

三叶青提取物对肺癌 A549 细胞的体外抑制作用

程 伟^{*}, 陆曙梅
(信阳职业技术学院, 河南 信阳 464000)

[摘要] 目的: 探讨三叶青提取物对肺癌细胞 A549 的体外抑制作用。方法: 采用体外细胞培养技术, 用 MTT 法观察三叶青提取物对肺癌细胞 A549 体外抑制作用的时效、量效关系; 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡; RT-PCR 法检测细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的表达。结果: 三叶青提取物以 $1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度与 A549 细胞共培养 48 h, 其细胞活性有显著降低; 不同浓度的三叶青提取物和 A549 细胞共同培养, 药物浓度为 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三叶青提取物对 A549 细胞活性有显著性抑制作用。琼脂糖凝胶电泳有明显的梯状条带; 不同浓度三叶青提取物作用于 A549 细胞后, 细胞 Bcl-2 基因的表达随浓度的增加而降低。结论: 三叶青提取物对 A549 细胞具有明显的体外抑制作用, 其抑制作用与药物的浓度和作用时间呈明显正相关。

[关键词] 三叶青提取物; A549 细胞; 体外抑制作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)10-0053-04

Depressant Effects of the Extract of Radix Tetrastigma Hemsleyani On Lung Carcinoma Cell Line A549 in vitro

CHENG Wei^{*}, LU Shu-mei
(Xinyang Vocational Technical College, Xinyang 464000, China)

[Abstract] **Objective:** To study depressant effects of the extract of Radix Tetrastigma Hemsleyani on lung carcinoma cell line A549 in vitro. **Methods:** The time-effect and quality-effect of the extract of Radix Tetrastigma Hemsleyani on lung carcinoma cell line A549 were observed by cell culture in vitro using the method of MTT. Agarose gel electrophoresis was used to detect the apoptosis. RT-PCR were used to detect the expression of Bcl-2 gene, which was related to apoptosis. **Results:** 48 hours after co-culturing A549 and Radix Tetrastigma Hemsleyani with a concentration

[收稿日期] 2007-04-24

[通讯作者] * 程伟, Tel: 13507602586; E-mail: chengwei@yahoo.com.cn

of $1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. the cell activity decreased significantly compared to control. When culturing A549 and the extract with different concentrations, it had a significant depressant effect on cell activity with concentrations of 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. There was an obvious apoptotic ladder in agarose gel electrophoresis. Culturing A549 and the extract with different concentrations, the expression of Bcl-2 gene was low following the density raise of Radix Tetrastigma Hemsleyani. Conclusions: the extract of Radix Tetrastigma Hemsleyani has a significant depressant effect on lung carcinoma cell line A549, which positively relates with its concentration and effect-time.

[Key words] The Extract of Radix Tetrastigma Hemsleyani; A549; depressant effects in vitro

肿瘤的发生取决于肿瘤细胞的凋亡率和增殖率的动态平衡是否破坏,这一过程取决于多种凋亡相关基因的表达及相互作用,这些正常调控机制的紊乱促使肿瘤的发生发展。三叶青具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功效,用于治疗高热惊厥、肺炎、哮喘、肝炎、风湿等症,具有良好疗效^[1]。在民间三叶青用于肿瘤的治疗,被许多民间验方收载。徐彩菊等对三叶青提取物抗肿瘤抑制进行了初探,认为调节机体的免疫功能是三叶青提取物抗肿瘤的重要机制之一^[2]。本研究对三叶青提取物作用于 A549 肺癌肿瘤细胞,主要探讨对其体外抑制作用,为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 三叶青块根 (Radix Tetrastigmatis Hemsleyani), 产自云南, 购于华东医药公司中药分公司; 三叶青提取物是由上海之江生物科技有限公司提供。

肺癌细胞株 A549 由上海之江生物科技有限公司提供; 小牛血清及 RPMI 1640 培养液购自 GIBCO 公司。

1.2 细胞培养及实验分组 A549 细胞株用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, (2~ 3) d 传代 1 次。

1.2.1 不同浓度三叶青提取物对 A549 细胞的作用

取对数生长期细胞使其脱壁, 用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液重悬成单细胞悬液。以 1×10^4 /孔密度将 A549 细胞接种于 6 孔细胞培养板, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养 24 h 后, 弃去原有细胞培养液, 加入用 DMEM 培养液稀释成 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的三叶青提取物各 200 μL , 每个提取物重复 3 孔。对照组只加含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 在培养 48 h 后, 每孔加入 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL , 继续培养 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内上清液, 每孔加入 DMSO

150 μL 震荡混合仪震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 选择酶标分析仪 490 nm 波长测定每孔光吸收值 (OD 值)。肿瘤细胞生长抑制率 (%) = (1 - 实验组吸光值/对照组吸光值) $\times 100\%$ 。

