

## 半枝莲提取物对肺癌 A549 细胞生存素蛋白表达的影响

梁宪梅<sup>1</sup>, 夏春波<sup>2\*</sup>

1. 桂林市第二人民医院呼吸内科, 广西 桂林 541001;
2. 桂林医学院人体解剖学教研室, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的:研究半枝莲提取物对肺癌 A549 细胞生存素(survivin)蛋白表达的影响及其作用机制。方法:体外培养(10%胎牛血清、1640培养基)肺癌 A549 细胞,MTT 法观察半枝莲提取物对 A549 细胞的抑制作用,TUNEL 法检测细胞凋亡,免疫细胞化学(SP)法检测半枝莲提取物对 A549 细胞 survivin 蛋白表达的影响。结果:MTT 法结果显示,半枝莲提取物质量浓度 5~40 mg·L<sup>-1</sup>对 A549 细胞的抑制率呈浓度依赖性( $P < 0.01$ )。半枝莲提取物 18.86 mg·L<sup>-1</sup>剂量组凋亡指数为(38.40 ± 7.41)%,对照组为(6.22 ± 0.45)%,两者有显著性差异( $P < 0.01$ )。半枝莲提取物组 survivin 蛋白阳性细胞数明显低于对照组( $P < 0.01$ )。结论:半枝莲提取物能明显抑制肺癌 A549 细胞生长,其机制可能与下调 survivin 表达有关。

**[关键词]** 半枝莲提取物;肺癌细胞;生存素蛋白;凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0155-04

### Effect of *Scutellaria barbata* Extract for Survivin Protein Expression in Human Lung Cancer A549 Cell

LIANG Xian-mei<sup>1</sup>, XIA Chun-bo<sup>2\*</sup>

1. Department of Respiratory, Second People's Hospital of Guilin, Guilin 541001, China;
2. Department of Anatomy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of *Scutellaria barbata* extract for survivin protein expression in human lung cancer A549 cell and its mechanism. **Method:** Using the MTT assay to display the sensitivity to the drug, the inhibition of *S. barbata* extract to lung cancer cell(A549, 10% fetal calf serum, 1640 nutrient medium) *in vitro* was observed. TUNEL was used to test the apoptosis, immunocytochemistry was applied to examine the expression of survivin protein. **Result:** The inhibition rate of *S. barbata* extract(5~40 μg·mL<sup>-1</sup>) to A549 indicated a dose-dependent anti-proliferative effect by MTT assay( $P < 0.01$ ). The apoptotic index was(38.40 ± 7.41)% in experiment group(*S. barbata* extract 18.86 μg·mL<sup>-1</sup>), higher than that(6.22 ± 0.45)% in control group, showed a significant difference( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the masculine cells of survivin protein was decreased in the experiment group obviously( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The proliferation of A549 cell was inhibited obviously by *S. barbata* extract and the mechanism maybe related with survivin expression downregulation.

**[Key words]** *Scutellaria barbata* extract; lung cancer cell; survivin protein; apoptosis

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,中国肺癌的死亡率为 1.754/万,近年来在肺癌治疗方

面虽已取得了一定的成果,但其预后仍然不理想,因此,探索新的治疗方法已成为肺癌的研究方向。半枝莲提取物(*Scutellaria barbata* extract, SBE)能诱导多种肿瘤细胞凋亡,但其具体机制尚不明确。生存素(survivin)是重要的凋亡抑制因子,其主要通过抑制 Caspase 级联反应下游的 Caspase-3 和 Caspase-7 活性,从而抑制细胞凋亡,是目前肿瘤相关基因研究

**[收稿日期]** 20101206(007)

**[基金项目]** 桂林医学院资助项目(KY2008001)

**[第一作者]** 梁宪梅,本科,副主任医师,研究方向:呼吸内科疾病, Tel:13978393696

**[通讯作者]** \*夏春波, E-mail:xiachunbo910@163.com

热点之一<sup>[1-2]</sup>。本研究通过体外培养肺癌 A549 细胞,应用 MTT 法检测 SBE 对癌细胞活性的影响, TUNEL 法检测细胞凋亡情况,免疫细胞化学(SP)法检测癌细胞 survivin 蛋白表达,以探索 SBE 在肺癌中作用的分子机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 肺癌 A549 细胞株购自中南大学湘雅医学院细胞中心。

