文章编号:1000-5404(2014)21-2201-06

论著

松油烯4醇体内外诱导A549细胞自噬及抑制增殖作用

潘乾广[1],石 瑶[1],叶秀峰[1,2],胡仕林[3],晏家瑛[3],周也涵[1],万 丹[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:病理科[1],神经科学研究中心[2];400065 重庆,重庆市日用化学工业研究所[3])

[摘要] **目的** 研究松油烯4醇体内外抑制人非小细胞肺癌细胞株A549增殖及诱导自噬的作用。**方法** 不同浓度松油烯4醇作用A549细胞后,应用MTT法检测抑制率及IC_{50};流式细胞仪检测细胞周期、凋亡、细胞内钙离子浓度变化;透射电镜观察作用前后细胞超微结构的变化。A549细胞移植瘤裸鼠药物连续腹腔注射10 d后分别测量各组移植瘤的平均体积和质量,观察药物的体内抑制肿瘤生长作用。用实时荧光定量PCR和Western blot法检测自噬相关基因BECN1和LC3的体内外表达情况。**结果** MTT结果显示松油烯4醇作用于A549细胞24 h后,随着药物浓度升高抑制率逐渐升高,呈浓度依赖性($P<0.05$),其24 h的IC_{50}为0.067%(体积分数)。FCM检测结果显示,实验组细胞周期被阻滞在S期,实验组细胞总凋亡率均高于对照组($P<0.05$),各实验组细胞内钙离子荧光强度均高于对照组($P<0.05$)。电镜结果显示经松油烯4醇处理的A549细胞内自噬泡数量明显增加。实验组移植瘤平均瘤体积和平均瘤质量均低于对照组($P<0.05$),高、低剂量实验组抑瘤率分别为77.46%和53.33%。实时荧光定量PCR及Western blot结果显示BECN1和LC3蛋白及mRNA表达量上调($P<0.05$)。**结论** 松油烯4醇在体内外可诱导人非小细胞肺癌细胞株A549自噬并抑制其增殖。

[关键词] 松油烯4醇;A549;凋亡;钙离子;自噬;LC3,BECN1
[中图法分类号] R73-361; R734.2; R965 [文献标志码] A

Terpinen-4-ol induces autophagy and inhibits proliferation in A549 cells and xenograft tumor of nude mice

Pan Qianguang[1], Shi Yao[1], Ye Xiufeng[1,2], Hu Shilin[3], Yan Jiaying[3], Zhou Yehan[1], Wan Dan[1] ([1]Department of Pathology, [2]Institute of Neurosciences, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Chongqing Institute of Daliy-used Chemical Industry, Chongqing, 400065, China)

[**Abstract**] Objective To assay the role of terpinen-4-ol in inducing autophagy and inhibiting proliferation in human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and explore its possible mechanism related to autophagy pathway. Methods A549 cells were incubated with various concentrations of terpinen-4-ol. MTT assay was used to observe the inhibitory effect of terpinen-4-ol on the growth of A549 cells and determine its IC_{50}. The changes of cell cycle, apoptosis and intracellular free calcium concentration were measured by flow cytometry. The ultrastructure of A549 cells were observed by transmission electron microscopy before and after terpinen-4-ol treatment. After xenograft transplantation tumor of A549 cells (1×10^6, with the diameter over 0.5 cm) were established in nude mice, terpinen-4-ol was injected intra-peritoneally for 10 d and then the nude mice were killed. Transplantation tumor were taken and then detected. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting were performed to detect the expression of BECN1 and LC3 in the A549 cells and the transplantation tumor. Results MTT assay showed that the viability of A549 cells was in a dose-dependent manner after the cells were treated with terpinen-4-ol for 24 h, with a IC_{50} value of 0.067%. The cell cycle was arrested in S phase according to the results of flow cytometry, and cell apoptosis was induced by terpinen-4-ol and the intracellular calcium concentrations were significantly higher in treatment groups than the control group ($P<0.05$). Transmission electron microscopy displayed that there were more autophagic vacuoles in the A594

[基金项目] 重庆市科委科技攻关计划项目(CSTC2012ggB10002)
[通信作者] 叶秀峰,E-mail:yxf1960@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1503.028.html(2014-08-21)

cells treated by terpinen-4-ol. Low and high-dose treatment resulted in the growth of the transplantation tumor obviously restrained (tumor inhibitory rate of 53.33% and 77.76% respectively). Real-time PCR and Western blot analysis showed that terpinen-4-ol inhibited the mRNA and protein levels of BECN1 and LC3 ($P<0.05$). **Conclusion** Terpinen-4-ol induces autophagy and inhibits cell proliferation in A549 cells *in vitro* and *in vivo*.

