

内质网应激激活剂上调 GRP78 表达与肺癌 A549 细胞对顺铂的敏感性

刘全利¹, 冯燕², 孙惠洁¹, 付金龙¹

1. 北华大学第二附属医院综合内科, 吉林 吉林 132022; 2. 北华大学第二附属医院放疗科, 吉林 吉林 132022

摘要: **目的** 探讨内质网应激激活剂衣霉素(tunicamycin, TM)与肺癌 A549 细胞对顺铂(cisplatin, DDP)的敏感性的关系及其机制。**方法** 体外培养肺癌 A549 细胞,并应用不同浓度的 DDP(0、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$)和/或 TM(0、1、2、4 $\mu\text{g/ml}$)处理肺癌 A549 细胞。MTT 法检测肺癌 A549 细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡水平;Western blot 检测内质网应激相关蛋白-葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)和凋亡相关蛋白-激活型半胱天冬酶-7(Cleaved caspase-7)的表达水平。**结果** (1)不同浓度 DDP 作用于肺癌 A549 细胞 24 h 后,细胞存活率随 DDP 浓度的增加而下降, A549 细胞凋亡率、凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-7 的表达水平随 DDP 浓度增加而增加(P 均 <0.01);(2)不同浓度 TM 作用 A549 细胞 24 h 后,随着 TM 浓度的增加,GRP78 的表达水平递增($P <0.05$);(3)TM 联合 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 处理 A549 细胞 24 h 后,与单纯 TM 组和单纯 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 组比较, A549 细胞存活率降低,而细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义($P <0.05, P <0.01$);(4)TM 联合 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 处理 A549 细胞 24 h 后,与单纯 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 组比较, TM 联合 DDP 组 Cleaved caspase-7 表达明显升高,差异有统计学意义($P <0.05$)。**结论** TM 可促进 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞存活率的降低、凋亡率的增加和凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-7 的表达,提示 TM 可能通过上调 GRP78 增加肺癌 A549 细胞对 DDP 的敏感性,联合应用 TM 和 DDP 有望成为治疗肺癌的新策略。

关键词: 肺癌; 内质网应激; 衣霉素; 内质网应激相关蛋白; 葡萄糖调节蛋白; 凋亡相关蛋白; 激活型半胱天冬酶-7; 顺铂; 细胞凋亡

中图分类号: R 73-3 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2015)11-1418-04

Endoplasmic reticulum stress agonist up-regulating GRP78 expression and sensitivity of A549 human lung cancer cells to cisplatin

LIU Quan-li*, FENG Yan, SUN Hui-jie, FU Jin-long

* Department of General Internal Medicine, Second Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin, Jilin 132022, China

Corresponding author: FENG Yan, E-mail: 2985735441@qq.com

Abstract: Objective To investigate the relationship of tunicamycin(TM, an endoplasmic reticulum stress agonist) and enhancing sensitivity of A549 human lung cancer cells to cisplatin (DDP) and its mechanism. **Methods** The A549 human lung cancer cells were cultured in vitro, and treated with different concentrations of DDP(0, 10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$) and/or different concentrations of TM(0, 1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$). The survival rate of A549 cells was determined by MTT assay. The cell apoptosis level was detected by flow cytometry. The expressions of glucose regulated protein of 78kD (GRP78, an endoplasmic reticulum stress-related protein), and Cleaved Caspase-7 (an apoptosis-related protein) were detected by Western blot method. **Results** (1) After A549 cells were treated with different concentrations of DDP for 24 hours, the survival rate of A549 cells gradually decreased with the increase of DDP concentrations($P <0.01$), and the apoptosis rate of A549 cells and the Cleaved Caspase-7 expression level gradually increased with the increase of DDP concentrations(all $P <0.01$). (2) After A549 cells were treated with different concentrations of TM for 24 hours, GRP78 expression level gradually increased with the increase of TM concentrations($P <0.05$). (3) After A549 cells were treated with TM plus 20 $\mu\text{mol/L}$ of DDP for 24 hours, the survival rate of A549 cells decreased, while the apoptosis rate of A549 cells increased compared with TM group alone or 20 $\mu\text{mol/L}$ DDP group($P <0.05, P <0.01$). (4) After A549 cells were treated with TM combined with

