

草苈蓉苯丙素苷对肺癌细胞周期分布和凋亡的影响

金延华¹, 刘春彦², 金爱花², 许惠仙¹, 尹学哲^{1*}

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学基础医学院, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:**探讨草苈蓉苯丙素苷(PGBR)对肺癌细胞增殖的抑制作用及其可能机制。**方法:**采用 MTT 法观察 PGBR 对 A549 肺癌细胞增殖的影响,采用流式细胞术检测对 A549 细胞周期分布和细胞凋亡的影响,采用 TUNEL 染色法检测对 A549 细胞凋亡的影响,免疫细胞化学法检测凋亡相关蛋白 p53, Fas, Bax, Bcl-2 蛋白的表达。**结果:**PGBR 可时间和浓度依赖性抑制肺癌细胞增殖,200 mg·L⁻¹ PGBR 作用于 A549 细胞 12, 24, 48 h 时,抑制率分别为 (20.4 ± 2.1)%, (27.1 ± 2.0)%, (30.7 ± 2.2)%。PGBR 改变肺癌细胞周期分布,使 G₀/G₁ 期细胞由 (45.3 ± 4.1)% 增至 (57.4 ± 4.0)%,表现出 G₀/G₁ 期阻滞;同时诱导肺癌细胞凋亡,凋亡率由 (2.4 ± 0.90)% 增至 (7.8 ± 1.2)%。PGBR 明显增加 p53 和 Fas 表达,增加 Bax 表达和降低 Bcl-2 表达。**结论:**PGBR 可通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡而发挥抗肺癌作用。

[关键词] 草苈蓉;苯丙素苷;肺癌;增殖;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(2011)07-0231-04

Effect of Phenylpropanoid Glycosides from *Boschniakia rossica* on Cell Cycle Distribution and Apoptosis of Lung Carcinoma Cell

JIN Yan-hua¹, LIU Chun-yan², JIN Ai-hua², XU Hui-xian¹, YIN Xue-zhe^{1*}

(1. Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China;

2. College of Basic Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect and mechanism of phenylpropanoid glycosides from *Boschniakia rossica* (PGBR) on proliferation of lung carcinoma cells. **Method:** MTT assay was used to examine the proliferation of A549 cells, flow cytometry was used for the determination of cell cycle distribution and cell apoptosis, TUNEL method was used for the determination of cell apoptosis, and immunohistochemical method was used for the determination of p53, Fas, Bax and Bcl-2 protein expression. **Result:** PGBR inhibited the proliferation of lung carcinoma cells in a time-and concentration-dependent manner, the inhibitory ratios of 200 mg·L⁻¹ PGBR at 12, 24 and 48 h were (20.4 ± 2.1)%, (27.1 ± 2.0)% and (30.7 ± 2.2)%, respectively. PGBR increased the percentage of G₀/G₁ phase cells from (45.3 ± 4.1)% to (57.4 ± 4.0)%, and increased the apoptotic ratio from (2.4 ± 0.90)% to (7.8 ± 1.2)% to (57.4 ± 4.0)%, and increased the apoptotic ratio from (2.4 ± 0.90)% to (7.8 ± 1.2)%. Furthermore, PGBR increased the expression of p53, Fas and Bax proteins and decreased the expression of Bcl-2. **Conclusion:** PGBR could exert an anti-lung cancer effect via induction of cell cycle arrest and cell apoptosis.

[Key words] *Boschniakia rossica*; phenylpropanoids; lung cancer; proliferation; apoptosis; cell cycle

[收稿日期] 20101115(004)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(200705428);吉林省中医药管理局科技项目(08SYS-105)

[第一作者] 金延华, 硕士研究生, 研究方向: 呼吸肿瘤学, E-mail: aihua1028@sina.com

[通讯作者] * 尹学哲, 教授, 博士, 研究方向: 呼吸内科学, E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

草苈蓉 *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov 为列当科草本植物,主要分布于中国长白山地区、日本富士山及朝鲜北部山区以及俄罗斯部分地区,具有补肾壮阳、润肠止血、滋补强身及延年益寿的功效,在民间被誉为“不老草”,多作为抗衰老保健品服用。草苈蓉具有多种药理作用,如清除自由基、抗炎、细胞毒和抗化学致癌等^[1-2]。本文从草苈蓉提取其抗癌有效成分草苈蓉苯丙素苷(PGBR),观察其对人肺癌细胞株 A549 的细胞生长抑制作用及其机制。