[**Key words**] terpinen-4-ol; A549; apoptosis; calcium ion; autophagy; LC3; BECN1

Supported by the Tackling Project of Chongqing Municipal Commission of Science and Technology (CSTC2012ggB10002). Corresponding author: Ye Xiufeng, E-mail: yxf1960@126.com

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,随着我国人口老龄化的加剧,经济快速发展带来的环境污染以及吸烟率居高不下等原因,肺癌已成为我国城市人口恶性肿瘤死亡原因的第一位[1-3]。化疗目前是肺癌特别是中晚期肺癌最有效的治疗方法之一。然而传统的肺癌化疗药物常因严重损害人体正常组织细胞而使临床应用受到限制[4-5]。人们期望一种既能抗肿瘤,又不过多损害机体正常组织的新化疗药物的出现。

松油烯4醇是存在于多种植物精油中的一种单萜类化合物,具有较高的生物活性。研究发现含有该种成分的精油具有抗菌、抗炎、除螨、镇咳、抗氧化、抗肿瘤等活性,已被用于治疗口腔黏膜溃疡、牙龈炎、牙根管炎、手足癣、皮肤感染等疾病,同时也被用于生产护肤品的原料,用于减少痤疮引起的红肿等[6-8]。本实验通过研究松油烯4醇对肺癌细胞株A549增殖抑制作用及可能的作用机制,为肺癌及其他肿瘤化疗提供一个新的选择。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物

人肺癌细胞株A549由重庆医科大学基础医学院病理科提供。BALB/c-nu裸鼠21只,购自重庆医科大学实验动物中心,4~5周龄,体质量15~19 g,雌雄不限。

1.2 主要试剂

标准胎牛血清(HyClone公司);DMEM培养基(高糖型,HyClone公司);0.25%胰蛋白酶(HyClone公司);MTT(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);松油烯4醇(西亚试剂,纯度≥98%);β-actin抗体(北京四正柏生物技术有限公司);兔抗LC3多克隆抗体购自美国Abcam公司;兔抗BECN1多克隆抗体购自美国Santa公司;Total RNA提取试剂,逆转录试剂和Real-time PCR试剂(TaKaRa公司);引物由上海生工合成。

1.3 细胞培养、动物饲养及药品配制

将A549细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖完全培养基中,培养基中加入1%青霉素和链霉素双抗。将细胞置于37 ℃,5% CO_2孵箱中在饱和湿度下培养,隔日换液1次,每3天以1∶2正常传代培养1次,采用0.25%胰蛋白酶消化细胞。裸鼠实验和饲养均在重庆医科大学实验动物中心恒温、恒湿的SPF动物房进行,12 h昼夜节律,裸鼠可以自由进食和饮水。松油烯4醇以11 μL加入5.5 mL培养液中配成0.2%(体积分数)的母液,使用时按比例稀释成0.02%~0.1%(体积分数)工作液。

1.4 MTT法检测细胞增殖抑制及IC_{50}

实验分为对照组和实验组。将密度为1×10^4/mL的A549细胞接种于96孔板中过夜,每孔100 μL,实验组加入含不同浓度油烯4醇(0、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.1%,体积比)的培养液(200 μL/孔)培养24 h后,每孔加入20 μL的MTT(5 mg/mL用PBS配制,pH=7.5)。继续培养4 h后,小心吸出废液,每孔加入150 μL DMSO,室温下于摇床中振荡10 min。在490 nm波长处用酶联免疫检测仪测定各孔$D(490)$值。计算抑制率:抑制率=$[1-D(490)_{实验组}/D(490)_{对照组}]\times100\%$。再计算出半数抑制浓度($IC_{50}$)。

1.5 体外和体内实验分组

根据MTT实验结果将A549细胞分为对照组和实验组,对照组用正常培养基培养细胞,实验组分为0.04%、0.06%、0.08%(体积分数)组,分别以含有相应浓度的松油烯4醇的培养基培养。体内实验将21只裸鼠按随机数字表分为对照组(0%),低剂量(0.06%)、高剂量(0.08%)实验组。

