

沙蚕活性蛋白酶诱导人肺癌 SPC-A-1 细胞凋亡的机制研究

张国梅¹, 杨最素¹, 丁国芳^{1,2}, 黄芳芳¹, 赵玉勤¹

(1. 浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

(2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021)

摘要: 本文探讨了沙蚕活性蛋白酶(Nereis active protease, NAP)诱导 SPC-A-1 细胞凋亡机制。采用 MTT 法检测 NAP 对 SPC-A-1 细胞的抑制作用, 倒置显微镜及 AO/EB 染色观察 SPC-A-1 细胞的形态学的变化, 采用流式细胞术检测细胞早期凋亡率和细胞膜电位的变化; 并通过 Western Blotting 检测细胞中凋亡相关蛋白的表达变化。NAP 对 SPC-A-1 细胞活性具有明显的抑制作用且呈现剂量和时间的依赖性; NAP 作用后细胞出现凋亡的形态学特征; 经流式细胞术检测结果显示, 随着 NAP 作用浓度的增加, SPC-A-1 细胞的早期凋亡率从 13.50% 提高到 22.98%, 且线粒体膜电位下降所占的百分率从 12.95% 提高到 25.28%。Western Blotting 结果显示, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NAP 作用 24 h 后, Bax/Bcl-2 的比率相对对照组明显增加了 6.05 倍; Cyt-C、Cleaved-Caspase 9、Cleaved-Caspase 3、Cleaved-PARP 等含量显著上调, 相对表达量分别达到对照组的 2.32、3.07、3.68、1.36 倍。NAP 诱导 SPC-A-1 细胞凋亡的作用机理有可能是通过下调 Bcl-2 蛋白的表达、上调 Bax 蛋白的表达, 进而诱导线粒体膜电位的下降, 促使 Cyt-C 的转移以及激发 Caspase 家族发生级联反应最终导致 SPC-A-1 细胞的凋亡。

关键词: 海洋药物; 沙蚕; 蛋白酶; 抗肺癌; 细胞凋亡

文章编号: 1673-9078(2015)3-6-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.002

The Mechanism of Nereis Active Protease-induced Apoptosis in Lung Cancer SPC-A-1 Cells

ZHANG Guo-mei¹, YANG Zui-su¹, DING Guo-fang^{1,2}, HUANG Fang-fang¹, ZHAO Yu-qing¹

(1. School of Food Science and Pharmacy of Zhe Jiang Ocean University, Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhoushan 316022, China) (2. Zhejiang Marine Fisheries Research Institution, Zhoushan 316021, China)

Abstract: This study aims to investigate the mechanism of Nereis active protease (NAP)-induced SPC-A-1 cell apoptosis. The effect of NAP on the activity of SPC-A-1 cells was examined by MTT assay. Typical morphologic changes were observed in the SPC-A-1 cells by inverted microscopy and AO/EB staining. The early-stage apoptotic rate and membrane potential were detected using flow cytometry, and the protein expressions of apoptosis-related genes were examined via western blotting. The results showed that NAP significantly inhibited the activity of SPC-A-1 cells in a time- and dose-dependent manner. The flow cytometry (FCM) studies revealed that the percentage of the early-stage apoptotic SPC-A-1 cells that were treated with increasing concentrations of NAP for 24 h increased from 13.50% to 22.98%, and the percentage of cells with decreased mitochondrial membrane potential increased from 12.59% to 25.28%. After treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NAP for 24 h, the Bcl-2/Bax expression ratio relative to the control group increased by a factor of 6.05. The expression levels of Cyt-C, Cleaved-caspase 9, Cleaved-caspase 3, and Cleaved-PARP relative to the control group significantly increased by a factor of 2.32, 3.07, 3.68, and 1.36, respectively. In conclusion, NAP inducing apoptosis of SPC-A-1 cells by decreasing the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and upregulating the expression of Bax, thereby inducing the decrease of mitochondrial membrane potential which then promoting the transfer of Cyt-C and activate the cascade of caspase family.

