

## 温下方含药血清诱导 A549/DDP 细胞凋亡及对 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达的影响

季旭明, 欧阳兵\*, 吴智春, 于华芸, 王春燕, 李文华  
(山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 研究温下方含药血清诱导人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 凋亡及对 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达的影响。方法: 制备温下方含药血清, 高效液相色谱法(HPLC)定性检测含药血清中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、大黄素和乌头碱。A549/DDP 细胞分为 DDP 干预组, 含药血清 + DDP 干预组, 正常血清 + DDP 干预组。孵育 24 h 后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 激光共聚焦显微镜检测 Bcl-2, Bax 及 p53 蛋白表达。结果: HPLC 结果显示含药血清中含有人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、大黄素及乌头碱。含药血清作用后, 与 DDP 干预组比较, 含药血清 + DDP 干预组细胞凋亡率增高至  $(21.82 \pm 3.27)\%$  ( $P < 0.05$ ); 细胞内 Bcl-2 蛋白表达降低至  $2.81 \pm 0.02$  ( $P < 0.05$ ); Bax 蛋白表达增高至  $2.90 \pm 0.08$  ( $P < 0.05$ ); p53 蛋白表达增高至  $3.58 \pm 0.09$  ( $P < 0.05$ )。结论: 温下方含药血清明显诱导 A549/DDP 细胞凋亡, 显著降低 Bcl-2 蛋白表达, 提高 Bax, p53 蛋白表达, 可能从诱导耐药细胞凋亡角度逆转耐药。

**[关键词]** 温下方; 含药血清; 人肺腺癌耐药细胞株; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 x 蛋白; p53

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0123-04

## Effect of Wenxia Recipe Medicated Serum on Inducing Apoptosis of A549/DDP Cells and Expression of Bcl-2, Bax and p53

Ji Xu-ming, Ou Yang-bing\*, Wu Zhi-chun, Yu Hua-yun, Wang Chun-yan, Li Wen-hua  
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250035, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Wenxia recipe medicated serum on inducing apoptosis of A549/DDP cells and expression of Bcl-2, Bax and p53 protein by using serum pharmacological methods *in vitro*. **Method:** Drug-containing serum was prepared and analyzed by HPLC. Furthermore, A549/DDP cells were divided into DDP group, drug-containing serum + DDP group and normal serum + DDP group. After incubated 24h, cell apoptosis was evaluated by laser flow cytometry and the expression of Bcl-2, Bax and p53 protein in cells was investigated by laser scanning confocal microscope. **Result:** There were ginsenoside Rb<sub>1</sub>, emodin, aconitine in drug-containing serum. Compared to DDP group, the apoptosis rate of drug-containing serum + DDP group rose to  $(21.82 \pm 3.27)\%$  ( $P < 0.05$ ), the expression of Bcl-2 significantly dropped to  $2.81 \pm 0.02$  ( $P < 0.05$ ) and the expression of Bax and p53 significantly rose to  $2.90 \pm 0.08$  and  $3.58 \pm 0.09$  ( $P < 0.05$ ) respectively. **Conclusion:** Wenxia recipe medicated serum could significantly induce apoptosis of A549/DDP, decrease the expression of Bcl-2 and increase the expression of Bax and p53. This study showed that Wenxia recipe might reverse the multidrug-resistance of A549/DDP cell by inducing apoptosis.

**[Key words]** Wenxia recipe; drug-containing serum; A549/DDP cell line; apoptosis; Bcl-2; Bax; p53

**[收稿日期]** 2011-02-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873222); 山东省中青年科学家基金项目(2008BS03010); 山东省中医药管理局科技发展计划项目(2009-016)

**[第一作者]** 季旭明, 医学博士, 副教授, 从事中药复方药理学研究, Tel: 0531-89628055, E-mail: jixuming724@163.com

**[通讯作者]** \* 欧阳兵, 医学博士, 教授, 从事中医文献临床基础与实验研究, Tel: 0531-89628006, E-mail: doctoroy@sina.com

肺癌的多药耐药 (mutidrug-resistance, MDR) 形成机制复杂,国内外学者虽已进行多方面研究,但尚未获得完全清楚的结论。有研究表明肿瘤细胞对凋亡的耐受可能是耐药产生机制之一<sup>[1]</sup>,诱导耐药细胞凋亡可逆转其耐药<sup>[2]</sup>。温下方由大黄、人参等组成,其所含的大黄素、人参皂苷等成分已证实有逆转耐药作用<sup>[3-4]</sup>。前期研究结果表明,温下方含药血清能明显降低 A549/DDP 细胞的耐药性,增敏 2 ~ 2.5 倍<sup>[5]</sup>。本研究运用血清药理学方法,研究温下方含药血清诱导 A549/DDP 细胞凋亡及其可能机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康新西兰兔 10 只,雌雄各半,体质量 2.15 ~ 3.00 kg,由山东中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCSK(鲁)20050015。

