

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.009

· 基础研究 ·

青蒿素诱导非小细胞肺癌细胞凋亡及其可能的机制

靳彩玲¹, 赵树鹏², 张清琴¹, 王颖¹, 寇小格¹, 路平¹(1. 新乡医学院第一附属医院 肿瘤科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院第一附属医院 神经外科, 河南 卫辉 453100)

[摘要] **目的:**研究青蒿素(*Artemisinin*)对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer cell, NSCLC)细胞(ASTC-a-1和A549细胞)凋亡的影响,并初步探讨其作用机制。**方法:**CCK-8法检测0~150 μg/ml的青蒿素处理24 h和100 μg/ml青蒿素处理0、6、12、24、48 h对ASTC-a-1和A549细胞活性的影响;激光共聚焦显微镜观察1 μmol/L STS、100 μg/ml青蒿素单独或联合5 mmol/L活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)清除剂NAC(N-乙酰半胱氨酸)处理细胞24 h对细胞核形态的影响,并用流式细胞术检测青蒿素单独或联合NAC对细胞凋亡的影响;通过RNA干扰技术沉默*Bax*和*Bak*基因后,观察青蒿素对细胞活性的影响。**结果:**青蒿素能够以浓度和时间依赖的方式抑制ASTC-a-1和A549细胞的活性,IC₅₀值约为100 μg/ml;经NAC预处理后,青蒿素导致的细胞活性下降程度明显低于未经预处理的细胞,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。STS、青蒿素单独或联合NAC均能引起ASTC-a-1和A549细胞核固缩及细胞凋亡。经NAC预处理后,青蒿素诱导的ASTC-a-1和A549细胞凋亡率分别为(20.4 ± 2.1)%和(17.9 ± 3.8)%,明显低于STS组[(48.2 ± 2.6)%, (39.8 ± 4.9)%]和细胞未经预处理组[(59.6 ± 3.4)%, (50.7 ± 3.8)%]青蒿素引起的凋亡率(均 $P < 0.01$)。青蒿素只能引起*Bak*沉默细胞活性的上升($P < 0.01$),而对*Bax*沉默细胞活性没有明显影响($P > 0.05$)。**结论:**青蒿素能诱导两种非小细胞肺癌细胞(ASTC-a-1和A549细胞)ROS介导的细胞凋亡,促凋亡因子*Bak*而不是*Bax*参与了凋亡过程。

[关键词] 青蒿素;非小细胞肺癌;细胞凋亡;ROS;RNA基因干扰技术

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0729-05

The apoptosis of non-small cell lung cancer cells induced by *Artemisinin* and its possible mechanism

Jin Cailing¹, Zhao Shupeng², Zhang Qingqin¹, Wang Ying¹, Kou Xiaoge¹, Lu Ping¹(1. Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Artemisinin* on apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) ASTC-a-1 and A549 cells and its mechanism. **Methods:** CCK-8 assay was performed to assess the effect of treatment with *Artemisinin* at 0–150 μg/ml for 24 h and at 100 μg/ml for 0, 6, 12, 24, 48 h on the activity of ASTC-a-1 and A549 cells. Laser scanning confocal microscope was used to observed influence of treatment with STS at 1 μg/ml, *Artemisinin* at 100 μg/ml alone or combined with NAC for 24 h on nuclear morphologies, and flow cytometry was used to examine impact of treatment with *Artemisinin* alone or combined with NAC on apoptosis of the cells; After silencing of *Bax* and *Bak* genes by RNA interference technology, effect of *Artemisinin* on viability of the cells was examined. **Results:** *Artemisinin* induced growth inhibition of ASTC-a-1 and A549 cells in a concentration and time dependent manner (IC₅₀ ≈ 100 μg/ml), and the falling level of viability of the cells induced by *Artemisinin* was significantly less than untreated cells after pretreated with NAC (all $P < 0.01$). Treatments of ASTC-a-1 and A549 cells with STS, *Artemisinin* alone or combined with NAC induced their karyopyknosis and apoptosis. After pretreatment with NAC, the apoptosis rates of ASTC-a-1 and A549 cells induced by *Artemisinin* were (20.4 ± 2.1)% and (17.9 ± 3.8)% respectively, which were obviously less than STS

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(No. 2011020091)。Project supported by the Medical Science Research Project of Henan Province (No. 2011020091)