1.2.2 $10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三叶青与 A549 细胞共同培养不同时间对细胞的作用 将用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液培养的 A549 细胞以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔培养液 200 μL 。将培养板置细胞培养箱继续培养 24 h, 吸弃孔内原培养液, 加入用 DMEM 培养液稀释成 $1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的三叶青提取物, 对照孔只加含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 分别在 24, 48, 60 和 72 h 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液测定细胞活性, 每个时间点重复 3 孔。

1.3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 梯状条带 对数生长期细胞接种于细胞培养板中继续培养 24 h 后, 加入 $10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三叶青提取物继续培养, 对照组加等量的 DMSO, 培养 24 h 后, 取 1×10^6 个细胞用 DNA Ladder Isolation Kit 提取 DNA, 吸取 20 μL 的 DNA 与 4 μL 上样缓冲液混匀点于点样孔中, 以 90 V 电泳 1 h, 紫外透射仪上观察电泳结果。

1.4 三叶青提取物对 A549 细胞凋亡相关基因 Bcl-2 表达的影响 取 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个不同浓度三叶青提取物作用 24 h 后的细胞, 抽提 RNA, 进行 RT-PCR, 检测细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的表达。Bcl-2 基因的引物序列: F: 5'-GGAGAGAGCTGAAGATTGATG-3'; R: 5'-TTTCCCCCTTGGCTTGAGATG-3'。扩增片段 219 bp。

1.5 统计学方法 每组实验在相同条件下重复 3 次, 结果用 spss 11 统计软件进行方差分析。当 $P < 0.05$ 时, 认为两组间有显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度的三叶青提取物对 A549 细胞的抑制 将 A549 细胞与不同浓度三叶青提取物共培养 48

h 后,用 MTT 法测定,发现随着药物浓度的增加,细胞的生长抑制作用增强,呈剂量-效应关系,见图 1。随着药物浓度的增加,A549 细胞的抑制率分别为 0.96%,1.62%,17.94%,49.3% 和 60.3%。三叶青提取物浓度为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} $g \cdot L^{-1}$ 时对 A549 细胞活性有显著性抑制 ($P < 0.05$)。抑制半数癌细胞生长的药物浓度约为 10^{-3} $g \cdot L^{-1}$ 。

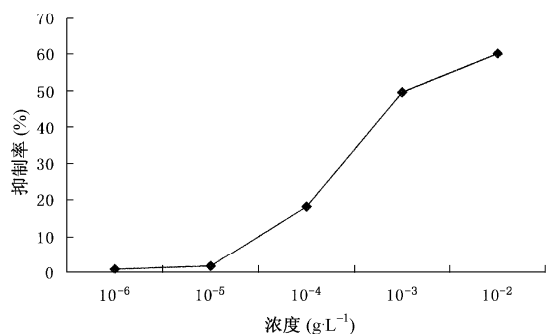


图 1 不同浓度的三叶青提取物对 A549 细胞的抑制率

2.2 共同培养不同时间后细胞的抑制率 在贴壁培养的 A549 细胞加入浓度约为 10^{-3} $g \cdot L^{-1}$ 三叶青提取物后继续培养,用 MTT 法检测 24, 48, 60 和 72 h 的 OD 值。从图 2 可见,加入三叶青提取物后,A549 细胞增殖受到抑制,在 24 h 时,细胞抑制率低,48 h 时细胞抑制率明显增加,和对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$),接近半数抑制,48 h 后抑制率增长变缓。

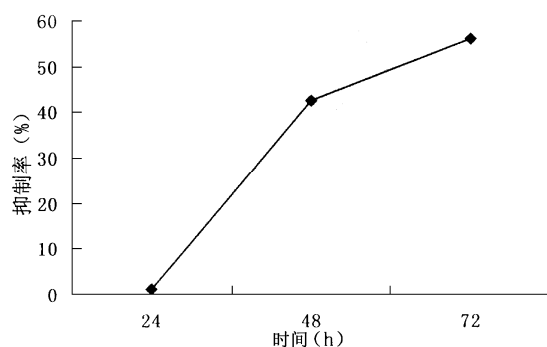


图 2 与 10^{-3} $g \cdot L^{-1}$ 三叶青提取物共培养不同时间后细胞的抑制率

2.3 琼脂糖凝胶电泳检测 琼脂糖凝胶电泳检测药物作用后的 A549 细胞,凋亡细胞呈现梯状条带,表明三叶青提取物能促进 A549 细胞的凋亡,见图 3。

2.4 细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的表达 结果见图 4,图 4A 为内参 GAPDH 电泳图,4B 为目的基因 Bcl-2 电泳图。从图中可看出,随着药物浓度的增加,

