

· 药理 ·

芹菜素抗肺癌 SPC-A1 细胞增殖和诱导凋亡作用

杨周萍, 臧林泉, 黄婕, 潘晓彤, 张正兵, 张海涛, 杜侃, 潘雪刁*
(广东药学院药科学院药理系、新药筛选与药效学评价中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨芹菜素对人非小细胞肺癌 SPC-A1 细胞增殖和凋亡的影响。方法:体外常规培养人肺癌细胞株 SPC-A1 细胞,用 5~80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度芹菜素作用 SPC-A1 细胞,MTT 法检测细胞增殖抑制率;Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡的形态学变化;流式细胞术 FITC-Annexin V/碘化丙啶(PI)双标记染色法检测细胞凋亡率。结果:芹菜素对 SPC-A1 细胞增殖的抑制作用呈时间和浓度依赖性,芹菜素干预 24,48,72 h 的 IC_{50} 值分别为 319.02,37.23,18.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;Hoechst 33258 染色后倒置荧光显微镜下观察可见芹菜素给药后出现细胞数逐渐减少,凋亡细胞核固缩,染色质凝集,着色深而呈亮蓝色;流式细胞术检测结果显示芹菜素可诱导 SPC-A1 细胞出现不同程度的凋亡。结论:芹菜素能抑制人非小细胞肺癌 SPC-A1 细胞的增殖和诱导其凋亡。

[关键词] 芹菜素; SPC-A1 细胞; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)01-0115-04

[doi] 10.11653/syfyj2014010115

Effect of Apigenin on Proliferation and Apoptosis in Human NSCLC SPC-A1 Cell Line

YANG Zhou-ping, ZANG Lin-quan, HUANG Jie, PAN Xiao-tong, ZHANG Zheng-bing,
ZHANG Hai-tao, DU Kan, PAN Xue-diao*
(New Drug Screening and Efficacy Evaluation Center, Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of apigenin on the growth inhibition and apoptosis in human lung cancer cell line SPC-A1. **Method:** Lung cancer cell line SPC-A1 were cultured *in vitro* routinely with different concentration (5-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cell proliferation was detected by MTT. Hoechst 33258 was used to detect the morphological change of apoptotic cells. Stained by Annexin V and propidium iodide (PI), the cells were observed by flow cytometry for apoptosis. **Result:** The proliferation of human lung cancer cell line SPC-A1 could be inhibited and apoptosis could be induced by apigenin. The inhibition rate and apoptosis rate were different with the different concentrations. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) at the 24, 48, 72 h was 319.02, 37.23, 18.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. Apoptotic body could be observed by Hoechst 33258 dying. Flow cytometry showed that apigenin could induce SPC-A1 cell apoptosis distinctly at different levels. **Conclusion:** Apigenin could inhibit the proliferation and induce apoptosis of human non-small cell lung cancer SPC-A1.

[Key words] apigenin; SPC-A1 cell; cell proliferation; apoptosis

[收稿日期] 20130520(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102465);国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2011zx09102-001-31);国家高技术研究发展计划(863 计划,2012AA020304)

[第一作者] 杨周萍, 硕士, 从事药理学专业研究, Tel:15915917493, E-mail:964976992@qq.com

[通讯作者] * 潘雪刁, 硕士, 讲师, 从事肿瘤药理及多肽药物的研究, Tel:020-39352123, E-mail:panxuediao@126.com

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,肺癌患者 5 年生存率没有明显改变,其中非小细胞肺癌死亡率约占 80%^[1-2]。目前,化疗仍是肺癌的主要治疗手段,但其毒副作用大,近年来众多学者努力寻求中西医结合治疗方法来减少化疗的毒副作用。

