

傣百解提取物对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤的影响

李晓花, 李海涛, 金玲钰, 牛迎凤, 张丽霞*

(西双版纳州傣药南药重点实验室, 中国医学科学院北京协和医学院
药用植物研究所云南分所, 云南景洪 666100)

[摘要] **目的:**探讨傣百解乙酸乙酯提取物(ethyl acetate fraction, EFA)诱导人肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长的抑制作用及作用机制。**方法:**建立人肺癌裸鼠移植瘤模型,随机分为模型组, EFA 高、中、低剂量(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)组, 环磷酰胺组和消癌平组, 每组 6 只。给药 3 周后剥离瘤组织, 比较各组肿瘤质量, 计算抑制率; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法(TUNEL)检测各组移植瘤组织中的细胞凋亡情况; 免疫组化法(immunohistochemical staining, IHC)检测瘤组织中 p53, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白的表达。**结果:**与模型组比较, EFA 高、中、低剂量组对肿瘤组织具有明显的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TUNEL 法检测结果显示 EFA 给药处理后, 与模型组比较, 肿瘤细胞凋亡明显增多。免疫组化结果显示, 与模型组比较, 各给药组移植瘤 p53 和 Bax 蛋白表达明显升高, 而 Bcl-2 表达降低。**结论:**EFA 对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤具有明显的抑制作用, 其机制可能与上调 p53 和 Bax 蛋白的表达, 降低 Bcl-2 蛋白的表达, 诱导肺癌细胞凋亡相关。

[关键词] 傣百解提取物; 肺癌; 凋亡; p53; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0104-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020104

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1517.050.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:17

Effect of Daibaijie Extract on Human Lung Cancer A549 Tumor Cells in Nude Mice

LI Xiao-hua, LI Hai-tao, JIN Ling-yu, NIU Ying-feng, ZHANG Li-xia*

(Key Laboratory of Dai and Southern medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture,
Yunnan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical
Sciences and Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect and mechanism of ethyl acetate fraction (EFA) extracted from Daibaijie on A549 human lung cancer cell line in nude mice. **Method:** Xenotransplanted tumor models of A549 tumor cells in nude mice were established, and were randomly divided into model group, EFA high-dose, middle-dose and low-dose (200, 100, 50 mg·kg⁻¹) groups, Xiaoaiping group and cyclophosphamide group. There were six mice in each group. Tumor weights were observed to calculate the inhibitory rate after three weeks of administration. The apoptosis rates were measured by terminal dexynucleotidyl transferase (TdT) - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining method and the protein expression levels of p53, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by immunohistochemical staining (IHC). **Result:** As compared with the model group, EFA can significantly inhibit the growth of A549 xenografts in a dose manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). TUNEL assay results showed that the apoptosis rate of tumor cells increased significantly after treatment with EFA. The immunohistochemical results showed that, as compared with model

[收稿日期] 20160325(012)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN-15-01); 景洪市科技三项费专项([2014]-43-2)

[第一作者] 李晓花, 博士, 助理研究员, 从事中药新药研发工作, Tel:13035998827, E-mail:lixiaohua1030@163.com

[通讯作者] *张丽霞, 硕士, 副研究员, 从事热带药用植物种质资源保护工作, Tel:13988194288, E-mail:87050233@qq.com

group, the protein expression level of Bcl-2 was decreased, while the expression levels of p53 and Bax were increased in nude mice after treatment with EFA. **Conclusion:** EFA has a significant inhibitory effect on human lung cancer A549 in nude mice. The mechanism may be related to up-regulating the expression of p53 and Bax protein, decreasing the expression of Bcl-2 protein, and inducing apoptosis of lung cancer cells.

[**Key words**] ethyl acetate fraction; human lung cancer; apoptosis; p53; B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax)