Key words: marine drugs; nereis; protease; anti-cancer; apoptosis

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273429); 浙江省科技厅重大专项 (2011002003, 2010R50029, 2013003036); 浙江省自然科学基金立项 (LY12C20005, LY12C20008); 舟山市科技计划项目 (2012G21013, 2012G23023); 作者简介: 张国梅 (1989-), 女, 硕士生, 海洋药物、海洋功能食品; 通讯作者: 丁国芳

肺癌是目前世界上发病率和死亡率居高不下的恶性肿瘤之一,其主要原因是肺癌缺乏早期症状,发病比较隐匿,确诊时已是中晚期。目前的治疗方案主要是化疗和手术,虽然可以增加患者的存活率,但患者经长期化疗严重影响重要脏器,且会产生肿瘤耐药性^[1]。海洋环境具有高盐、高压、低温等迥异于陆地环境的特点,许多海洋生物在这种极端环境中产生了大量不同于陆地生物、结构新颖的活性物质。随着近年来对海洋药物的研究发现,很多的海洋活性物质可以通过多种方式显著地抑制肿瘤的生长。因此从海洋生物中寻找低毒、高效的新型抗癌药物成为新的趋势。

沙蚕属于环节动物门,多毛纲,游走目,沙蚕科,刺沙蚕属,无脊椎动物,广泛分布于日本海与太平洋沿岸,属日本和中国特有品种。近年来,国内外对于沙蚕体内生物活性物质的研究逐渐增多,日本学者从沙蚕中分离出具有生物活性的多肽,这些多肽对环节动物的食管具有较强的收缩作用^[2],吉林大学白求恩医学院首次从沙蚕体内分离纯化出蛋白酶,该蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶,分子量为 29 kD,等电点为 4.4,最适温度 60℃,具有很强的降解纤维蛋白及纤维蛋白原作用,其水解顺序先是 A α 链接着是 B β 链最后水解 γ 链^[3],并且研究发现沙蚕蛋白酶在体外对多种白血病细胞具有显著抑制作用^[4-5]。但目前尚未见沙蚕活性蛋白酶(Nereis active protease, NAP)对肺癌细胞作用的研究报道。本实验以体外培养的肺癌 SPC-A-1 细胞株为研究对象,观察 NAP 对 SPC-A-1 细胞生长的影响,并对其诱导细胞凋亡及作用机制进行初步的探讨,为今后进一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

沙蚕活性蛋白酶由吉林大学白求恩医学院洪敏教授提供,MTT、RPMI-1640 培养基, Gibco 公司;胎牛血清(FBS),杭州四季青生物科技公司;Annexin V-FITC/PI 双染试剂,上海贝博生物;Bcl-2、Bax、Cyt-C、Caspase-9、Caspase-3、PARP 抗体与辣根酶标记的山羊抗小鼠辣根酶标记抗体、山羊抗兔辣根酶标记抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞株

人肺癌 SPC-A-1 细胞株购于中科院上海细胞库,由本实验室传代保存。

1.3 仪器与设备

CF16RX II 型高速低温离心机,日本日立公司;酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;easy Cyte6 HT-2L 流式细胞仪,美国 Millipore 公司;CKX4 倒置显微镜,OLYMPUS 公司;BX2-FLB3 荧光显微镜,OLYMPUS 公司;500 万像素 Pro-MicroScan CCD,日本 OLYMPUS 公司;电泳仪,美国 Bio-Rad;Fluor Chem FC3 化学发光成像分析系统,美国 Alpha 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

SPC-A-1 细胞接种于含有 10% FBS、双抗(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)溶液的 RPMI-1640 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下的培养箱中常规培养;当细胞生长饱和度超过 80% 时,按 1:2 的比例进行传代培养。

2.2 细胞活性抑制实验(MTT 法)

将 SPC-A-1 细胞以每孔约 1×10^4 个细胞数接种于 96 孔培养板中,每孔培养液 200 μ L。设对照组和加药组,对照组 0 μ g/mL 的 NAP,加药组 NAP 的药物浓度在前期粗筛基础上,确定给药浓度在细胞抑制率从 20% 到 90% 之间,分别为 30 μ g/mL、35 μ g/mL、40 μ g/mL、45 μ g/mL、50 μ g/mL 的 NAP,同时设置 6 个平行。常规条件下培养 12 h、24 h、36 h 后,弃培养液,每孔加入加 PBS 180 μ L,MTT 溶液 20 μ L,孵育 4 h 终止培养,加 DMSO 选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光密度值 A,重复试验 3 次。细胞活性抑制率 IR 公式如下: IR (%) = [(对照组 A 值 - 加药组 A 值) / 对照组 A 值] \times 100%。

