

藤梨根乙酸乙酯提取物对肺癌 A549 细胞凋亡的诱导作用

关 英*,阿选德(西宁市第一人民医院呼吸内科,西宁 810000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3499-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.15

摘要 目的:研究藤梨根乙酸乙酯提取物对肺癌A549细胞凋亡的诱导作用。方法:以0(阴性对照)、40、80、160 μg/ml藤梨根乙酸乙酯提取物培养细胞48、72 h后,凝胶电泳法测定细胞DNA裂解情况。以0(阴性对照)、40、80、160 μg/ml藤梨根乙酸乙酯提取物培养细胞24、48、72 h后,流式细胞仪测定细胞凋亡和细胞周期分布情况;免疫组化法测定细胞生存素(Survivin)表达。结果:40、80、160 μg/ml藤梨根乙酸乙酯提取物培养细胞48、72 h后出现凋亡细胞特有的梯状条带;与阴性对照比较,40、80、160 μg/ml藤梨根乙酸乙酯提取物培养细胞24、48、72 h后细胞凋亡率升高,G₀/G₁期细胞比例升高,Survivin表达减弱,且呈时间、浓度依赖关系。结论:藤梨根乙酸乙酯提取物可诱导A549细胞凋亡,将细胞周期阻滞于G₀/G₁期,其机制可能与降低Survivin表达有关。
关键词 肺癌A549细胞;藤梨根乙酸乙酯提取物;生存素;诱导凋亡

Induction of Ethyl Acetate Extract from *Actinidia arguta* on Apoptosis of Lung Cancer A549 Cells

GUAN Ying, A Xuan-de(Dept. of Respiration Medicine, Xining First People's Hospital, Xining 810000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the induction of ethyl acetate extract from *Actinidia arguta* on apoptosis of lung cancer A549 cells. METHODS: After the cells were cultured in 0 (negative control) 40, 80 and 160 μg/ml ethyl acetate extract from *A. arguta* for 48 and 72 h, gel electrophoresis method was used to detect DNA cleavage in the cells. After the cells were cultured in 0 (negative control), 40, 80 and 160 μg/ml ethyl acetate extract from *A. arguta* for 24, 48 and 72 h, flow cytometry was adopted to detect apoptosis and cell cycle distribution, and immunohistochemical method was employed to detect Survivin expression. RESULTS: After 48 and 72 h culture in 40, 80 and 160 μg/ml ethyl acetate extract from *A. arguta*, ladders appeared, which are the characteristic of apoptosis. Compared to the negative control, following 24, 48 and 72 h culture of cells in 40, 80 and 160 μg/ml ethyl acetate extract from *A. arguta*, apoptosis rate was higher, also was the percentage of the cells in G₀/G₁ phase; and the expression of Survivin was weaker, demonstrating a time and concentration-dependent relation. CONCLUSIONS: The ethyl acetate extract from *A. arguta* can induce apoptosis of A549 cells and cause a cell cycle arrest in G₀/G₁ phase, by a mechanism which may be related to the reduction in Survivin expression.

KEYWORDS Lung cancer A549 cells; Ethyl acetate extract from *Actinidia arguta*; Survivin; Apoptosis induction

肺癌是严重威胁人类生存健康的杀手之一,目前化疗是治疗肺癌的主要手段,但其副作用较大,在杀灭肿瘤细胞的同时对正常组织也有损伤,而中药抗肿瘤治疗历史悠久,且安全低毒^[1]。藤梨根是猕猴桃科植物猕猴桃的根,研究表明藤梨根乙酸乙酯提取物对癌细胞凋亡有一定诱导作用,而生存素(Survivin)是一种重要的凋亡抑制因子^[2]。基于此,笔者研究藤梨根乙酸乙酯提取物对肺癌A549细胞凋亡的诱导作用及对Survivin蛋白表达的影响,以为临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

801型形态学分析系统(江苏捷达科技发展有限公司);EpicsXL型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 药材

藤梨根购自青海省西宁市第一人民医院中药房,由笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(上海旭东海普药业有限公司,

* 主治医师。研究方向:呼吸临床、呼吸危重症。E-mail: guan7yi@126.com

批号:20130824,规格:10 ml:0.25 g);鼠抗人Survivin单克隆抗体、细胞免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司);细胞周期测试盒(南京凯基生物发展有限公司);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡测试盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);RPMI 1640培养基、小牛血清(美国Gibco公司);溴化乙锭、胰蛋白酶(美国Sigma公司);青霉素-链霉素(美国Amresco公司)。

1.4 细胞

A549细胞由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。

2 方法^[3-4]

