

· 基础医学 ·

文章编号: 1002-0217( 2017) 01-0005-04

## AAVC-1 诱导 A549 细胞凋亡的线粒体机制研究

徐 成<sup>1</sup> 张根葆<sup>2,3</sup> 周淑艳<sup>2</sup> 桑金凤<sup>2</sup>

( 皖南医学院 1. 临床医学院; 2. 病理生理学教研室; 3. 蛇毒研究所, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 探讨皖南五步蛇蛇毒抑瘤组分 I ( AAVC-1) 诱导人非小细胞型肺癌 A549 细胞凋亡的作用, 并分析其可能的线粒体机制。方法: 以不同作用浓度的 AAVC-1 处理 A549 细胞, 采用 Annexin V /PI 双染流式细胞仪分析法检测 A549 细胞凋亡百分率; JC-1 检测细胞线粒体的膜电位变化, 免疫组化检测细胞色素 C 在线粒体内的分布。结果: 不同浓度梯度 AAVC-1 1.0、3.0、9.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 24 h 后, 与对照组相比, A549 细胞早期凋亡率明显增加 ( $P < 0.05$ ); 线粒体膜电位绿色荧光百分比由 ( $23.01 \pm 6.07$ ) % 上升至 ( $87.26 \pm 9.54$ ) % ( $P < 0.01$ ) 荧光显微镜观察到绿色荧光增强; 免疫组化显示 随着 AAVC-1 浓度增加, 胞质内细胞色素 C 平均光密度值明显增加 ( $P < 0.05$ )。结论: AAVC-1 可以通过降低线粒体膜电位和促进细胞色素 C 的释放, 激活线粒体通路诱导人非小细胞型肺癌 A549 的凋亡。

**【关键词】**五步蛇毒抑瘤组分 I; 非小细胞型肺癌; 线粒体; 细胞凋亡

**【中图分类号】**R 734.2 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.01.002

## Mitochondrial mechanism of AAVC-1 induced apoptosis in A549 cells

XU Cheng ZHANG Genbao ZHOU Shuyan SANG Jinfeng

School of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the apoptosis pathway and mechanisms of human non-small cell lung cancer A549 cells induced by anticoagulant fraction from *Agkistrodon acutus venom* (AAVC-1). **Methods:** Different dose of AAVC-1 was used to treat A549 cells, and the apoptosis percentage of A549 cells was assessed by flow cytometry with annexin V/PI double staining. Mitochondrial trans-membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) of A549 cells was measured by JC-1 fluorescence probe and microscopy, and distribution of cytochrome C in the mitochondria was detected by immunohistochemistry after AAVC-1 treatment. **Results:** The early apoptosis rate of A549 cells was significantly increased after treatment with different dose of AAVC-1 for 24 h as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The fluorescence green intensity was increased from ( $20.13 \pm 1.6$ ) % to ( $89.12 \pm 1.2$ ) % ( $P < 0.01$ ), and fluorescence spectroscopy indicated intensified intracellular green fluorescence. Immunohistochemical test revealed markedly increased average light density of cytochrome C with added dose of AAVC-1 treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AAVC-1 can induce the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells by reducing the mitochondrial membrane potential and promoting the release of cytochrome C.

**【Key words】***Agkistrodon acutus venom* antitumor component I; non-small cell lung cancer; mitochondria; apoptosis

肺癌是威胁人类健康和生命的最常见的恶性肿瘤之一, 有报道指出我国肺癌的发病率和病死率有明显增高的趋势, 其中非小细胞型肺癌的恶性程度最高, 对放疗化疗均不敏感, 预后最差<sup>[1]</sup>。因此, 寻找有效安全的抗肿瘤药物是当前研究的一个热点问题。蛇毒生物学活性广泛, 是一种天然的药用资源, 富含多种酶类、蛋白质和多肽, 具有镇痛、抗凝、抗血栓、抗肿瘤等功效<sup>[2-3]</sup>, 其中抗肿瘤效应已越来越受