2.3 倒置显微镜观察细胞形态

于 6 孔培养板内放入经泡酸、高压灭菌过的盖玻片,将浓度约为 1×10^5 个/mL SPC-A-1 细胞悬液接种于培养板中的盖玻片上,常规条件下培养 24 h。弃培养液,分别加入含 30 μ g/mL、40 μ g/mL、50 μ g/mL 的 NAP 的培养液继续培养,并设立空白对照组。24 h 后,倒置显微镜下观察并拍片。

2.4 AO/EB 荧光染色观察细胞形态

细胞接种与实验分组同 2.3。24 h 后,取盖玻片,用 95% 乙醇固定 30 min。取 AO 和 EB 各 1 mg 分别溶解于 10 mL pH 7.2 的 PBS 缓冲液中,摇匀混合,现配现用,避光保存。观察前于载玻片上滴加 50 μ L PBS 和 8 μ L AO/EB 混合液,有细胞的一面朝下,荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡率

SPC-A-1 细胞约为 1×10^5 接种在 25 mL 的培养瓶中, 常规培养 24 h 后加入分别含 30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 NAP 的培养液继续培养, 设立空白对照组。继续培养 24 h 后, 参照凋亡试剂盒中的操作方式进行。胰蛋白酶消化, 预冷的 PBS 悬浮细胞, 1000 r/min 离心 5 min。去上清, 加入 $1 \times$ Annexin V 结合液 400 μL 吹打混匀。加入 5 μL Annexin V-FITC 染液, 混匀后避光孵育 15 min 后, 再加入 10 μL 的 PI, 室温下在暗室静置 5 min 后过 200 目筛子, 置于流式细胞仪进行检测。

2.6 流式细胞仪分析细胞膜电位变化

细胞接种与实验分组同 2.5。培养 24 h 后, 细胞膜电位检测参照试剂盒中的操作方式进行。培养结束, 胰酶消化细胞转移到离心管中, 再用 3 mL PBS 洗涤细胞两次, 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 取 500 μL $1 \times$ Incubation Buffer, 加 1 μL 的 JC-1; 吸取 500 μL 的 JC-1 工作液将细胞悬浮, 放置于 37°C 、5% CO_2 条件下的细胞培养箱中孵育 20 min; 1500 r/min 离心 5 min 并收集细胞, 用 $1 \times$ Incubation Buffer 悬浮细胞, 重复两次; 最后将用 $1 \times$ Incubation Buffer 悬浮均匀的细胞过 200 目筛子, 置于流式细胞仪进行检测。

2.7 Western Blotting 检测蛋白表达

药物浓度及分组设置同 2.3, 加入 RIPA(250 $\mu\text{L}/50 \text{ mm}^2$)+PMSF(10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 后反复吹打, 冰上细胞裂解 30 min。收集细胞裂解液, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液。按照测定的蛋白含量取等体积的蛋白提取液, 与 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液按 1:4 的比例混合, 沸水浴 5 min 后, -80°C 储存备用。采用 SDS-PAGE 法, 按照实验需要先后配置分离胶和浓缩胶; 取蛋白样品各 25 μL 经上样缓冲液处理后上样, 电压 60 V 电泳 25 min 后转换电压 100 v, 电泳 90 min; 在转膜溶液中将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用含 20% Tween-20 的 TBST 溶液漂洗 1 次后, 将 PVDF 膜至于 5% 脱脂奶粉中 4°C 封闭 2 h; TBST 10 mL 溶液洗膜 2 次, TBS 10 mL 溶液洗膜 1 次, 将膜置于 1% BSA 溶液稀释后的一抗(稀释比例参照使用说明书)的杂交袋, 4°C 孵育过夜; 洗膜后加入 1% BSA 的溶液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例参照说明书), 4°C 摇床孵育 2 h 后, 洗膜后 ECL 显影, 应用 Alpha 化学发光仪进行扫描并记录光密度强度。以 β -actin 作为内参对照校正并做相对量分析, 数值以两者的光密度值积分比值表示。

2.8 数据分析

所有实验组均进行 3 次平行试验, 实验数据使用 SPSS 18.0 统计软件分析处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与讨论

