

平肺浸膏对人肺腺癌 A549 细胞的杀伤作用

王玥姣^{1*}, 刘轩², 朱世杰¹

(1. 卫生部中日友好医院中西医结合肿瘤内科, 北京 100029;

2. 卫生部中日友好医院临床研究所生物化学及分子生物学研究室, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 研究中药复方平肺浸膏对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响及诱导细胞凋亡的作用。**方法:** 采用 CCK-8 比色法和磷脂酰丝氨酸外翻分析法分别检测平肺浸膏对人肺腺癌 A549 细胞增殖和细胞凋亡的作用。平肺浸膏($1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)由中日友好医院药学部提供, 实验前经定性滤纸粗滤, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后分装。人肺腺癌 A549 细胞常规复苏、培养及传代, 处于对数生长期开始用于实验。实验分为空白对照、生药终浓度 1, 5, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 4 组。细胞以 $7 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔培养板, 24 h 细胞贴壁后加不同浓度平肺浸膏, 对照组只换液不加药。分别于加药后 24, 48, 72 h 用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。将细胞以 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 6 孔培养板, 5 h 细胞贴壁后加不同浓度的平肺浸膏。药物作用 17 h 后收获细胞, 应用磷脂酰丝氨酸外翻分析法, 于流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果:** 平肺浸膏生药 5, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 在体外作用 24 h 以上表现出对 A549 细胞增殖的抑制作用, 与常规对照组相比存在统计学差异 ($P < 0.05$), 且这种抑制作用随时间和药物浓度增加而增强。生药 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 可诱导早期细胞凋亡, 与常规对照组相比存在统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 中药复方平肺浸膏能够抑制人肺腺癌细胞 A549 的增殖, 诱导细胞凋亡。

[关键词] 中药复方; 人肺腺癌 A549 细胞; 细胞凋亡; 平肺浸膏

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0283-03

A549 Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Liquid Extract of Pingfei Prescription

WANG Yue-jiao^{1*}, LIU Xuan², ZHU Shi-jie¹

(1. Department of Oncology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China;

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the growth effect on human lung adenocarcinoma cell line A549 by liquid extract of Pingfei prescription, a traditional Chinese medicine (TCM) formula that has been used to treat lung cancer. **Method:** Liquid extract of Pingfei prescription ($1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was provided by pharmaceutical department in China-Japan friendship hospital. The liquid extract was filtrated through primary filtration by qualitative filter paper and second filtration by $0.22 \mu\text{m}$ microporous membrane before applied to experiments. A549 cells were recovered, cultured and subcultured. Cells in logarithmic growth phase were prepared for single cell suspension in the following experiments. Groups were blank control, liquid extract of Pingfei prescription 1, 5, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group. A549 cells were seeded in 96-well plates, 7×10^4 per well, 3 wells for replica. Drugs were then added 24 hours after except for the blank control group, which was replaced with fresh medium only. A549 growth was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Donjino, Japan) at 24, 48, 72 h after drugs being added. For apoptosis study, A549 cells were seeded in 6-well plates with 3×10^4 per well, 3 for replica. Drugs were then added 5 hours after except for the blank control group, which was replaced with fresh medium only. Cells were

[收稿日期] 20120718(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873330)

[通讯作者] * 王玥姣, 博士, 从事肺癌的中西医结合治疗研究, Tel: 010-84205733, E-mail: yuejiao_wang@126.com

harvested 17 hours after drugs added. Apoptosis was detected by analyzing plasma membrane translocation of phosphatidylserine (PS) (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen), using FACS. Each experiment was repeated at least 3 times. Statistic analysis for quantitative data is student t-test. **Result:** 5, 10 g · L⁻¹ groups presented inhibitive effect on A549 growth at 24, 48, 72 h time points ($P < 0.01$). 10 g · L⁻¹ group showed early and late apoptosis induction ($P < 0.01$). **Conclusion:** Liquid extract of Pingfei prescription, a TCM formula, could suppress A549 growth *in vitro* in dose and time dependent manner. This inhibitory effect may be related to its apoptosis induction.

[**Key words**] TCM formula; human lung adenocarcinoma cell A549; cell apoptosis; Pingfei prescription

平肺浸膏是以养阴清肺、解毒散结为法,临床多用于中晚期非小细胞肺癌患者毒热内盛、阴津亏虚的治疗。研究发现该复方可减少肿瘤新生血管形成、调节机体免疫平衡及代谢状态^[1],使瘤体增殖速度减慢,是延长肺癌患者生存期的独立预后因素之一^[2]。但平肺浸膏是否有直接杀伤肿瘤细胞的作用尚有待实验证实。本研究初步探讨了平肺浸膏在体外对人肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制作用,以及对细胞凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 平肺浸膏处方源于中日友好医院中西医结合肿瘤内科首席专家李佩文教授,中日友好医院药学部制备,生药质量浓度 1 g · mL⁻¹。平肺复方的药物组成:浙贝母、白及、全瓜蒌、五味子、白花蛇舌草、八月札、鱼腥草等。实验前经定性滤纸粗滤,0.22 μm 滤膜过滤后分装, -80 °C 冻存,避免反复冻融。0.25% 胰酶溶液 (Hyclone 公司),进口胎牛血清、高糖 DMEM (Hyclone),CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (日本同仁化学研究所),FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (批号 556547, BD pharmingen)。

1.2 仪器 IX51 型倒置显微镜 (日本 Olympus), 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma), Labofuge 400R 型离心机 (德国 Heraeus), MULTISKAN MK3 型酶标仪 (美国 Thermo)。

1.3 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞株,中日友好医院临床医学研究所生化室冻存。用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 常规培养,每 2 ~ 3 d 传代 1 次,细胞处于对数生长期开始用于实验。