[作者简介] 靳彩玲(1978–),女,河南省新乡市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究,E-mail:jincailing1978@163.com

[通信作者] 路平(Lu Ping, corresponding author),E-mail:lupingxx@126.com

group ([48.2 ± 2.6]% and [39.8 ± 4.9]%, respectively) and without pretreated group ([59.6 ± 3.4]% and [50.7 ± 3.8]% respectively) (all $P < 0.01$). Artemisinin only increased viability of silencing *Bak* cells ($P < 0.01$), but not obviously impact that of silencing *Bax* cells ($P > 0.05$). **Conclusion:** Artemisinin induces apoptosis of non-small cell lung cancer ASTC-a-1 and A549 cells, which requires the participation of reactive oxygen species (ROS) and promoting apoptosis factor *Bak*, but not *Bax*.

[**Key words**] Artemisinin; non-small cell lung cancer(NSCLC); cell apoptosis; ROS; RNA interference technology [Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 729-733]

肺腺癌是一种严重威胁人类健康和生命的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌发病率的 80% ~ 90%, 其中 30% 左右在确诊时已经是晚期,失去了手术的机会^[1-3]。因此,放疗和化疗成为晚期 NSCLC 患者的主要治疗手段,但放射疗法具有很大的副作用,近年来许多研究者致力于研发新型抗肿瘤药物,如从天然产物中寻找高效低毒的抗肿瘤活性成分。青蒿素(*Artemisinin*)及其衍生物是从植物黄花蒿茎叶中提取而得^[4],是目前临床上抗疟疾的一线药物,近年来,随着研究的不断深入,研究者们相继发现青蒿素对白血病细胞、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌等都具有一定杀伤作用^[5-7],但青蒿素及其衍生物的抗肿瘤机制还需要进一步研究。本研究检测了青蒿素对 NSCLC 细胞(ASTC-a-1 和 A549 细胞)的杀伤作用,并初步探讨了其细胞死亡的方式和分子机制,为青蒿素成为肺腺癌的治疗药物提供初步的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与仪器

人 NSCLC 细胞系 ASTC-a-1 和 A549 购买自中国科学院上海细胞库,均常规培养。青蒿素 HPLC 检测含量 ≥ 99%, 为白色粉末状,购自西安乐森生物科技有限公司; DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,新生牛血清购自四季青生物公司,胰蛋白酶购自华美生物工程公司, Hoechst 33258 染料、星形孢菌素(staurosporin, STS)、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)特异性清除剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)均购自美国 Sigma 公司, Lipofectamin™ 2000 转染试剂购自 Fermentas 公司; 细胞活性检测试剂 Cell Counting Kit-8 购自碧云天生物技术研究 所, Annexin V-FITC/PI 凋亡双染试剂盒购自上海贝博生物公司。 *Bax* 和 *Bak* 的 shRNA 购自 GenePharma 公司。流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国 BD 公司,激光共聚焦扫描显微镜(Leica TCS SP8 STED 3X)购于德国徕卡公司。全自动酶标仪(RT-6000)购

买于雷杜公司。

1.2 CCK-8 方法检测青蒿素对 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性的影响

将 100 μl ASTC-a-1 和 A549 细胞悬液(10^5 /ml)接种于 96 孔板内,置于细胞培养箱内培养 24 h。弃掉旧培养液,加入含 0、10、30、50、100、150 μg/ml 青蒿素的新鲜培养液培养 24 h, 每组 4 个平行孔, 0 μg/ml 组为空白对照组(下同), 计算 IC_{50} 。含 100 μg/ml 青蒿素的培养液分别培养两种细胞 6、12、24、48 h, 更换含 10% CCK-8 的培养液, 置培养箱中孵育 30 min, 酶标仪测定 450 nm 处的光密度(D)值, D 值越大, 细胞活力越高。细胞存活率(%) = (实验组 D 值 - 空白组 D 值) / (对照组 D 值 - 空白组 D 值) × 100%