**1.2 药物与试剂** 半枝莲(Scutellariae Barbatae Herba,干燥全草)购自广西桂林市中医院中药房。细胞凋亡原位检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。MTT 购自 Amresco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。survivin 抗体购自 Santa Cruz 公司,工作浓度为 1:100。兔 SP 检测试剂盒(SP-9001,批号 1386323)及 DAB 显色试剂盒(ZLI-9032,批号 375230AJ)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Triton X-100 购自 Generay 公司。

**1.3 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(MCO175,SANYO),水平流超净工作台(ZHJH-2112),倒置显微镜(Olympus,IX-70),电子分析天平(FA2004N),酶标仪(ELX800 型)。

## 2 方法

**2.1 半枝莲提取物(SBE)的制备** 半枝莲经粉碎、过筛后,用 10 倍量石油醚回流提取 2 次后,再用 80% 乙醇回流提取 3 次(10,8,8 倍量),每次 1.5 h。乙醇提取液回收溶剂至成浓水液。提取物经萃取分离,过滤,使用时用 PBS 稀释至所需浓度。

**2.2 细胞培养** 肺癌 A549 细胞经含 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养基(含青霉素和链霉素)培养,置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

**2.3 MTT 法测定 SBE 对 A549 细胞的抑制作用** 取对数生长期的 A549 细胞经计数后以密度  $1 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔培养板,200  $\mu$ L/孔。实验设空白对照组和实验组(SBE 分别为 5,10,20,40 mg·L<sup>-1</sup>),每组设 12 个孔,在药物作用 48 h 后取出,加入 50  $\mu$ L MTT,继续培养 4 h 后终止培养,吸出上清,每孔加 DMSO 200  $\mu$ L,置摇床上低速振荡,用全自动酶标仪在波长 570 nm 处比色,测定各孔吸光度(A),取平均值。计算半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

抑制率 = (1 - 实验组平均 A / 对照组平均 A) × 100%

**2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡** 以 IC<sub>50</sub> 的 SBE 浓度与 A549 细胞培养,细胞凋亡检测采用 TUNEL 技术,

严格按照说明书进行,以 50  $\mu$ L 标记液(不含末端转换酶)代替 TUNEL 反应混和液做阴性对照。细胞凋亡阳性判断标准:细胞核内出现棕黑色或黑色颗粒为阳性细胞。计算方法:选择 5 个以上具有代表性的高倍视野(×400),计数 500 个 TUNEL 染色阳性的细胞数即细胞凋亡数。

凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 × 100%

**2.5 免疫细胞化学(SP)法检测肺癌 A549 细胞 survivin 蛋白表达** 以 IC<sub>50</sub> 的 SBE 浓度与 A549 细胞培养,爬片,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ L 处理 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 冲洗,加 1% Triton X-100 处理 10 min,PBS 冲洗,加入正常山羊血清工作液封闭 20 min,倾去血清,滴加 survivin 抗体(1:100)50  $\mu$ L,4 °C 过夜,PBS 冲洗,加入生物素标记二抗工作液 50  $\mu$ L,37 °C 孵育 40 min,PBS 冲洗,加辣根酶标记链霉卵白素工作液 50  $\mu$ L,37 °C 孵育 40 min,PBS 冲洗,加新鲜配置的 DAB 工作液 100  $\mu$ L 显色,中性树脂封片,镜下观察和照相。设 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 代替一抗的阴性对照。以胞质出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,在每张切片的阳性细胞区域取 10 个不同的高倍镜视野,计算每个视野的阳性细胞数目。

**2.6 统计学分析** 数据经 SPSS 15.0 统计软件处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 SBE 对肺癌 A549 细胞的抑制作用** SBE 对肺癌 A548 细胞的抑制作用随浓度的增加而增强,表现为浓度依赖性( $P < 0.01$ )。48 h 的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 18.86 mg·L<sup>-1</sup>。见表 1。

表 1 SBE 对肺癌 A549 细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	A	抑制率/%
0	1.288 ± 0.092	-
5	1.191 ± 0.080	7.53 ± 0.061 <sup>1)</sup>
10	0.942 ± 0.064	26.86 ± 0.070 <sup>1)</sup>
20	0.605 ± 0.075	53.03 ± 0.040 <sup>1)</sup>
40	0.371 ± 0.040	71.20 ± 0.083 <sup>1)</sup>