3.1 NAP 对 SPC-A-1 细胞活性的影响

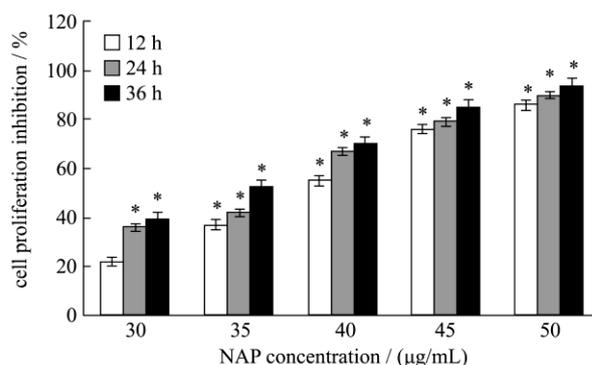


图1 NAP 对 SPC-A-1 细胞活性的影响

Fig.1 The effect of NAP treatment on the proliferation of SPC-A-1 cells

不同浓度 NAP 作用后对 SPC-A-1 细胞活性的影响如图 1 所示, 当 NAP 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 作用细胞 12 h 时, 细胞活性的抑制率为 25.65%, 浓度增加至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率达到 86.09%, 半数抑制浓度率 (IC_{50}) 为 39.50 $\mu\text{g/mL}$; 随着作用时间的延长, 作用 24 h 时, IC_{50} 为 36.12 $\mu\text{g/mL}$; 作用 36 h 时, IC_{50} 为 32.33 $\mu\text{g/mL}$ 。随着 NAP 浓度的增加和作用时间的延长, 抑制指数明显上升, 与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.2 倒置显微镜下观察结果

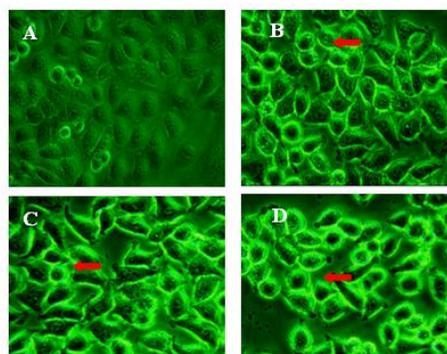


图2 倒置显微镜下的 SPC-A-1 细胞, $\times 400$

Fig.2 SPC-A-1 cells under an inverted microscope, $400 \times$

注: A 空白对照组, B 30 $\mu\text{g/mL}$ 组, C 40 $\mu\text{g/mL}$ 组, D 50 $\mu\text{g/mL}$ 组。

结果如图 2 所示, 正常组的 SPC-A-1 细胞生长良好, 细胞间排列紧密, 形态饱满。NAP 作用 24 h 后,

如 30 $\mu\text{g/mL}$ 组 SPC-A-1 细胞出现细胞间隙增大, 轮廓模糊, 形态不规则, 较多突起等现象, 胞质出现空泡; 高浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 组还出现了核固缩等细胞凋亡的形态学变化。

3.3 AO/EB 荧光观察结果

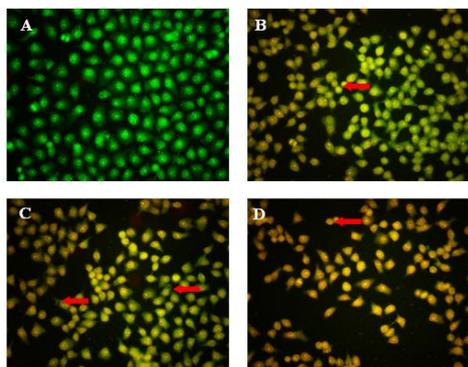


图 3 SPC-A-1 细胞形态, AO/EB 染色, $\times 200$

Fig3 The morphology of SPC-A-1 cells, AO/EB staining, $200\times$

注: A: 空白对照组, B: 30 $\mu\text{g/mL}$ 组, C: 40 $\mu\text{g/mL}$ 组, D: 50 $\mu\text{g/mL}$ 组。

