

痰火草有效部位对人肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用

聂 阳^{1,2}, 方春生², 曾庆钱^{1,2}, 黄海潮², 杨燕军^{1,2*}

(1. 广东省中药研究所, 广东 广州 510520; 2. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要:目的 筛选痰火草抗肺癌的有效部位, 并初步探讨其作用机制。方法 采用 MTT 法检测痰火草的不同部位对肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用, 从细胞形态 (显微镜观察)、细胞凋亡 (AnnexinV-FITC/PI 染色)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量 (ELISA 检测) 方面检测痰火草有效部位对肺癌 A549 细胞的影响。结果 痰火草乙酸乙酯部位 (EAMB) 对 A549 细胞增殖的抑制作用最强, 50、100、200 μg/mL 的 EAMB 能引起 A549 细胞死亡、细胞凋亡, 同时 SOD 活性增强, MDA 含量降低。结论 乙酸乙酯部位是痰火草抗肺癌的有效部位, 其机制可能是通过细胞凋亡、抗氧化及清除自由基实现的。

关键词: 痰火草; 有效部位; A549 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2016)11-2490-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.11.039

痰火草又称围夹草、青竹壳菜、青鸭跖草, 为鸭跖草科水竹草属植物大苞水竹叶 *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze ex J. K. Morton 的全草, 具有化痰散结、清热通淋等功效^[1-2], 民间使用其治疗肺癆咳嗽、淋巴结结核、痔疮等病症, 在肺癌治疗上已有不少案例报道^[3-6]。目前, 痰火草广泛用作园林景观植物, 其药用价值未得到利用, 药理活性及化学成分的相关研究未见报道^[7-8]。本研究在前期实验的基础上, 对痰火草醇提物进行萃取分离, 筛选对肺癌 A549 细胞增殖的有效部位, 初步探讨其抗肺癌的作用与机制, 将为相关新药开发提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肺癌细胞株 A549, 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 药品与试剂 痰火草采自广东省中药研究所中药园, 经广东省中药研究所曾庆钱副主任中药师鉴定为鸭跖草科水竹草属植物大苞水竹叶 *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze ex J. K. Morton 的干燥全草。RPMI 1640 液体培养基、标准胎牛血清 FBS、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 甲基噻唑兰 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma 公司); AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒 (美国 BD 公司, 批号 556547); 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20141029、20141013)。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪、MSC1.2 超净工作台、Model 311 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); DMIL 倒置相

差显微镜 (德国 Leica 公司); FACSCanto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); BP-211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 痰火草提取物制备 采集痰火草全草, 阴干, 粉碎过 20 目筛, 称取药粉 500 g, 用 10 倍量 80% 乙醇浸泡 24 h, 回流提取 2 次, 每次 1 h, 分别过滤, 收集 2 次滤液, 减压浓缩 (温度不超过 60 ℃) 至无乙醇味, 得醇提物浸膏。将浸膏悬浮于水中, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到以上 4 个部位及水溶液层共 5 个部分, 减压浓缩及干燥, 得 5 个部位的干膏粉。使用前, 各部位干膏粉先用少量 DMSO 助溶, 再用 RPMI 1640 配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的各部位药液的贮备液; 使用时, 以完全培养基稀释至实验所需的质量浓度。

2.2 细胞培养 人肺癌细胞 A549 采用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下常规培养和传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3 MTT 法测定 收集对数生长期人肺癌细胞 A549, 以 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 调整细胞悬液密度, 按每孔 5 × 10³ 个接种于 96 孔细胞培养板, 在 CO₂ 培养箱培养过夜。贴壁 12 h 后, 弃原培养基, 加入含不同质量浓度的提取物部位溶液, 每组设 6 个复孔, 并设对照组, 继续培养 48 h。吸除每孔培养基, PBS 洗 3 次, 加入 100 μL 含 MTT (1 mg/mL) 的完全培养基, 培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 避光振荡 5 min, 置于酶标

收稿日期: 2016-01-08
基金项目: 广东食品药品职业学院自然科学项目 (2015YZ005); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题 (20171032)
作者简介: 聂 阳 (1983—), 男, 副主任药师, 从事中药新药与新剂型研究。Tel: (020) 28854883, E-mail: abcsunshine365@163.com
* 通信作者: 杨燕军 (1963—), 女, 教授, 从事中药活性成分及新药研究。Tel: (020) 28854995, E-mail: yangyj@gdyzy.edu.com