1.3 Hoechst 33258 细胞核染色及流式细胞术检测青蒿素对 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色: 将 1 ml ASTC-a-1 和 A549 细胞悬液(10^5 /ml)加入共聚焦培养皿中, 分别加入 1 μmol/L STS、100 μg/ml 青蒿素、100 μg/ml 青蒿素 + 5 mmol/L NAC 处理(NAC 为 ROS 清除剂, 在加药前预处理 3 h)后, 培养 24 h, PBS 清洗 3 次, 加入终浓度为 1 μmol/L 的 Hoechst 33258 染色 30 min, PBS 清洗 3 次, 用共聚焦显微镜观察细胞核形态并拍照。

Annexin V-FITC/PI 双染法: 取 1 ml 对数期 ASTC-a-1 和 A549 细胞悬液(10^5 /ml)接种到 6 孔板中, 分别加入 STS、青蒿素、青蒿素 + NAC 处理(NAC 预处理 3 h)培养 24 h 后, 收集细胞, 加入 10 μmol/L 的 FITC, 避光、4 °C 孵育 15 min, 然后加入 10 μg/ml PI, 避光、4 °C 孵育 5 min, 用 300 目的筛子过滤细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.4 RNA 干扰及 CCK-8 实验检测沉默 *Bax*、*Bak* 对细胞活性的影响

分别取 1 ml 的 ASTC-a-1 和 A549 细胞(10^5 /ml)培养在 6 孔板中, 当细胞密度达到 70% 左右时, 取两只 EP 管, 其中一只加入 0.5 μg sh*Bax*、sh*Bak* 或 shNC 质粒和 50 μl 培养基; 另一只加入 2 μl Lipofectamin™ 2000 试剂和 50 μl 培养基, 室

温静置 5 min, 然后将上述两管液体轻轻混匀, 室温静置 15 min。用无血清培养基清洗细胞 1 次, 再加 400 μ l 无血清培养基于上述混合物中, 轻轻混匀, 然后与细胞混合, 培养 4 h 后用含血清的培养基替换掉上述转染液, 继续培养 24 h, 传代到 96 孔板或 6 孔板以进行后续的 CCK-8 细胞活性检测实验。

1.5 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用独立样本 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿素以浓度和时间依赖方式抑制 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性

0 ~ 150 μ g/ml 的青蒿素分别处理 ASTC-a-1 和 A549 细胞 24 h, CCK-8 检测结果显示, 青蒿素对 ASTC-a-1 和 A549 细胞均有杀伤作用, 随着浓度升高, 细胞活性也随之下降, 青蒿素杀伤两种细胞的 IC_{50} 值均约为 100 μ g/ml (图 1); 100 μ g/ml 青蒿素分别处理两种细胞 0 ~ 48 h 后, 细胞活性随着时间的增长, 活性也随之下降 (图 2)。

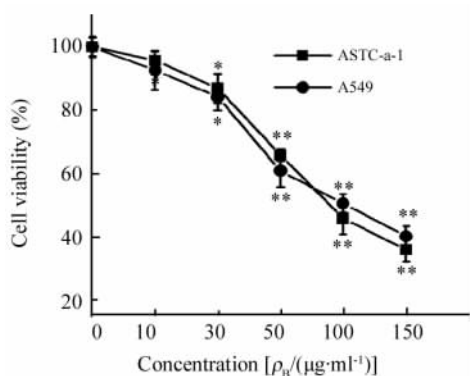


图 1 不同浓度青蒿素对 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of Artemisinin at various concentration on viability of ASTC-a-1 and A549 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μ g/ml group

2.2 ROS 促进青蒿素诱导的 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性下降

CCK-8 检测结果 (图 3) 显示, 100 μ g/ml 青蒿素处理 ASTC-a-1 和 A549 细胞 24 h 后细胞活性分别为 (42.9 \pm 2.6)% 和 (54.7 \pm 2.4)%, 而经 NAC 预处理的两种细胞活性分别为 (74.6 \pm 1.5)% 和 (76.5 \pm 3.1)%, 均显著高于未经 NAC 预处理的细

胞活性 (均 $P < 0.01$)。

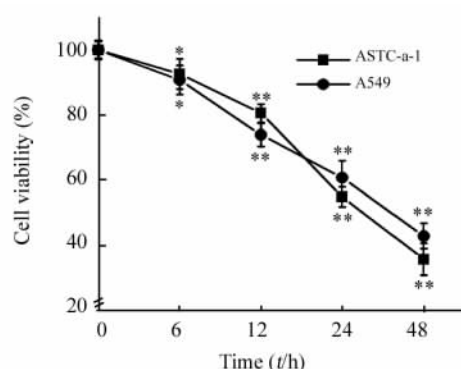


图 2 10 μ g/ml 青蒿素处理细胞不同时间后对 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of Artemisinin at 10 μ g/ml treating for various time on viability of ASTC-a-1 and A549 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h group (0 μ g/ml group)