**1.2 细胞株** A549/DDP 细胞株由中国科学院生物物理所提供。置于含 10% 小牛血清培养液中,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。细胞培养液中顺铂 (DDP) 的维持浓度为 6 μmol · L<sup>-1</sup>。

**1.3 仪器** Agilen 1200 高效液相色谱仪 (DAB 检测器,美国 Agilent 公司);FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司);LSM510 型激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

**1.4 药品** 温下方由人参、大黄、附子、当归组成,水煎浓缩成含生药量 1 g · mL<sup>-1</sup>,山东中医药大学附属医院制剂室负责制剂和质量控制。

**1.5 试剂** Annexin V-FITC 试剂盒 (编号 51-65874-X),美国 BD PharMingen 公司;Bcl-2 (编号 ZM-0300),Bax (编号 ZM-0331),北京中杉金桥生物技术有限公司;p53 (编号 sc-6243),Santa Cruz 公司。

对照品购自山东省药检所瑞发公司,批号 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 11074-200318;大黄素 110756-2001100;乌头碱 110720-200410。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 实验动物随机分为含药血清组和正常血清组。含药血清组 ig 温下方 24 g · kg<sup>-1</sup>,正常血清组 ig 等容积生理盐水,2 次/d,连续 3 d,末次 ig 后禁食 12 h,ig 1 d 药量,1 h 后采血,取血清,56 °C 水浴灭活,-70 °C 保存备用。

**2.2 HPLC 分析** 取含药血清 100 μL,加入 200 μL 甲醇沉淀蛋白,离心,取上清液。色谱条件:人参皂苷 Rb<sub>1</sub>: 乙腈-0.1% 磷酸 (32:68);大黄素: 甲醇-0.1% 磷酸 (80:20);乌头碱: 甲醇-水 (56:44)。柱

温: 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 40 °C,大黄素 37 °C,乌头碱 35 °C。波长: 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 203 nm,大黄素 254 nm,乌头碱 240 nm。流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL。

**2.3 细胞培养与分组** 将复苏后的 A549/DDP 细胞接种传代。实验取对数生长期细胞。以 1 × 10<sup>6</sup>/mL 密度接种于 24 孔细胞培养板,12 h 后分为 3 组并加入药物。DDP 干预组: 加入低效浓度顺铂 (10 mg · L<sup>-1</sup>);含药血清 + DDP 干预组: 细胞加入含药血清和低效浓度顺铂;正常血清 + DDP 干预组: 正常血清和低效浓度顺铂。继续培养 24 h 后,4% 多聚甲醛固定,-20 °C 保存。

**2.4 激光共聚焦显微镜检测 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达** 采用免疫荧光细胞化学法。抗体效价均为 1:100。标本 PBS 洗 3 次,5 min/次,山羊血清室温孵育 15 min,加入一抗,4 °C 过夜;加入荧光素标记的二抗,室温孵育 20 min;PBS 洗 3 次。Zeiss LSM510 激光共聚焦显微镜检测。Zeiss LSM510 Image Examiner 图像分析软件半定量分析图像相对荧光强度<sup>[1]</sup>,蛋白表达量以相对荧光强度表示。

**2.5 激光流式细胞仪分析细胞凋亡率** 各组细胞经含药血清处理 24 h 后,胰酶消化,PBS 漂洗,离心,调整细胞密度,按文献[6]方法染色。激光流式细胞仪检测,cellquest 软件定量分析细胞凋亡率。

**2.6 统计方法** 应用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 HPLC 分析结果** 液相图谱显示,温下方水煎液及含药血清均含有人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、大黄素及乌头碱 (图 1 ~ 9)。

**3.2 温下方含药血清对 A549/DDP 细胞 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达的影响** 与 DDP 干预组比较,含药血清 + DDP 干预组细胞 Bcl-2 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), Bax, p53 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.3 温下方含药血清对 A549/DDP 细胞凋亡率的影响** 流式细胞仪获取 10 000 个细胞,DDP 干预组荧光值为 10.54 ± 3.01,正常血清 + DDP 干预组荧光值为 11.02 ± 3.69,含药血清 + DDP 干预组荧光值为 21.82 ± 3.27,与 DDP 干预组比较,含药血清 + DDP 干预组细胞凋亡率明显增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