1.6 细胞周期及凋亡检测

取对数生长期A549细胞按5×10^5/孔的浓度接种于6孔板中。培养箱内培养过夜贴壁后弃上清,加入无血清DMEM高糖培养液,饥饿同步18 h,使细胞停滞于G_0期。按分组方法分组培养24 h后,收集上清液细胞;0.25%胰酶EDTA消化,1 000 r/min离心10 min,收集贴壁细胞,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心10 min。在检测细胞凋亡的试管中先后加入1×Buffer 100 mL,AV染液5 μL,PI染液1 μL,避光15 min,再加入1×Buffer 400 μL,上机检测;检测周期细胞加入70%冷乙醇在4 ℃固定12 h后在试管中加入1 mL的DNA染色剂,避光30 min,上机检测。并用随机软件进行数据分析,每组重复3次。

1.7 细胞内钙离子浓度测定

对数生长期的A549细胞按分组方法分组培养24 h,1 000 r/min离心5 min。洗涤后,在结合缓冲液中,加入终浓度为5 μmol/L的Flou-3/AM,置CO_2培养箱中孵育1 h后反复洗涤,用流式细胞仪检测各组荧光强度,激发波长488 nm,每组重复3次。

1.8 透射电镜观察细胞超微结构改变

细胞培养方法同周期及凋亡检测,培养24 h后用胰酶消化PBS洗涤1次后,将细胞悬液转移到EP管中以1 200 r/min离心10 min。小心吸弃上清液,沿管壁缓慢加入预先配制好的固定液,4 ℃保存过夜后送重庆医科大学生命科学研究院电镜

室,用 HITACHI-7500 透射电镜观察各组细胞的超微结构变化。

1.9 BALB/c(nu/nu)裸小鼠体内移植瘤建立及治疗后抑瘤率的测定

将肺癌 A549 细胞按前述常规方法培养,消化离心收集后,运用台盼蓝染色法检测活细胞数 >99%,细胞计数后调整细胞浓度至 5×10^6/mL。将细胞悬液接种于裸鼠右前腋下皮下,每只接种细胞数约 1×10^6,接种完成后观察移植瘤形成情况,以肿瘤直径≥0.5 cm 为成瘤。按分组方法每只以相应药物浓度进行腹腔注射(0.1 mL/d),治疗 10 d 后脱颈处死,分离瘤组织测量其长短径和质量,移植瘤的体积按公式:$V(mm^3)=\pi ab^2/6$ 计算。根据治疗结束后移植瘤质量及体积计算各组平均瘤质量和瘤体积。根据各组平均瘤质量计算抑瘤率 IR =(对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量 ×100%。

1.10 Western blot 检测 BECN1 和 LC3 蛋白表达变化

提取体外培养的 A549 细胞内以及裸鼠移植瘤组织中的总蛋白,用酶标仪测蛋白含量。加入 5 × SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min, -80 ℃保存。配置 SDS-PAGE 胶,每样品取 20 μg 蛋白,常规电泳、转膜、封闭。加入一抗 BECN1(1∶500)、LC3(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000),4 ℃过夜。兔二抗(1∶1 000)鼠二抗(1∶1 000)37 ℃孵育 2 h。辣根过氧化物酶通过 ChemiDocXRS 化学发光成像系统进行曝光采图,用 Quantity One 4.4.0 进行图像分析。

1.11 Real-time PCR 检测 BECN1 和 LC3 mRNA 表达变化

提取培养细胞及移植瘤组织中总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,分别以 BECN1、LC3 和 β-actin 上下游引物进行 PCR 扩增。反应条件:95 ℃ 10 min 预变性;95 ℃ 50 s 变性,60 ℃ 50 s,72 ℃ 60 s,共循环 40 次;72 ℃ 延伸 5 min。记录各 Ct 值,换算成基因拷贝数,以 BECN1、LC3 和 β-actin 基因拷贝数的比值作为其相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因名称	引物序列	产物大小(bp)
BECN1	上游引物 AGGTTGAGAAAGGCGAGACAC 下游引物 CTGGGTTTTGATGGAATAGGAG	110
LC3	上游引物 TCCTGGACAAGACCAAGTTTTT 下游引物 CTCGTCTTTCTCCTGCTCGTAG	179
β-actin	上游引物 CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC 下游引物 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	240

