

# 莪术油对肺腺癌 A549 细胞周期及组织蛋白酶 K 表达的影响

杨长福<sup>1,2</sup>, 李亚东<sup>1</sup>, 牛建昭<sup>1\*</sup>, 王晓波<sup>1</sup>, 黄春芳<sup>1</sup>, 唐炳华<sup>1</sup>, 赵丕文<sup>1</sup>, 刘霞<sup>1</sup>, 王继峰<sup>1</sup>  
(1. 北京中医药大学生化教研室, 北京 100029; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨莪术油对 A549 细胞增殖抑制作用及组织蛋白酶 K 表达的影响。方法: MTT 法观察莪术油对 A549 细胞增殖的抑制作用; 流式细胞术检测细胞周期阻滞; Western blot 检测组织蛋白酶 K 的表达情况。结果: 莪术油作用后 MTT 法结果显示莪术油在  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ~  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对 A549 细胞增殖有抑制作用,  $\text{IC}_{50}$  随作用时间的延长显著前移。流式细胞术结果出现凋亡峰, 与未处理组细胞相比, 给药组细胞  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期细胞比例增加, S 期细胞比例降低。Western blot 结果显示, 莪术油处理细胞 24 h 后, 组织蛋白酶 K 表达明显上调,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  达最大值。结论: 莪术油能抑制肺腺癌 A549 细胞增殖, 阻滞细胞周期的作用, 其机制可能与上调组织蛋白酶 K 表达水平有关。

[关键词] 莪术油; A549 细胞; 细胞周期; 组织蛋白酶 K

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0113-04

## Influence of Zedoary Oil on Cell Cycle and Cathepsin K Expression in A549 Cell Line

YANG Chang-fu<sup>1,2</sup>, NIU Jian-zhao<sup>1\*</sup>, WANG Ji-feng<sup>1</sup>, WANG Xiao-bo<sup>1</sup>,  
HUANG Chun-fang<sup>1</sup>, TANG Bing-hua<sup>1</sup>, LI Ya-dong<sup>1</sup>, ZHAO Pi-wen<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 10029, China;  
2. Gui Yang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the Zedoary oil on A549 cell line inhibiting the proliferation and cathepsin K expression. **Method:** The effects of Zedoary oil on the proliferation of lung adenocarcinoma cell line A549 were determined by MTT assay. The cells cyclic retardation were examined by using flowcytometry. Cathepsin K expression of level were detected by using western blot. **Result:** MTT showed that Zedoary oil had an inhibitory effect on the proliferation of A549 cells in  $60 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Flow cytometry showed that Zedoary oil increased the percentage of  $\text{G}_0/\text{G}_1$  phase cells and reduced the percentage of S phase cells. The results of western blot showed that the expression of cathepsin K was up-regulated significantly in A549 cells of Zedoary oil groups compared with that in controls. **Conclusion:** Zedoary oil can significantly inhibit the growth of A549 cells, blocking the cell cycle. The effects may due to the up-regulation of cathepsin K.

[Key words] Zedoary oil; A549 cell; cell cycle; cathepsin k

莪术油(oleum curcumae)系莪术(温莪术)经水

蒸气蒸馏提取的挥发油,属于抗病毒药、抗癌药。化学成分主要有 -榄香烯、莪术醇、莪术二醇、莪术酮、吉玛酮等。研究表明,莪术油是一种有效的抗肿瘤药物,通过抑制肿瘤细胞增殖<sup>[1]</sup>、诱导细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>及阻滞细胞周期<sup>[5]</sup>,与其他中药配伍使用能减少肺纤维化大鼠肺泡炎和纤维化情况<sup>[6-7]</sup>。本实验以 A549 细胞为材料,测定莪术挥发油对癌细胞的生长抑制率,检测莪术油对细胞凋亡的诱导、细胞周期的

[收稿日期] 20100208(003)

