

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.36.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 36-0023-04

尼古丁对 A549 化学治疗敏感性的影响 *

史夏青, 刘玲, 王成志, 廖明媚, 杨满意, 赵劲风

(中南大学湘雅医院 卫生部纳米生物技术重点实验室, 湖南 长沙 410008)

摘要: 目的 探讨尼古丁 (Nicotine) 诱导的肺癌 A549 细胞对顺铂的敏感性, 以及对凋亡相关蛋白表达水平的影响。**方法** 将 A549 细胞随机分为对照组、顺铂 (CDDP) 组和 CDDP+Nicotine 组, 培养 48 h, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bak 和 Mcl-1 的表达水平。**结果** 与 CDDP 组比较, CDDP+Nicotine 组的细胞活力更高, 细胞凋亡率更低, 促凋亡蛋白 Bak 的表达无变化, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的表达上调, 且 Mcl-1 磷酸化水平上调。**结论** 尼古丁可能通过上调 Bcl-2 和 Mcl-1 的表达, 以及 Mcl-1 的磷酸化水平降低肺癌细胞 A549 对 CDDP 的敏感性。

关键词: 肺肿瘤; 尼古丁; 化学治疗; 敏感性

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of Nicotine on chemo-sensitivity in A549*

Xia-qing Shi, Ling Liu, Cheng-zhi Wang, Ming-mei Liao, Man-yi Yang, Jin-feng Zhao

(Key Laboratory of Nano biological Technology of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the sensitivity of lung cancer cell A549 induced by Nicotine to Cisplatin (CDDP) and its effect on apoptosis-related protein. **Methods** A549 cells were randomly divided into control group, CDDP group and CDDP + Nicotine group. After co-cultured for 48 hours, cell viability was measured by MTT assay, apoptosis was detected by flow cytometry, and expression levels of apoptosis-related protein Bcl-2, Bak and Mcl-1 were identified by western blot. **Results** Compared with the CDDP group, the cell viability was higher and apoptosis rate was lower in Cisplatin + Nicotine group while no significant change in pro-apoptotic protein Bak was identified. Expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1 and phosphorylation level of Mcl-1 were upregulated when compared with those in CDDP group. **Conclusions** Nicotine may reduce the sensitivity of lung cancer cell A549 to CDDP by up-regulating the expression of Bcl-2 and Mcl-1, and the phosphorylation of Mcl-1.

Keywords: lung neoplasms; Nicotine; chemotherapy; sensitivity

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率居于癌症的首位, 其发病率在许多发展中国家迅速上升^[1-2]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 包括腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌, 占肺癌病例约 85%^[3]。近些年肺癌治疗已经在分子诊断和靶向治疗方面取

得进展, 但其临床治疗效果仍然很差, 5 年生存率低于 15%^[4]。长期吸烟是导致肺癌发生及耐药的主要因素, 尼古丁 (Nicotine) 是香烟烟雾中的主要成分, 其可以通过调控细胞内各种不同信号通路来促进癌细胞增殖, 并对化学治疗 (以下简称化疗) 药物导致的癌

收稿日期: 2018-04-12

[通信作者] 赵劲风, E-mail: zhaojinfeng@hotmail.com; Tel: 15874856567

细胞凋亡起抑制作用^[5]。本研究探讨 Nicotine 对人肺癌细胞 A549 化疗敏感性以及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bak 和 Mcl-1 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

A549 细胞 (上海中国科学院细胞库)。顺铂 (cisplatin, CDDP)、Nicotine、MTT (美国 Sigma 公司), RPMI 1640 培养基和青、链霉素 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) [依科赛生物科技 (太仓) 有限公司], DMSO (北京索莱宝科技有限公司), Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司), 一抗 p-Mcl-1 (T163)、Mcl-1、Bak、GAPDH 和二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司), Bcl-2 (英国 Abcam 公司), BCA 试剂盒 (美国赛默飞公司)。细胞培养箱 (日本 SANYO 公司), FACS-Canto 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 全波长酶标仪 (美国 BioTek Epoch 公司), 电泳仪 (美国 BIORAD 公司), Fluor Chem R 多功能成像分析系统 (美国 Protein Simple 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞培养于含 10%FBS, 1% 青霉素和链霉素, RPMI-1640 培养基, 37℃, 5% 二氧化碳培养箱。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力 将对数生长期的 A549 细胞接种于 96 孔板, 每孔 5 000 个细胞, 每组 3 个复孔。待细胞贴壁后, 在有或无 Nicotine 处理的条件下, 加入含有不同浓度 CDDP (0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 μmol/L) 的培养基, 继续培养 48 h。同时设空白组 (只含有等量培养基) 和对照组 (含同数量细胞和等量培养基), 每孔加入 10 μl MTT 溶液 (5 mg/ml, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 每孔加入 100 μl DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪 490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.3 Annexin V/PI 检测细胞凋亡 取处于对数生