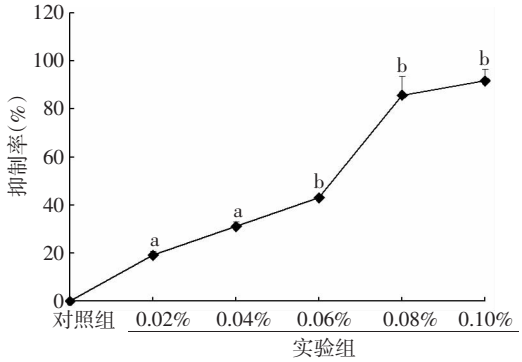
1.12 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 松油烯 4 醇对 A549 细胞增殖影响及 IC_{50}

不同浓度的松油烯 4 醇作用于 A549 细胞 24 h 后,从松油烯 4 醇浓度 0.02% 开始对细胞株的生长均有抑制作用,与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),并呈浓度依赖性(图 1)。A549 细胞株 24 h 的 IC_{50} 为 0.067%。

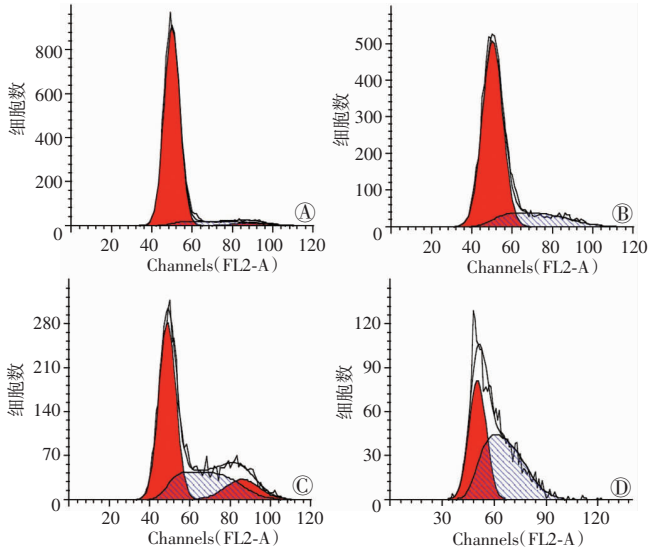


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 不同浓度松油烯 4 醇作用 24 h 后对 A549 增殖抑制的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 松油烯 4 醇对 A549 细胞周期分布、凋亡率以及细胞内钙离子浓度的影响

2.2.1 A549 细胞周期分布测定 不同浓度松油烯 4 醇处理细胞 24 h 后,实验组与对照组比较 G_1 期细胞的比例降低,S 期细胞比例升高,呈现 S 期阻滞现象,并呈剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05$)。如图 2、表 2 所示。



A:对照组;B:0.04% 实验组;C:0.06% 实验组;D:0.08% 实验组

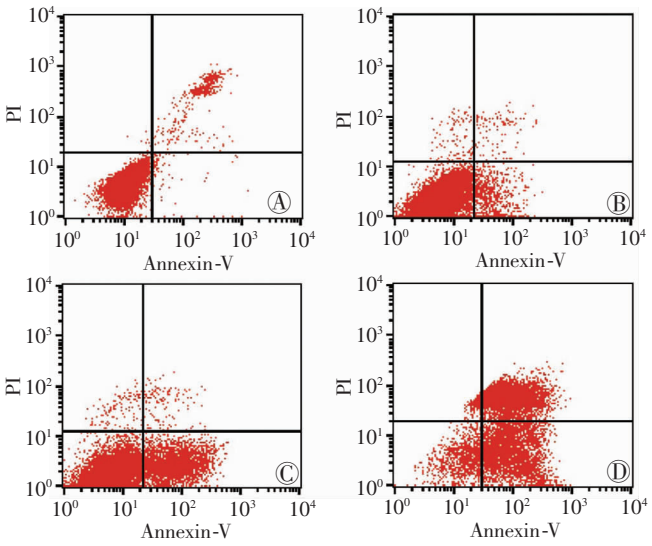
图 2 流式细胞仪分析松油烯 4 醇处理后 A549 细胞周期变化

表 2 松油烯 4 醇对 A549 细胞周期的影响[$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	G_1	G_2	S
对照组	86.17 ± 5.05	3.24 ± 2.23	10.49 ± 2.97
0.04% 实验组	79.66 ± 1.76[a]	0.57 ± 0.81	18.94 ± 1.10[a]
0.06% 实验组	61.09 ± 4.29[a]	10.06 ± 6.66	28.85 ± 5.61[a]
0.08% 实验组	42.56 ± 1.58[b]	1.32 ± 1.46	55.98 ± 0.31[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