NAP 作用于 SPC-A-1 细胞 24 h 后, 细胞经 AO/EB 染色, 出现了明显的早期凋亡的形态学特征。实验结果如图 3 所示, 正常对照组无明显凋亡细胞出现, 细胞大小均匀, 细胞核形态规则, 胞核及胞浆均呈现绿色荧光; 30 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞出现早期凋亡的现象, 胞质及胞核发生了变化, 胞质出现空泡, 并呈现强黄绿色荧光。随着用药浓度的增加, 50 $\mu\text{g/mL}$ 组早期凋亡的细胞和晚期凋亡的细胞明显增多, 细胞核呈固缩状, 呈现橘红色荧光。

3.4 流式细胞术检测结果

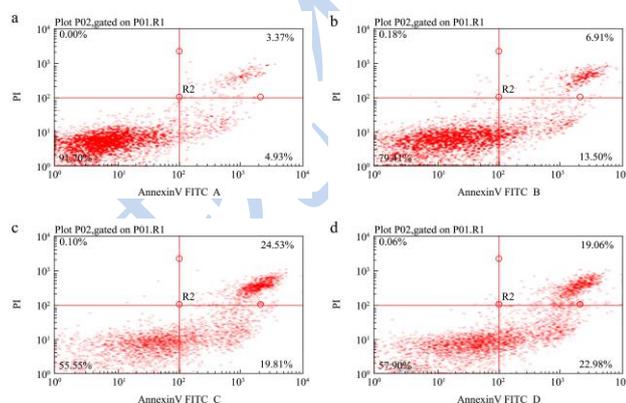


图 4 SPC-A-1 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染 24 h

Fig4 SPC-A-1 cells with Annexin V-FITC/PI staining for 24 h

注: a: 空白对照组, b: 30 $\mu\text{g/mL}$ 组, c: 40 $\mu\text{g/mL}$ 组, d: 50 $\mu\text{g/mL}$ 组。

如图 4 所示, 以 FITC 和 PI 荧光作双参数点图,

细胞分成 4 个区: 左下象限 (LL), 代表正常细胞; 左上象限 (UL), 代表机械损伤细胞; 右下象限 (LR), 为早期凋亡细胞; 右上象限 (UR), 为凋亡晚期或坏死细胞。从图中可见, 对照组细胞基本分布在 LL 区域, 也有 4.93% 的早期凋亡率, 但以不同浓度的 NAP 作用后, 早期凋亡细胞明显增多, 当 NAP 浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 早期凋亡率达到 22.98%。

3.5 SPC-A-1 细胞中线粒体膜电位的变化结果

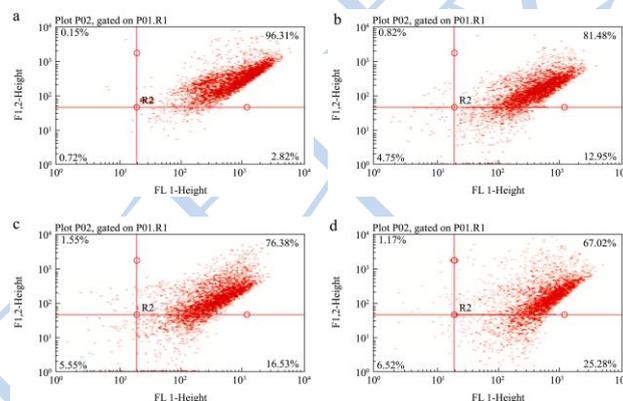


图 5 SPC-A-1 细胞线粒体膜电位的变化 24 h

Fig5 Changes in the mitochondrial membrane potential of SPC-A-1 cells at 24 h

注: a: 空白对照组, b: 0 $\mu\text{g/mL}$ 组, c: 40 $\mu\text{g/mL}$ 组, d: 50 $\mu\text{g/mL}$ 组。

细胞内线粒体对 JC-1 染料的摄取依赖于线粒体的膜电位, 正常情况下的 SPC-A-1 细胞线粒体的膜电位比较高, 呈现出红色荧光。当细胞受到损伤后, 线粒体的膜电位就会下降, 出现由红色荧光向绿色荧光的转变。当 NAP 作用 SPC-A-1 细胞 24 h 后, 利用线粒体对荧光探针染料 JC-1 的吸收情况, 采用流式细胞仪来检测线粒体的膜电位的变化。如图 5 所示, 每个图片中右上象限表示为正常线粒体的膜电位所占细胞的百分率 (即 JC-1 聚集在线粒体膜上), 右下象限则为线粒体的膜电位所降低的细胞百分率 (即 JC-1 释放为单体形式存在)。如实验结果显示, 30 $\mu\text{g/mL}$ 组可使 12.95% 的细胞呈绿色荧光 (即膜电位降低), 40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 组分别可使 16.53%、25.28% 的细胞呈现绿色荧光。