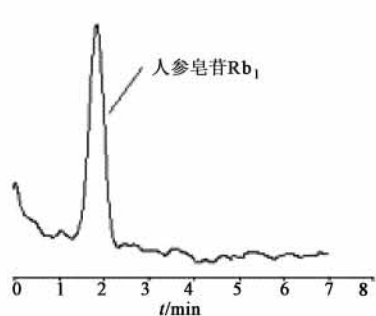


图1 人参对照品

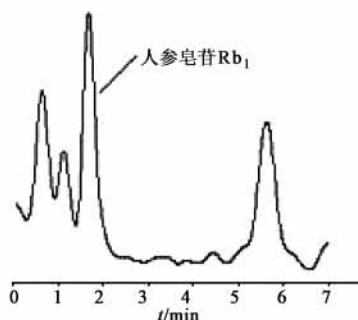


图2 温下方水煎液

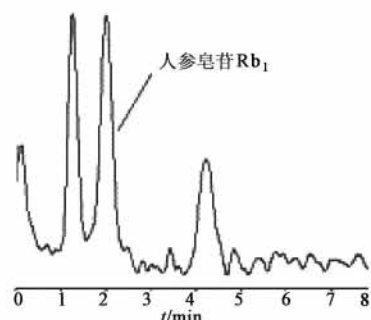


图3 温下方含药血清

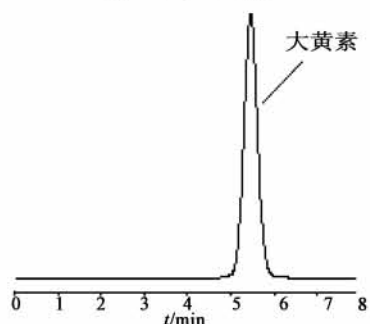


图4 大黄对照品

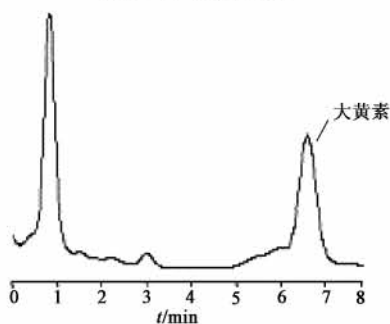


图5 温下方水煎液

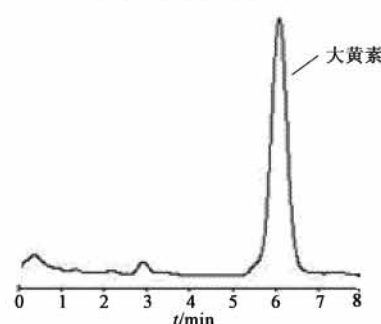


图6 温下方含药血清

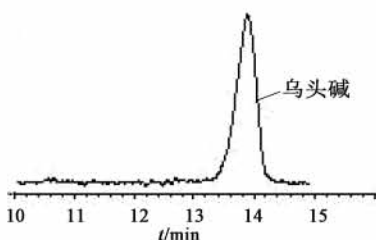


图7 附子对照品

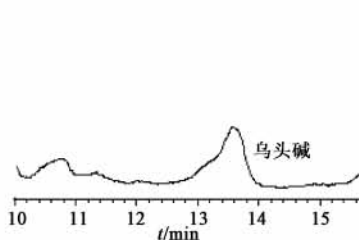


图8 温下方水煎液

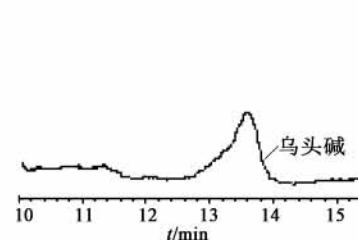


图9 温下方含药血清

表1 温下方含药血清对 A549/DDP 细胞 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bcl-2	Bax	p53
DDP 干预	3.38 ± 0.06	2.21 ± 0.08	2.61 ± 0.12
正常血清 + DDP 干预	3.46 ± 0.05	2.23 ± 0.09	2.50 ± 0.10
含药血清 + DDP 干预	2.81 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>	2.90 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>	3.58 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>