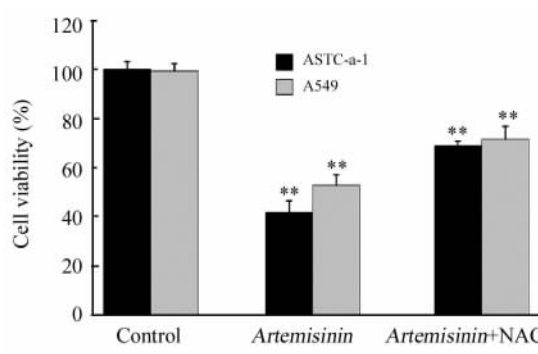


图 3 ROS 促进青蒿素引起的 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性的下降

Fig. 3 ROS promoted viability decrease of ASTC-a-1 and A549 cells induced by Artemisinin

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 ROS 促进青蒿素诱导的 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡

Hoechst 33258 细胞核染色结果 (图 4) 显示, 细胞凋亡阳性药物 STS 和青蒿素均能引起细胞核皱缩, 而 NAC 预处理组没有发生细胞核皱缩。

流式细胞仪检测结果 (图 5) 表明, STS 组的 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡百分率分别为 (48.2 \pm 2.6)% 和 (39.8 \pm 4.9)%; 青蒿素组的 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡率分别为 (59.6 \pm 3.4)% 和 (50.7 \pm 3.8)%; NAC + 青蒿素组的 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡率分别为 (20.4 \pm 2.1)% 和 (17.9 \pm 3.8)%, 3 组细胞的凋亡率均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且青蒿素组凋亡率高于

NAC + 青蒿素组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Bak 促进青蒿素诱导的 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性下降

CCK-8 检测结果(图 6)所示,转染 shNC、shBax、shBAK 均对细胞活性没有明显影响($P > 0.05$);沉默 Bak 后,青蒿素处理 ASTC-a-1 和 A549

细胞 24 h 后细胞活性分别为(90.5 ± 2.1)% 和 (93.5 ± 3.6)%,明显高于阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),这与 STS 的效果相似($P > 0.05$);而沉默 Bax,青蒿素处理后 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性分别为(52.3 ± 2.85)% 和 (43.9 ± 1.9)%,与阴性对照组的相似($P > 0.05$)。

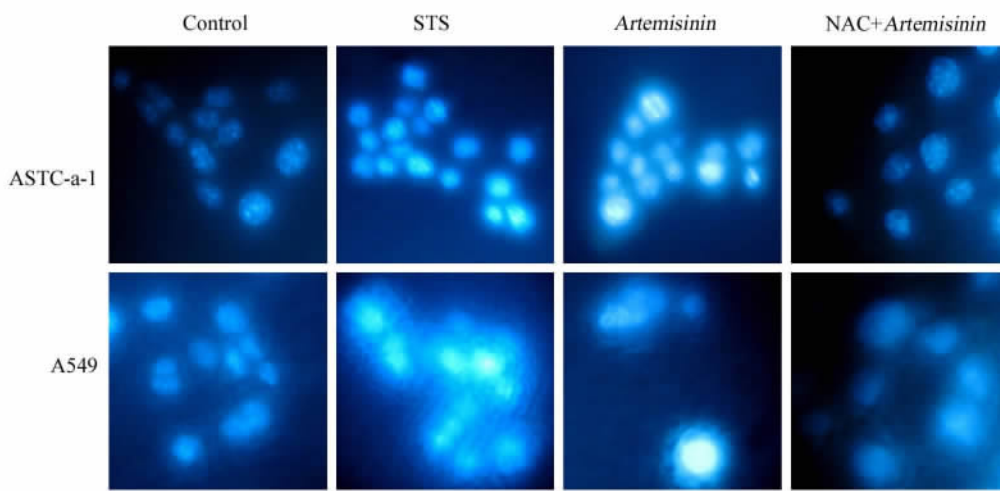


图 4 青蒿素和 NAC 对 ASTC-a-1 和 A549 细胞核形态的影响(×200)