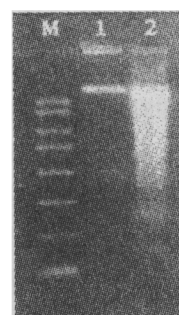


图 3 三叶青提取物作用后 A549 细胞的 DNA ladder
M 为 Marker;1 为对照组;2 为作用组。

Bcl-2 基因的表达降低。在浓度达到 10^{-4} 后,Bcl-2 基因表达迅速降低,在浓度达到 10^{-3} 后,表达降低变缓。

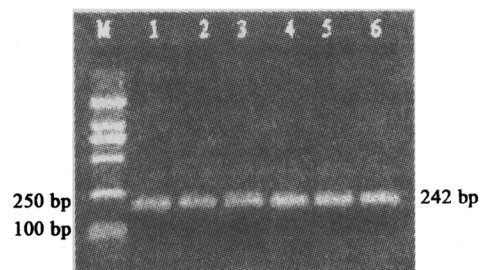


图 4A 不同浓度三叶青提取物作用后细胞 GAPDH 电泳图

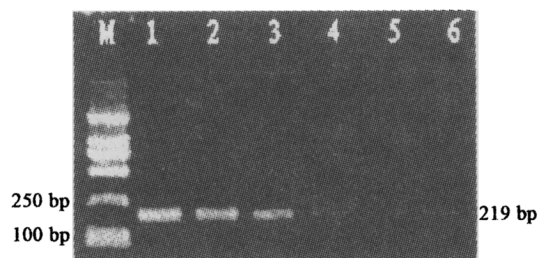


图 4B 不同浓度三叶青提取物作用后细胞 Bcl-2 基因电泳图

M 为 Marker;1 为对照组;2~6 分别为 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} $g \cdot L^{-1}$ 不同浓度三叶青提取物作用后的细胞

3 讨论

丁钢强等发现三叶青提取物对肝癌细胞 HepG2 具有明显的体外细胞毒作用,其毒性作用与药物的浓度和作用时间呈明显正相关^[3]。冯正权等^[4]发现三叶青黄酮能显著地抑制胃癌细胞 SGC-7901 的生长,并且具有浓度依赖性。本研究在肺癌 A549 细胞中加入不同浓度的三叶青提取物后,共培养 48 h 后检测吸光值,发现随着三叶青提取物浓度的增加,对肺癌 A549 细胞的抑制作用明显增强,在浓度达到 10^{-4} $g \cdot L^{-1}$ 后,与对照组有显著差异,表明 10^{-4} $g \cdot L^{-1}$

可能是三叶青药物发挥药效的最低浓度。将一定浓度的三叶青提取物作用于 A549 细胞, 共培养不同时间后检测吸光值, 结果随着共培养时间的延长, 对细胞的抑制作用也变强, 在共培养 48 h 后, 抑制率接近 50%, 继续培养, 细胞的抑制变缓, 这为三叶青抗肿瘤的进一步研究及临床用药提供了药效时间的依据。

DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现“梯状”条带, 是细胞凋亡的一个重要标志。本研究表明三叶青提取物能促进 A549 细胞的凋亡。Bcl-2 基因在细胞凋亡中起着重要作用, 与肿瘤的发生发展关系极为密切^[5,6]。Kren 等(2004 年)研究发现 Bcl-2 基因的过量表达能使多种肿瘤细胞系统对放、化疗药物产生耐药性^[7]。Bcl-2 不但与肺癌的发病有关, 在治疗反应性及预后方面也起重要作用^[8,9], 本研究发现, 随着三叶青提取物浓度的增加, Bcl-2 基因的表达降低。在浓度达到 10^{-4} 后, Bcl-2 基因表达迅速降低, 在浓度达到 10^{-3} 后, 表达降低变缓。我们可以认为 $10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 是三叶青提取物作用于 A549 细胞的最佳浓度区域, 这与以上体外肿瘤细胞的抑制作用的结果一致, 这对将来用于临床提供了量的依据和参考。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 2123.

- [2] 徐彩菊, 丁钢强, 孟佳, 等. 中药三叶青提取物抗肿瘤机制初探[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1): 14-16.
- [3] 丁钢强, 郑军献, 魏克民, 等. 三叶青提取物对肝癌细胞 HepG2 及原代大鼠肝细胞的体外毒作用研究[J]. 浙江预防医学, 2005, 17(9): 1-5.
- [4] 冯正权, 倪克锋, 何煜, 等. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(6): 669-672.
- [5] Lan ave C, San tamaria M, Saccolle C. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family[J]. Gene, 2004, 333(5): 71-79.
- [6] Manion M. K, Hockenbery DM. Targeting BCL-2-related proteins in cancer therapy[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 24(4): 105-114.
- [7] Kren L, Brazdil J, Hermanova M, et al. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and Bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004, 12(1): 44-49.
- [8] Kirkln V, Joos S, Zomig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1644(3): 229-249.
- [9] Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, et al. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2004, 24(3): 1925-1927.