到重视<sup>[4]</sup>。本实验室前期从皖南地区五步蛇粗毒中分离纯化了一种抑瘤组分 I ( *Agkistrodon acutus venom*-I, AAVC-1), 研究表明, AAVC-1 可以剂量依赖性抑制人非小细胞肺癌细胞 A549 的体外增殖和诱导其凋亡, 但其确切的机制尚不清楚<sup>[5]</sup>。本实验进一步探讨 AAVC-1 诱导 A549 细胞凋亡的线粒体机制, 为 AAVC-1 可能的临床应用提供一定的理论依据。

基金项目: 皖南医学院大学生科研资助项目 (RG20151204); 安徽高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2011A266)

收稿日期: 2016-09-23

作者简介: 徐 成 (1993-), 女, 2012 级临床医学专业本科生 (电话) 18356976912 (电子信箱) 1165911631@qq.com;

张根葆, 男, 教授, 硕士生导师 (电子信箱) zgb858@163.com, 通信作者。

### 1 材料与方法

1.1 试剂、药品和仪器 五步蛇毒抑瘤组分 I (AAVC-1) 冻干粉由皖南医学院蛇毒研究所提供。无支原体胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI 1640 (Hyclone)、胰蛋白酶 (Gibco-brl)、JC-1 检测试剂盒、细胞色素 C 单克隆抗体、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂均购自浙江碧云天生物技术研究所 (进口分装产品); 免疫组化试剂盒为武汉博士德公司产品; MUSE 智能触控细胞分析仪 (德国, Milipore 公司)、倒置荧光显微镜 (日本, OLYMPUS IX51)、二氧化碳培养箱 (美国, Thermo 公司)、超净工作台 (上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 细胞培养和分组 人肺癌细胞 A549 由皖南医学院蛇毒研究所留存, 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 RPMI1640 中, 置于 5%CO<sub>2</sub> 恒温 37℃ 细胞培养箱中常规培养。设置对照组 (加入等体积的细胞培养液), 实验组 (分别加入 1.0、3.0、9.0、20.0 μg/mL AAVC-1), 以及 CCCP 组 (CCCP 作为一种质子载体, 强效的线粒体氧化磷酸化解偶联剂, 可使线粒体内膜两侧的膜电位彻底丧失<sup>[6]</sup>)。

### 1.3 方法

1.3.1 Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡 各组细胞培养 24 h 后, 细胞样本均分 3 份。处理细胞及加入试剂的具体操作参照凋亡检测试剂盒说明。细胞消化、离心, 收集悬浮细胞, 弃培养基。用冷 PBS 洗涤细胞两次。用 400 μL 1X Binding Buffer 悬浮细胞, 浓度大约为 1 × 10<sup>6</sup>/mL。在细胞悬浮液中加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 2~8℃ 避光条件下孵育 15 min。加入 10 μL PI 后轻轻混匀于 2~8℃ 避光条件下孵育 5 min。使用 MUSE 智能触控细胞分析仪分析样本。样本最少细胞数为 1×10<sup>5</sup> 个。以上检测重复 3 遍。

1.3.2 JC-1 检测线粒体膜电位变化 依据 JC-1 检测试剂盒使用说明进行操作。JC-1 是一种广泛用

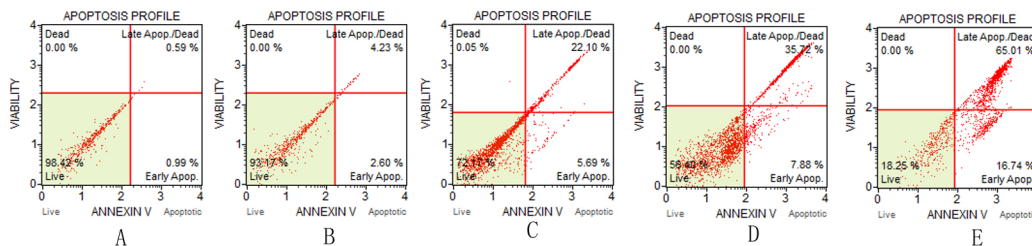
于检测线粒体膜电位的理想荧光探针, 取对数增殖期细胞, 将细胞接种于 6 孔板, 分别设置对照组 (加入等量的培养基), CCCP (1 μg/mL CCCP 处理 20 min) 以及不同浓度的 AAVC-1 (1.0、3.0、9.0、20.0 μg/mL) 实验组, 37℃ 孵育 24 h, 重复 3 次, 荧光显微镜下观察线粒体膜电位改变, 用 Image pro plus 6.0 软件的 Color Histogram 模板计算出 5 个视野绿色荧光强度的平均值, 以平均荧光强度做统计分析, 定量线粒体膜电位水平。