1 材料

1.1 PGBR 的制备 草苈蓉采自吉林省长白山,由延边大学药学院刘勇镇教授鉴定。将 10 kg 草苈蓉全草切碎后用 90% 乙醇提取,将提取液减压浓缩,获草苈蓉醇提取物 1.86 kg。将醇提取物加水溶解,依次在等体积的乙酸乙酯和正丁醇中萃取,减压蒸馏得正丁醇提取物 1.41 kg。取 200 g 上 MCI-gel CHP20P 凝胶柱(Mitsubishi Chemical Co.),用 30%, 50%, 70%, 100% 甲醇梯度洗脱,收集 50% 甲醇洗脱成分,再上硅胶柱色谱,用 CHCl_3 -MeOH- H_2O (10:2:0.1) 洗脱得到 PGBR,产率为 4.33%。

1.2 细胞株和试剂 A549 细胞为本实验室保存。噻唑蓝(MTT,批号 M2128)购自美国 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基(批号 1181499)购自美国 GIBCO 公司,小牛血清(批号 200408)购自北京华美生物工程公司,胰蛋白酶(批号 040524)购自美国 DIFCO 公司,鼠抗 Bax, Bcl-2, P53, Fas 单克隆抗体和细胞凋亡原位检测试剂盒(批号分别为 ZM-0300, ZM-0010, ZM-0408, ZM-0295, ZK-8004)购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 U-2010 型紫外分光光度仪(日本岛津公司); OLYMPUS 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); RT-2100 型酶标仪(深圳雷杜公司), FACS Calibur 流式细胞仪、YPS2000 真彩色病理图像分析仪(上海华岩仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞增殖抑制实验 肺癌细胞贴壁生长,培养于含 10% 小牛血清、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液(pH 7.2)中,置 37 $^\circ\text{C}$ 、相对湿度 90%, 5% CO_2 孵箱内培养。取对数生长期的 A549 细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL 。待细胞贴壁后,药物组加入药物使其终浓度分别为 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,另

设不加药物的阴性对照组以及不接种细胞的空白对照组。分别培养 12, 24, 48 h, 每个浓度每个时点均设 6 个复孔。于终止前 4 h, 每孔加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL , 继续孵育 4 h 后弃去上清液, 加入 150 μL DMSO, 轻轻振荡 10 min, 使结晶物完全溶解, 于 490 nm 波长处在酶联分析仪上测吸光度值(A), 计算生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.2 A549 细胞形态学观察 取对数生长期 A549 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 24 h 后换液, 加入含 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物的 10% 新生小牛血清 RPMI 1640 培养液 200 μL , 另设不加药物的阴性对照组。置 5% CO_2 孵箱内培养 24 h。在倒置显微镜下观察细胞生长状态, 并进行常规 HE 染色。

2.3 TUNEL 法观察细胞凋亡 经 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物作用 24 h 的细胞爬片, 按试剂盒操作说明进行处理, 光镜下观察凋亡细胞并计数。染色后细胞核呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞。随机选取 5 个高倍镜视野, 分别计数凋亡细胞数和总细胞数, 计算凋亡指数(AI)。

$$\text{AI} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$$

2.4 流式细胞术检测细胞周期分布 取对数生长期的 A549 细胞接种于 12 孔板中。待细胞贴壁后, 药物组加入药物使其终浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 继续作用细胞 24 h 后, 收集细胞悬液 1 mL, 调细胞密度为 1×10^6 个/mL, 离心弃掉培养液, 70% 冷乙醇固定, 4 $^\circ\text{C}$ PI 暗染 30 min, 用流式细胞仪检测, 采用 ModfitLT3.0 软件对各组样本进行 DNA 含量及细胞周期分析。

2.5 细胞凋亡相关基因 p53, Fas, Bax, Bcl-2 蛋白检测 取对数生长期的 A549 细胞, 以 1×10^5 个/mL 的细胞密度接种于放有多聚赖氨酸预处理的无菌盖玻片的 6 孔培养板, 每孔 2 mL。待细胞贴壁生长良好, 吸除上清液, 加入 PGBR 使终浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 继续培养 24 h 后取出细胞爬片, 应用免疫细胞化学方法检测 P53, Fas, Bax, Bcl-2 蛋白的表达。选取阳性细胞密度最高的部位在真彩色病理细胞图像分析系统分析, 每例随机 5 个统计场, 取其平均值作为凋亡相关基因蛋白的阳性表达率。

3 结果

3.1 对 A549 细胞增殖的影响 不同浓度药物组分别培养 12, 24, 48 h 时, 对 A549 细胞生长均有抑制作用。PGBR 对肿瘤细胞生长的抑制率呈时间和浓

表1 PGBR对A549细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ mg·L ⁻¹	抑制率/%		
		12 h	24 h	48 h
PGBR	50	9.7 ± 1.2	14.3 ± 1.4 ²⁾	19.2 ± 1.4 ²⁾
	100	19.4 ± 1.7 ¹⁾	23.5 ± 1.6 ^{1,2)}	27.8 ± 1.5 ¹⁾
	200	20.4 ± 2.1 ¹⁾	27.1 ± 2.0 ^{1,2)}	30.7 ± 2.2 ^{1,2)}
顺铂	3	12.2 ± 1.5	22.8 ± 1.4 ²⁾	36.6 ± 2.6 ²⁾

