

# 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

张延英<sup>1</sup>, 吴建军<sup>1</sup>, 王鹏善<sup>2</sup>, 薛娜<sup>1</sup>, 舒畅<sup>1</sup>, 吴红彦<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医学院; 兰州 730000; 2. 高台县宣化乡卫生院, 甘肃 张掖 734304)

[摘要] 目的: 探索贞芪酪蛋白肽(ligustri-astragali casein co-peptid, LACP)复合物对人肺腺癌 A549 细胞分化的诱导作用及作用机制。方法: MTT 法检测贞芪酪蛋白肽含药血清 5%, 10%, 15%, 20% 浓度对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响; 通过贞芪酪蛋白肽药物血清对 A549 细胞核质比和端粒酶活性的影响观察其诱导分化作用; 免疫细胞化学方法观察贞芪酪蛋白肽药物血清对 A549 细胞 Bax/bcl-2 基因表达的影响。结果: 4 种不同浓度的贞芪酪蛋白肽含药血清均对 A549 细胞增殖有抑制作用, 其中以浓度为 20% 的贞芪酪蛋白肽血清的抑制率最高; 能降低细胞的核质比, 并抑制人肺癌细胞端粒酶活性的作用; 贞芪酪蛋白肽血清能促进 A549 细胞凋亡基因 bax/bcl-2 的表达, 与无药血清对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论: 贞芪酪蛋白肽含药血清对人肺腺癌细胞 A549 有一定抑制作用; 有诱导人肺癌细胞 A549 分化的作用, 其主要机理可能是抑制了 A549 细胞端粒酶活性; 贞芪酪蛋白肽诱导 A549 细胞凋亡的作用机制之一可能是促进促凋亡基因 bax/bcl-2 的表达。

[关键词] 贞芪酪蛋白肽复合物; 药物血清; A549; 细胞分化; 凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0114-04

## Ligustri-Astragali Casein Co-Peptide Serum Inhibition of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells and its Mechanism Study

ZHANG Yan-yin<sup>1\*</sup>, WU Jian-jun<sup>1</sup>, WANG Peng-shan<sup>2</sup>, XUE Na<sup>1</sup>, SHU Chang<sup>1</sup>, WU Hong-yan<sup>1</sup>

(1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine; Lanzhou 730000, China;

2. Xuanhua Rural Health Center of Gaotai County; Zhangye 734304, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of ligustri-astragali casein co-peptid(LACP) on human lung adenocarcinoma A549 cell differentiation and the related mechanism. **Method:** MTT assay for human lung adenocarcinoma A549 cells; containing 5%, 10%, 15%, 20% concentration of LACP serum was used. The influence of LACP containing serum on differentiation was evaluated by investigation of cellular nuclear-mass ratio and telomerase activity. Immunocytochemical method was used to observe the effect of LACP drug serum on the A549 Bax/bcl-2 expression. **Results:** The four kinds of different concentrations of LACP serum inhibited A549 cell proliferation. Among them, 20% of LACP showed the highest inhibitory rate; and reduced the cell's nuclear-mass ratio. LACP serum promoted A549 cell bax/bcl-2 gene expression for apoptosis, and compared with the serum-free control group, the difference was significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** LACP containing serum has certain inhibitory effect on human lung adenocarcinoma A549 cells. LACP complex shows promotion to human lung cancer cell A549 differentiation. The mechanism may be linked to inhibition of telomerase activity. The complex induced apoptosis of A549 cells may be related to promotion of bax/bcl-2 gene expression.

[Key words] Ligustri-Astragali Casein co-peptid(LACP); drug serum; human Lung adenocarcinoma A549 cell; cell differentiation; apoptosis

目前在国外, 各种肽的研究在不断深化, 酪蛋白

肽的研究最为明朗, 具有抗诱变、免疫调节, 延缓衰老、抗过敏性、抗高血压、促进激素分泌和细胞繁殖, 保护表皮细胞, 防止黑色素沉淀等多种功效。贞芪酪蛋白肽(ligustri-astragali casein co-peptid, LACP) 是

[收稿日期] 2009-07-01

[通讯作者] \* 张延英, Tel: (0931) 8763471

中医药与多肽类物质有机结合研制的,其保健效果较佳。本文通过探讨其抗肿瘤作用以探索其功能、作用机理等。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞** SD 雄性大鼠 30 只,体重 200 ~ 300 g, SPF 级,购自甘肃中医学院实验动物中心,制备药物血清用;制备药物血清的动物实验在甘肃中医学院 SPF 级动物实验室进行;人肺腺癌细胞株 A549 由兰州大学基础医学院药理研究所馈赠,用含 10% 胎牛血清和双抗的 RPMI 1640 培养液,在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 传代 1 次。