1.4 分组 实验共分为 4 组。空白对照组:完全培养基 (含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM); 生药 A 组:完全培养基中含平肺浸膏,生药终质量浓度 1 g · L⁻¹; 生药 B 组:完全培养基中含平肺浸膏,生药终质量浓度 5 g · L⁻¹; 生药 C 组:完全培养基中含平肺浸膏,生药终质量浓度 10 g · L⁻¹。每组设 3 个副孔,

每次实验重复 3 次以上。接种 A549 细胞于 96 孔板中。

1.5 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法检测细胞的增殖情况 将细胞以 7 × 10⁴ /mL 接种于 96 孔培养板, 24 h 细胞贴壁后用于实验。实验组加不同浓度平肺浸膏,对照组只换液不加药。分别于加药后 24, 48, 72 h 用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。弃上清,每孔加入含 CCK-8 试剂 10% 的培养基,37 °C 孵育 1 h,空白对照调零,振荡 20 s,酶标仪 450 nm 处测定各孔的吸光度 (A)。

1.6 流式细胞术检测细胞周期和凋亡 将细胞以 3 × 10⁴ /mL 接种于 6 孔培养板,5 h 细胞贴壁后加不同浓度的平肺浸膏,对照组只换液不加药。药物作用 17 h 后收获细胞,应用磷脂酰丝氨酸外翻分析法,于流式细胞仪检测细胞凋亡,具体步骤按照说明书步骤进行。

1.7 统计方法 采用 SPSS 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数的比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 平肺浸膏对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响 应用 CCK-8 法检测人肺腺癌 A549 细胞的增殖显示,平肺浸膏生药 1 g · L⁻¹ 在体外作用 72 h 内对细胞生长没有明显影响,平肺浸膏生药 5, 10 g · L⁻¹ 在作用 24, 48, 72 h 表现出对 A549 细胞增殖的抑制作用,与空白对照组相比存在统计学差异 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 不同浓度平肺浸膏对 A549 的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /g · L ⁻¹	A _{450 nm}		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	1.072 ± 0.045	2.102 ± 0.099	2.524 ± 0.089
A	1	0.967 ± 0.030	2.011 ± 0.027	2.554 ± 0.068
B	5	0.783 ± 0.023 ²⁾	1.608 ± 0.088 ¹⁾	2.156 ± 0.039 ²⁾
C	10	0.513 ± 0.071 ²⁾	0.864 ± 0.162 ²⁾	1.109 ± 0.260 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 平肺浸膏对 A549 细胞凋亡的影响 应用流式细胞术检测不同浓度平肺浸膏对 A549 细胞凋亡的影响,结果显示平肺浸膏 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 17 h 可引起 A549 发生早期凋亡及死亡,与空白对照组相比存在统计学意义(表 2)。

表 2 不同浓度平肺浸膏对 A549 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	活细胞 $/\%$	早期凋亡 $/\%$	末期凋亡及 死亡 $/\%$
空白对照	-	91.79 ± 3.72	1.71 ± 0.27	6.00 ± 3.15
A	1	91.31 ± 2.96	1.49 ± 0.13	6.17 ± 2.67
B	5	88.54 ± 0.12	2.83 ± 1.21	7.96 ± 0.92
C	10	$22.25 \pm 2.66^{2)}$	$17.72 \pm 5.69^{1)}$	$59.00 \pm 9.11^{2)}$

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞增殖、分化异常,以及细胞凋亡不足,与肿瘤疾病的发生发展有着密切的关系。细胞增殖和凋亡失衡,导致细胞的净增长率提高,稳态被破坏,此时便会发生癌前病变和肿瘤。活化凋亡通路,促使肿瘤细胞凋亡,是治疗肿瘤的重要途径。平肺复方以养阴清肺为法,解毒散结,攻补兼施。其在肿瘤治疗中的作用机制尚在研究探索之中。

研究表明,平肺复方(平肺口服液)可促进 T 淋巴细胞增殖,与化疗药物相比具有明显优势($P < 0.01$)^[3];针对放疗的患者,平肺复方(平肺口服液)可抑制肺成纤维细胞增殖,诱导细胞凋亡,减少放射性肺炎及肺纤维化的发生率^[4-5]。同时,平肺复方可使病灶稳定,是延长肺癌患者生存期的独立预后

因素之一^[2]。作为门诊肺癌患者,尤其是带瘤生存患者的常用中药,平肺复方能否直接杀伤肿瘤细胞尚无足够的实验依据。因此,本研究采用体外细胞培养、CCK-8 比色法、流式细胞术等方法,直接观察了平肺浸膏对人肺腺癌 A549 细胞抑制增殖、诱导凋亡的作用。结果显示, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度的平肺浸膏不但可以有效抑制 A549 细胞的增殖,而且还使早期及末期细胞凋亡增加,这在临床上应用平肺口服液治疗肺癌提供了依据。其作用机制可能与调控细胞增殖和凋亡的相关蛋白有关,但仍有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 朱世杰,李佩文,贾立群,等.平肺口服液延长肺癌生存期的临床观察[J].中华中西医临床杂志,2003,3(8):820.
- [2] 朱世杰,李佩文,贾立群.养阴清肺方治疗肺癌的机理研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(2):64.
- [3] 朱世杰,李佩文,贾立群.平肺口服液对荷瘤小鼠细胞增殖的双向调节作用[J].中西医结合学报,2003,1(3):202.
- [4] 刘轩,李红艳,夏启胜,等.平肺口服液抑制肺成纤维细胞生长和诱导凋亡[J].中药新药与临床药理,2010,21(3):127.
- [5] 程志强,张嘉,刘轩,等.平肺口服液在非小细胞肺癌放疗中的应用[J].中日友好医院学报,2009,23(6):334.

[责任编辑 邹晓翠]