注:与 0 mg·L<sup>-1</sup> 组比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 SBE 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响** 在光学显微镜下,可观察到凋亡细胞表现为核染色质致密浓缩,边缘化,核膜裂解,染色质分割成块状等典型的凋亡形态。SBE 浓度 18.86 mg·L<sup>-1</sup> 组的凋亡指数为 (38.40 ± 7.41)%, 对照组为 (6.22 ± 0.45)%, 2 者

有显著性差异( $P < 0.01$ )。

### 3.3 SBE 对肺癌 A549 细胞 survivin 蛋白表达的影响

免疫细胞化学结果显示,肺癌 A549 细胞 survivin 蛋白表达阳性染色主要位于细胞浆中,为棕黄色颗粒。SBE 浓度  $18.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 survivin 蛋白阳性细胞数为  $(10.23 \pm 1.09)$  个,对照组为  $(34.79 \pm 2.86)$  个,2 者有显著性差异( $P < 0.01$ )。

## 4 讨论

半枝莲为唇形科黄芩属植物的干燥全草,具有清热解毒,活血化痰,消肿止痛等功效。研究表明,半枝莲具有良好的抗肿瘤活性,并与其他中药联合治疗多种肿瘤,其主要成分为黄酮类化合物和二萜类化合物,亦含有生物碱、甾体、多糖等成分<sup>[3,4]</sup>。然而,半枝莲抑制肿瘤细胞生长的具体机制尚未明确。有报道,半枝莲醇提物对自由基具有较强的清除和抑制作用<sup>[5]</sup>,半枝莲多糖(*Scutellaria barbata* polysaccharides, SPS)可抑制肿瘤生长,促进荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖,诱导脾细胞分泌 IL-2 和 TNF- $\alpha$ ,降低 H22 肝癌小鼠瘤重,具有较好的抗肝癌作用<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,SBE 质量浓度  $5 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时对肺癌 A549 细胞的抑制作用随药物浓度增大而抑制作用增强,呈浓度依赖性( $P < 0.01$ )。另有报道<sup>[7]</sup>,半枝莲黄酮类化合物对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有明显抑制增殖和诱导癌细胞凋亡作用。

survivin 是细胞凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP)的重要成员,除具有促进细胞周期调控、参与细胞有丝分裂和血管生成等作用外,其抵抗细胞凋亡功能在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用。桑占发等<sup>[8]</sup>研究了 survivin 与乳腺癌细胞增殖的关系,认为 survivin 不仅参与凋亡的调控,还促进细胞增殖,在乳腺癌发生中起重要作用,与临床分期、淋巴结转移有关,过度表达提示预后不良。survivin 蛋白在分化型甲状腺癌组织中表达上调,与原发灶的包膜侵犯和微血管生成关系密切<sup>[9]</sup>。细胞凋亡与肺癌发生发展关系密切,贞芪酪蛋白肽含药血清可抑制肺癌细胞端粒酶活性,有诱导人肺癌细胞分化和促进细胞凋亡的作用<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,SBE 质量浓度  $18.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时肺癌 A549 细胞凋亡指数为  $(38.40 \pm 7.41)\%$ ,对照组为  $(6.22 \pm 0.45)\%$  ( $P < 0.01$ );免疫细胞化学结果显示,SBE 组 survivin 蛋白阳性细胞数明显低于对照组

( $P < 0.01$ ),推测半枝莲对肺癌 A549 细胞的抑制作用可能与诱导细胞凋亡有关,其机制可能是通过下调 survivin 蛋白表达发挥作用的。目前认为 survivin 可通过以下两种途径抑制细胞凋亡:①直接或间接抑制 caspase-3, caspase-7, caspase-9 等的活性阻断细胞凋亡过程。②抑制 p53 功能。有研究<sup>[11]</sup>显示, survivin 小分子拮抗剂咪唑类化合物 YM155 体外实验中可抑制多种肿瘤细胞株生长,诱导细胞凋亡,增加肿瘤治疗(放疗、化疗)的敏感性。另有报道<sup>[12]</sup>,应用 RNA 干扰技术可下调子宫颈癌移植瘤组织 survivin 蛋白表达和抑制移植瘤生长并促进其凋亡。

半枝莲高效、低毒的抗癌特点显示了它的良好应用前景,但其抗癌作用机制的深层次研究还需进一步开展,阐明半枝莲在肿瘤中作用的分子机制,可为中药半枝莲的深入研制和开发奠定理论基础。