3.6 Western blotting 结果

SPC-A-1 细胞经不同浓度的 NAP 作用 24 h 后, Bcl-2、Bax、Cyt-C、Cleaved-caspase 9、Cleaved-caspase 3、PARP 的蛋白电泳条带结果如图 6 所示。经 Apha 化

学发光系统数据分析后各基因的蛋白水平表达如图 7 所示。Western blotting 结果显示, 50 $\mu\text{g/mL}$ NAP 组细胞中的 Bcl-2 蛋白表达水平较对照组明显降低, Bax 蛋白表达水平也显著增加, 较对照组差异具有显著性 ($P < 0.05$); Cyt-C、Cleaved-caspase 9、Cleaved-caspase 3 水平显著上调, 相对表达量分别达到对照组的 2.32、3.07、3.68 倍; 50 $\mu\text{g/mL}$ NAP 作用后, 细胞中 PARP 含量显著降低, 而 Cleaved-PARP 的水平则出现显著的上调。结果表明一定浓度的 NAP 对 Cyt-C、Cleaved-caspase 9、Cleaved-caspase 3、Bax 及 Cleaved-PARP 蛋白水平具有明显的上调作用, 对 Bcl-2、PARP 蛋白水平具有明显的下调作用。

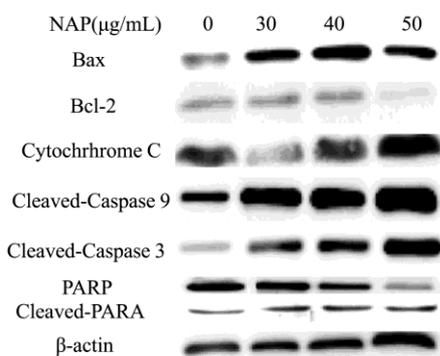


图 6 NAP 作用 SPC-A-1 细胞后 Bcl-2、Bax、Cytochrome C、Cleaved-caspase 9、Cleaved-caspase 3 和 PARP 的蛋白表达

Fig.6 Expression of Bcl-2, Bax, Cyt-C, Cleaved-caspase 9, Cleaved-caspase 3, and PARP proteins in SPC-A-1 cells treated with NAP for 24 h

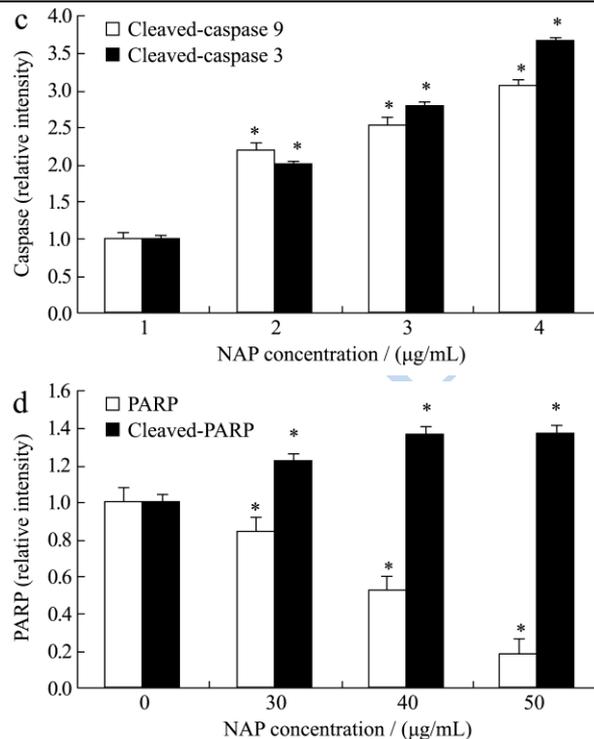
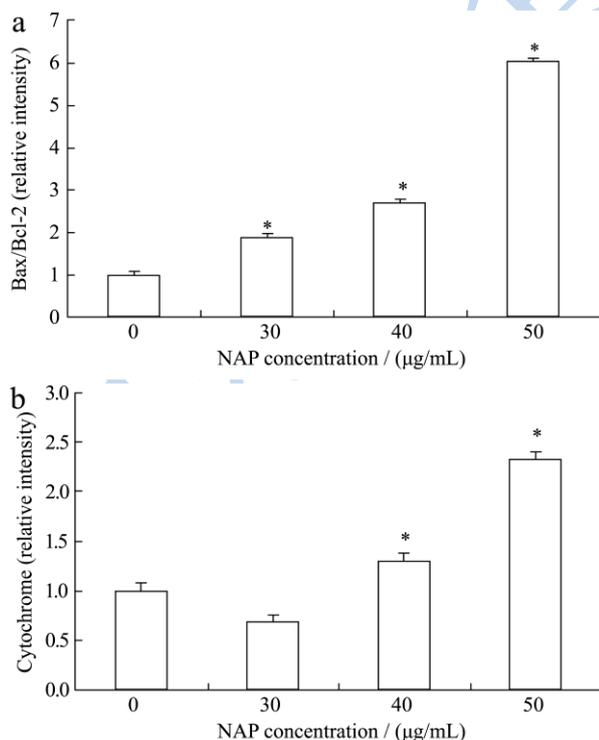