[基金项目] 科技部国际合作项目(2008DFA31970)

[作者简介] 杨长福,讲师,在读博士。研究方向:组织蛋白酶与肺纤维化, E-mail: yangchangfu@126.com

[通讯作者] 牛建昭,教授,博导, E-mail: niujianzhao@126.com

阻滞及组织蛋白酶 K 的表达, 从细胞分子水平探讨莪术油抑制 型肺泡细胞生长的作用机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料和主要试剂** 莪术油由浙江天瑞药业有限公司提供(批号 080301); 肺腺癌细胞株 A549 由中国医学科学院细胞基础研究所提供; 胎牛血清为 HYCLONE 公司产品; Ham 'F12 培养液为北京迈晨科技有限公司产品; 二甲亚砜(DMSO) 购自和光纯乐工作株式会社; 四甲基偶氮唑盐法(MTT) 试剂购自 Sigma 公司; 一抗: 组织蛋白酶 K 兔单抗、 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin) 兔单抗购自 Santa Cruz; 二抗: 山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物有限公司; RIPA 蛋白裂解缓冲液、电泳级十二烷基硫酸钠(SDS)、ECL 发光试剂盒购自北京普利来生物有限公司; 碘化丙(Pi) 和 RNase A 为 Amersco 公司产品, 聚偏乙烯二氟膜(PVDF) 为 BIO-RAD 公司产品

**1.2 主要仪器** 流式细胞仪(BD 公司), 全波长荧光酶标仪(TECAN 公司), 倒置显微镜(Olympus), 垂直板电泳仪(Bio-rad)

## 1.3 方 法

### 1.3.1 莪术油对 A549 细胞生长的增殖抑制作用

MTT 法测定细胞的增殖抑制作用。莪术油用吐温-80 助悬, 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜滤过后, 加入新鲜的 Ham 'F12 培养液配制成所需的浓度。实验共设未处理组、莪术油不同浓度组(60 ~200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。取对数生长期细胞, 以 0.25% 胰酶消化后, 加入含血清培养基终止消化, 离心, 弃上清, 再加入含有 5% 血清的 Ham 'F12 培养液, 反复吹打细胞, 配成细胞悬液, 计数并调整细胞密度为  $2 \times 10^4 / \text{mL}$ 。以每孔 100  $\mu$ L 接种细胞悬液入 96 孔培养板内, 每组设 3 个复孔。将培养板放入  $\text{CO}_2$  培养箱中, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养 24 h。吸弃上清, 按组加入含有不同浓度莪术油的培养液(血清含量为 5%), 并设对照组继续培养。培养 24, 48, 72 h 后, 分别取出培养板, 加入 MTT 溶液( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min, 于酶标仪 492 nm 波长处测定各孔吸光度(A), 以下式计算抑制率。各时间点重复 3 次, 计算平均值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{加药组 } A}{\text{未处理组 } A}\right) \times 100\%$$

**1.3.2 莪术油对 A549 细胞细胞形态及周期的影响** 取对数生长期的 A549 细胞, 胰酶消化, 制成细

胞悬液, 调整细胞密度使每一 25 cm 的培养瓶细胞数为  $5 \times 10^5 / \text{mL}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养 24 h, 使细胞同步。随机按未处理组、加药组(莪术油终浓度为 40 ~160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激细胞, 于 24, 48 h 将细胞培养瓶置倒置显微镜下观察, 记录加药组及未处理组细胞形态的变化, 并于 40  $\times$  目镜视野下拍照; 收获细胞冷乙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜, RNase A 处理, PI 染色, 2 h 内上流式细胞仪检测细胞周期分布。