## [参考文献]

- [1] Zhang T, Fields J Z, Opdenaker L, et al. Survivin-induced aurora-B kinase activation; A mechanism by which APC mutations contribute to increased mitoses during colon cancer development [J]. Am J Pathol. 2010,177(6):2816.
- [2] Grossi F, Spizzo R, Bordo D, et al. Prognostic stratification of stage IIIA pN2 non-small cell lung cancer by hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data; an alpe adria thoracic oncology multidisciplinary group study (ATOM 014) [J]. J Thorac Oncol, 2010,5(9):1354.
- [3] 夏春波,蒋常文,戴支凯,等.半枝莲提取物对鼻咽癌 CNE-2 细胞 XIAP 蛋白表达的影响[J].中国新药杂志,2010,19(7):78.
- [4] Yin X, Zhou J, Jie C, et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549 [J]. Life Sci, 2004, 75(18):2233.
- [5] 薛海萍,朱春赞,芮欣忆,等.半枝莲醇提工艺的优化及体外抗氧化活性评价的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):12.
- [6] 叶华,崔燎.半枝莲多糖的抗肝癌作用及其机制的研究[J].癌症进展杂志,2009,7(3):331.
- [7] 韦鹏涯,浦洪琴,韦星,等.半枝莲提取物诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其对凋亡相关蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2007,18(12):3020.

## 桑椹多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响

田春雨\*, 薄海美, 李继安

(河北联合大学, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 观察桑椹多糖对链脲佐菌素(STZ)和高能量饲料诱发的 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠血糖、血脂的影响。方法: 高糖高脂饲料喂养 4 周后, ip 30 mg·kg<sup>-1</sup>STZ 建立 T2DM 大鼠模型, 随机分为糖尿病模型对照组、桑椹多糖低剂量组(ig 150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、中剂量组(ig 300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、高剂量组(ig 450 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及罗格列酮治疗组(ig 4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。持续 ig 给药 60 d 后测空腹血糖(FBG)、血脂、糖化血红蛋白(HbA1c)、胰岛素(Ins)的含量。结果: 桑椹多糖治疗组与模型组比较, FBG, HbA1c, 甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCH)及低密度脂蛋白(LDL)水平显著降低( $P < 0.05$ ), 高密度脂蛋白(HDL)和 Ins 水平显著升高( $P < 0.05$ )。结论: 桑椹多糖能有效地降低 T2DM 模型大鼠的血糖, 促进 Ins 分泌, 调节血脂。

**[关键词]** 桑椹多糖; 2 型糖尿病; 血糖; 血脂

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0158-03

## Influence of Mori Fructus Polysaccharide on Blood Glucose and Serum Lipoprotein in Rats with Experimental Type 2 Diabetes

TIAN Chun-yu\*, BO Hai-mei, LI Ji-an

(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of Mori Fructus polysaccharide (FMP) on blood glucose, serum lipoprotein in diabetic rats induced by streptozotocin (STZ) and high-energy diet. **Method:** Type 2 diabetes model was induced with high sucrose-fat diet for 4 weeks and STZ ip at 30 mg·kg<sup>-1</sup>. Rats were randomly divided into groups: model group, FMP low dose(ig 150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and middle dose(ig 300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and high dose treatment group (ig 450 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), rosiglitazone treatment group (ig 4 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Blood glucose, serum lipoprotein, HbA1c, Ins contents in rats were detected after 60 d of continuous medication. **Result:** Compared with the model group, FMP could significantly reduce the levels of blood glucose, HbA1c, TG, TCH and

**[收稿日期]** 20101121(002)

**[基金项目]** 国家科技部国际科技合作项目(2008DFA31050)

**[通讯作者]** \* 田春雨, 讲师, 硕士, 主要从事中药有效成分及糖尿病新药开发研究, Tel: 13831525878, E-mail: tcy4479@sina.com

- [8] 桑占发, 王兴, 齐玉新, 等. 乳腺癌组织 Survivin 表达与细胞增殖的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(8):1478.
- [9] 马静, 李晓江, 隋军, 等. survivin 在甲状腺癌中的表达及与微血管生成的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(10):1149.
- [10] 张延英, 吴建军, 王鹏善, 等. 贞芪酪蛋白肽复合物血清对人肺腺癌 A549 细胞分化抑制作用及相关机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4):114.
- [11] Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, et al. A novel small-molecule survivin suppressant induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts [J]. Cancer Res, 2007, 67(17):8014.
- [12] 宋晖, 辛晓燕, 肖锋, 等. Survivin 基因 RNAi 对子宫颈癌裸鼠移植瘤生长与凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4):374.

[责任编辑 聂淑琴]