肺癌近年来发病率和死亡率逐年上升,《2015 中国肿瘤登记年报》^[1]发表的统计数据显示,中国肺癌的总发病率为 733 人/10 万人,死亡率为 610.2 人/10 万人,居所有肿瘤发病率和死亡率首位。因此,寻找安全有效的治疗肺癌的药物尤为重要。傣百解是傣族最具特色的“解药”品种之一^[2],具有清火解毒、消肿止痛之功效,在我国西双版纳、德宏等傣族地区使用广泛^[3]。萝藦科(Asclepiadaceae)牛奶菜属(*Marsdenia*)植物有 100 多种,分布于美洲、亚洲及非洲,我国有 22 种 5 个变种^[4]。该属多种植物在民间广泛应用,如百灵草(*M. longipes*)具有舒筋活络、止咳平喘等功效,大白药(*M. griffithii*)具有止血接骨的功效,牛奶菜(*M. sinensis*)具有壮筋骨、健胃利肠的作用等^[5]。其中通关藤被 2015 年版《中国药典》^[6]收载,以其提取物开发成的抗肿瘤药物消癌平,临床用于治疗肺癌、食道癌、贲门癌等多种恶性肿瘤的治疗^[7]。课题组经过前期药理筛选,发现傣百解提取物体外对肺癌细胞具有显著的抑制作用,但关于傣百解提取物抗肿瘤效应及作用机制研究未见报道。本研究应用 A549 肺癌细胞裸小鼠移植瘤模型,通过测定肿瘤抑制率,末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法(TUNEL)检测移植瘤组织中的细胞凋亡情况,免疫组化法检测移植瘤组织中 p53, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白的表达,了解傣百解提取物抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 傣百解于 2014 年 3 月采自云南西双版纳州,经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所云南分所李海涛副研究员鉴定为萝藦科植物傣百解 *Marsdenia tenacissima* 的根茎,材料经过粗粉后,备用。原标本保存于中国医学科学院药用植物研究所云南分所标本馆(标本号 D20100720008)。消癌平片(陕西科学制药厂,批号 140225);注射用环磷酰胺(山西普德药业股份有限公司,批号 04141102);RPMI 1640 培养基,胎牛血清,胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为

11875085,10100-147,27250-018);p53, Bcl-2, Bax 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab179477, ab692, ab32503);TUNEL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C1098);DAB 显色剂(北京中杉金桥有限公司,批号 ZLI-9017)。

1.2 动物与细胞 BALB/c-nu 裸鼠购于北京中国医学科学院实验动物研究所,合格证号 SCXK(京)2014-0013;A549 人肺癌肿瘤细胞株购自中国科学院上海细胞库,用含有 10% FBS RPMI-1640 的培养液传代培养。

1.3 仪器 301499-5093 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司);CKX31/41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);DYCZ-24DN 型垂直电泳装置(北京六一仪器厂);HQ-350XT 型显影、定影设备(苏州虎丘影像设备有限公司);VE-386 型转移电泳槽(北京原平皓生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 傣百解提取物的制备 傣百解切段粉碎,取粉末 400 g,加入 10 倍量 95% 乙醇浸润,回流提取 2 h,减压浓缩,得到提取物浸膏,提取率为 13.0%。浸膏用蒸馏水 500 mL 混悬后,依次用等量的乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到乙酸乙酯部位(EFA)、正丁醇部位和水部位,得率分别为 5.9%, 1.4% 和 5.7%。根据《药理实验方法学》^[8]中的折算方法,将傣百解提取物、消癌平片和环磷酰胺按照临床使用剂量,根据折算系数,计算动物实验中药物的用法用量。取傣百解提取物乙酸乙酯部位(EFA)100 mg·kg⁻¹·d⁻¹为中剂量,2 倍为高剂量,1/2 的量为低剂量;消癌平片组用药剂量为 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹;环磷酰胺组用药剂量为临床用量的 2 倍,即 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

2.2 裸鼠移植瘤模型的建立、分组及给药^[9] 选取 6~8 周龄雌性裸鼠 40 只,适应性饲养 1 周。取对数生长期 A549 细胞,用胰酶消化后收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,计数后用无菌生理盐水调细胞密度为 5 × 10⁷ 个/mL,接种于裸鼠右前肢腋窝皮下,每只 0.1 mL,接种 1 周后,肉眼可见肿瘤形成,接种的肿瘤体积平均达 50~100 mm³,证实

接种成功,随机分为模型组,傥百解提取物乙酸乙酯部位(EFA, 50, 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,消癌平(1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,环磷酰胺(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,每组 6 只。模型组建模后,腹腔注射生理盐水,0.1 mL/次;傥百解提取物乙酸乙酯部位组和消癌平组每日按相应药物(0.5% 羧甲基纤维素钠助悬药物)灌胃,0.5 mL/次;环磷酰胺组按药物剂量注射环磷酰胺,0.1 mL/次。各组连续给药 3 周。

2.3 肿瘤质量抑制率测定^[9] 给药 3 周,治疗结束后次日,脱颈椎处死裸鼠,剥离肿瘤组织,称取肿瘤质量,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}) / \text{模型组平均瘤重} \times 100\%$$

