

白术精油含药血清对人肺癌 A549 细胞株的抑瘤作用及机制研究

牟洁¹, 黄小千², 朱莹^{3,4}, 贺嵩敏^{3,4}, 冯兵^{3,4}, 李秀丽², 郑广娟^{3,4*}

(1. 山东医学高等专科学校, 济南 250000; 2. 山东中医药大学, 济南 250000;
3. 广东省中医院, 广州 510006; 4. 广东省中医药科学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨白术精油对人肺癌 A549 细胞的抑瘤作用及作用机制。方法:白术精油乳剂灌胃 SD 大鼠,10 日后采集含药血清体外培养 A549 细胞,噻唑蓝法(MTT)测其细胞生长抑制率,流式细胞术(FCM)检测白术精油含药血清对 A549 细胞细胞周期的影响,酶联免疫法(ELISA)检测白术精油含药血清对 A549 细胞半胱天冬蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达的影响。结果:白术精油中剂量组($150 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)15% 含药血清、高剂量组($300 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)15% 含药血清能够显著抑制 A549 细胞增殖,使 A549 细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,并能显著增加 A549 细胞 caspase-3 的蛋白含量。结论:白术精油具有抑制 A549 细胞增殖的作用,其抑瘤机制可能是控制 A549 细胞周期停滞在 G_0/G_1 期、促进细胞内 caspase-3 的蛋白表达促进细胞凋亡,从而抑制 A549 细胞增殖。

[关键词] 白术精油; A549 细胞; 抑瘤; 机制; 细胞周期; 半胱天冬蛋白酶 3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0209-04

[doi] 10.11653/syfy2013220209

Antitumor Effects and Mechanism of Essential Oil of *Atractylodes macrocephala* and on Lung Cancer Cell Line A549

MU Jie¹, HUANG Xiao-qian², ZHU Ying^{3,4}, HE Song-min^{3,4}, FENG Bing^{3,4},
LI Xiu-li², ZHENG Guang-juan^{3,4*}

(1. Shandong Medical College, Ji'nan 250000, China; 2. Shandong University of
Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250000, China;
3. Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510006, China;
4. Guangdong Provincial Academy of TCM, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor effect and the mechanism of *Atractylodes macrocephala* essential oils on human lung cancer A549 cells. **Method:** *A. macrocephala* oil emulsion was orally given to rats, after 10 days collection containing drug serum was collected, A549 cells were cultured in serum, MTT method was used to measure the activity of A549 cells, and ELISA method was used to assay the expression of caspase-3 in A549 cells. **Result:** 150, 300 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ of containing *A. macrocephalae* oil 15% serum could significantly inhibit the proliferation of A549 cell, A549 cell cycle arrested in G_0/G_1 phase, and increased the content of caspase-3 protein in A549 cells. **Conclusion:** *A. macrocephalae* oil can inhibit the proliferation of A549 cells, its antitumor mechanism may control A549 cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase, promote the expression of the caspase-3 protein.

[Key words] essential oil of *Atractylodes macrocephala*; A549 cells; inhibit; mechanism; caspase-3

[收稿日期] 20130402(025)