注:同一时间与前一剂量比较¹⁾P < 0.01;同一浓度时与前一时间比较²⁾P < 0.01。

度依赖性,随着时间的延长和浓度的增加,抑制效果更明显(表1)。

3.2 A549细胞的形态学观察 倒置显微镜观察显示对照组A549细胞呈上皮型贴壁生长,细胞呈扁平,核膜、核仁轮廓明显,细胞间结构紧密。药物组细胞增殖减慢,细胞轮廓增强、反差增大,变圆浮起,胞质中颗粒增多,部分脱落漂浮于培养瓶中,但细胞膜完整。药物浓度越高、作用时间越长,上述表现越明显。HE染色结果表明,对照组正常细胞核均匀着色,未见凋亡小体。药物组出现较多的凋亡细胞,表现为细胞体积缩小,核固缩、碎裂、深染,部分裂解形成凋亡小体。另可见肿胀的坏死细胞,细胞膜呈连续性破坏(图1)。

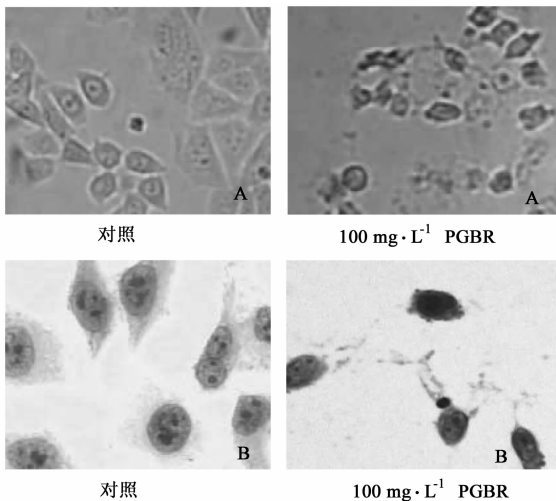


图1 PGBR对A549细胞形态学的影响

A. 显微观察; B. HE染色

3.3 对A549细胞凋亡的影响 用PGBR处理细胞后,细胞凋亡数明显增加,棕褐色染色颗粒定位于细胞核内。PGBR组凋亡指数与对照组比较,差异均具有统计学意义(表2)。

3.4 PGBR对A549细胞周期分布的影响 用PGBR处理细胞后,G₀/G₁期细胞比率显著上升,多

表2 PGBR对A549细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ mg·L ⁻¹	凋亡指数/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	-	2.1 ± 0.6	2.5 ± 0.8	2.3 ± 0.7
PGBR	100	7.8 ± 1.2 ¹⁾	9.4 ± 1.3 ^{1,2)}	15.7 ± 2.0 ^{1,2)}
顺铂	3	9.5 ± 1.9	11.6 ± 1.5	21.6 ± 2.7 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05;与前一时间比较²⁾P < 0.05。

数细胞阻滞在G₀/G₁期。同时,药物组可见明显的凋亡峰,作用24h时,凋亡率为7.8%,接近TUNEL法检测结果(图2)。

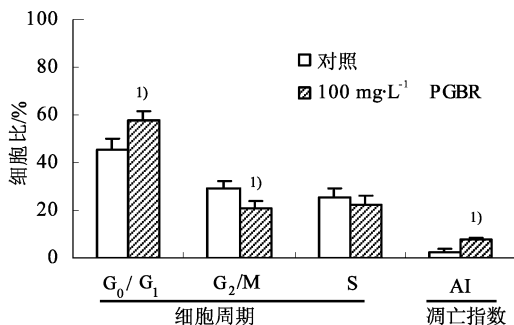


图2 PGBR对A549细胞周期分布及凋亡的影响

与对照组比较¹⁾P < 0.01

3.5 细胞凋亡相关基因P53, Fas, Bax, Bcl-2蛋白表达 镜下P53阳性细胞胞核染成棕色; Fas阳性部位主要在细胞膜, Bax和Bcl-2阳性部位主要在细胞浆,呈棕色。PGBR作用于A549细胞后, PGBR组细胞P53及Fas阳性细胞增加,蛋白表达明显增加。同时, PGBR组细胞Bax蛋白表达明显增加, Bcl-2表达明显下降, PGBR组Bcl-2/Bax比值明显降低(图3)。