2.4 TUNEL 法检测肿瘤组织中细胞凋亡^[10-11] 取剥离肿瘤组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,按 TUNEL 检测试剂盒说明操作,测定肿瘤组织中的细胞凋亡情况。每张切片随机选取 5 个视野,棕色颗粒为凋亡阳性细胞,阴性细胞核为蓝色,计数视野中凋亡细胞和细胞总数,计算细胞凋亡率。每组实验重复次数为 3 次。

$$\text{凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{肿瘤细胞总数} \times 100\%$$

2.5 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 p53, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达^[12-13] 取各组实验动物肿瘤组织,甲醛固定、石蜡包埋、切片后,按 p53, Bcl-2 和 Bax 免疫组化试剂盒说明书方法进行染色。切片脱蜡至水,进行抗原修复,加入一抗(1:100)孵育后,加入辣根过氧化物酶作为二抗孵育,DAB 溶液显色,苏木素复染后封片,棕黄色颗粒为阳性表达,观察蛋白在肿瘤组织中的表达情况。每组实验重复 3 次。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EFA 对移植瘤生长的影响 给药期间,EFA 组裸鼠活动正常,未见活动迟缓及四肢肌张力降低表现,二便及饮食情况正常,未见死亡现象。本研究中裸鼠接种成瘤率为 100%。

与模型组比较,EFA 各给药剂量明显抑制 A549 移植瘤的生长,肿瘤质量显著下降($P < 0.01$),抑瘤效果具有剂量依赖性。EFA 高剂量组抑瘤作用与环磷酰胺效果相当,EFA 低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 49.6% ,61.5% ,85.2% 。见表 1。

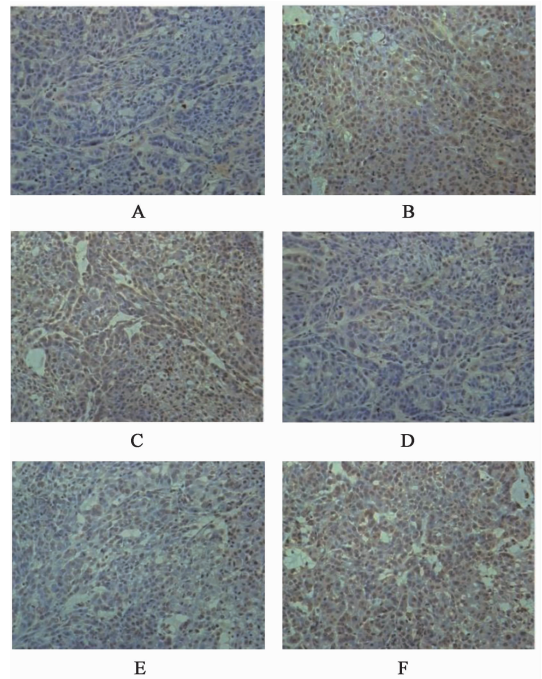
表 1 EFA 对人肺癌 A549 裸鼠移植瘤重、抑瘤率和凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of EFA on transplanted tumor weight, anti-tumor rate and apoptosis rate of human lung cancer A549 cells in nude mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿瘤质量 /g	抑瘤率 /%	凋亡率 /%
模型	-	1.35 ± 0.02	-	11.3 ± 0.03
EFA	50	0.68 ± 0.03	49.6 ²⁾	19.3 ± 0.02 ¹⁾
	100	0.52 ± 0.02	61.5 ²⁾	57.6 ± 0.06 ²⁾
	200	0.20 ± 0.03	85.2 ²⁾	80.5 ± 0.05 ²⁾
消癌平	1 200	0.18 ± 0.03	86.7 ²⁾	87.9 ± 0.01 ²⁾
环磷酰胺	50	0.14 ± 0.20	89.6 ²⁾	92.1 ± 0.03 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 EFA 对移植瘤组织细胞凋亡的影响 凋亡细胞的细胞核呈棕色,非凋亡细胞的细胞核为蓝色。与模型组比较,EFA 低剂量组肿瘤组织细胞明显凋亡,凋亡率为 19.3% ($P < 0.05$);EFA 中、高剂量组肿瘤组织细胞凋亡显著,凋亡率为 57.6% ,80.5% ($P < 0.01$)。计算各组细胞凋亡率。见表 1,图 1。



A. 模型组;B. 消癌平组;C. 环磷酰胺组;D~F. EFA 低、中、高剂量组(图 2~4 同)

图 1 EFA 对肿瘤组织凋亡的影响(TUNEL, ×200)

Fig.1 Effect of EFA on tumor cell apoptosis rate in tumor tissues (TUNEL, ×200)