长期的 A549 细胞, 调整细胞密度为 1×10^4 个/ml, 以 2 ml/孔接种于 6 孔细胞培养板, 加入 5 μmol/L Nicotine 处理 2 h, 加入含有 7 μmol/L CDDP 的培养基继续培养 48 h 后, 收集细胞并使用冷的 PBS 缓冲液洗细胞 2 次, 再用 $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液制成 $100 \mu\text{l}$ 的 1×10^6 个/ml 的细胞悬液, 加入 Annexin V 与 PI 轻轻混匀, 室温 20 ~ 25 °C 避光处放置 15 min 后, 加入 $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液 400 μl, 1 h 内上流式细胞仪测定结果。

1.2.4 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 收集处理后的细胞, 提取细胞总蛋白, 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 250 mA 转膜至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1 h, 一抗 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 化学发光显影。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nicotine 作用 A549 后对 CDDP 敏感性的影响

5 μmol/L Nicotine 处理 A549 细胞 2 h 后, 不同浓度的 (0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 μmol/L) CDDP 分别处理 A549 细胞 48 h, CDDP 能降低 A549 细胞的存活率, 且具有剂量依赖性, 随着浓度增加细胞存活率逐渐降低 ($P < 0.05$)。CDDP+Nicotine 组的细胞存活率较 CDDP 组的细胞存活率高。见表 1。

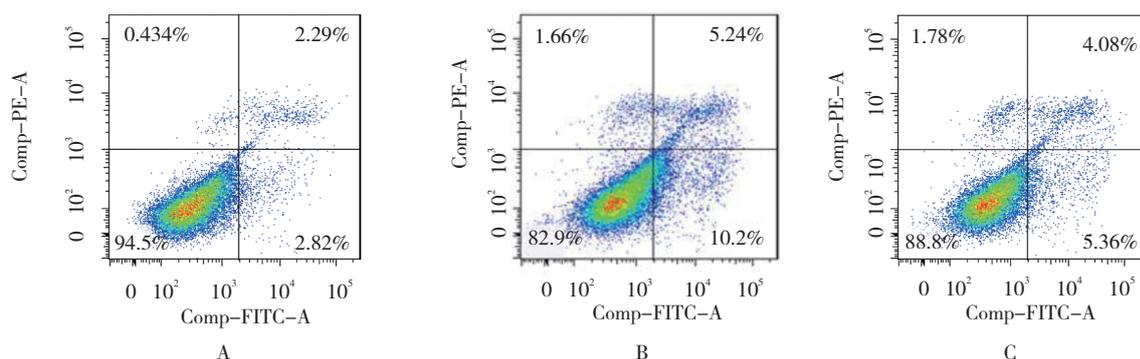
2.2 Nicotine 与 CDDP 对 A549 细胞凋亡的影响

对照组、CDDP 组和 CDDP+Nicotine 组的细胞凋亡率分别为 (3.94 ± 1.15) %、(14.75 ± 2.17) % 和 (9.53 ± 0.86) %。经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 38.626$, $P = 0.000$)。CDDP 组和 CDDP+Nicotine 组细胞凋亡率均大于对照组 ($P < 0.05$); CDDP 组和 CDDP+Nicotine 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CDDP+Nicotine 组的细胞凋亡率降低。见图 1。

表 1 CDDP 和 CDDP+Nicotine 对 A549 细胞存活率的影响 ($n = 3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	0.0 μmol/L	2.5 μmol/L	5.0 μmol/L	10.0 μmol/L	20.0 μmol/L	40.0 μmol/L	F 值	P 值
CDDP 组	1.00 ± 0.08	70.77 ± 0.33 ¹⁾	55.41 ± 2.60 ¹⁾	39.49 ± 3.21 ¹⁾	31.37 ± 2.42 ¹⁾	23.22 ± 3.22 ¹⁾	237.987	0.000
CDDP+Nicotine 组	1.00 ± 0.08	77.02 ± 1.97 ¹⁾	71.03 ± 2.37 ¹⁾²⁾	52.44 ± 3.06 ¹⁾²⁾	35.58 ± 1.84 ¹⁾²⁾	29.89 ± 5.56 ¹⁾	60.985	0.000