Fig. 4 Effect of Artemisinin and NAC on nucleus morphology of ASTC-a-1 and A549 cells (×200)

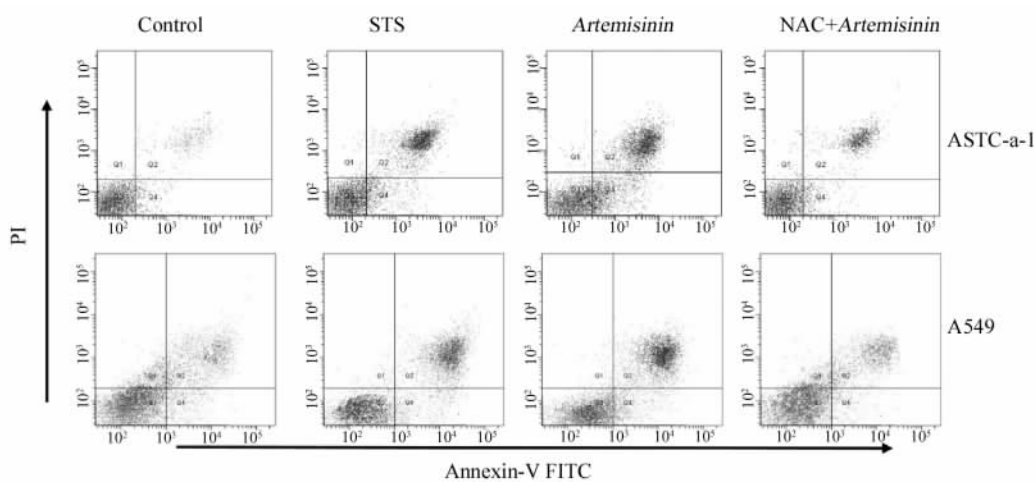


图 5 青蒿素和 NAC 对 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of Artemisinin and NAC on the apoptosis of ASTC-a-1 and A549 cells

3 讨论

青蒿素是从植物黄花蒿茎叶中提取的有过氧基团的倍半萜内酯药物^[8],是一种有效的抗疟疾药物^[9-10]。近年来研究^[10]表明,青蒿素类衍生物对体外培养的多种肿瘤细胞均具有较强的抑制作用,如白血病、结肠癌、中枢神经系统肿瘤、黑色素瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌等。

本研究以 NSCLC ASTC-a-1 和 A549 细胞为研究对象,探讨了青蒿素对这两种细胞凋亡的影响,并初步考察了其作用机制。细胞活性研究发现,青蒿素引起的 ASTC-a-1 和 A549 细胞活性下降具有浓度和时间依赖性。从细胞核形态和细胞凋亡率分析两个层面证明了青蒿素诱导的细胞死亡为凋亡。NAC 为内源性 ROS 清除剂,与未经 NAC 预处理的细胞相比,细胞经 NAC 预处理后再加入青蒿素处理,细胞活性较

高,细胞凋亡率较低,说明 ROS 参与了青蒿素诱导的细胞凋亡。ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇,包括: O_2^- 、 H_2O_2 及 $HO_2 \cdot$ 、 $\cdot OH$ 等^[11-12],当细胞内 ROS 浓度达到一定程度时,ROS 通过细胞氧化应激反应诱导细胞凋亡^[13]。因此推测,青蒿素是一种可诱导 ROS 产生并促使细胞凋亡的药物。最近的一项研究^[14]表明,人宫颈癌细胞 HeLa 细胞在青蒿素衍生物青蒿琥酯作用下 16 h 产生 ROS,48 h 发现其细胞毒作用,这表明,ROS 可能是青蒿素类药物引起损伤的起始机制。研究^[15-17]显示,线粒体的电子传递链对青蒿素类药物的细胞毒性的发挥起关键作用,这与本研究结果相似。