20 $\mu\text{mol/L}$ of DDP for 24 hours, Cleaved Caspase-7 expression significantly increased compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ DDP group alone ($P < 0.05$). **Conclusions** In DDP-induced A549 cells, TM can promote the decrease of survival rate, the increase of apoptosis rate, and the expression of Cleaved caspase-7. That may suggest TM enhance the sensitivity of A549 human lung cancer cells to DDP by up-regulation of GRP78 expression. The combination therapy of DDP and TM may be a promising therapeutic strategy for human lung cancer.

Key words: Lung cancer; Endoplasmic reticulum; Tunicamycin; Endoplasmic reticulum stress-related protein; Glucose regulated protein; Apoptosis-related protein; Cleaved Caspase-7; Cisplatin; Cell apoptosis

目前,肺癌的治疗除了手术和放疗外,化疗是主要的治疗手段^[1]。铂类药物顺铂(DDP)通过损伤细胞的 DNA 而发挥抗肿瘤作用^[2],是治疗肿瘤最常用的药物,如卵巢癌、头颈部肿瘤和肺癌等,其治疗肿瘤的主要障碍是药物耐受^[3]。新近报道,线粒体通路和内质网应激参与了 DDP 诱导的癌细胞凋亡^[4]。有研究显示,在人黑色素瘤和结肠癌细胞中,DDP 是通过影响内质网中的钙稳态而诱导内质网应激,进而导致癌细胞凋亡^[5]。当缺氧、DNA 损伤、细胞内钙紊乱等时,诱导癌细胞发生内质网应激。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein of 78kD, GRP78) 是细胞的内质网蛋白,当内质网应激发生时表达上调,并进一步活化内质网上跨膜蛋白质传感器(ATF6、IRE1、PERK)^[6]。有研究报道,在肺癌 A549 细胞中,GRP78 的上调能增强肿瘤细胞对 DDP 的敏感性^[7]。本研究旨在观察 DDP 作用于肺癌 A549 细胞前后细胞凋亡的变化,以及联合内质网应激激活剂衣霉素(tunicamycin, TM)对细胞凋亡产生的影响,并初步探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 将人肺癌 A549 细胞用含 10% 胎牛血清、双抗(100 U/ml 青霉素及 0.1 mg/ml 链霉素, Gibco 公司)的 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司),在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法检测细胞活力 取生长状态良好、对数生长期的肺癌 A549 细胞接种至 96 孔板,待细胞完全贴壁,加入不同浓度的 DDP (Sigma, P4394-25 MG) 和(或)TM (Sigma, T7765-1 MG),每孔 200 μl 的终体积液体,每组设 6 个复孔,药物干预作用 24 h 后,每孔加入 20 μl MTT 溶液(5g/L),将细胞在培养箱继续培养 4~6 h。弃去培养基,加入 150 μl DMSO 于每孔内,振荡摇匀后,用酶标仪于 490 nm 波长测定各孔的吸光度值,计算细胞的生存率。

1.2.2 流式细胞技术检测细胞凋亡率 取生长状态良好的肺癌 A549 细胞,将细胞接种于 6 孔板,培养

24 h 后,换液并按不同浓度的 DDP 和(或)TM 处理细胞,药物干预 24 h 后,收集悬浮细胞,并用胰酶消化贴壁细胞,加入 400 μl 结合缓冲液使细胞重悬,之后加入 AnnexinV 和 PI 溶液(凯基生物),于室温条件下避光孵育 15 min,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率,每组实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法检测 GRP78 和凋亡相关蛋白 - 激活型半胱天冬酶-7 (Cleaved Caspase-7) 的表达

