

仙慈丹有效部位对人肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用

王培培¹, 李婧¹, 黄松^{1,2*}, 陈玲玲¹, 冯泓瑞¹, 杜先华¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:**探讨仙慈丹(XCD)有效部位对肺癌细胞 A549 增殖抑制作用及其作用机制。**方法:**XCD 有效部位为 XCD 水提滤液通过 AB-8 型大孔树脂柱收集 80% 乙醇洗脱液所得, 得率为 0.90%。体外培养 A549 细胞至对数期, 分别以质量浓度为 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 的仙慈丹有效部位作用, 应用 MTT 法测定其对 A549 细胞的抑制率, 进而求出半数抑制浓度(IC₅₀)。运用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术及 PI 单染流式细胞术测定 XCD 有效部位对 A549 细胞凋亡及周期的影响。**结果:**通过 MTT 实验, 经过统计计算得出 XCD 有效部位在对 A549 作用 24, 48, 72 h 后的 IC₅₀ 分别为 136.550, 56.671, 55.322 mg·L⁻¹; 通过流式细胞仪测定 XCD 作用下 A549 在 24, 48, 72 h 的凋亡率分别为 (17.98 ± 0.11)%, (23.34 ± 0.23)%, (29.54 ± 0.78)%; XCD 作用 A549 细胞 24 h 后, 细胞周期被阻滞在 S 期, 在 48 h 后细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期。**结论:**XCD 有效部位对 A549 细胞增殖抑制作用明显, 通过诱导肿瘤细胞凋亡, 同时调节细胞周期抑制 A549 细胞生长。

[关键词] 仙慈丹; A549 细胞; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0278-04

Effect of Xiancidan on Apoptosis and Cycle of non-small Cell Lung Cancer A549 *in vitro*

WANG Pei-pei¹, LI Jing¹, HUANG Song^{1,2*}, CHEN Ling-ling¹, FENG Hong-rui¹, DU Xian-hua¹

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Xiancidan (XCD) effective parts on inhibition of lung cancer A549 *in vitro*, and explore its mechanism. **Method:** The A549 cells *in vitro* were treated with the XCD effective parts at different concentrations, the concentrations of the XCD effective parts were 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ respectively. The inhibitory rate of the A549 cell proliferation was measured by MTF assay, the IC₅₀ (the 50% inhibitory concentration) was determined. The effects of XCD effective parts on A549 cell cycle and cell apoptosis were determined by Annexin V-FITC/PI double staining assay. **Result:** MTT assay was used to calculate XCD effective parts in A549 role for 24, 48, 72 h. the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the 3 manners above were 136.550, 56.671, 55.322 mg·L⁻¹ respectively. Flow cytometry was used to measured the XCD effective parts in A549 role for 24, 48, 72 h. The rates of apoptosis of the above 3 manners were (17.98 ± 0.11)%, (23.34 ± 0.23)%, (29.54 ± 0.78)% respectively. After treated by XCD for 24 h, A549 cells were arrested in S phase, and for 48 h in G₀/G₁ phase. **Conclusion:** The XCD effective parts can inhibit the growth of A549 cells remarkably by inducing apoptosis and blocking cell cycle.

[Key words] Xiancidan; A549 cells; apoptosis; cell cycle

[收稿日期] 20120809(001)

[基金项目] 广东省科学技术厅社会发展项目(2010B030700001)

[第一作者] 王培培, 在读硕士研究生, 从事中药新药开发研究, E-mail: wangpeipei8201@163.com

[通讯作者] * 黄松, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-32503212, E-mail: hsl318@yahoo.com.cn

抗肿瘤复方制剂仙慈丹(XCD)是广西市某中医院自制中药复方制剂,是以中医药基本理论为指导的临床验方,由北黄芪、冬虫夏草、苏木、田七、柴胡、灵芝、女贞子等 10 余味中药组方制成的丸剂。临床实践验证该制剂具有良好的抗肿瘤药效,尤其对治疗肺癌有显著的疗效,该组方已申请知识产权保护^[1]。根据罗明珺^[2]等的研究,确定了其有效成分及其提取方法。本实验应用体外培养的人肺癌 A549 细胞系,探讨 XCD 有效部位对 A549 细胞的影响,为进一步阐明 XCD 的抗肿瘤机制提供新的证据。

1 材料

1.1 药物 抗肿瘤复方制剂仙慈丹由北黄芪、冬虫夏草、蜈蚣、苏木、田七、柴胡、蟾酥、斑蝥、灵芝、黄药子、莪术、女贞子、西洋参、白花蛇舌草、房姑、甘草、姜黄等 10 余味中药组方制成的丸剂(广西某中医院制剂科,批号 20110219)。