[基金项目] 山东省科技厅重大项目 2008GG30002027

[第一作者] 牟洁,教授,从事药剂学研究,Tel:0531-86305165,E-mail:mujie_111@163.com

[通讯作者] * 郑广娟,博士生导师,教授,从事中西医结合治疗心血管疾病和肿瘤转移研究,E-mail:zhengguangjuan@163.com

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz 的干燥根茎。白术性温味苦、甘,归脾经、胃经,具有健脾益气,燥湿利水,止汗,安胎之功效^[1]。有文献研究表明,白术具明显抗肿瘤功效^[2]。目前文献研究表明,白术对 S180 肉瘤、肝癌、艾氏腹水癌、膀胱癌等均有一定的抑瘤作用,但对肺癌的抑瘤作用研究较少,尚未有白术对肺癌抑瘤机制的研究;且用药方式多为白术水煎剂,对白术精油给药的抑瘤作用研究较少。本课题组前期试验表明,白术水煎剂具明显抑瘤及抗肿瘤转移的作用,并进一步对其提取物体外研究发现,其抑瘤及抗肿瘤转移作用的主要有效成分为白术精油。为初步阐述白术精油对肺癌的抑瘤作用及机制,本实验以人肺癌 A549 细胞株为研究对象,给予白术精油含药血清,MTT 法测其细胞生长抑制率,FCM 法检测白术精油含药血清对 A549 细胞细胞周期的影响,ELISA 法检测白术精油含药血清对 A549 细胞 caspase-3 蛋白表达的影响。本研究将首次进行白术精油含药血清对肺癌 A549 细胞活性、细胞周期及 caspase-3 的蛋白表达方面研究,并初步阐述白术精油的抑瘤机制。

1 材料

1.1 细胞株 人肺癌 A549 细胞株由广东省中医院中心实验室惠赠。中国细胞库典藏细胞中心细胞目录编号 QK10865。

1.2 药品及试剂 白术饮片(康美药业股份有限公司,111208111)、吐温-80(天津市富宇精细化工有限公司,20120221)、顺铂注射液(南京制药厂有限公司生产,批号 20120502)、水合氯醛(上海化学试剂采购供应五联化工厂,2010020879)、FBS(英潍捷基贸易有限公司,96118006-2)、PBS(吉诺生物医药技术有限公司,12112904)、RPMI 1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,NXR0575)、青霉素-链霉素(hyclone,SH30028.01B)、0.25% 胰酶(吉诺生物医药技术有限公司,12110307)、0.25% 不含 EDTA 胰酶(吉诺生物医药技术有限公司,12110902)、噻唑蓝(MTT,Sigma,0219020202)、二甲基亚砜(DMSO,北京鼎国昌盛生物技术有限公司,D5879)、人胱天蛋白酶 3 检测试剂盒(caspase-3,USCN,L121212271)、碘化丙啶(PI,Sigma,0210035105)。

1.3 仪器 粉碎机(哈瑞工贸有限公司,Q-250B3),超临界流体萃取装置(江苏华安科研仪器有限公司,HA121-50-05),细胞培养箱(上海博讯仪器有限公司,HH.CP-7W),电动匀浆器(IKA,T10),5430R 型高速台式冷冻离心机(ependorf),BX51 型

显微镜(Olympus),DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),6HT-2L 型流式细胞仪(美国默克),多功能酶标仪(Biotek,EonC),真空采血管(广州阳普医疗科技股份有限公司,120507),0.22 μm 微孔滤膜(NEST,W20120109087)、GKC 型控温水浴箱(上海苏达实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 白术精油的提取 取生白术饮片 200 g,粉碎过 20 目筛,装入提取罐,调节超临界流体萃取仪,控制萃取压力 25 MPa,CO₂ 流量 25 ~ 30 L·h⁻¹、萃取温度 40 °C,超临界萃取法提取 2 h,收集所得白术精油。

2.2 白术精油乳剂的制备 白术精油加适量乳化剂吐温-80(乳剂量的 1%)混匀,加少许纯化水混匀制成初乳后,再加纯化水至所需量。

2.3 含药血清的制备 SD 大鼠按体重随机分为 4 组,每组 3 只。第 1 组为蒸馏水组,第 2 组为白术精油低剂量组(白术精油 75 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$),第 3 组为白术精油中剂量组(白术精油 150 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$),第 4 组为白术精油高剂量组(白术精油 300 $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)。其中蒸馏水组每天给予 10 mL·kg⁻¹ 蒸馏水灌胃;白术精油各组每天分别给予 10 mL·kg⁻¹ 不同浓度的白术精油乳剂灌胃。10 d 后,SD 大鼠提前一晚禁食,10% 水合氯醛麻醉(ip,0.33 g·kg⁻¹),腹主动脉取血于促凝采血管中,标记,静置。3 000 r·min⁻¹ 离心机离心 15 min,取血清,56 °C 水浴锅灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装至 2 mL EP 管,冰箱冷冻备用。