取生长状态良好的肺癌 A549 细胞,接种于细胞培养瓶,细胞贴壁后分别加入不同浓度的 DDP 和(或)TM 处理细胞,药物干预 24 h 后,收集贴壁细胞和悬浮细胞,提取细胞蛋白,采用 BCA 方法将蛋白进行定量并进行 SDS-PAGE 电泳(200 V, 45 min),之后用 100 V 转膜 1 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上,同时用含 15% 脱脂牛奶的 PBST 封闭 2 h,用 PBST 洗涤 3 次,之后加入相应一抗,经 4℃ 孵育过夜后,用 PBST 洗涤 3 次,15 min, 5 min, 5 min 后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h [GRP78 和 Caspase-7 抗体 (Cell Signaling Technology) 稀释比例为 1:100、 β -actin 抗体稀释比例为 1:1 000、二抗稀释比例为 1:1 000]。之后再用 PBST 洗涤 3 次,使用 ECL 进行显影,后再用凝胶成像系统分析条带的灰度值。

1.3 统计学分析 数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 DDP 对肺癌 A549 细胞存活率、凋亡率的影响 0、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 干预 24 h 后,MTT 结果显示,随着药物浓度的增加,细胞存活率逐渐降低 ($P < 0.01$),即其对 A549 细胞生长抑制作用逐渐增加;并且随着药物浓度的逐渐增加,A549 细胞逐渐皱缩,且脱离贴壁的现象明显增加,其中 20、50 $\mu\text{mol/L}$ DDP 时 A549 细胞的存活率明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ DDP ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。不同浓度的 DDP 作用 24 h 后,A549 细胞凋亡率随 DDP 浓度增

表 1 不同浓度 DDP 对 A549 细胞生存率、凋亡率和 Cleaved Caspase-7 的影响

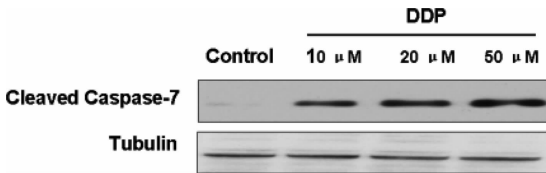
指标	对照组	10 $\mu\text{mol/L}$ DDP	20 $\mu\text{mol/L}$ DDP	50 $\mu\text{mol/L}$ DDP	<i>P</i> 值
细胞存活率	1.00	0.74 \pm 0.110	0.52 \pm 0.054*	0.32 \pm 0.021**	<0.01
细胞凋亡率(%)	2.14 \pm 0.680	8.67 \pm 0.690**	13.16 \pm 1.110**	19.22 \pm 1.650**	<0.01
Cleaved Caspase-7(灰度)	0.04 \pm 0.023	0.73 \pm 0.280*	1.33 \pm 0.079**	1.67 \pm 0.121**	<0.01

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 2 TM、DDP 分别应用和联合应用对 A549 细胞生存率、凋亡率和 Cleaved Caspase-7 的影响

指标	对照组	1 $\mu\text{g/ml}$ TM	20 $\mu\text{mol/L}$ DDP	20 $\mu\text{mol/L}$ DDP + 1 $\mu\text{g/ml}$ TM	<i>P</i> 值
细胞存活率	1.00	0.95 \pm 0.075	0.55 \pm 0.068 Δ^*	0.24 \pm 0.030 $\Delta^{\#}$	<0.01
细胞凋亡率(%)	2.60 \pm 0.062	3.30 \pm 0.170	10.21 \pm 0.320 Δ^*	18.69 \pm 1.120 $\Delta^{\#}$	<0.01
Cleaved Caspase-7(灰度)	0.03 \pm 0.020	0.04 \pm 0.031	0.32 \pm 0.060 Δ^*	0.71 \pm 0.054 $\Delta^{\#}$	<0.01

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 1 $\mu\text{g/ml}$ TM 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 组比较, $\#P < 0.05$ 。



注: μM 表示 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 1 不同浓度 DDP 诱导肺癌细胞凋亡相关蛋白的表达水平