2.1 藤梨根乙酸乙酯提取物的制备

将藤梨根500 g粉碎成20目的粗粉,加8倍水煮2次,每次1 h,滤过浓缩后加入乙酸乙酯溶剂萃取3次(每次300 ml),回收溶剂,得浓缩物约25 g,用蒸馏水热溶滤过后取滤液供试验用,含量为92.6%。

2.2 细胞培养与分组

在含10%小牛血清、青霉素及链霉素各100 u/ml的RPMI 1640培养基中培养A549细胞,培养环境控制在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下,以0.25%胰蛋白酶消化传代,培养细胞至对

数生长期用于后续试验。

2.3 细胞DNA梯状条带测定

以DNA琼脂糖凝胶电泳法检测裂解片段。取对数生长期细胞,调整细胞密度至 $5.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于25 ml培养瓶中,每瓶3 ml RPMI 1640培养基。培养24 h后更换培养液,以40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞48、72 h,分别收集2 ml细胞液,利用DNA琼脂糖凝胶电泳检测细胞DNA梯状条带。

2.4 细胞凋亡率测定

取对数生长期细胞,接种于6孔板中,调整细胞密度至 10^5 ml^{-1} 。以0(阴性对照)、40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞24、48、72 h,弃上清液,以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞1次,用0.25%胰蛋白酶消化,收集0.2~1 ml细胞液,加入500 μl Buffer缓冲液后再加入5 μl Annexin V-FITC、10 μl PI,混匀,室温下避光反应15 min,1 h内进行流式细胞仪检测。

2.5 细胞周期分布测定

取对数生长期细胞,接种于6孔板中,调整细胞密度至 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。以0(阴性对照)、40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞24、48、72 h,弃上清液,用0.25%胰蛋白酶消化调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,用70%冷乙醇500 μl 固定1 ml单细胞悬液,常规离心,弃上清液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存12 h。以PBS洗去固定液,在100 μl RnaseA 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴30 min,再加入400 μl PI染色混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存30 min后检测细胞周期分布。

2.6 Survivin表达测定

免疫组化法测定Survivin表达。取对数生长期细胞,接种于6孔板中,调整细胞密度至 10^5 ml^{-1} 。以0(阴性对照)、40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞24、48、72 h,弃上清液,以PBS清洗细胞1次,用0.25%的胰蛋白酶消化,收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 。以细胞免疫组化试剂盒测定Survivin表达,阳性反应为细胞质内可见黄色或棕黄色颗粒,在高倍视野($\times 400$)下观察,由形态分析系统进行分析,选取4个视野进行阳性率测定。

2.7 统计学方法

采用SPSS 15.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞DNA梯状条带测定结果

通过DNA琼脂糖凝胶电泳检测后,阴性对照细胞中未发现明显DNA梯状条带。以40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞48、72 h后,均发现凋亡细胞所特有的DNA梯状条带,表明藤梨根乙酸乙酯提取物对于A549细胞的DNA裂解有一定作用。

3.2 细胞凋亡率测定结果

与阴性对照比较,40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞24、48、72 h后,细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞凋亡率测定结果见图1、表1。

3.3 细胞周期分布测定结果

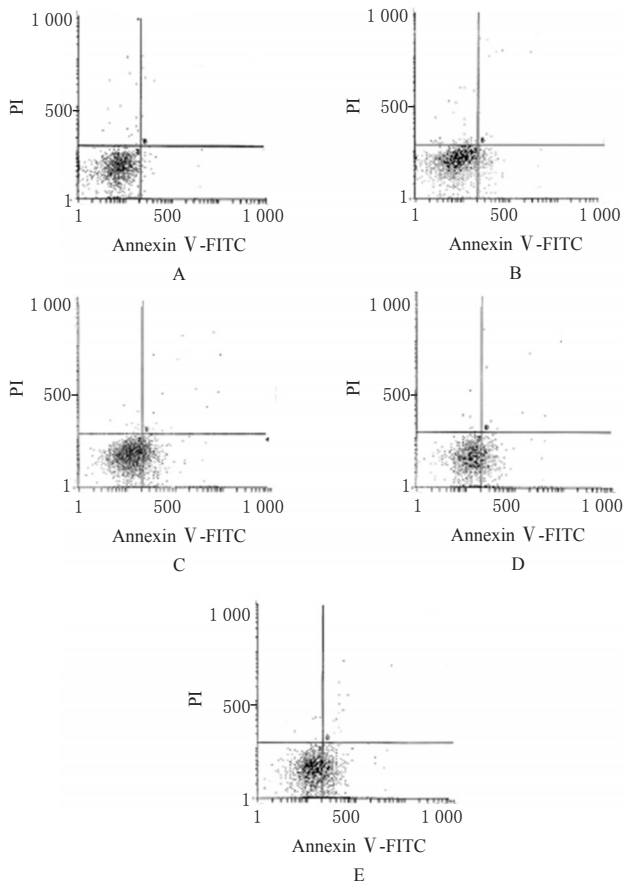


图1 细胞凋亡流式细胞仪测定结果

A. 阴性对照; B. 5-FU; C. 40 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物; D. 80 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物; E. 160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物