2.4 白术精油对人肺癌 A549 细胞株的影响 无菌条件下,取对数生长期人肺癌 A549 细胞,0.25% 胰酶消化,计数为 2×10^4 个/mL,以 100 μL /孔接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁后,将细胞分为 5 组,分别为蒸馏水组、顺铂组、白术精油低、中、高剂量组,每组设 12 个复孔。蒸馏水组加入 RPMI 1640 培养基(10% FBS + 90% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),浓度 100 mL·L⁻¹;顺铂组加入含 5% 顺铂注射液的培养基(5% 顺铂注射液 + 95% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),浓度 50 mL·L⁻¹;白术精油各组分别加入 15% 上述大鼠含药血清的培养基(15% 含药血清 + 85% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),其白术精油浓度分别为低剂量组 0.10 mL·L⁻¹、中剂量组 0.19 mL·L⁻¹、高剂量组 0.38 mL·L⁻¹。加药后每隔 2 h 于显微镜下观察细胞的生长状态、贴壁及死亡情况。24 h 后,避光加入 MTT(5 g·L⁻¹),10 μL /孔。4 h 后,加入 DMSO,100 μL /孔,振荡器振荡

至结晶溶解,于全自动酶标仪上机检测,570 nm 波长下测定各孔吸光度(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (\text{给药组 A} - \text{空白对照组 A}) / (\text{蒸馏水组 A} - \text{空白对照组 A}) \times 100\%$$

2.5 白术精油对人肺癌 A549 细胞株细胞周期的影响 无菌条件下,取对数生长期人肺癌 A549 细胞,0.25% 胰酶消化,计数为 1×10^6 个/mL,以 2 mL/孔接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁后,将细胞分为 4 组,分别为蒸馏水组、白术精油低、中、高剂量组,每组设 12 个复孔。蒸馏水组加入 RPMI 1640 培养基(10% FBS + 90% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),浓度 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$;白术精油各组分别加入 15% 上述大鼠含药血清的培养基(15% 含药血清 + 85% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),其白术精油浓度低、中、高剂量组分别为 0.10, 0.19, 0.38 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。24 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,离心,预冷 PBS 洗涤两次,加预冷的 75% 乙醇 1 mL/孔,固定过夜。固定好的细胞离心弃上清,3 mL PBS 洗涤,过 200 目筛网,离心弃上清,分别加入 PI($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 500 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。孵育好的标本,流式细胞仪检测,分析其细胞周期。

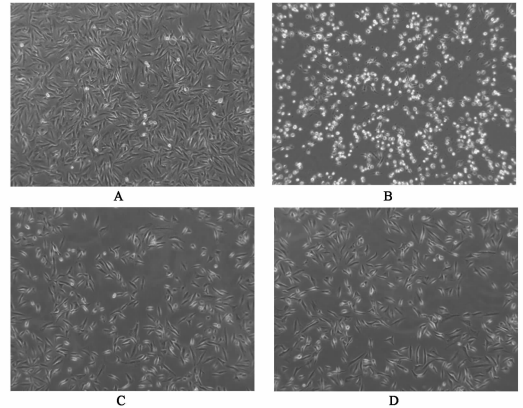
2.6 白术精油对人肺癌 A549 细胞株 caspase-3 蛋白表达的影响 无菌条件下,取对数生长期人肺癌 A549 细胞,0.25% 胰酶消化,计数为 1×10^6 个/mL,以 2 mL/孔接种于 96 孔培养板中。待细胞贴壁后,分为 5 组,分别为蒸馏水组、顺铂组、白术精油低剂量组、白术精油中剂量组、白术精油高剂量组,每组设 6 个复孔。蒸馏水组加入 RPMI 1640 培养基(10% FBS + 90% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),浓度 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$;顺铂组加入含 5% 顺铂注射液的培养基(5% 顺铂注射液 + 95% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),浓度 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$;白术精油各组分别加入 15% 上述大鼠含药血清的培养基(15% 含药血清 + 85% RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素),其白术精油浓度分别为低剂量组 $0.10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、中剂量组 $0.19 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、高剂量组 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。36 h 后,消化,离心,弃上清,用预冷 PBS 洗涤 3 次后,加 PBS 500 μL ,冰箱反复冻融 3 次,离心机离心。取上清为样品标本,按照 ELISA 试剂盒步骤说明进行操作。