1.2 细胞株 实验用人非小细胞株 A549(广州中医药大学新药开发研究中心)。

1.3 试剂 RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 811325),PBS 缓冲液(吉诺生物医药技术有限公司,批号 12053001),0.25% 胰酶-EDTA(美国 Gibco 公司,批号,1079100),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10099-141),MTT 溶液(碧云天公司)。5-氟尿嘧啶 5-Fu(上海旭东海普药业有限公司,批号 100610),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 811325),Annexin V-FITC Apoptosis Detecton Kit(美国 Bio Vision 公司,批号 K101-100-2),PI 试剂(广州威佳试剂公司),RNase A(核糖核酸酶 A)(Sigma 公司),无水乙醇(天津市富起华工有限公司)。

1.4 仪器 KQ5200DA 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器公司),XW-80A 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司),离心机(江西飞鹤离心机制造有限公司),SW-CJ-2F 型医用净化工作台(苏州净化设备厂),CO-150 型二氧化碳培养箱(美国 NBS 公司),CKX-41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),CU600 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),BIO-RAD550 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)FC500 型流式细胞仪(美国贝克曼-库尔特公司,配有 Muticycle AV DNA Analysis 分析软件)。

2 方法

2.1 有效部位制备 取仙慈丹丸打碎成粉,称取 100 g,加水 500 mL,回流提取 1.5 h,过滤,得滤液,冷却,加乙醇至 50%,放置过夜,抽滤,得滤液。将

滤液回收至约 100 mL。使滤液通过 AB-8 型大孔树脂柱,分别以水、体积分数 30%,80%,95% 乙醇梯度洗脱,收集 80% 乙醇洗脱液,浓缩至 100 mL。将回收液转移至蒸发皿,水浴蒸干,所得浸膏于烘箱 60 ℃ 烘过夜。得到干膏 0.90 g,得膏率为 0.90%。

2.2 体外细胞培养 A549 细胞用含有体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37 ℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.3 MTT 法检测^[3] 细胞生长至指数生长期时,以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,用含有 10% 血清的培养液调细胞密度为 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个/mL,96 孔培养板每孔接种 100 μL,在 37 ℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,24 h 后用含有 1% 血清的培养液同步化,48 h 后加入不同质量浓度的 XCD 有效部位提取液(5,10,15,25,50,100,200 mg·L⁻¹,n=6)。继续培养 24,48,72 h,加入 20 μL 质量浓度为 5 g·L⁻¹ 的 MTT,4 h 后加入 100 μL DMSO,振荡 10 min,置酶标分析仪中以 490 nm 为检测波长,测定各孔的吸光度(A),计算各给药浓度的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (\text{加药孔平均 } A - \text{调零孔平均 } A / \text{对照孔平均 } A - \text{调零孔平均 } A) \times 100\%$$

2.4 Annexin V-FITC 法测定 XCD 有效部位对细胞凋亡的影响^[4] 细胞生长至指数生长期时,以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,用含有 10% 血清的培养液调细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/mL,6 孔培养板每孔接种 1 mL,在 37 ℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,24 h 后用含有 1% 血清的同步化,48 h 后加入浓度为 56.00 mg·L⁻¹ 的 XCD 有效部位提取液,分别培养 24,48,72 h 后,离心收集悬浮细胞,在消化之前将悬浮液保留与消化后的细胞合并离心,微量离心机转速 1 500 r·min⁻¹,离心时间 5 min,弃培养基。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次。用 500 μL 1 × Binding Buffer 悬浮细胞,密度大约为 5×10^5 个/mL。在细胞悬浮液中加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后加入 5 μL PI 后轻轻混匀于 2~8 ℃ 避光条件下孵育 5 min。在 1 h 内用流式细胞仪检测。

2.5 PI 单染法测定 XCD 有效部位对细胞周期的影响 细胞生长至指数生长期时,以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,用含有 10% 血清的培养液调细胞密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL,6 孔培养板每孔接种 1 mL,培养 24 h 后用含有 1% 血清的同步化,48 h 后加入 56.00 mg·L⁻¹ 的 XCD 有效部位提取液,设 6 个复孔,对照孔加入等量 PBS 溶液,调零孔加入等量

的含血清培养液,分别培养 24,48,72 h 后离心收集悬浮细胞,在消化之前将悬浮液保留与消化后的细胞合并离心,微量离心机转速 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心时间 5 min,弃培养基。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次。用 $500\ \mu\text{L}\ 1\times\ \text{Binding Buffer}$ 悬浮细胞,密度为 5×10^5 个/mL。加入 75% 乙醇 ($-20\ ^\circ\text{C}$ 预冷) 固定细胞 1 h。加入 PI(终质量浓度 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和无 DNA 酶污染的 RNA 酶 (终质量浓度 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL 染色 0.5~1 h,用流式细胞仪检测。