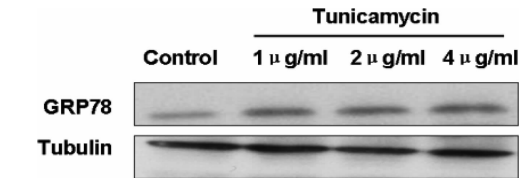


图 2 不同浓度 TM 对肺癌 A549 细胞 GRP78 表达水平的影响

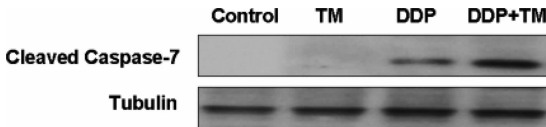


图 3 TM、DDP 分别应用和联合应用对肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

加而增加($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白的表达水平 0、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 DDP 作用 A549 细胞 24 h 后,凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-7 表达灰度值随药物浓度增加而上升,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 DDP 时,Cleaved Caspase-7 的表达水平均明显增加,尤以 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 时更显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1、图 1。

2.3 TM 对内质网应激相关蛋白 GRP78 表达水平的影响 TM 作用 A549 细胞 24 h 后,内质网应激相关蛋白 GRP78 的相对表达量随 TM 浓度由 0 \rightarrow 1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 $\mu\text{g/ml}$ 逐步上升而递升:(0.23 \pm 0.058)、(0.49 \pm 0.110)、(0.62 \pm 0.062)、(0.79 \pm 0.077),差异有统计学意义($P < 0.05$);与 0 $\mu\text{g/ml}$ TM 相比,1、2、4 $\mu\text{g/ml}$ TM 时,肺癌 A549 细胞 GRP78 的表达量均明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。

2.4 TM 联合 DDP 对肺癌 A549 细胞存活率的影响 MTT 结果显示,1 $\mu\text{g/ml}$ TM 联合 20 $\mu\text{mol/L}$ DDP

处理 A549 细胞 24 h 后,A549 细胞存活率分别低于不加药物的对照组、1 $\mu\text{g/ml}$ TM 组和 20 $\mu\text{mol/L}$ DDP 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示 TM 促进了 DDP 对 A549 细胞存活率的降低。见表 2。

2.5 TM 促进 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞的凋亡 TM 联合 DDP 处理肺癌 A549 细胞 24 h 后,与不加药物的对照组相比,单加 1 $\mu\text{g/ml}$ TM 组肺癌 A549 细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$);而 20 $\mu\text{mol/L}$ DDP 组和 TM 联合 DDP 组的细胞凋亡率均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 TM 促进了 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞凋亡率的增加。见表 2。

2.6 TM 上调 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白表达 TM 联合 DDP 处理肺癌 A549 细胞 24 h 后,与不加药物的对照组相比,单加 TM 组细胞凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-7 的表达无明显变化($P > 0.05$);与单加 DDP 组比较,TM 联合 DDP 组 Cleaved Caspase-7 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示 TM 上调 DDP 诱导的肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白的表达。见表 2、图 3。

3 讨论

目前研究发现,内质网应激在化疗药物诱导的肺癌凋亡中起到了重要的作用^[8]。在以往的研究中,内质网应激被认为是一种生物学的级联反应,能够有效诱导细胞凋亡;事实上,内质网应激是对许多刺激因素如生物化学、病理及生理条件下的刺激产生的一种细胞反应,能够促发各种细胞功能紊乱包括错误折叠蛋白质的聚集和 Ca^{2+} 稳态的改变^[9]。且过度的内质网应激和细胞凋亡之间的关系在巨噬细胞、神经细胞和内皮细胞以及癌症细胞中都已得到了证实^[10]。在本研究中,也发现内质网应激激活剂 TM 增强了肺癌 A549 细胞对 DDP 的敏感性。

