

α -细辛醚对食管癌 Eca-109 细胞线粒体凋亡通路的影响*

王白燕¹, 张方方¹, 韩倩倩¹, 李瑞琴², 朱艳琴¹

(河南中医药大学 1. 基础医学院实验教学中心; 2. 病理实验中心, 郑州 450046)

摘要 目的 探讨 α -细辛醚对人食管癌 Eca-109 细胞线粒体凋亡通路 Cyt-c、Smac 及 Caspase3 mRNA 和蛋白表达水平的影响。方法 体外培养的人食管癌 Eca-109 细胞设为阴性对照组和 α -细辛醚组, α -细辛醚终浓度分别为 25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 培养 48 h 后使用荧光倒置显微镜观察细胞凋亡形态改变, 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞 Cyt-c、Smac 及 Caspase3 mRNA 的表达, Western blotting 检测其蛋白表达, 选取 β -actin 进行相对定量分析。结果 α -细辛醚组细胞形态发生明显凋亡改变; 与阴性对照组比较, α -细辛醚组细胞 Cyt-c、Smac 及 Caspase3 mRNA 和蛋白的表达量均明显增加 ($P < 0.05$)。结论 α -细辛醚可通过调节线粒体凋亡途径相关基因 Cyt-c、Smac 及 Caspase3 的表达增加诱导 Eca-109 细胞凋亡。

关键词 α -细辛醚; Eca-109 细胞线粒体; 癌, 食管; Cyt-c; Smac; Caspase3

中图分类号 R282.71; R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2018)01-0027-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.006

Effect of α -Asarone on Esophageal Eca-109 Cell Mitochondrial Apoptosis Pathway

WANG Baiyan¹, ZHANG Fangfang¹, HAN Qianqian¹, LI Ruiqin², ZHU Yanqin¹ (1. Experimental Teaching Center, Basic Medical School; 2. Pathology Center, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT Objective To discuss the effect of α -asarone on the expression level of Cyt-c, Smac, Caspase3 mRNA and protein in human esophageal carcinoma Eca-109 cell mitochondria. **Methods** The Eca-109 cells were cultured *in vitro*, and divided into the negative control group and the α -asarone treatment groups (final concentration: 25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). After 48 h, the morphological changes of Eca-109 cells were observed by fluorescence inversion microscope. The total RNA of cells were extracted by TRIzol method, the expressions of Cyt-c, Smac and Caspase3 were measured by RT-PCR and Western blotting. **Results** After Eca-109 cells were treated with different concentrations of α -asarone for 48 h, and obvious changes in the morphology were observed, the expressions of Cyt-c, Smac and Caspase3 genes and protein were increased significantly compared to the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** α -asarone can induce the human Eca-109 cells apoptosis by regulating expressions of mitochondrial apoptosis pathway correlation genes such as Cyt-c, Smac and Caspase3.

KEY WORDS α -asarone; Eca-109 cell mitochondria; Carcinoma, esophageal; Cyt-c; Smac; Caspase3

α -细辛醚为石菖蒲的主要活性成分之一, 具有抗癫痫、保护神经细胞、抗血栓、保护心肌细胞、止咳祛痰和杀虫灭菌的作用^[1], 可以促进基质金属蛋白酶的表达增加和血管生成^[2]。刘秋弟等^[3]报道 α -细辛醚对 SCG-701、HeLa 细胞株有抗癌活性, 也有报道石菖蒲挥发油中的另一主要成分 β -细辛醚对肠癌增殖有抑制作用和诱导肠癌细胞凋亡的作用^[4]。但关于 α -细辛

醚对食管癌的抗癌活性鲜有报道。笔者在本研究中检测线粒体凋亡通路相关蛋白 Cyt-c、Smac 及 Caspase3 的表达情况, 为 α -细辛醚应用于食管癌治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 α -细辛醚注射液 (山西普德药业股份有限公司, 批号: 201308, 规格: 2 mg); 人食管癌细胞系 Eca-109 为南京凯基生物科技发展有限公司, 批号: KG189; RPMI1640 培养液 (Hyclone 公司, 批号: MyG0919); 新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 150402); 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (Takara 公司, 批号: DRR047S); 三氯甲烷、异丙醇及无水乙醇等均为国产分析纯。小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (Santa cruz, 批号: SC-81178); 鼠多抗 Cytochrome C (Abcam, 批号:

收稿日期 2016-12-13 **修回日期** 2017-01-23

基金项目 * 郑州市科技攻关项目 (131PPTGG417-1); 河南省高等学校重点科研项目 (16A310021); 河南省中医药科学研究专项课题 (2016ZY2017)