2.6 统计学分析 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 19.0 对各个组进行单因素方差分析比较组间差异。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 A549 细胞生长抑制作用 XCD 有效部位对 A549 有明显的抑制作用,结果见图 1。实验结果表明,XCD 有效部位对 A549 细胞生长的抑制呈现浓度和时间的依赖性。相同作用时间下,XCD 有效部位质量浓度越大,其对 A549 抑制作用越明显;XCD 有效部位浓度为 $200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其抑制率达到 90% 以上。

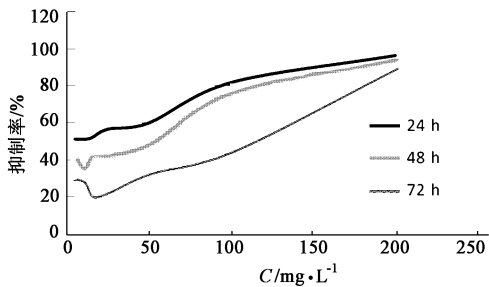
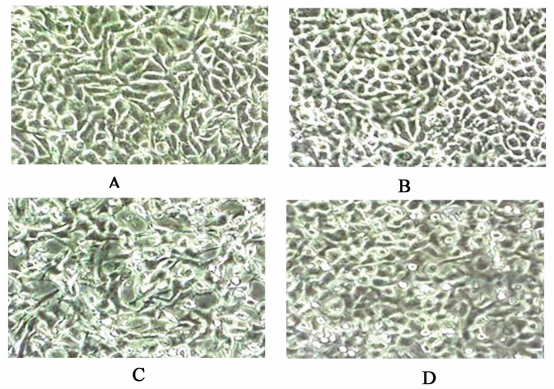


图 1 XCD 对人非小细胞肺癌细胞 A549 生长抑制作用

XCD 有效部位作用 48,72 h 后的半数抑制率的质量浓度分别为 $56.67, 55.32\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,二者数据接近,且明显低于作用 24 h 的质量浓度 $136.55\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。显示 XCD 有效部位在作用 48 h 时已达到最佳效果。

3.2 显微镜下观察 XCD 有效部位对 A549 细胞生长抑制 $56.00\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XCD 作用不同时间后对 A549 细胞生长抑制见图 2。空白组的 A549 细胞,呈现梭形,轮廓清晰;XCD 作用 24 h 后 A549 细胞缩小,轮廓模糊;XCD 作用 48,72 h 后,细胞形状模糊,细胞间隙增大,出现大量凋亡细胞。XCD 有效部位具有诱导 A549 细胞凋亡的作用。

3.3 XCD 有效部位对 A549 细胞凋亡的影响 XCD 有效部位 $56\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24,48,72 h 后,体外培养 A549 细胞的早期凋亡率分别为 $(17.98\pm$



A. PBS 空白对照组;B. XCD 有效部位作用 24 h;
C. XCD 有效部位作用 48 h;D. XCD 有效部位作用 72 h

图 2 XCD 有效部位 $56\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用不同时间
对 A549 细胞生长抑制显微图 ($\times 10$)

$0.11)\%$, $(23.34\pm 0.23)\%$, $(29.54\pm 0.78)\%$;而相应的对照组的早期凋亡率分别为 $(0.06\pm 0.09)\%$, $(0.08\pm 0.06)\%$, $(4.30\pm 0.45)\%$ 。XCD 有效部位作用后的凋亡率与相应时间的空白组比较具有显著性差异。见表 1。

表 1 XCD 有效部位对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	时间 /h	凋亡率 /%
空白对照	-	24	0.06 ± 0.09
	-	48	0.08 ± 0.06
	-	72	4.30 ± 0.45
XCD	56	24	$17.98\pm 0.11^{(1)}$
	56	48	$23.34\pm 0.23^{(1)}$
	56	72	$29.54\pm 0.78^{(1)}$

注:与相应时间点的对照组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

3.4 XCD 有效部位 $56\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 A549 细胞周期的影响 XCD 有效部位作用 24 h 后,细胞主要被阻滞在 S 期(即 DNA 合成期),而随着时间的延长,作用 48 h 后,细胞被进一步阻滞在 G_0/G_1 期(即 DNA 合成前期),见表 2。

4 讨论

肺纤维化是多种原因引起慢性肺疾病的共同结局。近年研究证明,肺纤维化是由于慢性炎性细胞的浸润,促使肺泡细胞活化并向间质迁移,活化的间质细胞伴随成纤维细胞/肌成纤维细胞灶和细胞外基质(ECM)大量聚积、炎症过度修复而形成^[5]。A549 来源于人 II 型肺泡上皮细胞,在肺纤维化进展过程中修复损伤的效率与 II 型肺泡上皮细胞较为接近,故作为本研究的细胞模型^[6]。

