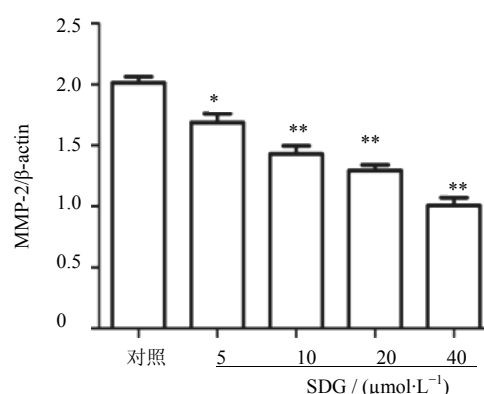


图 5 SDG 对肺癌 A549 细胞 MMP-2 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effect of SDG in different concentration on mRNA expression of MMP-2 of A549 cell

3.6 SDG 对肺癌 A549 细胞 MMP-2 蛋白表达的影响

用浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 SDG 处理 48 h 后, MMP-2 蛋白条带逐渐变细, 表明 SDG 呈剂量依赖性的抑制 MMP-2 蛋白的表达。图像灰度分析结果显示, 随着药物浓度的增加, MMP-2 蛋白的表达显著降低, 见图 6。

4 讨论

动物实验证明, 大鼠哺乳期摄入 10% 的亚麻籽或相当量的 SDG, 可促进子代正常乳腺的分化, 因而可潜在降低乳腺癌发生的风险^[5]。在 MCF-7 细胞 (ER+) 乳腺癌裸鼠移植模型的研究中也发现, 摄入 10% 亚麻籽可以抑制肿瘤的生长, 同时加强他莫西芬的抗肿瘤效应^[6]。但在雌激素受体阴性的乳腺癌移植瘤模型中研究发现, SDG 可抑制裸鼠 MDA-MB-231 细胞 (ER-) 乳腺移植瘤的生长^[7], 这是因为 SDG 除了具有抗雌激素样作用外, 还具有抗氧化、抑制血管生成等活性。

本研究通过 MTT 法发现, SDG 能明显抑制肺

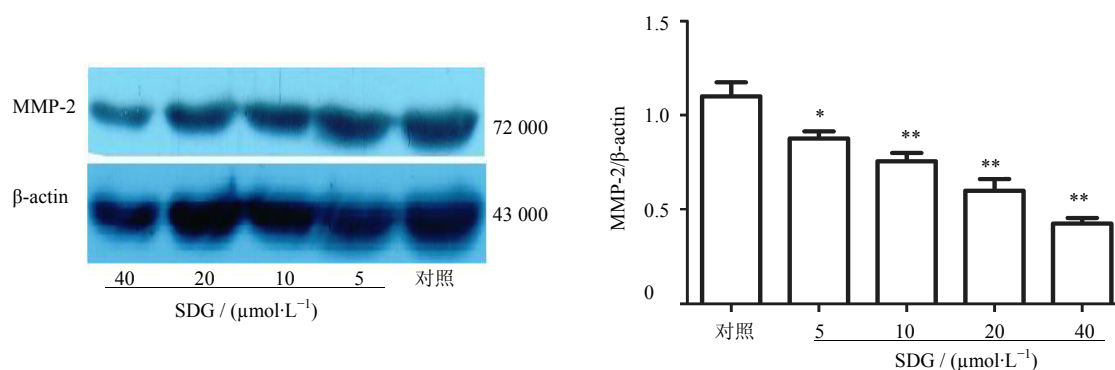


图6 SDG对肺癌A549细胞MMP-2蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of SDG in different concentration on protein expression of MMP-2 of A549 cells

癌 A549 细胞的生长, 并且呈时间-浓度依赖性。随着 SDG 作用时间延长, 其对 A549 细胞的抑制作用不断加强, 48 h 组抑制作用最强; 随着 SDG 浓度增加, 其对 A549 细胞抑制率亦明显增加。用 SDG 处理细胞 48 h 后, 给药组细胞的结构形态发生明显的改变, 部分细胞呈典型的凋亡表现: 细胞变小、核固缩或边缘化或破碎, 出现凋亡小体。酶标仪检测发现随着 SDG 浓度的增加, Caspase-3 活性显著增高。提示 SDG 能通过 Caspase 依赖性途径促进细胞凋亡, 抑制细胞的增殖, 但详细的机制有待于进一步研究。同时, SDG 可抑制 A549 细胞 MMP-2 mRNA 表达, 使 A549 细胞穿过基质胶滤膜的能力明显下降, 表明 SDG 可明显降低肺癌 A549 细胞的侵袭能力, 但详细的机制也有待于进一步研究。本实验研究证实 SDG 在体外对肺癌 A549 细胞有明显的抑制的作用, 其机制涉及诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞转移两个方面。

参考文献

- [1] Xie L H, Ahn E, Akao T, *et al.* Transformation of arctiin to estrogenic and antiestrogenic substances by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(4): 378-384.
- [2] Eklund P, Langvik O, Warna J, *et al.* Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans [J]. *Org Biomol Chem*, 2005(3): 3336-3347.
- [3] Magee P, Rowland I. Phytoestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer [J]. *Brit J Nutr*, 2004, 91(4): 513-531.
- [4] Shen H, Yuan Y, Sun J, *et al.* Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(2): 88-92.
- [5] Tan K, Chen J M, Ward W E, *et al.* Mammary gland morphogenesis is enhanced by exposure to flaxseed or its major lignan during suckling in rats [J]. *Exp Biol Med*, 2004, 229(2): 147-157.
- [6] Chen J M, Wang L D, Thompson L. Flaxseed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice [J]. *Cancer Lett*, 2006, 234(2): 168-175.
- [7] 王晓蕾, 张莲英, 胡晓燕, 等. 亚麻籽木酚素的提取及其对裸鼠乳腺移植瘤生长的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 3(28): 176-178.