作者简介 王白燕 (1976-), 女, 山西定襄人, 讲师, 硕士, 主要从事中医药抗肿瘤研究工作。电话: 0371-86635027, E-mail: hllgwyb@sina.com。

通信作者 朱艳琴 (1956-), 女, 河南濮阳人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医药抗肿瘤研究工作。电话: 0371-86635027, E-mail: jc.zyqin@163.com。

ab110325);鼠多抗 Smac (Abcam,批号:ab111893);鼠多抗 Caspase3(Abcam,批号:ab119794);HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZB2305);预染蛋白参照物(PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, 批号: SM0671); eECL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:CW0049)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Eca-109 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液、37 ℃、5%二氧化碳培养箱中培养,实验取对数生长状态良好的细胞,2~3 d 更换培养液,3~4 d 传代一次。

1.2.2 免疫荧光染色检测细胞凋亡 用胰酶消化贴壁生长的药物处理 48 h 的 Eca-109 细胞及经完全培养基培养 48 h 的阴性对照细胞;收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,离心 1 500 r · min⁻¹, (r = 3 cm)5 min,弃去上清液,加入 PBS 50 μL 重悬;按吖啶橙/溴乙啶(AO/EB)双染试剂盒说明书染色,吸取混合液 10 μL,滴于载玻片上,盖玻片封片,在 510 nm 波长处激发荧光,倒置荧光显微镜下观察。结果判定标准为:活细胞核染色质着绿色并呈正常结构;早期凋亡细胞,核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状。晚期凋亡细胞,核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状;非凋亡的死亡细胞,核染色质为橘红色并呈正常结构^[5-6]。

1.2.3 总 RNA 的提取 取对数生长期细胞,收集细胞5×10⁶个,加入预冷的 Trizol 试剂 1 mL,反复吹打细胞至透明状,静置 5 min,分离核酸蛋白复合物;4 ℃,12 000 r · min⁻¹离心 5 min(r=3 cm),将上清液转移至新的 1.5 mL EP 管中。按 0.2 mL 三氯甲烷:1 mL Trizol 比例加入三氯甲烷,盖紧 EP 管盖,剧烈振荡混匀,直至呈乳白状,无分相现象;室温静置5 min,4 ℃,12 000 r · min⁻¹离心 15 min(r=3 cm);匀浆液分为 3 层,把上清液水相液小心转移至新的 EP 管,随后加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min;4 ℃,12 000 r · min⁻¹离心15 min(r=3 cm);弃去上清液,白色沉淀即为总 RNA。向含有沉淀的 EP 管加入 1 mL、-20 ℃预冷的 75%乙醇,轻轻颠倒混匀;4 ℃,12 000 r · min⁻¹离心5 min(r=3 cm);除去上清液;室温放置约 4 min,加入 RNase-free 水 20~35 μL 溶解 RNA 沉淀,RNA 溶液保存在-80 ℃冰箱。

1.2.4 RNA 的质量检测及 cDNA 的合成 按照 1:50 的比例,用 RNase-free 水稀释 RNA 样品,利用超微量分光光度计测定样品在 260,280 及 320 nm 下的吸光度,计算其 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值和 RNA 浓度。RNA 的浓度(μg · μL⁻¹) = (A₂₆₀ - A₃₂₀) × 稀释倍数 × 0.04,理想的

RNA 纯度 A₂₆₀/A₂₈₀ 应在 1.8~2.2 范围内。取总 RNA 浓度稀释至 100 ng · μL⁻¹,反应体系 10 μL:5×Primer Script Buffer 2 μL,Prime Script RT Enzyme Mix 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, Random 6 mers(100 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, RNA (100 ng) 5 μL, Rnase-Free 水 1.5 μL,反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,逆转录合成 cDNA。

1.2.5 PCR 引物扩增 引物序列见表 1。将反转录获得的 cDNA 溶液进行 10 倍稀释,反应体系 20 μL:2 × Ultra SYBR Mixture 10 μL,上游引物和下游引物各 0.5 μL,模板 cDNA 2 μL,Rnase-Free 水 7 μL。然后进行实时 PCR 反应:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火/延伸 1 min,扩增 40 个循环。熔解曲线分析从 60 ℃到 95 ℃,每升高 1 ℃测出一个荧光数值。每个样本重复 3 次,每个样本的 RNA 含量均根据各自的 β-actin 含量进行标准化,实验结果用相对定量 2^{-ΔΔCt}法分析(ΔΔCt=观察样本 ΔCt-对照样本 ΔCt,观察标本 ΔCt=观察样本目标基因 Ct-观察样本内参 Ct,对照样本 ΔCt=对照样本目标基因 Ct-对照样本内参 Ct)。