注: 1) 与 0.0 μmol/L 比较, $P < 0.05$; 2) 与 CDDP 组比较, $P < 0.05$



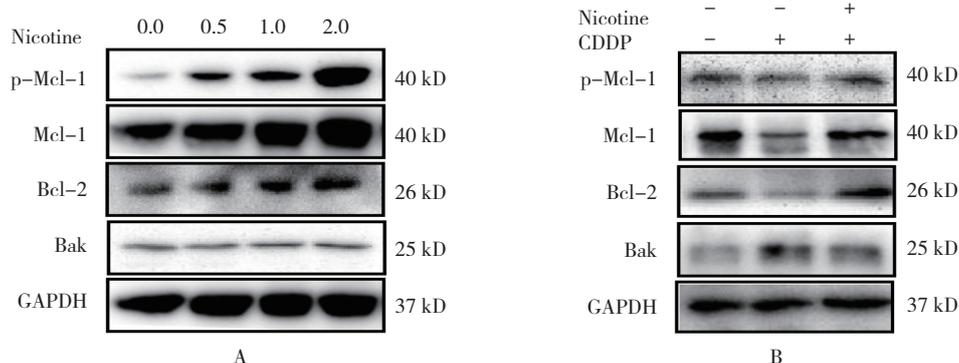
A: 对照组; B: CDDP 组 (7 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 处理 A549 细胞 48 h); C: CDDP+Nicotine 组 (5 $\mu\text{mol/L}$ Nicotine 处理 A549 细胞 2 h, 7 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 继续处理 48 h)

图 1 Nicotine 与 COPD 对 A549 细胞凋亡影响

2.3 Nicotine 对 A549 的凋亡相关蛋白表达水平的影响

结果见图 2 和表 2、3。5 $\mu\text{mol/L}$ Nicotine 处

理 A549 细胞不同时间 (0.0、0.5、1.0 及 2.0 h) 后, A549 细胞的 p-Mcl-1、Mcl-1、Bcl-2 和 Bak 的表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: 5 $\mu\text{mol/L}$ Nicotine 处理 A549 细胞 0.0、0.5、1.0 及 2.0 h; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ Nicotine 处理 A549 细胞 2 h, 7 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 的培养基继续培养 48 h

图 2 Nicotine 影响 A549 的凋亡相关蛋白的表达水平

表 2 5 $\mu\text{mol/L}$ Nicotine 处理不同时间后对 A549 细胞凋亡相关蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

蛋白	0.0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	F 值	P 值
p-Mcl-1	5.48 \pm 2.34	23.65 \pm 3.37 [†]	34.24 \pm 1.73 [†]	65.65 \pm 2.71 [†]	273.899	0.000
Mcl-1	41.62 \pm 2.00	63.73 \pm 2.80 [†]	87.44 \pm 4.03 [†]	97.50 \pm 2.91 [†]	98.699	0.000
Bcl-2	9.33 \pm 1.00	17.05 \pm 1.15 [†]	23.51 \pm 0.87 [†]	34.21 \pm 2.26 [†]	38.323	0.000
Bak	6.15 \pm 0.27	6.16 \pm 0.39	6.24 \pm 0.39	6.39 \pm 0.22	0.335	0.801

注: † 与 0.0 h 处理组比较, $P < 0.05$

表 3 Nicotine 和 CDDP 联合处理后 A549 细胞凋亡相关蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	p-Mcl-1	Mcl-1	Bcl-2	Bak
对照组	23.02 \pm 1.76	94.26 \pm 1.55	25.52 \pm 3.64	7.15 \pm 2.13
CDDP 组	15.58 \pm 1.25 ¹⁾	21.84 \pm 1.93 ¹⁾	9.42 \pm 0.64 ¹⁾	13.55 \pm 2.71 ¹⁾
CDDP+Nicotine 组	22.18 \pm 1.84 ¹⁾²⁾	88.21 \pm 4.50 ¹⁾²⁾	70.38 \pm 3.74 ¹⁾²⁾	15.05 \pm 0.39 ¹⁾
F 值	23.830	52.811	41.143	96.150
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CDDP 组比较, $P < 0.05$

Nicotine 和 CDDP 联合处理后, CDDP+Nicotine 组 A549 细胞的 p-Mcl-1、Mcl-1、Bcl-2 和 Bak 的表达, CDDP 组较对照组的 p-Mcl-1、Mcl-1、Bcl-2 的表达均降低, Bak 的表达升高。较 CDDP 组 p-Mcl-1、Mcl-1、Bcl-2 的表达均升高, Bak 的表达无变化。

3 讨论

肺癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤, 超过乳腺癌, 前列腺癌和结肠癌的总和^[6]。到目前为止, 许多治疗手段, 如手术、放化疗、免疫治疗和其他一些有针对性的方法已应用于肺癌治疗^[7]。CDDP 是用于治疗各种人类恶性肿瘤最有效和广泛使用的 DNA 损伤抗癌药物之一。然而, 目前肺癌患者往往会对 CDDP 产生耐药性, 导致化疗失败^[8]。因此, 更好地了解肺癌中 CDDP 耐药的分子机制对于肺癌的靶向治疗和改善肺癌患者的预后非常必要。