2.7 统计学处理 实验数据采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 给药后人肺癌 A549 细胞株生长状态观察

蒸馏水组细胞呈长梭形,贴壁生长,生长状态良好,极少量散在死细胞。顺铂组细胞生长状态不佳,活细胞数量稀少,大量散在死细胞。白术精油给药组细胞大部分呈长梭形贴壁生长,生长状态较好,少量散在死细胞。见图 1。



A. 蒸馏水组;B. 顺铂 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;
C. 白术精油 $0.19 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. 白术精油 $0.38 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 白术精油含药血清对人肺癌 A549 细胞株生长状态的影响($\times 100$)

3.2 白术精油对人肺癌 A549 细胞株的影响 由表 1 知,白术精油含药血清能够抑制人肺癌 A549 细胞株的增殖,以白术精油中剂量组效果最好(细胞生长抑制率 45.7%)。顺铂组、白术精油各用药组与蒸馏水组比较具有显著性差异。

表 1 白术精油含药血清对人肺癌 A549 细胞株增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	药物终浓度 / $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率 / %
蒸馏水	-	100
顺铂 ³⁾	50	$44.3 \pm 4.6^{2)}$
白术精油	0.10	$75.3 \pm 9.4^{2)}$
	0.19	$54.3 \pm 8.2^{2)}$
	0.38	$59.3 \pm 4.0^{2)}$

注:与蒸馏水组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;³⁾ 顺铂的终浓度单位为“ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ”(表 2~3 同)。

3.3 白术精油对人肺癌 A549 细胞株细胞周期的影响 由表 2 知,白术精油含药血清处理人肺癌 A549 细胞株后, G_0/G_1 期肿瘤细胞增加, G_2/M 期、S 期肿瘤细胞减少,且以白术精油高剂量组效果最好。顺铂组、白术精油中剂量组、白术精油高剂量组与蒸馏水组比较具有显著性差异。

3.4 白术精油对人肺癌 A549 细胞株 caspase-3 蛋白表达的影响 由表 3 知,顺铂组、白术精油各剂量组 caspase-3 含量均高于蒸馏水组。顺铂组、白术精油各剂量组与蒸馏水组比较具有显著性差异。

表 2 白术精油对人肺癌 A549 细胞株细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	药物终浓度/mL·L ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ /M 期	S 期
蒸馏水	-	62.16 ± 4.24	19.49 ± 2.49	18.35 ± 1.58
白术精油	0.1	64.15 ± 1.27	17.26 ± 1.04	18.59 ± 2.41
	0.19	70.19 ± 3.27 ¹⁾	16.14 ± 2.54	13.67 ± 1.18 ¹⁾
	0.38	72.71 ± 1.58 ²⁾	13.13 ± 3.16 ¹⁾	14.16 ± 4.29 ¹⁾

表 3 白术精油对人肺癌 A549 细胞株中 caspase-3 浓度的影响

组别	药物终浓度/mL·L ⁻¹	Caspase-3/μg·L ⁻¹
蒸馏水	-	3.50 ± 0.10
顺铂 ³⁾	50	8.33 ± 0.35 ²⁾
白术精油	0.10	4.44 ± 0.13 ²⁾
	0.19	5.34 ± 0.51 ²⁾
	0.38	5.35 ± 0.37 ²⁾