芹菜素 (apigenin, API) 是一种低毒、非诱变性的黄酮类物质^[3], 主要来源于蔬菜和水果^[4], 也存在于一些药材中, 例如黑草药材等^[5]。实验证明^[6-12], 芹菜素在体外能够显著抑制多种肿瘤细胞的生长, 诱导其凋亡, 从而抑制肿瘤的生长, 但关于抗非小细胞肺癌的研究较少, 本实验观察了芹菜素体外抗人非小细胞肺癌 SPC-A-1 细胞增殖以及诱导其凋亡的作用, 为肺癌的预防和治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞株 人非小细胞肺癌细胞株 SPC-A1, 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂 芹菜素 (纯度为 $\geq 98\%$, 阿拉丁公司, 批号 22806); 0.25% 胰蛋白酶 (批号 1147330), 胎牛血清 (FBS, 批号 8131650), 均为美国 Gibco 公司; RPMI 1640 培养基 (美国 Thermo 公司, 批号 MYB0809); Hoechst 33258 试剂 (韩国 Biosharp 公司, 批号 WH201203); 噻唑蓝 (MTT, 批号 0793); 青霉素 (批号 10251), 均为广州瑞舒生物科技有限公司; 硫酸链霉素 (北京鼎国生物技术有限责任公司, 批号 FW1457); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGA108)。

1.3 仪器 3111 型 CO₂ 恒温细胞培养箱、CR3i 冷冻型多功能离心机 (美国 Thermo 公司), SW-CJ-1FD 型洁净工作台 (洁净度 ISO 5) (苏州安泰空气技术有限公司), 680 型酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司), KQ-100M 型超声清洗器 (东莞市科桥超声波设备有限公司), 倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司), 贝克曼 EPICS XL 型流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 按常规方法培养 SPC-A1 细胞株, 在完全培养基 (含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中恒温培养。

2.2 检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 SPC-A1 细胞, 接种于 96 孔板 (细胞密度为 3×10^3 个/孔), 细胞贴壁后分别加入 100 μL 不同浓度的

芹菜素 (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其中, 加入 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的芹菜素组为对照组。同时设空白组 (不加细胞, 其他平行操作), 每组设 4 个复孔, 分别培养 24, 48, 72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 4 h 后, 弃上清, 加入二甲基亚砜 100 μL 溶解, 置于摇床振荡 10 min, 至结晶完全溶解后, 于酶标仪上测定波长 570 nm 下的每孔吸光度 (A), 并计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (\text{对照孔 } A - \text{加药孔 } A) / (\text{对照孔 } A - \text{空白组 } A) \times 100\%$$

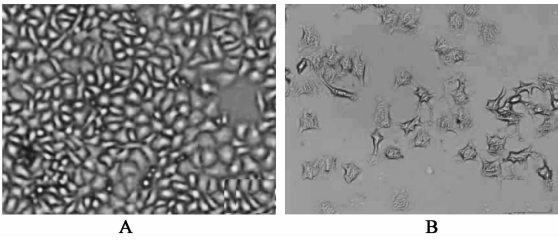
2.3 检测细胞凋亡形态学变化 取对数生长期 SPC-A1 细胞调整密度为 1×10^5 个/mL, 以每孔 1 mL 接种于 6 孔培养板中, 细胞贴壁后, 分别加入 1 mL 不同浓度的芹菜素 (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 48 h 后, 将培养液吸尽, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 4% 的多聚甲醛液 1 mL 固定 20 min。弃固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min。加 Hoechst 33258 (5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 染色液 1 mL, 室温避光染色 10 min 后, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 超净台中避光风干, 倒置荧光显微镜观察, 并随机拍照。

2.4 检测细胞凋亡率 取对数生长期的 SPC-A1 细胞调整密度 1×10^7 个/mL, 以每孔 1 mL 接种于 6 孔培养板中。细胞贴壁后, 按 2.3 分别加入不同浓度的芹菜素, 继续培养 48 h。悬浮细胞收集, 再消化收集贴壁细胞, 离心 (2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 弃上清。用 PBS 洗涤 2 次。加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 再加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL PI, 混匀, 室温避光反应 5 min, 于流式细胞仪进样检测, 并以仪器所配软件进行数据处理, 计算细胞凋亡率。

2.5 统计学分析 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行 ANOVA *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学观察 细胞培养 48 h 后在倒置显微镜下观察, 正常对照组 SPC-A1 (图 1-A) 的短梭形细胞, 细胞透明, 折光性较好, 胞浆丰富透亮, 细胞间连接紧密, 细胞密度较大, 极少见悬浮的死细胞及细胞碎片。选择 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的芹菜素作用 48 h 后观察 (图 1-B), 大体可见细胞密度明显减少, 细胞内颗粒感增强, 胞体变长, 细胞间隙逐渐增宽, 细胞界限模糊, 胞浆减少, 细胞脱落呈悬浮状, 可见细胞碎片, 存活细胞减少。