Fig 1 Determination results of cell apoptosis by the flow cytometry

A. negative control; B. 5-FU; C. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 40 $\mu\text{g/ml}$; D. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 80 $\mu\text{g/ml}$; E. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 160 $\mu\text{g/ml}$

表1 细胞凋亡率与Survivin表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of cell apoptosis and Survivin protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	不同时间点凋亡率, %			不同时间点Survivin表达, %		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
藤梨根乙酸乙酯提取物	0(阴性对照)	2.05 ± 0.44	2.53 ± 0.66	2.81 ± 0.65	34.77 ± 1.93	35.75 ± 2.17	35.63 ± 3.03
	40	$9.42 \pm 1.88^*$	$13.46 \pm 3.21^*$	$28.43 \pm 4.31^*$	$28.72 \pm 2.63^*$	$22.63 \pm 2.79^*$	$15.63 \pm 3.82^*$
	80	$13.73 \pm 2.33^*$	$32.34 \pm 4.44^*$	$44.28 \pm 3.82^*$	$24.15 \pm 3.11^*$	$19.36 \pm 3.44^*$	$10.32 \pm 2.43^*$
	160	$24.37 \pm 3.52^*$	$40.68 \pm 4.12^*$	$53.27 \pm 4.31^*$	$16.43 \pm 1.89^*$	$11.89 \pm 1.72^*$	$5.98 \pm 1.98^*$
5-FU	5	$12.11 \pm 1.46^*$	$22.78 \pm 2.89^*$	$33.12 \pm 3.72^*$	$23.45 \pm 1.46^*$	$16.45 \pm 2.41^*$	$13.21 \pm 1.47^*$

注:与阴性对照比较, $*P < 0.05$

Note: vs. negative control, $*P < 0.05$

40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取物与5 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU培养细胞24、48、72 h后,可使细胞滞留于 G_0/G_1 期,与阴性对照比较, G_0/G_1 期细胞数增加,S期细胞增加, G_2/M 期细胞减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞周期测定结果见图2、表2。

3.4 Survivin表达测定结果

与阴性对照比较,40、80、160 $\mu\text{g/ml}$ 藤梨根乙酸乙酯提取

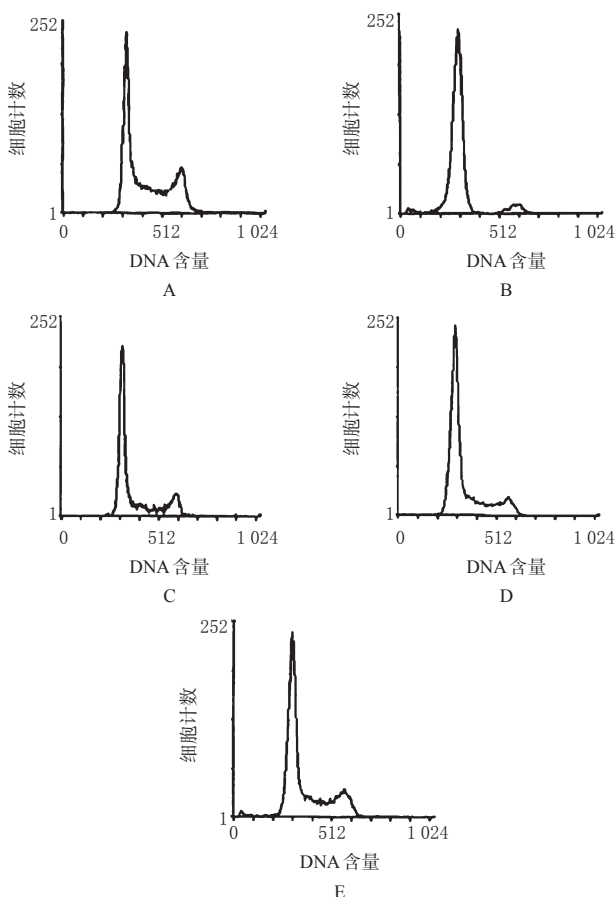


图2 细胞周期流式细胞仪测定结果

A. 阴性对照; B. 5-FU; C. 40 µg/ml 藤梨根乙酸乙酯提取物; D. 80 µg/ml 藤梨根乙酸乙酯提取物; E. 160 µg/ml 藤梨根乙酸乙酯提取物

Fig 2 Determination results of cell cycles by the flow cytometry

A. negative control; B. 5-FU; C. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 40 µg/ml; D. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 80 µg/ml; E. ethyl acetate extract from *A. arguta* of 160 µg/ml