**1.3.3 莪术油对 A549 细胞中组织蛋白酶 K 表达的影响** 取对数生长期的 A549 细胞, 胰酶消化, 制成细胞悬液, 调整细胞密度使为  $5 \times 10^5 / \text{mL}$ , 培养 24 h 使细胞同步。随机按未处理组、加药组(莪术油终浓度 60 ~160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激细胞, 于 24 h 收获细胞置冰上, 加入 RIPA 蛋白裂解缓冲液裂解细胞提取蛋白(4  $^{\circ}\text{C}$  离心 14 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min), BCA 法进行蛋白定量, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, PVDF 膜 0.8  $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  恒流转膜 1 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗结合(组织蛋白酶 K 按 1 500 稀释,  $\alpha$ -actin 按 1 1 000 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, TBST 洗膜 3 次, 1 2 000 稀释的二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  2 h, TBST 洗膜 3 次; ECL 发光试剂盒发光, 胶片感光, 底片显影、定影。

**1.3.4 统计分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  试验结果用 SPSS 13.0 统计软件统计分析。

## 2 结果与分析

**2.1 莪术油对肺癌细胞 A549 的增殖抑制作用** 实验结果见表 1。莪术油在 60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ~200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对肺腺癌 A549 细胞增殖有抑制作用, 药物浓度高, 作用时间增加, 其抑制细胞增殖作用亦强, 在一定程度上体现时间-剂量-效应关系。药物对细胞的半数抑制率( $\text{IC}_{50}$ ) 随作用时间的增加, 由作用 24 h 的 110  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  显著前移到 48, 72 h 的约 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  附近。

**2.2 莪术油对肺腺癌 A549 细胞形态的影响** 细胞形态学观察结果显示, 随药物浓度的增加细胞生长密度逐渐下降, 漂浮的死细胞数量增多, 细胞体积变小, 核固缩现象增多。莪术油在 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量下, 出现少量的细胞空泡现象, 开始有凋亡细胞产生; 当剂量为 120  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 空泡化细胞达 75% 以上; 当剂量为 160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 大量细胞碎片形成, 完整形态细胞少见, 细胞少有贴壁。

**2.3 莪术油对肺腺癌 A549 细胞凋亡及细胞周期的**

影响 实验结果见表 2。流式细胞术 PI 染色结果显示, 莪术油在  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  能使肺腺癌 A549 细胞发生凋亡, 与对照组相比, 细胞凋亡与药物浓度成正相关, 具有明显的剂量依赖性。与未处理组细胞相比, 80, 100, 120, 160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量处理的

A549 细胞在 DNA 直方图中,  $G_0/G_1$  期峰前均见有凋亡峰(亚二倍体峰)出现。

同时, 实验结果也表明在  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内均能使细胞  $G_0/G_1$  期细胞比例增加, S 期细胞比例降低, 但无剂量依赖性。

表 1 不同浓度莪术油在不同时间对肺腺癌 A549 细胞的抑制作用(  $\bar{x} \pm s, n=3$  )

级别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率 /%	A	抑制率 /%	A	抑制率 /%
未处理组	-	0.4530 $\pm$ 0.0078	-	0.6688 $\pm$ 0.0612	-	1.0279 $\pm$ 0.1189	-
莪术油	60	0.3764 $\pm$ 0.0310	16.91	0.4253 $\pm$ 0.0679 <sup>1)</sup>	36.41	0.7015 $\pm$ 0.1069 <sup>1)</sup>	31.75
	80	0.2933 $\pm$ 0.0519 <sup>1)</sup>	35.25	0.2332 $\pm$ 0.0460 <sup>1)</sup>	65.13	0.3472 $\pm$ 0.0607 <sup>1)</sup>	66.22
	100	0.2468 $\pm$ 0.0432 <sup>1)</sup>	45.53	0.1761 $\pm$ 0.0238 <sup>1)</sup>	73.67	0.1673 $\pm$ 0.0492 <sup>1)</sup>	83.73
	120	0.1917 $\pm$ 0.0217 <sup>1)</sup>	57.68	0.1232 $\pm$ 0.0276 <sup>1)</sup>	81.57	0.1020 $\pm$ 0.0196 <sup>1)</sup>	90.08
	160	0.0578 $\pm$ 0.0036 <sup>1)</sup>	87.23	0.0541 $\pm$ 0.0032 <sup>1)</sup>	91.91	0.0783 $\pm$ 0.0444 <sup>1)</sup>	92.38
	200	0.0554 $\pm$ 0.0045 <sup>1)</sup>	87.78	0.0529 $\pm$ 0.0042 <sup>1)</sup>	92.09	0.0643 $\pm$ 0.0283 <sup>1)</sup>	93.75