3.3 EFA 对移植瘤组织中 p53, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 p53 蛋白是重要的肿瘤抑制基因,主要分布于细胞浆中;Bcl 家族蛋白是重要的细胞

凋亡调节因子,在生理状态下,Bcl-2 通常定位于线粒体膜、内质网膜和外核膜上,而 Bax 蛋白则以单体的形式定位于细胞浆中。与模型组比较,肺癌移植瘤组织中促凋亡蛋白 p53 和 Bax 的表达明显增加,但低于消癌平组和环磷酰胺组;EFA 能有效抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 在肿瘤组织中的表达,高于消癌平组和环磷酰胺组。以上实验结果说明,EFA 能通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,但可能不是唯一途径。见图 2~4。

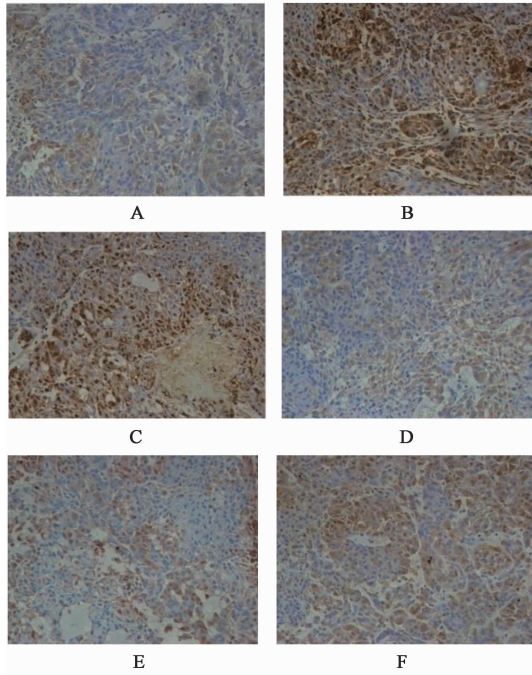


图 2 EFA 对肿瘤组织凋亡相关蛋白 p53 表达的影响(IHC, ×200)
Fig.2 Effect of EFA on expression of p53 protein in tumor tissues (IHC, ×200)

4 讨论

傣百解为国药准字品种“雅解片”的主要组方药材^[14],同时也是西双版纳傣医院多个院内制剂如百解胶囊、版纳凉剂、雅解嘎罕等的组方药材,其中“百解胶囊”在傣医临床应用较广,具有清热解毒、定心安神的作用,具有良好的应用开发前景^[15]。

动物体内实验模型进行抗肿瘤中药活性和作用机制研究是新药开发的前提,也是判断中药抗肿瘤作用的保障^[16]。移植性肿瘤动物模型具有生长速度较为一致、个体差异小、接种成活率高等优点,常用于观察药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用和诱导肿瘤细胞凋亡作用等^[17]。本研究结果表明,傣百解乙酸乙酯提取物可以抑制肺癌 A549 裸鼠移植瘤的生长,其中高剂量组的抑瘤率与环磷酰胺组效果相当,且给药过程中未出现动物死亡的情况。说明傣百解

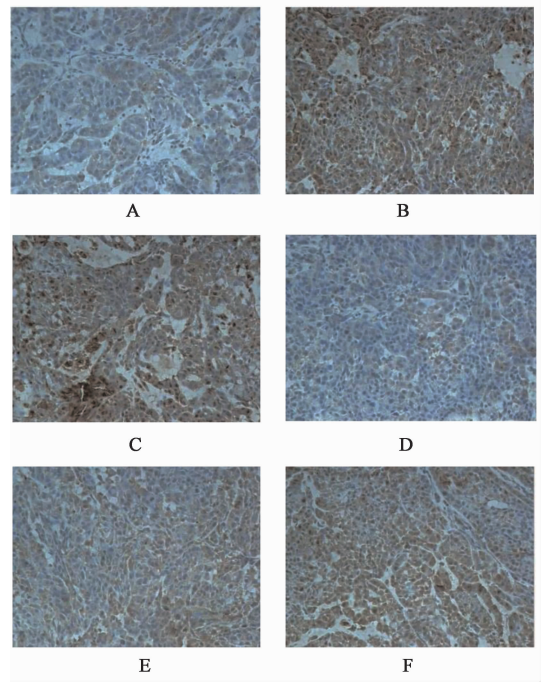


图 3 EFA 对肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bax 表达的影响(IHC, ×200)
Fig.3 Effect of EFA on expression of Bax protein in tumor tissues (IHC, ×200)