**1.2 药物** 贞芪酪蛋白肽复合物由甘肃中医学院提供。临用时用蒸馏水稀释成所需浓度(实验所用剂量均以生药量计)。

**1.3 试剂** 维甲酸(RA)为 Sigma 公司产品,小牛血清(fetal calf serum, FCS)购于杭州四季青公司(批号 010816), RPMI-1640 培养基干粉为 Gibco 公司产品, PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒( TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit) 为美国 Intergen 公司产品,购自兰州生升医药科技有限责任公司;即用型 S-P 法(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)免疫组化试剂盒、DAB 显色剂均购自兰州生升医药科技有限责任公司。 唑蓝(MTT)由华美生物工程公司提供,胰蛋白酶由美国 GIBCO 公司提供,注射用盐酸阿霉素(批号 0736-20074),浙江省海正药业股份有限公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

**1.4 仪器设备** 大恒 CZAS-1000 细胞图像分析系统;全自动酶标仪,美国伯乐公司生产;倒置显微镜,日本 OLYMPUS,型号 ZX71-22PH/FL; CO<sub>2</sub> 培养箱,日本 SANYO,型号 MCO-15AC。

## 2 方法

**2.1 贞芪酪蛋白肽制备工艺** 贞芪酪蛋白肽复合物是根据“扶正培本、扶正祛邪”的祖国医学理论,以黄芪(*Astragalus membranaceus*, AM)、女贞子(*Ligustrum lucidum*, LL)及酪蛋白复合多肽等组方经特定制剂工艺研制而成,主要是采用先进的提取(超临界萃取技术、大孔树脂吸附)、成型工艺(薄膜包衣)。

**2.2 贞芪酪蛋白肽含药血清对人肺癌细胞增殖的影响**

**2.2.1 药物血清制备** 取大鼠 24 只,分为 3 组,每组 8 只。生理盐水组以生理盐水 ig,贞芪酪蛋白肽

药物组以 600mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>贞芪酪蛋白肽 ig, 1 次/d,连续给药 5 d,末次给药后 2 h 取血,用 3% 的戊巴比妥钠麻醉动物,无菌硅胶插管于左颈动脉收集血液,离心后分离血清将同组动物血清混合,56 °C 30 min 灭活补体,以 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,存于 -70 °C 保存备用。

**2.2.2 A549 细胞增殖抑制实验** 取对数生长期肺癌细胞 A549 消化,用 PBS 洗涤 1 次,离心,弃去洗液。用含 10% 胎牛血清 1640 培养液配成浓度为 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔接种 100 μL,培养 24 h 后弃培养液,分别加入 ig 生理盐水和给药后的大鼠血清。即生理盐水血清组和贞芪酪蛋白肽药物血清 5%, 10%, 15%, 20% 组。阿霉素浓度稀释 10 μg·mL<sup>-1</sup> 为阳性对照组。另设 A549 细胞作阴性对照,阴性对照组仅加入 1640 培养液。每组设 10 个复孔,继续培养 48 h 后吸出培养液加入 180 μL 不含血清的培养液和 20 μL MTT,置于 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养 4 h,吸出培养液,加入 200 μL 二甲基亚砷,振荡 10 min,使用甲瓚结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪上测定吸光度(A),测定波长为 570 nm。

抑制率(%) = (肺癌细胞对照组 A 值 - 药物血清组 A 值) / 肺癌细胞对照组 A 值 × 100%。

**2.3 贞芪酪蛋白肽复合物对 A549 细胞分化诱导作用及其对端粒酶活性的影响**

**2.3.1 药物血清的制备** 参照文献方法<sup>[1]</sup>。贞芪酪蛋白肽复合物提取液按成人公斤体重剂量的 10 倍量即 600 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig, 对照组给同体积生理盐水,均按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 大鼠体重,分别给正常大鼠 ig, 每组 10 只,每天 2 次,连续 3 d,于第 4 天在 1 次给予全日剂量后 1 h,戊巴比妥钠 ip 麻醉后,从大鼠下腔静脉采血,静置 3 ~ 4 h, 4 °C, 3 000 r/min 离心 20 min,过滤除菌。将同一组的大鼠血清混匀,56 °C 灭活 30 min, -70 °C 保存备用。

**2.3.2 分组及药物血清添加** 受试细胞分为生理盐水鼠血清阴性对照组、维甲酸阳性对照组、贞芪酪蛋白肽复合物药物血清组,共 3 组。维甲酸避光溶解于 0.02% 二甲基亚砷中,过滤除菌制成贮液。临用前将各组药物血清加入 RPMI-1640 培养液,贞芪酪蛋白肽复合物含药血清配成 10% 浓度;维甲酸贮液加入阳性对照温育液中,终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>。