2.2.2 A549 细胞凋亡率检测 各组总凋亡率分别为对照组(1.18 ± 0.16)%、0.04% 实验组(8.43 ± 0.51)%、0.06% 实验组(33.75 ± 0.65)%、0.08% 实验组(44.32 ± 2.35)%,各实验组与对照组比较差异明显($P<0.01$)。经药物处理 24 h 后细胞凋亡的比例均有明显升高,呈现一定的剂量-效应关系。见图 3。



A:对照组;B:0.04%实验组;C:0.06%实验组;D:0.08%实验组

图3 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪分析松油烯4醇处理A549细胞后细胞凋亡

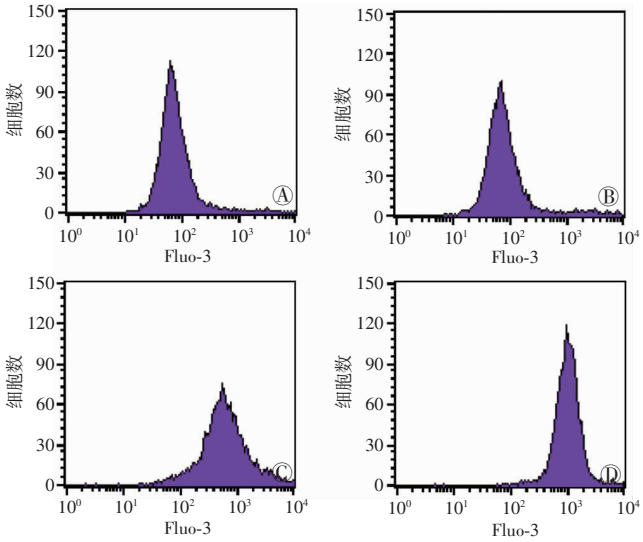
2.2.3 A549内钙离子浓度测定 不同药物浓度作用24 h后,各组细胞内钙离子荧光强度分别为对照组(100.30±12.75)、0.04%实验组(129.79±0.96)、0.06%实验组(781.78±9.24)、0.08%实验组(1 014.20±83.47),各实验组与对照组比较差异明显($P<0.05$)。各实验组细胞内钙离子荧光强度均明显高于对照组,且随着药物浓度的增加而增加(图4)。

2.3 松油烯4醇对A549细胞超微结构的影响

透射电镜观察结果显示:在对照组细胞内可见到少量自噬空泡(图5A),不同浓度松油烯4醇处理24 h后的实验组细胞内可见大量自噬空泡,自噬泡数量较对照组明显增加(图5B~D)。

2.4 松油烯4醇对裸鼠移植瘤生长的影响

治疗结束时各组移植瘤平均瘤体积和平均瘤质量比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表3。



A:对照组;B:0.04%实验组;C:0.06%实验组;D:0.08%实验组

图4 不同药物浓度作用A549细胞后细胞内钙离子浓度改变

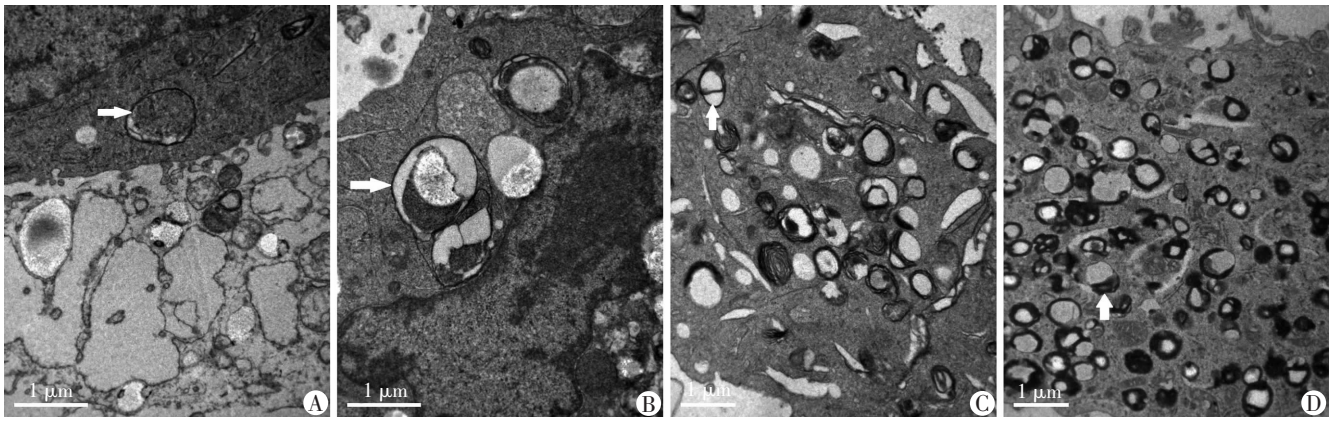
表3 各组裸鼠移植瘤平均瘤体积和瘤质量及抑制率比较($n=7$)