表2 细胞周期测定结果(%, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of cell cycles(%, $\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度, µg/ml	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
藤梨根乙酸乙酯提取物	0(阴性对照)	50.1±2.41	19.4±1.57	26.5±1.46
	40	67.8±4.76*	10.5±0.72*	15.4±1.65*
	80	71.4±3.45*	11.6±1.32*	13.7±0.82*
	160	64.6±3.46*	12.5±0.61*	16.4±1.11*
5-Fu	5	88.6±3.75*	1.96±0.71*	5.9±1.54*

注:与阴性对照比较, *P<0.05

Note: vs. negative control, *P<0.05

物与5 µg/ml 5-FU培养细胞24、48、72 h后, Survivin表达减弱, 差异有统计学意义(P<0.05); 且随质量浓度的增加和作用时间的延长, 其表达逐渐减弱。Survivin表达测定结果见表1。

4 讨论

藤梨根学名猕猴桃根, 为猕猴桃科植物猕猴桃的干燥根, 其乙酸乙酯提取物具有增强细胞免疫和抑制体液免疫的作

用, 一般用作治疗腹部肿瘤的清热解毒药; 另外因其在促进淋巴细胞转化和增强自然杀伤(NK)细胞活性上有一定作用, 现多应用在治疗胃肠道癌症中^[6]。

本研究显示, 藤梨根乙酸乙酯提取物作用于A549细胞后, 通过DNA琼脂糖凝胶电泳检测裂解片段, 阴性对照未出现明显的DNA梯状条带, 而用药培养细胞后, 都出现了相应的DNA条带, 说明在藤梨根乙酸乙酯提取物作用下, A549细胞出现裂解。细胞周期测定显示, 用其培养细胞后, 细胞周期阻滞在G₀/G₁期, 且随药物质量浓度增加, 处于G₀/G₁期的A549细胞比例增加。在不同的藤梨根乙酸乙酯提取物质量浓度下, 免疫组化法检测显示阴性对照细胞凋亡率明显低于用药细胞。细胞凋亡受多种基因控制的, 早有研究表明Survivin是凋亡抑制蛋白家族新成员, 是具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双功能蛋白^[6-9]。本研究显示, 用药培养细胞后, Survivin蛋白表达明显降低, 因此藤梨根乙酸乙酯提取物诱导A549细胞凋亡的机制可能与降低Survivin蛋白表达有关^[10]。

综上所述, 藤梨根乙酸乙酯提取物对于A549细胞凋亡具有一定的诱导作用, 且在一定范围内呈浓度和时间依赖性, 其机制可能与降低Survivin表达有关。本研究为藤梨根乙酸乙酯提取物应用于临床治疗肺腺癌提供了一定依据。

参考文献

- [1] 李凤君, 韩丽萍, 袁进, 等. 蛇毒心脏毒素诱导肺腺癌A549细胞的凋亡机制研究[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 583.
- [2] 郭洁, 王小平, 白吉庆. 藤梨根乙酸乙酯提取物对人胃癌BGC细胞凋亡及Bax蛋白表达的影响[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 12.
- [3] 夏荣耀, 陈复辉, 张冉冉. 重组人血管内皮抑制素对肺腺癌A549细胞生长及凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(7): 1511.
- [4] 杨莉, 安益国, 郑建忠. 柚皮素诱导肺腺癌A549细胞凋亡的研究[J]. 中国现代医药杂志, 2014, 16(10): 19.
- [5] 王平, 董德平, 张建平, 等. 膀胱癌裸鼠移植瘤模型中下调生存素表达的实验研究[J]. 江西医药, 2014, 40(23): 2824.
- [6] 郑来双, 李玉莲, 李帅. 利巴韦林对人肺腺癌细胞A549、人乳腺癌细胞Hela迁移和凋亡的影响研究[J]. 中国药房, 2014, 25(33): 3103.
- [7] 王永富, 秦治明. 紫杉醇对肺癌细胞株A549Wnt/β-catenin信号通路相关基因和蛋白表达的影响[J]. 中国药房, 2012, 23(45): 4233.
- [8] 梁宪梅, 夏春波. 半枝莲乙酸乙酯提取物对肺腺癌A549细胞生存素蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 155.
- [9] 陈璇, 童晔玲, 任泽明, 等. 杨梅酮对人肺腺癌A549细胞凋亡和细胞周期的影响[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(1): 14.

(收稿日期: 2015-04-01 修回日期: 2015-06-03)

(编辑: 张静)