注: 与未处理组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 莪术油作用 24 h 对 A549 细胞周期及凋亡率的影响(  $n=3$  )

组别	浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$ 期	S 期	$G_2/M$ 期	凋亡率
未处理	-	58.24	28.86	12.90	0.10
莪术油	40	64.90	25.75	9.31	0.13
	60	75.50	13.78	10.72	0.35
	80	75.40	13.56	11.05	2.45
	100	70.29	15.61	14.10	2.43
	120	62.55	24.57	12.87	18.23
	160	66.31	24.83	8.86	28.40

### 2.4 莪术油对 A549 细胞中组织蛋白酶 K 表达的影响

蛋白免疫印迹结果表明, 与未处理组细胞中组织蛋白酶 K 的表达相比, 60, 80, 100, 120  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度药物处理的细胞中组织蛋白酶 K 的表达均增加, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量下达最大值(图 1)。

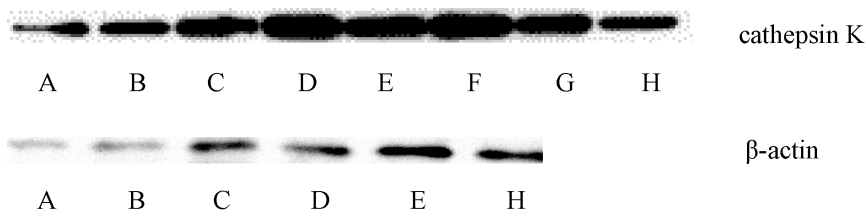


图 1 组织蛋白酶 K 在莪术油处理 A549 细胞中的表达

A. 未处理组; B. 莪术油  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; C. 莪术油  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

D, F.  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; E, G. 莪术油  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; H. 莪术油  $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

### 3 讨论

肺纤维化是多种原因引起慢性肺疾病的共同结局, 现明确的致病因素有药物毒性作用、环境暴露、结缔组织病等<sup>[8]</sup>。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<sup>[9]</sup>。A549 来源于人 I 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<sup>[10]</sup>, 故作为本研究的细胞模型。

本实验 MTT 法测定结果表明, 莪术油在  $0 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 24 h 作用时间点具有明显的量效关系, 即药物抑制细胞增殖能力与药物剂量呈正相关,  $IC_{50}$  约  $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 随药物作用细胞时间延长, 在 48, 72 h, 药物的  $IC_{50}$  显著前移。进一步流式细胞术研究发现, 莪术油在 60, 80, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量下主要是通过阻滞细胞于  $G_0/G_1$  期, 阻止细胞 DNA 的复制, 影响细胞向 S 期,  $G_2/M$  期移行, 抑制肺腺癌 A549 细胞增殖; 在 120, 160  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量下, 药物过度的富集, 反复刺激, 引发细胞大量的死亡、漂浮, 体现的是药物的细胞毒作用。

组织蛋白酶 K (cathepsin K, Cat K) 是大量存在于内涵体/溶酶体腔内的半胱氨酸蛋白酶, 属木瓜蛋白酶家族成员, 与人体的多种生理过程密切相关, 近年来研究表明组织蛋白酶 K 在肺系疾病的发生发展过程中起作用的关键酶<sup>[11-12]</sup>, 在维持肺细胞外基质动态平衡中发挥着重要的作用, 高表达的组织蛋白酶 K 能调节博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型肺组织细胞外基质的降解<sup>[13]</sup>。组织蛋白酶 K 在肺泡上皮和支气管上皮细胞中存在, 并参与肺组织中