4 讨论

细胞有增殖、分化和凋亡 3 个方面的特征,在维持正常组织的生长平衡过程中,三者相互协调,共同调节。如果其中一个特征受抑,细胞的平衡调节被破坏,一旦机体不能重新恢复这种平衡,细胞数目将不断增加,表现出生长优势,这是肿瘤形成的重要基础。

细胞周期指细胞增殖的过程,分 4 个阶段:DNA 合成前期(G₁ 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G₂ 期)、有丝分裂期(M 期)。细胞周期延长,长期处于静止态,不发生增殖,称 G₀ 期。本实验结果表明,白术精油不同浓度的含药血清作用于 A549 细胞 24 h 后,细胞周期发生了改变。与蒸馏水组相比,白术精油含药血清能明显增加人肺癌 A549 细胞在 G₀/G₁ 期数目,并随着浓度增加阻止细胞数目增加。说明白术精油能够通过减少人肺癌 A549 细胞的 DNA 合成来影响细胞增殖。

细胞凋亡的途径主要有 3 种:第 1 种是线粒体凋亡途径,第 2 种是死亡受体途径,第 3 种是通过凋亡诱导因子实现凋亡。前两条凋亡通路均需通过 caspase 通路完成^[3-4]。Caspases 是一类与细胞凋亡相关的蛋白酶家族,它可以激活细胞内的 DNA 酶,切割染色体 DNA,直接导致细胞凋亡^[5]。其中 caspase-3 是 caspases 家族中最重要的凋亡执行者,负责全部或部分关键性蛋白的酶切,使胞质、胞核及细胞骨架的重要蛋白酶失活,从而引发细胞凋亡^[6-9]。本实验结果表明,白术精油含药血清作用于人肺癌 A549 细胞 24 h 后,细胞中 caspase-3 的蛋白表达发生了改变。与蒸馏水组相比,细胞中 caspase-3 的蛋白表达量明显增加,并随浓度增加 caspase-3 的蛋白表达量增加。说明白术能够促进细胞中 caspase-3 的蛋白表达。

本实验结果显示,白术精油中剂量组能够抑制 A549 细胞株增殖,将其细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期,并能够促进细胞中 caspase-3 蛋白表达。白术精油的抑瘤机制可能是通过控制细胞周期,阻滞细胞有丝分裂来抑制细胞增殖;也可能是作用于 caspase-3,促进 caspase-3 的蛋白表达,促进细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体途径,从而抑制人肺癌 A549 细胞的增殖。白术精油抗癌机制的深层次研究还需进一步发展。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:68.

[2] 朱庆均,郑广娟,张丹. 白术水提物抑瘤作用及其机制研究[J]. 山东中医药大学学报,2006,30(1):69.

[3] Hoshi T, Sasano H, Kato K, et al. Immunohistochemistry of Caspase-3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis [J]. Anticancer Res, 1998, 18(6A):4347.

[4] Rust C, Wild N, Bernt C, et al. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3-dependent [J]. J Biol Chem, 2009, 284(5):2908.

[5] Persad R, Liu C, Wu T T, et al. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas [J]. Mod Pathol, 2004, 17(7):861.

[6] Koomagi R, Volm M. Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2000, 20(1B):493.

[7] 银锋,刘彤. 卵巢上皮性肿瘤组织中 Caspase-3, bcl-2 的表达及其与细胞凋亡和增殖的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(8):55.

[8] Cicala C, Arthos J, Rubburt A, et al. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD⁽⁺⁾T cell [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(3):1178.

[9] 饶韬,陈迪诗,曾飞. Caspase-3 和 Caspase-6 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 南昌大学学报, 2011, 51(1):45.

[责任编辑 聂淑琴]