**2.3.3 细胞核质比测定** 细胞按 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 浓度接种于 6 孔培养板,每孔 1 000 μL。6 孔板中预先

放入无菌玻片, 培养 24 h 细胞爬片后, 吸弃培养液, 加入含药物血清培养液及含维甲酸培养液, 继续培养 48 h 后, 中性福尔马林固定, HE 染色, 图像分析系统测定细胞核及细胞质面积和核质比。

### 2.4 贞芪酪蛋白肽复合物对 A549 细胞端粒酶活性的影响

**2.4.1 分组及药物血清添加** 受试细胞分为生理盐水鼠血清阴性对照组、维甲酸阳性对照组、贞芪酪蛋白肽复合物药物血清组, 共 3 组。维甲酸避光溶解于 0.02% 二甲基亚砷中, 过滤除菌制成贮液。临用前将各组药物血清加入 RPMI-1640 培养液, 配成 10% 药物血清培养液; 维甲酸贮液加入阳性对照温育液中, 给药终浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.4.2 端粒酶活性的检测** 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 浓度接种于直径 3.5 cm 培养皿, 24 h 后换为 10% 药物血清培养液, 继续培养 72 h, 收集细胞, 抽提端粒酶。按美国 Intergen 公司端粒酶检测试剂盒 (TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit) 说明的方法检测端粒酶活性。样品在 TRAP 反应时蛋白定量为 1  $\mu\text{g}$ , 设端粒酶阳性细胞对照组和样本加热灭活端粒酶阴性对照组。

### 2.5 贞芪酪蛋白肽药物血清对 A549 细胞 bax/bcl-2 基因表达的影响

**2.5.1 细胞配制及分组** 将对数生长期细胞按 2.1.2 的方法在盖玻片上生长, 实验分 5 组, 分别为空白血清对照组、5-氟尿嘧啶以  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  剂量作为阳性对照组、贞芪酪蛋白肽药物血清 5%, 10%, 20% 3 个处理组。

**2.5.2 制片及染色方法** 按即用型 S-P 法 (链霉亲

和素-生物素-过氧化物酶复合物) 免疫组化试剂盒说明的方法检测抗体染色后的表达。

**2.6 统计学方法** 吸光度资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 Levene 方差齐性检验, 然后应用 SNK-*t* 检验分析。

## 3 结果

**3.1 贞芪酪蛋白肽含药血清对人肺癌细胞增殖的影响** 贞芪酪蛋白肽含药血清浓度分别稀释为 5%, 10%, 15%, 20% 对人肺癌细胞增殖影响的结果见表 1。

表 1 各组 A549 细胞增殖情况比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	血清浓度 / %	吸光率 A 值	抑制率 / %
肺癌细胞对照	-	0.856 ± 0.040	-
生理盐水血清	10	0.851 ± 0.043	0.66
LACP 血清	5	0.641 ± 0.041 <sup>1)</sup>	10.47
	10	0.626 ± 0.046 <sup>1)</sup>	19.11
	15	0.530 ± 0.039 <sup>1)</sup>	18.30
	20	0.444 ± 0.031 <sup>2)</sup>	37.68
阿霉素血清	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.501 ± 0.032 <sup>1)</sup>	42.55

注: 与生理盐水血清组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

由表 1 可见, 生理盐水血清对 A549 细胞生长无抑制作用, 两种药物血清均对 A549 细胞有抑制作用, 4 种浓度的贞芪酪蛋白肽血清中以 20% 贞芪酪蛋白肽血清抑制率最高, 与阿霉素血清比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。但 20% 的贞芪酪蛋白肽血清与浓度为 15%, 10% 的贞芪酪蛋白肽血清相比较, 其抑制率没有明显提高。

**3.2 贞芪酪蛋白肽复合物对 A549 细胞分化诱导作用及其对端粒酶活性的影响**

**3.2.1 LACP 药物血清对 A549 细胞核质比的影响**

见表 2。与对照组比较, 贞芪酪蛋白肽复合物药物血清组比维甲酸组细胞质面积明显增高 ( $P < 0.01$ ), 核质比显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 2 LACP 药物血清对 A549 细胞核质比的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	血清浓度 / %	核面积 / $\mu\text{m}^2$	质面积 / $\mu\text{m}^2$	核质比
对照	10	168.51 ± 14.46	154.85 ± 10.74	1.09 ± 0.05
LACP	10	156.46 ± 14.06	211.88 ± 21.48	0.75 ± 0.14 <sup>1)</sup>
RA	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	151.89 ± 10.59	226.71 ± 25.77	0.68 ± 0.13 <sup>1)</sup>