图 7 NAP 作用 SPC-A-1 细胞后各基因的蛋白表达水平示意图
Fig.7 The expression level of proteins related to apoptosis in SPC-A-1 cells treated with NAP for 24 h

注: a: Bcl-2/Bax 比值变化示意图; b: Cyt-C 蛋白含量变化示意图; c: Cleaved-Caspase 9,3 蛋白含量变化示意图; d: PARP、Cleaved-PARP 蛋白含量变化示意图。

本实验以沙蚕活性蛋白酶 (NAP) 为实验材料来探讨其对肺癌细胞株 SPC-A-1 的作用机制。MTT 法结果表明 NAP 对 SPC-A-1 细胞具有明显的增殖抑制作用, 呈现明显的剂量和时间依赖性。从倒置显微镜观察和 AO/EB 染色观察到 NAP 作用后 SPC-A-1 细胞出现凋亡的形态学变化, 而流式细胞术的检测结果表明 30 $\mu\text{g/mL}$ NAP 有促进 SPC-A-1 细胞凋亡并引起线粒体膜电位的改变, 且早期凋亡率和线粒体膜电位下降的百分率随其浓度的升高而逐渐增加。

细胞凋亡是一种由基因控制的程序化细胞死亡的方式, 通常包括外源性和内源性两条经典途径, 其中内源性凋亡途径是凋亡的主要过程^[6]。为了探究 NAP 诱导 SPC-A-1 细胞凋亡是否通过内源性凋亡途径, 我们通过 Western blotting 技术检测相关蛋白的表达情况。Bcl-2 家族在调节内源性途径的启动期发挥了至关重要的作用^[7], 凋亡过程中, Bax 等促凋亡蛋白从细胞质转移至线粒体外膜, 改变线粒体膜的通透性, 使 Cyt-C 释放入细胞质。抗凋亡蛋白 Bcl-2 能阻止 Bax 的激活并移位至线粒体外膜, 从而阻止 Cyt-C 释放; Bcl-2 和 Bax 通过形成同二聚体或异二聚体对 Cyt-C

的释放进行调节^[8-10],所以细胞中 Bcl-2/Bax 比值决定了调控方向。结果显示经 30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 及 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 NAP 作用后, Bax 蛋白表达水平上升, Bcl-2 蛋白表达量明显下降,且 Bax/Bcl-2 比值上升,同时 Cyt-C 表达量显著上升。提示 NAP 通过上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,从而上调了 Bax/Bcl-2 的比值,促使 Cyt-C 释放,从上游促进了内源性细胞凋亡途径的启动。