组别	瘤体积(mm^3)	瘤质量(mg)	抑制率(%)
对照组	390.06±32.85	537.00±98.52	-
低剂量实验组	213.67±23.45[a]	250.67±14.77[a]	53.33
高剂量实验组	83.40±29.23[b]	121.00±40.51[b]	77.46

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

2.5 Western blot检测松油烯4醇体内外对LC3和BECN1蛋白表达的影响

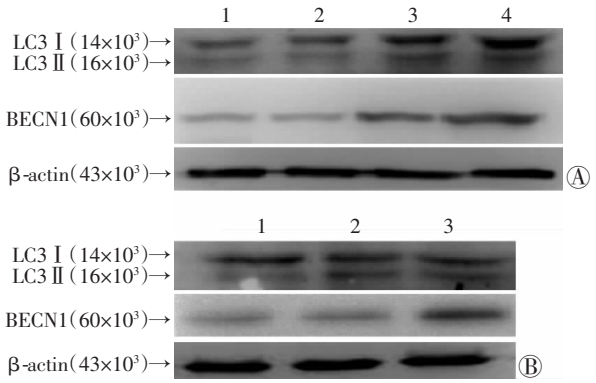
松油烯4醇作用于体外培养的A549细胞后,BECN1/β-actin灰度值比值分别为:对照组(0.40±0.08)、0.04%实验组(0.98±0.06)、0.06%实验组(1.05±0.15)、0.08%实验组(1.39±0.17),各实验组与对照组比较均有统计学差异($P<0.05$);LC3Ⅱ/C3Ⅰ灰度值比值:对照组(0.05±0.02)、0.04%实验组(0.19±0.06)、0.06%实验组(0.44±0.07)、0.08%实验组(0.59±0.07),各实验组与对照组相比有统计学差异($P<0.05$),见图6A。



A:对照组;B:0.04%实验组;C:0.06%实验组;D:0.08%实验组;箭头示自噬体

图5 不同浓度松油烯4醇作用于A549细胞后透射电镜观察细胞超微结构改变

松油烯4醇作用于移植瘤后，BECN1/β-actin灰度值比值分别为：对照组（0.35±0.12）、低剂量实验组（1.14±0.14）、高剂量实验组（1.56±0.19），各实验组与对照组比较均有统计学差异（$P<0.05$）；LC3 Ⅱ/C3 Ⅰ灰度值比值：对照组（0.32±0.08）、低剂量实验组（0.76±0.09）、高剂量实验组（0.85±0.14），各实验组与对照组比较差异显著（$P<0.05$），见图6B。Western blot实验结果显示，松油烯4醇作用于体外培养的A549细胞以及体内移植瘤后，自噬相关蛋白BECN1、LC3以及LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ的表达量均显著上升（$P<0.05$）。