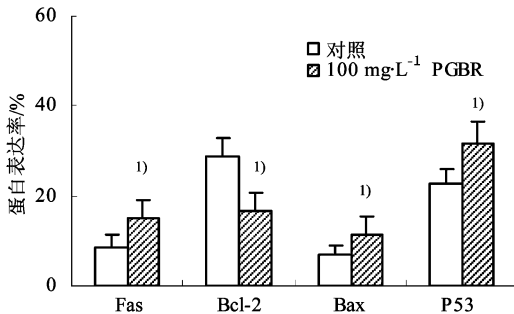


图3 PGBR对A549细胞Bax, Bcl-2, P53, Fas表达的影响

4 讨论

草苾蓉是长白山名贵药材,其化学成分因产地和药用部位的不同,存在一定的差异。作者参考Lin^[3]的方法,经多次萃取和反相吸附色谱从长白

大鼠离体肾灌注技术评价尿肝型脂肪酸结合蛋白 在马兜铃酸致肾损伤中的价值

周绮, 张泽安, 金若敏*

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨大鼠离体肾灌注体系中尿肝型脂肪酸结合蛋白与马兜铃酸(AA)肾损伤的关系。方法: 建立大鼠离体肾灌注模型, 按 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒速灌注, 空白组给予正常灌注液, 马兜铃酸组给予 $7 \text{ mg} \cdot (50 \text{ mL})^{-1}$, 灌注给药 10 min 后, 不同时间点收集灌注液和尿液, 分别检测钾、钠、氯离子浓度, 计算离子清除率, ELISA 方法检测尿液肝型脂肪酸结合蛋白浓度。结果: 马兜铃酸组钾、钠离子清除率在给药后 0.5h 明显下降, 分别从给药前的 $(99.54 \pm 14.55)\%$ 和 $(27.93 \pm 6.66)\%$ 下降至 $(33.16 \pm 9.59)\%$ 和 $(9.70 \pm 2.62)\%$, 与空白组相比差异显著; 尿肝型脂肪酸结合蛋白在给药灌注后即刻明显升高, 从给药前 $(7.42 \pm 0.12) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 升高至 $(8.18 \pm 0.47) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 与空白组相比差异显著。结论: 尿肝型脂肪酸结合蛋白在评价马兜铃酸致急性肾小管损伤方面优于传统指标离子清除率, 是一个早期且敏感的肾小管损伤生物标志物。

[关键词] 马兜铃酸肾病; 大鼠离体肾脏灌注体系; 肝型脂肪酸结合蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0216-04

[收稿日期] 20101026(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2009CB522807)(973 计划); 国家“重大新药创新”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

[第一作者] 周绮, 博士在读, 专业: 中西医结合基础, 从事药物肝肾毒性的病理学研究, Tel: 021-51323053, E-mail: zhou.qi@sohu.com

[通讯作者] * 金若敏, 研究员, 上海中医药大学药物安全评价研究中心主任, Tel: 021-51322401, E-mail: rmj801@126.com

山草苈蓉分离 PGBR, 并研究 PGBR 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。

肿瘤细胞的典型特征是逃逸了正常细胞增殖的调控体系而自主地无限生长。本 MTT 试验结果显示, 在所用浓度范围内 PGBR 能有效地抑制 A549 细胞的增殖, 呈现出良好的时效与量效关系。而肿瘤的发生和发展不仅是肿瘤增殖和分化异常所致, 而且还是肿瘤细胞凋亡异常的结果。大多数抗肿瘤药物都能诱导敏感肿瘤细胞发生凋亡, 其抗肿瘤效能与肿瘤细胞在药物诱导下发生细胞凋亡的活性有关。因此, 诱导瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的一个新热点^[4]。本实验结果表明, PGBR 可诱导肺癌 A549 细胞凋亡, 同时能明显改变癌细胞的周期分布, 使细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 促使细胞发生凋亡。细胞凋亡的过程是程序化的、多基因调控的。与细胞凋亡相关的蛋白大致有 Bcl-2 家族, p53, Fas, c-Myc, k-Ras 等, 细胞是否进入凋亡通道取决于这些凋亡相关蛋白的综合调控结果^[5]。在本实验中, PGBR 可使肺癌细胞 p53 和 Fas 蛋白水平增高, Bcl-2 表达下降, Bax 表达增高。说明 PGBR 可能通过上调 p53

和 Fas 表达和降低 Bcl-2/Bax 比值而诱导 A549 细胞凋亡。总之, PGBR 可通过诱导肺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞而发挥抗肺癌作用, 其抗癌作用机制需进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Quan J S, Piao L, Wang X, et al. Rossicaside B protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105:380.
- [2] 尹学哲, 许惠仙, 金爱花, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6):134.
- [3] Lin L C, Chen K T. New phenylpropanoid glycoside from *Boschniakia rossica* [J]. Chin Pharmaceutical J, 2004, 56: 77.
- [4] Tan T T, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 81.
- [5] Lu Q L, Poulsom R, Wong L, et al. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues [J]. J Pathol, 1993, 169(4): 431.

[责任编辑 邹晓翠]