1.2.6 Western blotting 检测蛋白表达 按实验分组培养细胞,收获后用 PBS 洗涤 2 次,收集细胞,加组织细胞裂解液置冰浴裂解 50 min,4 ℃离心 (14 000 r · min⁻¹)5 min 后取上清液,去除细胞碎片,用 BCA 试剂盒测定蛋白及内参浓度,常规聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白湿转法至聚偏二氟乙烯膜上,再至封闭液中室温振摇 2 h,分别加入鼠多抗 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 抗体于 4 ℃孵育过夜,TBST 漂洗 10 min×3 次,二抗为用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:1 000),室温振摇孵育 1 h,漂洗后用电化学发光法(ECL)显色,室温孵育 3 min,曝光照相,并计算灰度值。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequence of RT-PCR		
基因	引物序列	产物长度/bp
β-actin	5'-CCGCTCTCCCTCCATCG	155
	5'-GTCCCAGTTGGTGACGATGC	
Cyt-c	5'-TTGCACTTACACCGGTACTTAAGC	62
	5'-ACGTCCCCACTCTCTAAGTCCAA	
Smac	5'-TGTGACGATTGGCTTTGGAGTAAC	161
	5'-TTCAATCAACGCATATGTGGTCTG	
Caspase3	5'-CAGTGGAGGCCGACTTCTTG	101
	5'-TGGCACAAAGCGACTGGAT	

1.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS17.0 版统计软件包进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析进行检验,以 P<0.05 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞凋亡形态学观察 α -细辛醚处理细胞 48 h 后,收集细胞,根据 AO/EB 双染说明书对细胞进行染色,荧光倒置显微镜观察可见:阴性对照组细胞数量较多,核染色质着绿色并呈正常结构,凋亡现象很少; α -细辛醚处理组细胞出现不同程度的凋亡细胞形态,有核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状的早期凋亡细胞;有核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状的晚期凋亡细胞(图 1)。

2.2 RT-PCR 检测结果 不同浓度 α -细辛醚作用于人食管癌 Eca-109 细胞 48 h 后,与阴性对照组比较, α -细辛醚 25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 Cyt-c 基因的表达水平分别为阴性对照组的 1.247, 1.651, 3.77 倍;Smac 基因的表达水平分别为阴性对照组的 1.323, 1.65, 2.133 倍;Caspase3 基因的表达水平分别为阴性对照组的 1.612, 1.726, 2.568 倍,见表 2。与阴性对照组比较, α -细辛醚 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组细胞的 Cyt-c、Smac mRNA 表达均明显增加,25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度组细胞的 Caspase3 mRNA 表达均明显增加($P < 0.05$)。

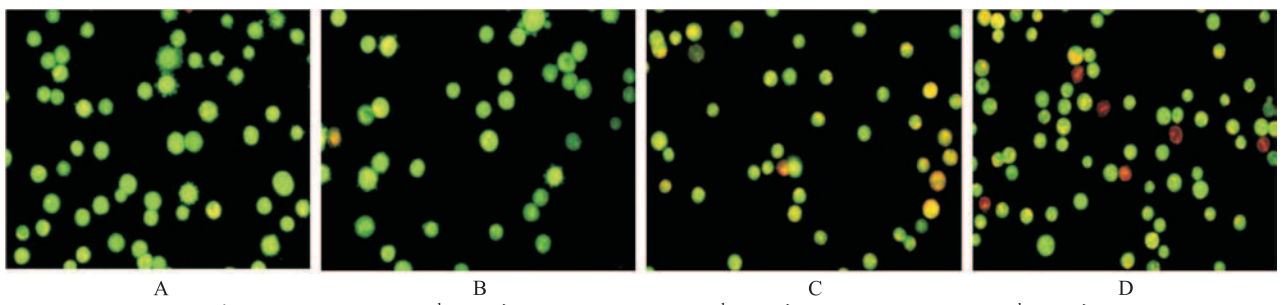
2.3 Western blotting 检测结果 用不同浓度 α -细辛醚处理人食管癌 Eca-109 细胞 48 h 后,Cyt-c 的相对表达量在 α -细辛醚浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时明显增加,而在 25 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时表达没有明显变化;Smac 的相对表达在 3 个浓度组都有明显增加,且呈现浓度依赖性;Caspase3 的相对表达量在 α -细辛醚浓度为 50 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时明显增加,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2 和表 3。