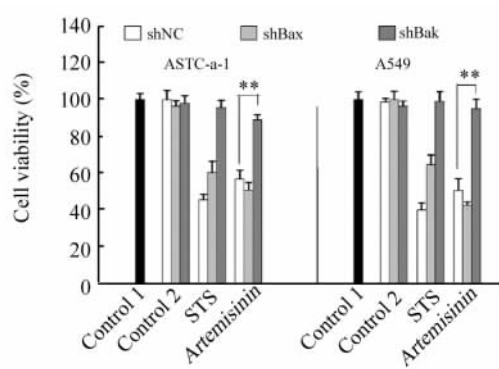


图 6 Bak 促进青蒿素引起的细胞活性的下降

Fig. 6 Bak promoted the decrease of cell viability induced by Artemisinin

Control 1: Blank control group; Control 2: Silent cell groups

Bax 和 Bak 属于 Bcl-2 家族的 BH3-only 家族成员,在线粒体途径中是一类非常重要的促凋亡因子^[18-20]。本研究发现沉默 Bak 在一定程度上抑制了青蒿素诱导的细胞凋亡,而沉默 Bax 对青蒿素诱导的细胞凋亡没有影响,说明 Bak 而不是 Bax 参与了青蒿素诱导的细胞凋亡。

综上所述,青蒿素诱导 ASTC-a-1 和 A549 细胞凋亡是 ROS 依赖性的,并且促凋亡因子 Bak 参与了青蒿素诱导的细胞凋亡过程,Bak 可能是 NSCLC 治疗的潜在靶点。总之,青蒿素作为一种安全有效的抗癌药物,已逐渐受到临床关注,将具有十分广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] 周晓娟,许峰. 局部晚期非小细胞肺癌(NSCLC)辅助治疗现状和进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(5): 485-488.
- [2] 许可,邓盛. 非小细胞肺癌棘皮动物微管结合蛋白 4-间变淋巴瘤激酶及表皮生长因子受体基因相关性的研究进展 [J].

中国医师进修杂志, 2013, 36(5): 69-71.

- [3] Agulló-Ortuño MT, Díaz-García CV, Agudo-López A, et al. Relevance of insulin-like growth factor 1 receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(1): 43-53.
- [4] Zhou JY, Zhu Y. Progress in antitumor effects of artemisinin and its derivatives [J]. Curr Med Chem, 2014, 26(6): 975-981.
- [5] 符祥俊,姚红霞,林丽娥,等. 青蒿琥酯逆转多发性骨髓瘤细胞株多药耐药的实验研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(9): 1075-1078.
- [6] 任静,史小荣. 双氢青蒿素对卵巢癌细胞株 HO-8910 生长及 Ang-2 表达的影响 [J]. 中国医药科学, 2012, 2(4): 36-38.
- [7] 周洁芸,谢淑武,朱焰. 青蒿素衍生物体外抗肿瘤作用的研究 [C] // 中国药理学会第八届全国生殖药理学术研讨会论文集汇编. 2013: 34.
- [8] 黄小燕. 青蒿素类抗疟药研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2009, 29(6): 983-984.
- [9] 孙利娜,张中伟. 青蒿素治疗疟疾的研究现状 [J]. 医学信息, 2013(11): 716.
- [10] 张小鹏,张长城. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(5): 66-68.
- [11] Chandra-Kuntal K, Lee J, Singh SV. Critical role for reactive oxygen species in apoptosis induction and cell migration inhibition by diallyl trisulfide, a cancer chemopreventive component of garlic [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 138(1): 69-79.
- [12] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 981-990.
- [13] Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species [J]. Mol Cell, 2012, 48(2): 158-167.
- [14] Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, et al. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials [J]. J Biol Chem, 2011, 286(2): 987-996.
- [15] Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, et al. The chemical and molecular basis of mammalian cell susceptibility to cell death induced by the artemisinin antimalarials [J]. Toxicol, 2010, 278(3): 358-359.
- [16] 母佩,张厚德,杜冀晖. 活性氧在青蒿素及其衍生物抗肿瘤作用机制中的研究进展 [J]. 当代医学, 2013, 19(16): 13-14.
- [17] 尹纪业,王和枚,丁日高. 青蒿素及其衍生物毒理学研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 2(2): 309-314.
- [18] 吉木斯,李存保. Bcl-2 家族在线粒体细胞凋亡途径中的作用 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(2): 152-157.
- [19] El Maadidi S, Faletti L, Berg B, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis [J]. J Immunol, 2014, 192(3): 1171-1183.
- [20] Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis [J]. Cell, 2012, 148(5): 988-1000.

[收稿日期] 2015 - 08 - 11

[修回日期] 2015 - 11 - 26

[本文编辑] 黄静怡