GRPs 是内质网分子伴侣,普遍存在内质网中,能够辅助蛋白质的折叠^[11]。GRP78 是典型的 GRPs

家族成员,和细胞质中的热休克蛋白质 70 和 90 同源,并且一般被认为是内质网应激的分子标志^[12]。在内质网应激发生时,GRP78 表达水平明显上调。本研究也显示,在肺癌 A549 细胞中,TM 能以浓度依赖的方式上调 GRP78 的表达,并且当 TM 和 DDP 联用时,能够有效抑制肺癌 A549 细胞的生存率,明显增加肺癌 A549 细胞的凋亡率及凋亡相关蛋白 Caspase-7 的表达。

DDP 作为治疗癌症经典的化疗药物,通过诱导肺癌 A549 细胞中 DNA 损伤而引起细胞凋亡。但 DDP 对肺癌的治疗效果并不理想。然而,加入内质网诱导剂 TM 能够有效增强 DDP 对肺癌 A549 细胞的杀伤作用,提高肺癌 A549 细胞对 DDP 的敏感性。因此,内质网诱导剂 TM 和 DDP 联合应用可能成为治疗肺癌的潜在新策略,值得进行进一步研究。

参考文献

- [1] Zhao J, Kim JE, Reed E, et al. Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2005, 27 (1): 247 - 256.
- [2] Holford J, Beale PJ, Boxall FE, et al. Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36 (15): 1984 - 1990.
- [3] Perego P, Gatti L, Righetti SC, et al. Development of resistance to a

trinuclear platinum complex in ovarian carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105 (5): 617 - 624.

- [4] Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, et al. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (5): 2693 - 2700.
- [5] Mandic A, Hansson J, Linder S, et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (11): 9100 - 9106.
- [6] Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 739 - 789.
- [7] Ahmad M, Hahn IF, Chatterjee S. GRP78 up-regulation leads to hypersensitization to cisplatin in A549 lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34 (7): 3493 - 3500.
- [8] Zhao Y, Zhu C, Li X, et al. Asterosaponin 1 induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in A549 human lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26 (4): 919 - 924.
- [9] Madeo F, Kroemer G. Intricate links between ER stress and apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2009, 33 (6): 669 - 670.
- [10] Tan Y, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (23): 16016 - 16024.
- [11] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355 (6355): 33 - 45.
- [12] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26 (8): 504 - 510.

收稿日期: 2015-07-20 修回日期: 2015-08-11 编辑: 王国品

(上接第 1417 页)

否参与, 还需进一步证实。

参考文献

- [1] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and Notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112 (12): 3491 - 3501.
- [2] Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia [J]. *Bone*, 2006, 39 (4): 754 - 766.
- [3] Scotece M, Conde J, Abella V, et al. Bone metabolism and adipokines: are there perspectives for bone diseases drug discovery? [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9 (8): 945 - 957.
- [4] Lee HW, Kim SY, Kim AY, et al. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (9): 2254 - 2262.
- [5] Luo E, Hu J, Bao CY, et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8 (2): 734 - 743.
- [6] Zhang J, Li T, Xu L, et al. Leptin promotes ossification through multiple ways of bone metabolism in osteoblast: a pilot study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29 (8): 758 - 762.
- [7] Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived ser-

ine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2005, 102 (30): 10610 - 10615.

- [8] Dalle Carbonare L, Valenti MT, Zanatta M, et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (11): 3356 - 3365.
- [9] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts [J]. *Aging Cell*, 2008, 7 (3): 335 - 343.
- [10] Butler JS, Queally JM, Devitt BM, et al. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 210.
- [11] Kamio N, Kawato T, Tanabe N, et al. Vaspain attenuates RANKL-induced osteoclast formation in RAW264.7 cells [J]. *Connect Tissue Res*, 2013, 54 (2): 147 - 152.
- [12] Zhu X, Jiang Y, Shan P, et al. Vaspain attenuates apoptosis of human osteoblasts through ERK signaling pathways [J]. *Amino Acids*, 2013, 44 (3): 961 - 968.
- [13] 刘源. microRNA-34c 在调控成骨细胞及间充质干细胞成骨分化中的作用及机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.

收稿日期: 2015-07-04 修回日期: 2015-07-20 编辑: 周永彬