注:与正常血清 + DDP 干预组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 DDP 干预组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,化疗是治疗的重要手段。许多患者经过放疗、化疗等治疗,容易产生 MDR。尤其是非小细胞肺癌(NSCLC),MDR 是导致化疗失败的主要原因,也是其治疗急需解决的难题<sup>[1]</sup>。

温下方由《金匱要略方论》大黄附子汤加减而成,方由人参、大黄、附子、当归组成,功能温肠腑、复阳气、调气机、下瘀滞。既往的实验结果提示温下方含药血清可降低细胞膜表面肺耐药相关蛋白(LRP)

等的表达,从而逆转 A549/DDP 细胞的多药耐药<sup>[5-6]</sup>。由于耐药机制的复杂性及中药复方作用的多靶点、多机制特点<sup>[7]</sup>,我们进行温下方含药血清诱导 A549/DDP 细胞凋亡的研究。

首先应用 HPLC 技术检测温下方含药血清中主要有效成分人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、大黄素和乌头碱,结果提示,含药血清中含有人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、大黄素和乌头碱。说明可以运用血清药理学方法,用含药血清代替小牛血清孵育细胞进行干预研究。

肿瘤细胞对凋亡的耐受是 MDR 的机制之一,具有 MDR 表型的细胞常呈现凋亡抗性,认为凋亡抗性

可能是 MDR 的本质<sup>[2]</sup>,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,发现温下方含药血清可明显诱导 A549/DDP 细胞凋亡。结合以往研究结果,提示温下方含药血清可能是通过诱导耐药细胞凋亡而逆转耐药。

研究报道 Bcl-2, p53 等基因改变与多药耐药存在相关性, Bcl-2 可作为一种耐药基因<sup>[8]</sup>,其过表达抑制肿瘤细胞的凋亡可导致多药耐药现象产生<sup>[9]</sup>。p53 能直接下调 Bcl-2 的表达,可能在促进耐药细胞凋亡中发挥关键作用<sup>[10]</sup>。Bax 亦具有促凋亡特性,其高表达能直接诱导肿瘤细胞凋亡,且能加强化疗敏感性<sup>[11]</sup>。提示 Bcl-2, Bax, p53 表达的变化可能是耐药细胞凋亡的分子机制。

实验结果表明温下方含药血清能明显下调 A549/DDP 细胞 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 和 p53 蛋白表达,诱导和促进 A549/DDP 细胞凋亡,从而逆转多药耐药,提示温下方含药血清诱导 A549/DDP 细胞凋亡可能是其逆转多药耐药的分子机制之一。

#### [参考文献]

[1] Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma[J]. Med Oncol, 2002, 19(2): 87.  
[2] 张梅春, 胡成平, 陈琼. Survivin 反义寡核苷酸提高人肺腺癌 A549 耐药细胞系对顺铂敏感性的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 408.  
[3] 史曦凯, 张翼军, 赵春景. 人参皂甙单体 Rb<sub>1</sub> 联合异博定对多药耐药细胞系 K562/HHT 的耐药逆转作用

[J]. 重庆医学, 2003, 32(6): 706.  
[4] 周颀, 傅建民, 石剑, 等. 大黄素逆转乳腺癌细胞多药耐药及其对 ERCC1 蛋白表达的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(1): 27.  
[5] 季旭明, 欧阳兵, 王春燕, 等. 温下方逆转 A549/DDP 细胞的多药耐药及对膜表面蛋白表达的影响[J]. 中国药物与临床, 2006, 6(12): 885.  
[6] 欧阳兵, 季旭明, 王春燕, 等. 温下方含药血清对 A549/DDP 细胞内铂含量及 erbB-2, Topo-II 表达的影响[J]. 新中医, 2008, 21(3): 219.  
[7] 林海星, 张天禹, 谭宁. 中药逆转肿瘤多药耐药作用的研究现状[J]. 医学综述, 2010, 16(13): 1970.  
[8] Hannun Y A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy[J]. Blood, 1997, 89(6): 1845.  
[9] Mese H, Sasaki A, Alcalde R E, et al. Regulation of apoptosis reduction in the cisplatin-resistant A431 cell line by bcl-2 and CPP32[J]. Chemotherapy, 2000, 46(1): 69.  
[10] Thomas A, El Roubi S, Reed J C, et al. Drug induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and BCL-2/Bax protein in drug resistance[J]. Oncogene, 1996, 12(5): 1055.  
[11] Xiang J, Gomez-Navarro J, Arafat W, et al. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer[J]. Gene Med, 2000, 2(2): 97.

[责任编辑 何伟]