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2.2 LACP 药物血清对 A549 细胞端粒酶活性的影响** 见表 3。贞芪酪蛋白肽复合物药物血清组端粒酶活性低于 A549 细胞对照组 ( $P < 0.01$ ), 表明贞芪酪蛋白肽复合物可抑制 A549 细胞端粒酶活性。

**3.3 贞芪酪蛋白肽药物血清对 A549 细胞 Bax/bcl-2 基因表达的影响** bax/bcl-2 基因主要定位于细胞浆, 也可见于细胞膜。染色阳性信号呈棕褐色。各

表 3 LACP 药物血清对 A549 细胞端粒酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	血清浓度 / %	端粒酶活性 ( $A_{450}$ )	抑制率 / %
A549 对照	-	0.975 ± 0.120	-
LACP	20	0.438 ± 0.117 <sup>1)</sup>	44.09
RA	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.379 ± 0.096 <sup>1)</sup>	32.42
阳性对照	-	0.986 ± 0.007	99.60
阴性对照	-	0.082 ± 0.006	-

注: 与 A549 细胞对照组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.01$

药物组 bcl-2 表达显色与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); bax 表达显色较对照组明显加深, 呈强染色, 且阳性细胞数明显增多, 有统计学意义

( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖关系。见表 4。

表 4 LACP 对 A549 凋亡相关调控基因 bax /bcl-2 表达的影响 ( $n = 10$ , 均 ± s)

组别	药物血清浓度 / %	bax 阳性细胞率 / %	bcl-2 阳性细胞率 / %	bax/bcl-2
空白对照	10	22.32 ± 1.95	42.62 ± 2.13	0.53 ± 0.03
LACP	5	23.56 ± 3.08	42.27 ± 3.34	0.54 ± 0.07
	10	39.07 ± 2.40	36.69 ± 1.48	1.07 ± 0.09 <sup>2)</sup>
	20	41.25 ± 2.08	32.98 ± 3.05	1.25 ± 0.06 <sup>2)</sup>
5-氟尿	20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	41.71 ± 2.67	29.66 ± 0.89	1.41 ± 0.08 <sup>2)</sup>

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

#### 4 讨论

肿瘤细胞的基本生物学特征为增殖与分化的平衡失调, 恶性肿瘤细胞由正常细胞分化障碍、恶变而来, 表现为失控的增殖和去分化, 许多恶性肿瘤细胞分化程度差, 呈现胚胎细胞特征。研究表明<sup>[2]</sup>, 肺癌细胞系 C27 和非实体瘤一样, 其癌细胞亦可在分化诱导剂的作用下向正常细胞转化。中医药用于诱导肿瘤细胞分化具有较广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。本实验结果显示 4 种浓度的贞芪酪蛋白肽药物血清均对 A549 细胞有一定的抑制作用, 以浓度为 20% 贞芪酪蛋白肽药物血清抑制率最高, 其抑制作用与 15% 阿霉素药物血清相当。但 20% 的贞芪酪蛋白肽血清与浓度为 15%, 10% 的贞芪酪蛋白肽血清相比较, 其抑制率增强不多, 这可能与药物血清浓度的递增和其对细胞的抑制作用不成等比增长有关。也可能与受到其它因素的制约有关, 有待于进一步探讨。

我们研究了贞芪酪蛋白肽对肺腺癌 A549 细胞增殖速度、核质比和端粒酶活性的影响。肺癌细胞分化不良在形态学上主要表现为细胞形状不规则, 细胞收缩变圆变小等凋亡相关现象。显示了贞芪酪蛋白肽复合物具有抑制人肺癌细胞端粒酶活性的作用, 这可能是其诱导人肺癌细胞分化的作用机理之

一。免疫细胞化学实验结果表明, 经贞芪酪蛋白肽处理的 A549 细胞, 与无药血清对照组比较, 其 bax 基因表达明显上调。而 bax/bcl-2 的升高在临床上具有非常重要的意义<sup>[4]</sup>。贞芪酪蛋白肽能上调人肺癌 A549 细胞凋亡调控基因 bax 的表达。提示贞芪酪蛋白肽诱导人肺癌细胞凋亡作用机制之一可能是通过上调促凋亡基因 bax 的表达来实现。

#### [参考文献]

- [1] 张延英, 朱建坤, 吴建军, 等. 贞芪酪蛋白肽药物血清诱导 Bel27402 细胞分化的体外实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9): 47.
- [2] Lee H Z, Hsu S L, Liu M C, et al. Effects and mechanisms of aloemodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 431(3): 287.
- [3] 花宝金. 中药有效单体对肿瘤细胞诱导分化及凋亡的机制研究 [J]. 中国中医基础医学杂志. 2002, 8(7): 63.
- [4] 杨建青, 杨连粤. 化疗诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡中 p53 和 bcl-2 基因的调控 [J], 中华肝胆外科杂志. 2001, 7(1): 31.