仪上,在 492 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A)。计算各给药质量浓度的抑制率,公式为细胞增殖抑制率 = (1 - $A_{\text{加药}}/A_{\text{对照}}$) × 100%。

2.4 细胞形态观察 取密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的 A549 细胞株接种于 6 孔板中培养,待细胞完全贴壁后,弃原培养基,加有效部位的含药培养基,培养 48 h 后,在倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化。

2.5 流式细胞仪检测 取密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的 A549 细胞株接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁后,弃去培养基,加入提取部位的含药培养基培养。48 h 后用胰酶消化,离心 (2 000 r/min) 5 min 后弃上清液, PBS 洗涤 2 次,用 Binding Buffer 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 分别加入 5 μL 异硫氰酸荧光素 Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶 (PI) 染液,混匀,室温避光孵育 15 min, 1 h 内上流式细胞仪检测。

2.6 SOD、MDA 测定 同“2.3”项接种细胞,加入有效部位的含药培养基,培养 48 h,弃培养液,细胞裂解、离心条件同上,取上清作为待测样品。采用氮蓝四唑 (NBT) 显色法,检测样品中 SOD 活性。待测样品与 MDA 检测工作液沸水浴加热反应 15 min,水浴冷却至室温,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 加入 96 孔板,用酶标仪检测,计算 MDA 含有量。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 t

检验。

3 结果

3.1 各部位对细胞增殖的影响 由图 1 可见,在 25 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,痰火草石油醚、氯仿、乙酸乙酯部位对 A549 细胞的增殖有较强的抑制作用,而正丁醇、水层部位作用较弱,其中乙酸乙酯部位 (EAMB) 对 A549 细胞增殖的抑制最强,并呈剂量依赖性, IC_{50} 为 138.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,为其抗肺癌的有效部位。

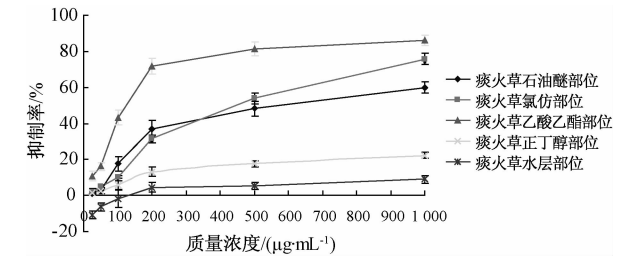


图 1 痰火草不同部位对 A549 细胞增殖的抑制曲线

3.2 有效部位对细胞形态的影响 以 EAMB 低、中、高质量浓度 (50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作用于 A549 细胞,观察细胞形态变化。由图 2 可见,对照组细胞贴壁成团生长,细胞近似梭形;实验组随 EAMB 质量浓度的增大,细胞贴壁能力减弱,细胞间连接松散,悬浮细胞和颗粒增加,出现越来越多的坏死细胞。

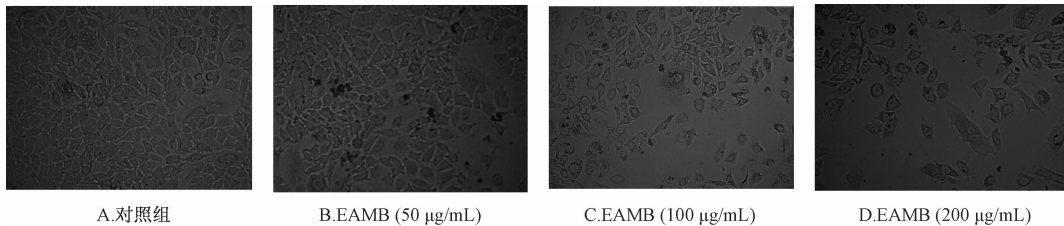


图 2 不同质量浓度 EAMB 对 A549 细胞形态的影响 (×100)

3.3 有效部位对细胞凋亡率的影响 以 EAMB 低、中、高质量浓度作用 A549 细胞,采用流式细胞仪检测。由表 1 可见,以 EAMB 作用于 A549 48 h 后,可促进 A549 细胞凋亡,而且随着质量浓度增加,凋亡率上升,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),进一步证明 EAMB 可诱导 A549 细胞发生凋亡。

表 1 EAMB 对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞凋亡率/%
对照组	—	5.24 ± 0.75
痰火草乙酸乙酯部位	50	$33.95 \pm 5.06^{**}$
痰火草乙酸乙酯部位	100	$50.22 \pm 5.56^{**}$
痰火草乙酸乙酯部位	200	$66.30 \pm 7.18^{**}$