EMC 的重构<sup>[14]</sup>, 我们的研究也证实这一点, 且莪术油在 60 ~160 mg·L<sup>-1</sup> 剂量下均能上调 A549 细胞中组织蛋白酶 K 的表达, 莪术油在 100 mg·L<sup>-1</sup> 剂量组织蛋白酶 K 表达量最高, 推测莪术油通过触发溶酶体途径激活组织蛋白酶 K 的传导途径, 抑制 A549 细胞的增殖。总之, 研究结果初步显示, 莪术油诱导人肺腺癌细胞 A549 组织蛋白酶 K 的高表达, 可能是其治疗肺纤维化的重要机制, 但莪术油防治肺纤维化的具体分子机制尚需作进一步研究。

#### [参考文献]

[ 1 ] 宋丽琼, 张昌菊. 莪术油联合干扰素对小鼠宫颈癌端粒酶活性和细胞凋亡的影响[ J ]. 上海中医药杂志, 2006, 40( 7 ) : 68.

[ 2 ] 吴冬梅, 杨荣宁. 莪术油对鼻咽癌 CNE-2 细胞的凋亡及放疗增敏机制的影响[ J ]. 肿瘤防治研究, 2008, 35( 11 ) : 778.

[ 3 ] 唐渊, 李晓辉. 莪术提取物对肝癌细胞系 HepG2 的抗癌作用及机制研究[ J ]. 中国药理学通报, 2007, 23( 6 ) : 790.

[ 4 ] 张维彬, 谭敏, 肖刚, 等. 莪术油诱导小鼠 HepA 肝癌细胞凋亡及其对 bcl-2 蛋白表达的影响[ J ]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18( 4 ) : 370.

[ 5 ] 王娟, 王顺启, 倪虹, 等. 莪术挥发油抑制人肝癌细胞株 SMMC-7721 生长的实验研究[ J ]. 天津中医药, 2003, 20( 1 ) : 48.

[ 6 ] 孙增涛, 廉富, 李小娟, 等. 肺纤维化模型大鼠肺组织中转化生长因子 1 及转化生长因子 1mRNA 的表

达及黄芪莪术合剂的干预效应[ J ]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11( 14 ) : 2645.

[ 7 ] 邱颂平, 王英豪, 杨素芳. 破血化瘀药三棱、莪术对肺纤维化大鼠模型肺形态学及羟脯氨酸的影响[ J ]. 福建医科大学学报, 2007, 41( 5 ) : 412.

[ 8 ] Taskar V S, Coultas D B. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease[ J ]. Proc Am Thorac Soc 2006, 3: 293.

[ 9 ] Mois é Selman, Annie Pardo. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis[ J ]. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 364

[ 10 ] 王金胜, 曾庆富, 冯德云, 等. 核转录因子 Sp1 在二氧化硅活化的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.

[ 11 ] Böhling F, Reisenauer A, Gerber A, et al. Cathepsin K—a marker of macrophage differentiation [ J ]. J Pathol, 2001, 195( 3 ) : 375.

[ 12 ] Böhling F, Waldburg N, Gerber A, et al. Cathepsin K expression in human lung[ J ]. Adv Exp Med Biol, 2000, 477: 281.

[ 13 ] Mrigank Srivastava, Kathrin Steinwede, Riku Kiviranta, et al. Overexpression of cathepsin K in mice decreases collagen deposition and lung resistance in response to bleomycin-induced pulmonary fibrosis[ J ]. Respiratory Research, 2008, 9: 54.

[ 14 ] Frank Böhling, Annegret Gerber, Carsten H ckel, et al. Expression of cathepsin K in lung epithelial cells[ J ]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20: 612.

[责任编辑 聂淑琴]