A：LC3表达　1：对照组；2：0.04%实验组；3：0.06%实验组；4：0.08%实验组

B：BECN1表达　1：对照组；2：低剂量实验组；3：高剂量实验组

图6　Western blot检测不同浓度松油烯4醇作用于A549细胞以及体内移植瘤后LC3和BECN1蛋白表达变化

2.6　实时荧光定量PCR检测松油烯4醇体内外对LC3和BECN1 mRNA表达的影响

松油烯4醇作用于体外培养的A549细胞后，各组BECN1 mRNA的相对表达量分别为：对照组（1±0）、0.04%实验组（1.90±0.09）、0.06%实验组（2.47±0.34）、0.08%实验组（3.58±0.33），各实验组与对照组比较差异显著（$P<0.05$）；各组LC3 mRNA的相对表达量分别为：对照组（1±0）、0.04%实验组（92.77±5.16）、0.06%实验组（373.24±10.25）、0.08%实验组（802.08±72.17），各实验组与对照组比较差异显著（$P<0.05$）。松油烯4醇作用于移植瘤后，各组BECN1 mRNA的相对表达量分别为：对照组（1±0）、低剂量实验组（3.27±0.53）、高剂量实验组（11.81±1.56），各实验组与对照组比较差异显著（$P<0.05$）；各组LC3 mRNA的相对表达量分别为：对照组（1±0）、低剂量实验组（2.09±0.46）、高剂量实验组（18.25±1.53），各实验组与对照组比较差异显著（$P<0.05$）。实时荧光定量PCR检测结果显示，松油烯4醇作用于体外培养的A549细胞以及体内移植瘤后，自噬相关基因BECN1和LC3 mRNA的相对表达量均显著上调（$P<0.05$）。

3　讨论

肺癌分为小细胞和非小细胞性肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC），其中非小细胞肺癌占85%～87%。化疗目前是非小细胞肺癌最有效的治疗方法之一。然而传统的肺癌化疗药物常因其各种严重的副作用使得其临床应用受到很大限制。因此寻找毒性更低、副作用更小的治疗肺癌化疗药物已成为医药界的一个重要课题。

松油烯4醇是一种存在于天然植物精油中的具有多种生物学活性的物质，但其对肿瘤的作用目前国内还未见报道。本实验希望通过松油烯4醇对人肺癌增殖抑制作用及可能作用机制的研究，为肺癌及其他肿瘤化疗提供一个新的选择。

本实验用人非小细胞肺癌细胞株A549研究了松油烯4醇对人肺癌的体内外作用及其机制，MTT以及体外抑制移植瘤生长实验结果表明，松油烯4醇在体内外对A549细胞生长具有抑制作用，并呈现剂量依赖关系。随后通过流式以及透射电镜技术检测了松油烯4醇可能的抑制A549细胞生长的机制，实验结果发现松油烯4醇具有抑制细胞周期、诱导细胞凋亡、诱导细胞内钙超载以及诱导自噬作用。最后我们运用Western blot和Real-time PCR方法在分子水平检测了自噬相关基因Beclin1以及LC3的蛋白和mRNA表达的变化。结果表明，不同浓度松油烯4醇作用于体外培养的A549细胞以及其移植瘤后，自噬相关基因LC3和Beclin1蛋白及mRNA的表达明显升高。

自噬（autophagy）意为自体吞噬（serf-eating），简称自噬，被称为Ⅱ型程序性细胞死亡，是溶酶体对细胞内受损的细胞质、细胞器等成分进行的一系列降解和细胞内能量再循环过程的统称[9]。近年来随着自噬与肿瘤关系研究的不断深入，人们发现肿瘤细胞中的一些自噬活动可以在一些治疗因素下被激活，而过度的自噬激活又会引发自噬性细胞死亡。自噬的发生具体机制尚不明确，其受到多种机制调节[10]。LC3是哺乳动物中Atg8的同源物，在自噬过程中LC3 Ⅰ被转化为LC3 Ⅱ并定位于新形成的自噬体膜上。因此，LC3通常被用作哺乳动物细胞中自噬的标志蛋白，尤其Ⅱ型/Ⅰ型LC3比值能很好反映自噬发生的情况[11-12]。Beclin1是酵母自噬相关基因（Atg6）的哺乳动物细胞同源基因，对于自噬体的形成至关重要，尤其是定位于内质网上的Beclin1是重要的自噬诱导因子，检测其表达可在一定程度上反映自噬的发生[13]。