吸烟是肺癌最大的危险因素, 约占非小细胞肺癌的 70% 和小细胞肺癌的 90%^[9]。Nicotine 是烟草中的主要成分, 可致癌且令人上瘾^[10]。最近的报道显示 Nicotine 抑制各种肺癌细胞凋亡, 这暗示 Nicotine 不仅具有促进肺癌细胞增殖的能力, 也可通过降低化疗药物的功效来促进肺癌细胞生存^[11]。笔者的研究表明, Nicotine 确实可以降低肺癌细胞 A549 对化疗药物 CDDP 的敏感性, 减少化疗过程中的肺癌细胞凋亡。

Bcl-2、Bak 和 Mcl-1 是 Bcl-2 基因家族的成员, Bak 是主要促凋亡蛋白, 在细胞凋亡中发挥重要作用。Mcl-1 的半衰期较短, 只有 0.5~3.0 h。因此, 延长 Mcl-1 蛋白半衰期对其长期促生存功能至关重要。Mcl-1 蛋白可以在 T163 位点磷酸化, 其磷酸化可以延长 Mcl-1 的半衰期, 增强抗凋亡功能。A549 细胞经 Nicotine 处理后, Nicotine 不仅上调 Mcl-1 的表达水平, 还增强其 T163 位点磷酸化水平。因此, Nicotine 促进 A549 细胞的增殖, 还降低其化疗敏感性可能通过上调 Bcl-2 和 Mcl-1 的表达, 以及 Mcl-1 的 T163 位点磷酸化水平。进一步的实验研究可以探讨 Mcl-1 是否可以作为肺癌靶向治疗的靶点或候选基因。

有研究证明 Nicotine 可以从肺癌细胞的乙酰胆碱受体上取代乙酰胆碱, 并激活 PI3K、Akt、MAPK、PKC 等蛋白激酶, 引起 Bcl-2 家族部分蛋白的表达及其磷酸化情况发生变化^[12-14]。而 Nicotine 是否通过激活 PI3K、Akt、MAPK、PKC 等蛋白激酶和 Bcl-2 家族蛋白诱导肺癌细胞耐药尚不明确, 进一步探索 Nicotine

诱导肺癌细胞耐药的分子机制可为肺癌治疗发现新的治疗靶点, 为肺癌的治疗提供新的治疗策略。

参考文献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] CHEN Z, FILLMORE C M, HAMMERMAN P S, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(8): 535-546.
- [4] YUMEI HUANG K H S Z, ZHAO X D T Z, CHEN G W S X. S6K1 phosphorylation-dependent degradation of Mxi1 by β -Trcp ubiquitin ligase promotes Myc activation and radioresistance in lung cancer[J]. *Theranostics*, 2018, 8(5): 1286-1300.
- [5] PEREZ-RUBIO G, SANSORES R, RAMIREZ-VENEGAS A, et al. Nicotine addiction development: From epidemiology to genetic factors[J]. *Rev Invest Clin*, 2015, 67(6): 333-343.
- [6] LIN J, KAMAMIA C, SHAO S, et al. Lung, breast, and prostate cancer patients with unknown ethnicity in US department of defense cancer registry data: Comparisons to patients with known ethnicity[J]. *J Registry Manag*, 2017, 44(1): 17-29.
- [7] HELFRICH B A, GAO D, BUNN P A. Eribulin inhibits the growth of small cell lung cancer cell lines alone and with radiotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2018, 118(4): 148-154.
- [8] XIAO H, LIU Y, LIANG P, et al. TP53TG1 enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-18a/PTEN axis[J]. *Cell Biosci*, 2018, 23(8): 2-13.
- [9] GREILLIER L, CORTOT A B, VIGUIER J, et al. Perception of lung cancer risk: Impact of smoking status and Nicotine dependence[J]. *Current Oncology Reports*, 2018, 20(S1): 18.
- [10] ZHANG C, YU P, ZHU L, et al. Blockade of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors inhibit nicotine-induced tumor growth and vimentin expression in non-small cell lung cancer through MEK/ERK signaling way[J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(6): 3309-3318.
- [11] NISHIOKA T, LUO L, SHEN L, et al. Nicotine increases the resistance of lung cancer cells to cisplatin through enhancing Bcl-2 stability[J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 110(7): 1785-1792.
- [12] RAFAL CZYŻYKOWSKI J P P P. Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment-possible mechanisms* Indukowana przez nikotynę oporność niedrobnokomórkowego raka płuca na terapię-możliwe mechanizmy[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70(2016): 186-193.
- [13] GRANDO S A. Connections of nicotine to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6): 419-429.
- [14] ZHAO J, XIN M, WANG T, et al. Nicotine enhances the antiapoptotic function of Mcl-1 through phosphorylation[J]. *Molecular Cancer Research*, 2009, 7(12): 1954-1961.

(王荣兵 编辑)