1.3.3 免疫组化检测胞质细胞色素 C (cyto.c) 含量 制备细胞爬片, 待铺满 60%~80% 后弃原培养液, PBS 洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 洗 3 次, 再加 0.5% Triton X-100 室温下封闭 15 min, PBS 洗 3 次, 加入抗细胞色素 C 兔单克隆抗体 1:200 (阴性对照组加 PBS), 37℃ 过夜, PBS 洗 3 次, 再加生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 加 DAB 显色液, 显微镜下控制显色, 苏木精复染, 水洗, 1% 盐酸酒精分化, 酒精梯度脱水, 最后中性树胶封片, 倒置显微镜观察拍照, 用 Image pro plus 6.0 软件的 Color Histogram 模板计算出 5 个视野平均光密度值, 以平均光密度值来定量细胞色素 C 表达水平。

1.4 统计分析 实验数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异采用单因素方差分析, 两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 AAVC-1 诱导 A549 细胞的凋亡 AAVC-1 作用于 A549 细胞 24 h 后, 利用 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测, 左下限为正常细胞群, 右下限为早期凋亡细胞群, 右上限为晚期凋亡细胞和坏死细胞群<sup>[7]</sup>。结果如图 1 所示, 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率也相应增加。当 AAVC-1 在 1.0 ~ 20.0 μg/mL 范围时, A549 细胞早期凋亡率分别为 0.99%、2.60%、5.69%、7.88%、16.74%, 而对照组细胞凋亡无明显改变。



A: 对照组; B~E: AAVC-1 1.0、3.0、9.0、20.0 μg/mL 处理组。

图 1 AAVC-1 诱导 A549 细胞早期凋亡的百分率

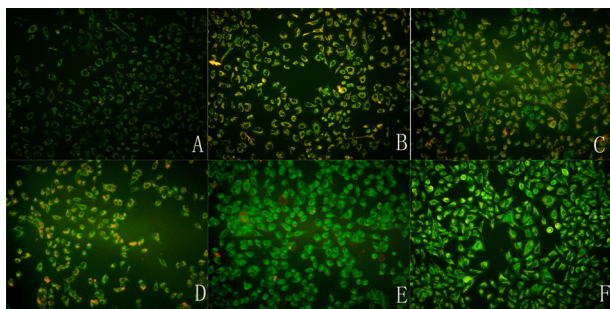
2.2 AAVC-1 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 是一种用于检测线粒体膜电位的荧光探针,可以检测细胞组织或纯化的线粒体膜电位<sup>[6]</sup>。当线粒体膜电位水平较高时,JC-1 聚集在线粒体基质中,形成聚合物,呈高红低绿;当膜电位水平较低时,JC-1 主要以单体形式存在于胞质中,呈高绿低红。各组 A549 细胞绿色荧光百分比见表 1 随着 AAVC-1 浓度的增加,绿色荧光逐渐增强( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) ,提示 AAVC-1 处理的 A549 细胞的线粒体膜电位水平明显下降(图 2)。

表 1 AAVC-1 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	绿色荧光百分比/%
Control	11.00±4.06
AAVC-1 1.0 μg/mL	23.01±6.07*
AAVC-1 3.0 μg/mL	51.61±6.99**
AAVC-1 9.0 μg/mL	64.05±6.20**△
AAVC-1 20.0 μg/mL	87.26±9.54**△
CCCP	92.62±12.26**
F 值	86.513
P 值	0.000

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 AAVC-1 1.0 μg/mL 组比较,△ $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B~E: AAVC-1 1.0、3.0、9.0、20.0 μg/mL 处理组; F: CCCP 组。

图 2 AAVC-1 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响(200×)