本实验测定结果表明,XCD 有效部位对 A549

表 2 XCD 有效部位干预后 A549 细胞周期进展变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	时间/h	G_0/G_1	S	G_2/M
对照	-	24	72.04 ± 3.09	7.68 ± 1.09	20.28 ± 2.67
	-	48	69.30 ± 2.07	7.45 ± 3.20	23.25 ± 1.23
	-	72	62.14 ± 1.45	8.56 ± 2.35	29.30 ± 2.87
XCD	56	24	70.98 ± 4.11	$19.46 \pm 3.56^{1)}$	$9.65 \pm 2.45^{1)}$
	56	48	71.34 ± 3.23	$21.78 \pm 2.37^{1)}$	$6.88 \pm 3.67^{1)}$
	56	72	$78.54 \pm 3.78^{1)}$	10.23 ± 1.56	$11.23 \pm 1.89^{1)}$

注:与相应时间点的对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

细胞生长的抑制作用明显。据罗明琮^[2]等人的前期研究显示,同样的 XCD 有效部位作用于 HepG₂ 细胞 48 h 后的 IC₅₀ 为 $25.204 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,而本实验用 XCD 有效部位作用于 A459 的 IC₅₀ 为 $56.671 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,可能是由于不同的肿瘤株具有不同的生物学特性,因而 XCD 有效部位对其作用也具有一定的差异性。由于 XCD 组方复杂,其有效成分繁多,作用机制也不明确,故需进行深入的研究与探讨。

中药复方可以作用于癌细胞的不同阶段,使细胞生长所需要的 DNA、RNA、蛋白质合成受到严重阻碍,使癌细胞停止于增殖周期中的某一环节或引起癌细胞死亡;或作用于癌细胞能量代谢的某一环节,抑制癌细胞呼吸功能而使其死亡;或破坏癌细胞膜引起细胞自溶^[7]。

细胞的失控的自主增殖是恶性肿瘤细胞的主要特征之一,肿瘤细胞增殖的调控异常可以引起肿瘤细胞无限制的增殖,使细胞死亡相对减少^[8]。在细胞增殖周期中, G_1 为 DNA 合成前期,此期合成 RNA、蛋白质等前期物质;S 期为 DNA 合成期,此期 DNA 进行自我复制以及合成蛋白等主要物质,此时 DNA 含量增加 1 倍; G_2 期为 DNA 合成后期,为 M 期做准备。肿瘤细胞异常增殖主要体现在 S 期的 DNA 复制旺盛^[9]。在细胞周期的 G_1/S , S/G_2 , G_2/M , 和 M/G_1 4 个检查点中以 G_1/S 最为重要^[10]。抗肿瘤药物对肿瘤细胞周期中的某一点或某一部分产生阻滞或延缓作用,就会影响细胞周期的进程,致使肿瘤细胞增殖减缓甚至停止,因此出现细胞周期时相分布的改变^[11]。

中药复方 XCD 有效部位作用于 A549 具有明显的抑制作用,通过对 XCD 有效部位作用于 A549 细胞的研究发现,XCD 有效部位对 A549 细胞的凋亡及细胞周期具有明显的影响,本实验显示给药组的早期凋亡率在 48 h 时可以达到 23%,72 h 时凋亡率

接近 30%。其对周期的影响主要为细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期(即 DNA 合成前期)。作用时间与 MTT 实验结果一致。

[参考文献]

- [1] 喻泽兰,刘欣荣,Michael McCulloch,等.黄药子抗肿瘤活性组分筛选及作用分析[J].中国中药杂志,2004,29(6):563.
- [2] 罗明琮,黄松,王杰,等.噻唑蓝法测定抗肿瘤复方制剂仙慈丹的体外抗肿瘤活性[J].中国药学杂志,2010,45(23):1816.
- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55.
- [4] Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T-cell [J]. J Immunol, 1993, 150(10): 4338.
- [5] 杨长福,李亚东,牛建昭,等.莪术油对肺腺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8): 113.
- [6] 王金胜,曾庆福,冯德云,等.转录因子 Sp1 在二氧化硅活化的 II 型肺泡细胞中的表达及作用[J].临床与实验病理学杂志,2006,22(6):710.
- [7] 郭晓辰,张军平.中药调控血管平滑肌细胞凋亡的作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):288.
- [8] 吴其夏,余应年,卢建.新编病理生理学[M].北京:中国协和医科大学出版社,1999:46.
- [9] 来茂德.医学分子生物学[M].北京:人民卫生出版社,1999:40.
- [10] 夏亚飞,阎姝.重楼抗肿瘤作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9): 304.
- [11] 朱星,周长福.莪术醇对人肺胚成纤维细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1): 226.

[责任编辑 聂淑琴]