A. 对照组; B. 芹菜素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 1 芹菜素作用 48 h SPC-A1 细胞的形态学变化 ($\times 200$)

表 1 芹菜素对肺癌 SPC-A1 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

芹菜素浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
	A_{570}	抑制率/%	A_{570}	抑制率/%	A_{570}	抑制率/%
对照组	0.989 ± 0.025	-	1.001 ± 0.036	-	1.140 ± 0.040	-
5	0.879 ± 0.044	11.86 ¹⁾	0.954 ± 0.042	18.85 ¹⁾	0.896 ± 0.039	22.56 ¹⁾
10	0.854 ± 0.019	14.55 ¹⁾	0.949 ± 0.022	21.04 ¹⁾	0.755 ± 0.026	35.63 ¹⁾
20	0.835 ± 0.048	16.65 ¹⁾	0.884 ± 0.030	46.60 ¹⁾	0.476 ± 0.042	61.42 ¹⁾
40	0.828 ± 0.030	17.38 ¹⁾	0.871 ± 0.021	51.77 ¹⁾	0.453 ± 0.040	63.56 ¹⁾
80	0.663 ± 0.043	37.17 ¹⁾	0.856 ± 0.021	57.92 ¹⁾	0.337 ± 0.016	74.28 ¹⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

色后可见,对照组细胞核大,核内的荧光染色浅,且亮度均一,呈淡蓝色。不同浓度的芹菜素处理后可见细胞出现凋亡,细胞数目随芹菜素浓度增大而逐渐减少,出现细胞凋亡形态学改变,包括凋亡细胞核固缩,细胞核碎裂成块状、着色深而呈亮蓝色,生成凋亡小体(见图 2)。

3.4 细胞凋亡率检测 流式细胞术结果显示,芹菜素作用后,晚期凋亡和坏死的细胞均明显多于对照组,且凋亡细胞数目随芹菜素的浓度增高而增加,呈现浓度依赖性。不同浓度的芹菜素作用 SPC-A1 细胞 48 h 后,5,10,20,40,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芹菜素的细胞凋亡率分别为 43.9%,50.9%,52.3%,80.2%,90.8%。此结果与 MTT 实验结果一致,提示芹菜素对 SPC-A1 细胞增殖的抑制作用与诱导其凋亡有关。

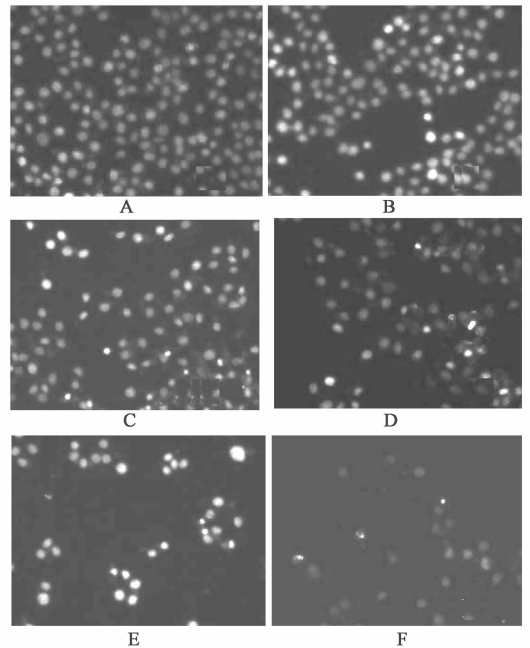
4 讨论

芹菜素,是一种天然存在于蔬菜和水果类的黄酮类化合物,它是鸟氨酸脱羧酶的强抑制剂,而此酶在肿瘤的诱发中起重要作用。芹菜素可以降低紫外线诱发的癌症发生率^[12],局部用药可以抑制二甲苯并蒽所诱发的皮肤癌^[13],吸烟患者肺癌的发生与芹菜素等黄酮类化合物的摄入量呈负相关等^[14],越来越多的有关抗肿瘤方面的研究已见报道^[8-11],但有关芹菜素抗非小细胞肺癌的研究却很少。