3 讨论

许多中草药及其提取物可通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用^[7]。细胞凋亡受许多凋亡相关基因的调控。线粒体是真核细胞中重要的亚细胞结构,是

合成 ATP、为细胞生命活动提供能量和维持内环境稳态的重要场所。线粒体功能缺陷可能导致细胞内信号通路级联反应,启动细胞凋亡的发生。细胞色素 C 及 Smac 是在线粒体膜间最重要的两种凋亡促进因子^[8]。细胞色素 C 是第一种被发现由线粒体释放的促细胞凋亡蛋白^[9-10],其主要通过两个途径诱导细胞凋亡:一是 Caspase 途径,当细胞受到刺激时,Cyt-c 释放入细胞质,与凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合,启动 Caspase-9 形成全酶,然后裂解,导致 pro-Caspase-9 活化,激活下游的 pro-Caspase3 进入内源性和外源性凋亡途径的最后通路最终导致细胞死亡;二是 Caspase 非依赖途径,该途径目前还不完全清楚,可能与 bax 有关。Smac 是 2000 年 DU 等^[11]发现一种新型线粒体膜间隙蛋白,在细胞发生凋亡时依赖 Cyt-c 的释放入细胞质,继而又从线粒体释放入细胞质,通过解除凋亡抑制蛋白对 Caspase3, 7, 9 的作用而诱导凋亡,尤其是 Caspase3 在凋亡级联反应中处于核心地位^[12-13]。Caspase3 是细胞凋亡过程中激活的关键酶,也是细胞凋亡的主要效应分子^[14]。

本研究结果发现不同浓度 α -细辛醚可诱导人食管癌 Eca-109 细胞凋亡。荧光倒置显微镜观察细胞形态发生改变,提示细胞发生凋亡,RT-PCR 和 Western blotting 检测发现药物处理组细胞特别是 α -细辛醚为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,线粒体 Cyt-c、Smac 表达明显增加,从线粒体膜间隙向细胞质内释放,经线粒体 Caspase 依赖凋亡通路诱导食管癌细胞凋亡,细胞色素 C 释放进入细胞质中,作用于 Caspase 家族,形成 Caspase 级联反应。Cyt-c、Smac mRNA 及蛋白的高表达,引起 Caspase 3 mRNA 和蛋白的高表达,从而诱导细胞发生凋亡。从本研究结果也看出, α -细辛醚为 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其诱导食管癌细胞凋亡的作用不是很明显,Cyt-c 和 Smac 的表达虽有所增加,但差异不明显,而当 α -细辛醚逐渐加大至终浓度 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其诱导凋亡的



A. 阴性对照组; B. 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -细辛醚组; C. 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -细辛醚组; D. 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -细辛醚组

图 1 人食管癌 Eca-109 细胞 AO/EB 双染荧光染色结果(AO/EB 染色, $\times 400$)

A. negative control group; B. 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -asarone group; C. 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -asarone group; D. 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -asarone group

Fig.1 Results of AO/EB fluorescent double staining on Eca-109 cells(AO/EB staining, $\times 400$)

表 2 α-细辛醚干预人食管癌 Eca-109 细胞 48 h 后 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 mRNA 的相对表达

Tab.2 Relative expression of Cyt-c、Smac and Caspase3 mRNA in Eca-109 cells treated with α-asarone for 48 h

组别	Cyt-c mRNA/ β-actin	Smac mRNA/ β-actin	Caspase3 mRNA/ β-actin
	β-actin	β-actin	β-actin
阴性对照组	1.00±0.02	1.01±0.02	1.00±0.11
α-细辛醚			
25 μg · mL ⁻¹ 组	1.247±0.42	1.323±0.20	1.612±0.10 ^{*1}
50 μg · mL ⁻¹ 组	1.651±0.67	1.650±0.55	1.726±0.23 ^{*1}
100 μg · mL ⁻¹ 组	3.77±1.07 ^{*1}	2.133±0.57 ^{*1}	2.568±0.19 ^{*1}

与阴性对照组比较, ^{*1}P<0.05
Compared with negative control group, ^{*1}P<0.05

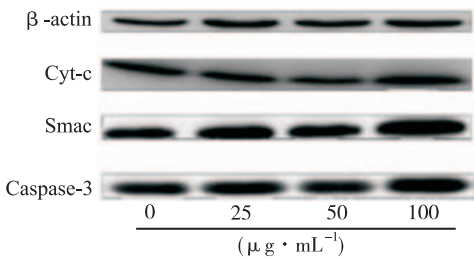


图 2 α-细辛醚不同浓度组处理人食管癌 Eca-109 细胞 48 h 后 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 的表达