2.3 AAVC-1 增加 A549 细胞线粒体细胞色素 C 的释放 免疫组化检测结果显示,在实验组 AAVC-1 孵育 A549 细胞 24 h 后,细胞胞质内出现明显的黄染颗粒,镜下细胞体积缩小,细胞间隙增大,胞质染色加深,随 AAVC-1 浓度的增加,细胞色素 C 平均光密度值也逐渐升高,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) ,见表 2。对照组细胞呈长梭形,边界清晰,胞质内黄染颗粒不明显。

表 2 各组细胞色素 C 平均光密度值( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	平均光密度值
Control	0.05±0.02
AAVC-1 1.0 μg/mL	0.37±0.10*
AAVC-1 3.0 μg/mL	0.44±0.43**
AAVC-1 9.0 μg/mL	0.54±0.84**
AAVC-1 20.0 μg/mL	0.79±0.10**
F 值	8.587
P 值	0.000

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞线粒体是细胞能量供应的场所,氧化磷酸化、电子传递、三羧酸循环等均依赖线粒体,当线粒体膜结构或功能受到破坏时,能量代谢异常,可引起细胞凋亡。有文献报道指出,线粒体死亡途径是细胞凋亡发生的主要机制之一<sup>[8]</sup>,当 Bax 蛋白和线粒体膜上的电位依赖性离子通道相结合,膜通透性改变,线粒体的膜电位  $\Delta\psi_m$  降低,细胞色素 C 和凋亡诱导因子 AIF 从线粒体释放入胞质,在 dATP 或 ATP 的作用下,和凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合,激活下游的 casapase-9,三者形成凋亡复合物,再进一步激活关键的凋亡蛋白 casapase-3,继而引发细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。AAVC-1 是从皖南五步蛇粗毒中分离纯化的一种抑瘤组分,具有明显的抑制肿瘤细胞增殖和促进凋亡的效应<sup>[5]</sup>。本实验结果进一步证实了 AAVC-1 的促细胞凋亡作用,20.0 μg/mL AAVC-1 可使人非小细胞肺癌 A549 细胞早期凋亡百分率达 16.97%。JC-1 荧光探针用来检测细胞膜电位改变,当线粒体的膜电位较高时,JC-1 主要以聚合物的形式聚集在胞质中,呈红色荧光;当膜电位浓度降低时,JC-1 以单体的形式,散在分布于胞质中,呈绿色荧光<sup>[6]</sup>。实验发现,不同浓度 AAVC-1 处理 24h 均会引起 A549 细胞线粒体膜电位  $\Delta\psi_m$  降低,绿色荧光百分比高于对照组( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) ;实验还观察到 AAVC-1 各浓度组(1.0~20.0 μg/mL)引起线粒体膜电位降低的程度小于 CCCP 组( $P < 0.05$ ) ,提示 AAVC-1 可以诱导线粒体膜电位的降低,但未使线粒体膜电位彻底崩溃。同时,免疫组化结果也显示实验组 AAVC-1 孵育 A549 细胞 24 h 后胞质内出现明显的黄染颗粒,细胞色素 C 平均光密度值也明显升高,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明,AAVC-1 可以通过降低 A549 细胞线粒体膜电位  $\Delta\psi_m$ ,诱导细胞色素 C 从细胞线粒体释放至胞质,从而导致细胞凋亡。

(下转第 15 页)

色透明液体 带有泥土气息 在工业上主要用作有机合成原料和溶剂; 侧柏酮( Thujone) 有类似薄荷醇的气味, 能作用于大脑中的 GABA 受体和 5-HT<sub>3</sub> 受体<sup>[14]</sup>, 使大脑产生兴奋作用; 蒿酮( 1, 5-Heptadien-4-one, 3, 3, 6-trimethyl- )、蒿醇( Artemisol) 等成分有抑制细菌、病毒的作用。