在本实验中,芹菜素对非小细胞肺腺癌细胞株

3.2 对 SPC-A1 细胞增殖的抑制作用 不同浓度的芹菜素处理 SPC-A1 细胞后,细胞生长受到不同程度的抑制,其抑制作用呈时间和浓度依赖性,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。采用 SPSS 11.0 统计软件统计分析,得芹菜素干预 24,48,72 h 的 IC_{50} 值分别为 319.02,37.23,18.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 SPC-A1 细胞荧光染色结果 Hoechst33258 染



A. 对照组; B. 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素; C. 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素;
D. 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素; E. 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素;
F. 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素

图 2 不同浓度芹菜素作用于 SPC-A1 细胞 48 h 形态凋亡 (Hoechst33258 荧光染色, $\times 200$)

SPC-A1 细胞的增殖具有抑制作用。并且具有浓度-效应和时间-效应的关系。本研究在非小细胞肺癌 SPC-A1 细胞中加入不同浓度的芹菜素后,培养 24,48,72 h 后检测发现,随着芹菜素浓度增加,对细胞

的抑制作用明显增强,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素作用 48 h 时,与对照组有显著性差异,表明 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可能是芹菜素发挥药效的最低浓度。这有助于为芹菜素抗非小细胞肺癌的进一步研究及其临床用药提供药效时间的依据。

检测细胞凋亡的 PI/AnnexinV 双染法可有效地区分凋亡及坏死细胞群,是目前国际上公认的检测方法,流式细胞术检测结果表明芹菜素药物作用 SPC-A1 细胞体积发生皱缩,且皱缩细胞数呈现浓度的依赖性,其凋亡率随药物浓度增大而增大,具有浓度依赖性。Annexin V/PI 双染法证实了芹菜素可以诱导细胞凋亡,从而抑制 SPC-A1 细胞增殖,发挥抗肿瘤作用。

总之,芹菜素可通过诱导肺癌细胞 SPC-A1 细胞凋亡,明显抑制肺癌细胞 SPC-A1 细胞的增殖。这提示芹菜素将会在今后的非小细胞肺癌的预防和治疗中具有广阔的前景,但是目前其抑制非小细胞肺癌生长和诱导凋亡的作用机制仍未明确,因此,对其机制的探讨和体内应用情况仍待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71.
[2] Sunil S, Anil V, Danielle Ao. Prognostic implications of cell cycle, a poptosis, and angiog-ensis biomarkers in non-small cell lung cancer; a review[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11):3974.
[3] Czeezot H, Tudek B, Kusztejak J, et al. Isolation and studies of the mutagenic activety in the Ames test of flavonoidsnaturally occurring medical herbs[J]. Mutat Res, 1990, 240(3):209.
[4] Horinaka M, Yoshida T, Shiraihit, et al. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(4):945.
[5] 刘吉成. HPLC 测定黑草中木犀草素和芹菜素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):72.
[6] 刘斌, 巴一. 芹菜素防治肿瘤及其机制研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 02(28):222.
[7] 吴华涛, 马涛, 孟勇. 芹菜素对肿瘤抑制作用研究进展[J]. 中国现代医生, 2009, 47(6):41.
[8] Way T D, Kao M C, Lin J K. Degradation of HER 2 / neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2 /neu overexpressing breast cancer cells [J]. FEBS Lett, 2005, 579(1):145.
[9] Hu T P, Cao J G. Study on pro-apoptotic effect of apigenin on human gastric cancer cells an-d its underlying mechanis[J]. Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(10):6.
[10] 杜俊瑶, 辛彦. 芹菜素抑制人卵巢癌 CAO3 细胞增殖的研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(5):374.
[11] Zheng P W, Chiangle, Linc C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells [J]. Life Sci, 2005, 76(12):1367.
[12] Birt D F, Mitchell D, Gold B, et al. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1mice by apigenin, a plant flavonoid[J]. Anticancer Res, 1997, 17(1A):85.
[13] Wei H, Tye L, Bresnick E, et al. Ingibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice [J]. Cancer Res, 1990, 50(3):499.
[14] Cui Y, Morgenstern H, Greenlsnd S, et al. Dietary flavonoid intake and lung cancer-a population-based case-control study[J]. Cancer, 2008, 112(10):2241.

[责任编辑 聂淑琴]