Fig.2 Expression of Cyt-c、Smac and Caspase3 in Eca-109 cells treated with different doses of α-asarone for 48 h

表 3 不同浓度 α-细辛醚处理 Eca-109 细胞 48 h 后 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 的相对表达

Tab.3 Relative expression of Cyt-c、Smac and Caspase3 in Eca-109 cells treated with different doses of α-asarone for 48 h

组别	Cyt-c/ β-actin	Smac/ β-actin	Caspase3/ β-actin
	β-actin	β-actin	β-actin
阴性对照组	0.653±0.036	2.069±0.306	2.162±0.122
α-细辛醚			
25 μg · mL ⁻¹ 组	0.632±0.015	4.999±0.117 ^{*1}	2.098±0.155
50 μg · mL ⁻¹ 组	0.721±0.037	6.009±0.307 ^{*1}	3.177±0.111 ^{*1}
100 μg · mL ⁻¹ 组	1.493±0.057 ^{*1}	11.015±0.305 ^{*1}	3.955±0.189 ^{*1}

与阴性对照组比较, ^{*1}P<0.05
Compared with negative control group, ^{*1}P<0.05

形态改变越来越明显,具有浓度依赖性;且 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 的表达在终浓度 100 μg · mL⁻¹ 时与阴性对照组比较差异均有统计学意义。

综上所述,α-细辛醚处理组细胞 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 基因的表达增加,提示 α-细辛醚可能通过上

调线粒体凋亡通路相关蛋白 Cyt-c、Smac 和 Caspase3 的表达诱导食管癌 Eca-109 细胞的凋亡,但其作用机制尚不明确,有待研究。

参考文献

[1] 王甜甜,吴芳,朱艳琴,等.α-细辛醚诱导人食管癌细胞系 Eca-109 凋亡的实验研究[J].中医学报,2014,29(4):473-475.

[2] PARK H J, LEE S J, KIM M M. Effect of α-asarone on angiogenesis and matrix metalloproteinase [J]. Environ Toxi Pharm, 2015, 39(3):1107-1114.

[3] 刘秋弟,刘夕霞,吴原,等.α-细辛醚对 KA 癫 大鼠海马组织中 Bax、Bcl-2 的影响[J].中风与神经疾病杂志,2013,30(4):312-315.

[4] 吴坚,张星星,陈敏,等.β-细辛醚对肠癌细胞 HT-29 生物行为学的影响及机制[J].时珍国医国药,2014,25(5):1103-1107.

[5] 张静,张超,杨光,等.香加皮杠柳苷对肺癌 A549 细胞凋亡及 Survivin 表达的影响[J].医药导报,2015,34(6):705-710.

[6] 咎雪娟,荣冬芸,涂云华,等.姜黄挥发油对皮肤鳞癌 A431 细胞增殖及凋亡的影响[J].中国中药杂志,2016,41(15):2883-2887.

[7] 张新红,朱佳,徐水凌.龙葵碱通过线粒体途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡[J].中国药理学杂志,2014,49(16):1404-1409.

[8] SRINIVASULA S M, DATTA P, FAN X J, et al. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the deathreceptor pathway[J]. J Biol Chem, 2000, 275(46):3612-3615.

[9] LI C F, CHEN L B, LI D D, et al. Dual-sensitive HRE/Egr1 promoter regulates Smac overexpression and enhances radiation-induced A549 human lung adenocarcinoma cell death under hypoxia[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2):1108-1116.

[10] 高凤兰,宋文刚,李维山,等.凋亡调节因子 Smac、Cyt-C 在食管癌中的表达及与预后的关系[J].世界华人消化杂志,2012,20(29):2822-2826.

[11] DU C, FANG M, LI Y, et al. Smac, a mi-tochondrial protein that promotes cytochrome-c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1):33-42.

[12] KIM K S, YOON S T, LI J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. Spine, 2005, 30(1):33-37.

[13] 寇有为,王强. XIAP、Caspase3 在胃癌中表达及其相关性[J].中国现代医学杂志,2011,21(28):3490-3494.

[14] 赖燕燕,黄应雯,黄丹场,等.山竹果皮中总氧杂蒽酮对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及凋亡的影响[J].医药导报,2016,35(1):20-24.