本研究采用 GC-MS 对安徽产地的艾叶挥发油进行分析, 使我们对该地区艾叶挥发油成分有了更进一步了解, 为艾叶挥发油的综合利用率奠定了理论基础。

### 【参考文献】

[1] 李慧. 艾叶的药理研究进展及开发应用[J]. 基层中药杂志, 2002, 16( 3) : 51-53.  
 [2] 黄学红, 谢元德, 朱婉萍, 等. 艾叶油治疗慢性支气管炎的实验研究[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41( 12) : 734-735.  
 [3] 邱洁芬, 胡遵荣. 试述艾叶的药理作用及临床应用[J]. 实用中医药杂志, 2003, 19( 8) : 446-447.  
 [4] 江国华, 张文惠, 崔峻. 艾叶研究近况[J]. 江西中医学院学报, 1998, 10( 4) : 192-193.  
 [5] 徐新建, 宋海, 薛国庆, 等. 不同提取方法对艾叶挥发油成分的影响[J]. 河西学院学报, 2008, 24( 5) : 42-44, 6.

[6] 曾虹燕, 张晓云, 冯波. 超临界 CO<sub>2</sub> 和微波辅助萃取艾叶挥发油工艺的研究[J]. 广西植物, 2005( 3) : 285-288.  
 [7] 周燕芳, 丁利君. 超声波辅助提取艾叶黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械, 2006, 22( 4) : 39-41.  
 [8] 刘志成, 杨民生, 申湘忠. 微波辅助法提取艾叶总黄酮的研究[J]. 湖南人文科技学院学报, 2008( 2) : 12-15.  
 [9] 江丹, 易筠, 杨梅, 等. 不同品种艾叶挥发油的化学成分分析[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4( 5) : 339-344.  
 [10] 阳一兰, 石峰, 詹国平, 等. 艾叶挥发油的提取及其化学成分分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41( 12) : 5267-5271.  
 [11] 廖传华, 黄振仁. 超临界流体与食品深加工[M]. 北京: 中国石化出版社, 2007.  
 [12] EGOROV AG, MAZO AB, MAKSUDOV RN. Extraction from a polydisperse granular layer of milled oilseeds with supercritical carbon dioxide[J]. Theoretical Foundations of Chemical Engineering, 2010, 44( 5) : 642-650.  
 [13] BOZAN B, TEMELLI F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of flaxseed[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79( 3) : 231-235.  
 [14] DEIMLT, HASENEDER R, ZIEGLCÄNSBERGER W *et al.* Alpha-thujone reduces 5-HT<sub>3</sub> receptor activity by an effect on the agonist-reduced desensitization[J]. Neuropharmacology, 2004, 46( 2) : 192-201.

( 上接第 7 页)

### 【参考文献】

[1] WAKELEE H, RAMALINGAM S, BELANI CP *et al.* Docetaxel in advanced non-small cell lung cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2005, 5( 1) : 13-24.  
 [2] ZHANG L, CUI L. A cytotoxin isolated from Agkistrodon acutus snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21( 6) : 1095-1103.  
 [3] 陈念, 付晓燕, 江伟健, 等. 蛇毒蛋白的分类和应用[J]. 中国新药杂志, 2009, 18( 13) : 1204-1011.  
 [4] JANEYUTH CHAISAKUL, WAYNE C HODGSON, SANJAYA KURUPPU *et al.* Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer[J]. Journal of Cancer, 2016, 7( 11) : 1571-1578.  
 [5] 徐平, 张根葆, 王斐, 等. 尖吻蝮蛇毒抑瘤组分 I 对人肺癌 A549 细胞增殖抑制作用. [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19( 5) : 493-496.

[6] ANTOINE T, FISHER N, AMEWU R *et al.* Rapid kill of malaria parasites by artemisinin and semi-synthetic endoperoxides involves ROS-dependent depolarization of the membrane potential[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69( 4) : 1005-1016.  
 [7] KHAN A, GILLIS K, CLOR J *et al.* Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyze[J]. Postepy Biochem, 2012, 58( 4) : 492-498.  
 [8] ESTAQUIER J, VALLETTE F, VAYSSIERE JL *et al.* The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Med Biol, 2012, 942: 157-183.  
 [9] GARCÍA-SÁEE AJ. The secrets of the Bcl-2 family[J]. Cell Death Differ, 2012, 19( 11) : 1733-1740.  
 [10] HOU LL, ZHOU LY, LUO KQ *et al.* Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 2005, 10( 2) : 289-299.