注:与对照组比较, $^{**}P < 0.01$

3.4 有效部位对 SOD 活性、MDA 含有量的影响 以 EAMB 低、中、高质量浓度作用 A549 细胞,检测 MDA 含有量、SOD 活性。由表 2 可见,与对照组比较,实验组 SOD 活性明显增加,MDA 含有量降低 ($P < 0.05, P <$

0.01)。

表 2 EAMB 对 A549 细胞 SOD 活性、MDA 含有量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	—	26.45 ± 3.49	3.32 ± 0.11
痰火草乙酸乙酯部位	50	30.08 ± 5.53	$2.67 \pm 0.23^*$
痰火草乙酸乙酯部位	100	$34.73 \pm 5.18^*$	$2.38 \pm 0.34^{**}$
痰火草乙酸乙酯部位	200	$37.36 \pm 7.29^{**}$	$2.15 \pm 0.31^{**}$

注:与对照组比较, $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$

4 讨论和结论

非小细胞肺癌 (NSCLC) 是最常见的一类肺癌,占肺癌发病率的 80% ~ 85%, 5 年内生存率不到 15%^[9]。A549 细胞是从人 NSCLC 患者癌组织中分离出来的肺腺癌上皮细胞系,常用作筛选药物抗肺癌活性模型的细胞株^[10],而 MTT 法是检测细胞增殖率或存活率的可靠方法,也是从大量药物中筛选抗肿瘤细胞作用的常用手段。前期实验采用

MTT 法比较了痰火草水提物、醇提物对 A549 细胞增殖的影响,发现后者抑制作用较强;本研究进一步将痰火草醇提物分离得到石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水层 5 个部位,结果显示乙酸乙酯部位(EAMB)为痰火草抗肺癌活性最强部位,可显著影响 A549 细胞形态的变化,诱导 A549 细胞的凋亡,并呈现剂量依赖关系。

氧化损伤是许多内外源致癌物诱导正常细胞和组织癌变的一个重要机制,吸烟产生自由基的危害要远远大于烟碱,是导致肺癌发病率升高的主要原因^[11]。在肿瘤患者或者荷瘤小鼠体内,抗氧化防御体系会受到抑制,自由基清除率降低,氧化应激反应增强^[12-13]。实验结果表明,EAMB 可增强 SOD 活性,降低 MDA 含量,从而调节细胞内的氧化平衡,提示 EAMB 抑制 A549 细胞的机制可能与其抗氧化及清除自由基作用有关。

本实验以肺癌 A549 细胞为筛选模型,以体外抗肿瘤活性为指标,筛选出痰火草抗肺癌的有效部位为乙酸乙酯部位,并初步探讨了其抗肺癌的作用机制。目前,痰火草治疗肺癌仅在民间使用,故对于其抗肺癌药效物质基础及作用机制有待深入研究。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第 8 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.

[2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编:下册[M].

北京:人民卫生出版社,1996.

[3] 黄素嫦,钟秋生. 中医药治疗感冒发热撮要[J]. 实用中医内科杂志,2002,16(3): 116-117.

[4] 王铁僧,宋国杰,郭荣麟,等. 民间抗癌药用植物的整理鉴定[J]. 中成药研究,1979(5): 33-35.

[5] 张宏伟,马 骥. 肺癌二三七例的辨证论治[J]. 新中医,1985(12): 24-27.

[6] 章湘平,吴茂雄. 气功和中草药治疗晚期肺癌一例报告[J]. 按摩与导引,1985(3): 37-38.

[7] 张宏伟,马 骥. 鼎湖山药用植物资源调查分析[J]. 广西植物,2005,25(6): 539-543.

[8] 简曙光,谢振华,敖惠修,等. 广州市屋顶自然生长的植物[J]. 中国野生植物资源,2004,23(6): 35-37.

[9] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Caracer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[10] 钟良瑞,魏克民. 三叶青黄酮对肺癌 A549 细胞生长抑制与 MAPKs 通路关系的研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(1): 101-104.

[11] 杨 询,高凌云,李世云. 氧化应激与慢性阻塞性肺疾病研究进展[J]. 中国病案. 2010,11(2): 23-27.

[12] 陈小平,营大礼,封 亮. 白藜芦醇抑制肺癌 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤生长及其体内外抗氧化活性[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(21): 1696 -1699.

[13] 隋 妍,李 威,杨云芬,等. 黄芩苷对人肺泡上皮细胞 A549 氧化损伤的保护作用研究[J]. 公共卫生与预防医学,2012,23(2): 8-10.