在内源性细胞凋亡途径中后期,进入胞浆的 Cyt-C 与凋亡蛋白酶激活因子 1(Apaf-1)羧基端的 WD 重复序列以 2:1 比例形成 Apaf-1/Cyt-C 复合物,并促使 Apaf-1 构象发生变化,形成凋亡小体,启动胱天蛋白酶级联反应,最终导致细胞凋亡^[11-12]。实验结果显示,活化的胱天蛋白酶 Caspase 9,3 蛋白含量随着 NAP 的增加而显著增加,说明活化的 Caspase 9 激活下游的效应 Caspase 3。胱天蛋白酶 Caspase 3 是细胞凋亡下游的关键执行者。活化的 Caspase 3 可以降解 ADP-核糖多聚合成酶(PARP)^[13],激活核内核酸内切酶,使核小体间 DNA 链水解断裂,产生凋亡所特有的 DNA 片段化。而我们的结果显示 PARP 蛋白水平降低,而 Cleaved-PARP 水平显著上升。表明 NAP 可以通过促进内源性细胞凋亡途径促使下游关键胱天蛋白酶的活化从而诱导 SPC-A-1 细胞凋亡。

4 结论

沙蚕活性蛋白酶(NAP)可以显著抑制 SPC-A-1 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,凋亡的机制是调节 Bax、Bcl-2 与细胞凋亡相关基因的蛋白表达水平,从而调控 Cyt-C 的释放、活化胱天蛋白酶家族成员细胞 Caspase 9 及凋亡执行蛋白酶 Caspase 3, PARP 被裂解激活与其相关的凋亡信号通路,最终诱导 SPC-A-1 细胞凋亡。而 NAP 是否能够在体内诱导肺癌细胞凋亡,发挥体内抗肿瘤作用,还有待于体内实验进行探讨研究。

参考文献

- [1] 郭其森.非小细胞肺癌内科治疗的现状[J].中华肿瘤防治杂志,2009,10:721-725
GUO Qi-sen. Current situation of medical treatment of non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2009, 10: 721-725
- [2] Takahashi T, Furukawa Y, et al. Isolation and characterization of four novel bioactive peptides from a polychaete annelid, *Perinereis vancaurica* [J]. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 1995, 110(3): 297-304
- [3] 李奇.沙蚕蛋白酶及同工酶的分离纯化 性质及药用生物活

性研究[D].吉林大学,2008

- LI qi. Purification, characterization and pharmacodynamic activity of proteases and its isoenzyme from *Nereisirens* [D]. Jilin University, 2008
- [4] 葛鑫.酸性丝氨酸蛋白酶ASP_{NJ}抑制急性髓细胞白血病NB4细胞的实验研究[D].吉林大学,2012
GE xin. Experimental study of acidic serine protease ASP_{NJ} on inhibition of acute myelocytic leukemia cell NB4 [D]. Jilin University, 2012
- [5] 薄其青.酸性丝氨酸蛋白酶对人慢性髓性粒细胞株K562细胞作用的初步研究[D].吉林大学,2012
BO Qi-qing. A preliminary study on effect of Acidic Serine Protease ASP_{NJ} on human chronic myeloid cell line K562 [D]. Jilin University, 2012
- [6] Chio S, Lew KL, Xiao H, et al. D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1 [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(1): 151-162
- [7] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. Dev. Cell, 2011, 21(1): 92-101
- [8] Chen ZQ, Jie X, Mo ZN. Curcumin inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis on human prostatic stromal cells by regulating Bcl-2/Bax [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2008, 33(16): 2022-2025
- [9] Liu W, Huang XF, Qi Q, et al. Asparagin A induces G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, 381(4): 700-705
- [10] Xu X, Liu Y, Wang L, et al. Gambogic acid induces apoptosis by regulating the expression of Bax and Bcl-2 and enhancing caspase-3 activity in human malignant melanoma A375 cells [J]. Int. J. Dermatol., 2009, 48(2): 186-192
- [11] Bhattacharjee M, Acharya S, Ghosh A, et al. Bax and Bid act in synergy to bring about T11TS-mediated glioma apoptosis via the release of mitochondrial cytochrome c and subsequent caspase activation [J]. Int. Immunol., 2008, 20(12): 1489-1505
- [12] Liu HR, Peng XD, He HB, et al. Antiproliferative activity of total saponin of *Solanum lyratum* Thunb in hela cells by inducing apoptosis [J]. Die Pharmazie, 2008, 63(11): 836-842
- [13] Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, et al. Assessment of Apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7 or cleaved PARP in monolayer cells, spheroid, and subcutaneous xenografts of human carcinoma [J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 57(4): 289-300

现代食品科技