电镜是自噬检测金标准，在电镜下能否观察到双层膜结构的自噬体是自噬是否发生的直观指标。本实

验电镜及 Western blot 和 Real-time PCR 结果证明,松油烯4醇具有诱导 A549 细胞发生自噬的作用。

Ca^{2+}是细胞内重要的信号分子,同时也是调节自噬的关键因素之一。细胞内 Ca^{2+}主要存在于内质网中,内质网上的 Ca^{2+}-ATP 酶(sacro/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA)、三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-tri-sphosphate receptor,IP3R)及雷诺丁受体(ryanodinereceptor,RyR)是控制 Ca^{2+}进出内质网的重要通道。有学者利用镉刺激钙通道开放使细胞质中 Ca^{2+}浓度升高,结果可促进自噬发生。此时若加入钙离子螯合剂快速稀释细胞质中 Ca^{2+}浓度,则可有效抑制自噬启动[14]。细胞膜上也存在控制 Ca^{2+}在细胞内外之间流动的通道,抑制内质网 Ca^{2+}通道的同时刺激细胞膜上的 Ca^{2+}通道开放,细胞内 Ca^{2+}浓度升高,同样也可以诱导细胞自噬[15]。研究发现细胞内 Ca^{2+}浓度升高可通过多种途径诱导自噬发生:①通过钙调蛋白激酶激酶 β(Ca^{2+}-calmodulin-dependent kinase kinase-β,CaMKK-β)介导 AMPK 活化而诱导自噬发生;②促进 3-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3-phosphate,PI3P)同自噬体膜的结合而诱导自噬;③激活其他多种蛋白酶和蛋白激酶而启动自噬[16-18]。以上研究表明细胞内游离 Ca^{2+}在诱导细胞自噬发生中发挥了重要作用。本研究流式检测细胞内 Ca^{2+}浓度显示,松油烯4醇引起 A549 细胞内游离 Ca^{2+}浓度升高,同时诱导细胞发生自噬,提示松油烯4醇诱导细胞发生自噬的作用可能是通过 Ca^{2+}依赖的自噬信号通路而实现的。

综上所述,本实验通过体内外研究结果证明松油烯4醇在体内外对 A549 细胞增殖存在抑制作用,其抗肿瘤机制与细胞周期阻滞、诱导细胞自噬和凋亡以及细胞内 Ca^{2+}超载有关。但其诱导自噬和凋亡以及自噬和凋亡两者间的相互作用关系还有待于进一步的研究证实。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493.

[3] 陈仁杰, 张金良, 阚海东. 中国大气污染与肺癌关系的流行病学研究回顾[J]. 卫生研究, 2011, 40(2): 243-245.

[4] 彭丽君, 曾伟生, 乔贵宾, 等. 错配切割修复蛋白表达与非小细胞肺癌术后辅助化疗效果的关系[J]. 广东医学, 2010, 31(11): 1396-1399.

[5] Lucio K A, Rocha-Gda G, Moncao-Ribeiro L C, *et al*. Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model *in vivo*[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28596.

[6] Tighe S, Gao Y Y, Tseng S C. Terpinen-4-ol is the Most Active Ingredient of Tea Tree Oil to Kill Mites[J]. Transl Vis Sci Technol, 2013, 2(7): 2.

[7] 吴鹏昌, 张伟. 茶树油的研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(3): 61-63.

[8] 李梦媛, 黄剑, 李泽琳, 等. 天然药物抗甲型流感病毒的有效成分的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 204-208.

[9] Tanida I. Autophagy basics[J]. Microbiol Immunol, 2011, 55(1): 1-11.

[10] Tsuyuki S, Takabayashi M, Kawazu M, *et al*. Detection of WIPI1 mRNA as an indicator of autophagosome formation[J]. Autophagy, 2014, 10(3): 497-513.

[11] Kabeya Y, Kawamata T, Suzuki K, *et al*. Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in Saccharomyces cerevisiae[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(2): 405-410.

[12] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2503-2518.

[13] Wang W, Fan H, Zhou Y, *et al*. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1501-1505.

[14] Hardie D G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism[J]. Int J Obes (Lond), 2008, 32(Suppl 4): S7-S12.

[15] Herrero-Martin G, Hoyer-Hansen M, Garcia-Garcia C, *et al*. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells[J]. EMBO J, 2009, 28(6): 677-685.

[16] Budanov A V, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling[J]. Cell, 2008, 134(3): 451-460.

[17] Grotemeier A, Alers S, Pfisterer S G, *et al*. AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca2 + increase[J]. Cell Signal, 2010, 22(6): 914-925.

[18] 陆蔚天,孙善全,黄娟,等. Aβ25-35 诱导 PC12 细胞内 Ca^{2+}浓度升高和自噬发生[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 355-359.

(**收稿**:2014-05-10;**修回**:2014-07-10)

(编辑 栾 嘉)