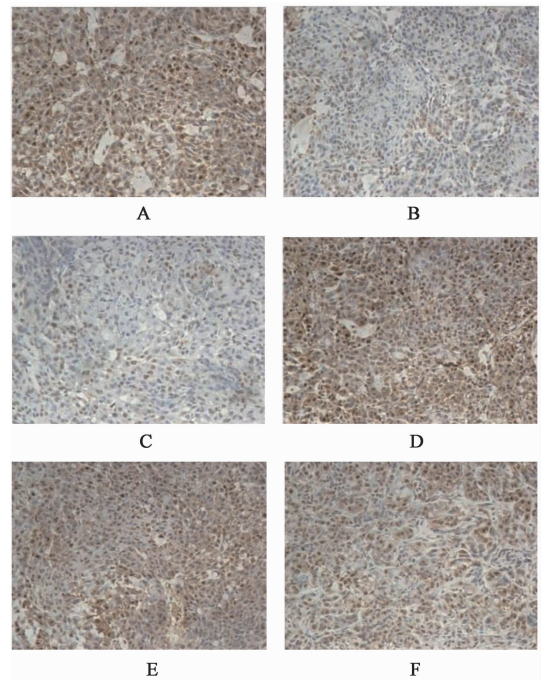


图 4 EFA 对肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达的影响(IHC, ×200)
Fig.4 Effect of EFA on expression of Bcl-2 protein in tumor tissues (IHC, ×200)

提取物具有显著的抑制肿瘤生长的作用和低毒的优点。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是细胞内发生

的一系列有序受控的连锁反应,有多种基因蛋白参与其中^[18]。实验结果显示,EFA可以诱导肿瘤组织细胞凋亡,与模型组比较,EFA中剂量和高剂量组具有显著差异;分子水平作用机制结果显示,EFA能增加肿瘤组织中 p53, Bax 蛋白的表达,降低 Bax 蛋白表达,说明 EFA 可能通过诱导 p53 的表达,抑制 Bcl-2 基因的转录,上调 Bax 表达^[19-20],进而提高线粒体的外膜通透性,增加线粒体中细胞色素 C 的释放,激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)蛋白,最终导致细胞凋亡。

综上,傣百解具有抗肿瘤活性,但傣百解提取物具体通过哪些化学成分和调控哪些信号通路发挥抗肿瘤作用,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 赫捷,陈万清. 2015年中国肿瘤登记年报[M]. 北京:军事医学科学出版社,2015:100-101.

[2] 林艳芳,依专,赵映红. 中国傣医药彩色图谱[M]. 昆明:云南民族出版社,2000:397.

[3] 李海涛,康利平,郭宝林,等. 常用傣药“傣百解”的基原考证[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1525-1529.

[4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1977:442-465.

[5] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1975. http://www.360doc.com/content/13/1211/10/7721693_336277127.shtml.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:296.

[7] 姜成,郑全英,肖何. 消癌平抗肿瘤药理实验与临床研究进展[J]. 上海中医药杂志,2007,41(7):78-79.

[8] 魏伟. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1698.

[9] 朱际平,沈健,晏婷婷. 消癌解毒方对肺癌 A549 细

胞裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 四川中医,2015,33(5):41-43.

[10] 黄小平,欧阳国,丁煌,等. 黄芩甲苷与三七有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和内质网应激的影响[J]. 中草药,2015,46(15):2257-2264.

[11] 李然,刘立萍,王哲,等. 丹栀逍遥散对人乳腺癌 MCF-7 细胞株裸鼠移植瘤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(2):78-81.

[12] 朱耀东,刘延庆,钱亚云,等. 南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中草药,2015,46(5):697-702.

[13] 李辉敏,殷嫦嫦,姜登钊. 刺头复叶耳蕨总黄酮体内抗肿瘤作用初探[J]. 中成药,2015,37(11):2347-2351.

[14] 彭霞,赵应红,廖瑞玲,等. 傣药雅解片质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志,2001,7(4):28.

[15] 曾君,曾湘荣. 傣药雅解沙把(百解胶囊)的研究概况[J]. 中国民族民间医药,2009,18(21):23-24.

[16] 刘华钢,刘丽敏,黄慧学,等. 抗肿瘤中药动物模型及机制研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(7):1334-1338.

[17] 吴细丕. 实验动物与肿瘤研究[M]. 北京:中国医药科技出版社,1999:122.

[18] 欧阳亮亮,李祺福,洪水根. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. 国外医学肿瘤学分册,2000,27(5):266-269.

[19] Tokino T, Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2000, 33(1):1-6.

[20] Kluck R M, Bossy-Wetzel E, Green D R, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. Science, 1997, 275(275):1132-1136.

[责任编辑 张丰丰]