

白及须根醇提物诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡研究^{*}

蒋瑞彬, 黄晶晶, 李浩宇, 潘 平, 蒋福升, 钱朝东, 丁志山[△]

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要:目的 研究白及须根醇提物(Alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata*, AEFB)诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡及相关作用机制。方法 运用 MTs、hoechst-PI 双染及流式细胞术检测白及须根醇提物对 A549 细胞的增殖及凋亡影响;二维水平的细胞迁移检测白及须根醇提物对 A549 细胞转移的影响;RT-PCR 法检测白及须根醇提物对肺腺癌细胞凋亡和转移相关基因 bcl-2、bax、ICAM-1 mRNA 的影响。结果 白及须根醇提物能够抑制肺腺癌细胞的增殖,并且有浓度效应,随着药物浓度的提高,bcl-2、ICAM-1 mRNA 表达下调,bax mRNA 表达上调。结论 白及须根醇提物能够明显的抑制肺腺癌细胞的生长作用,具有明显的促进肿瘤细胞凋亡作用和抑制肿瘤细胞的转移作用,其机制可能是通过下调 bcl-2、ICAM-1 及上调 bax 的表达相关。

关键词:白及须根醇提物;细胞凋亡;肿瘤细胞;转移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0012-06

肺癌是我国最常见的癌症之一,其中非小细胞肺癌占原发癌的 75%~80%^[1]。细胞凋亡是细胞的程序性死亡,在正常组织及肿瘤组织都广泛存在,它对维持机体的稳定起到非常重要的作用^[2]。近年来,随着的对凋亡机制的研究,发现凋亡与肿瘤细胞的发生及发展中存在密切的关系,诱导细胞的凋亡成为目前研究肿瘤的靶点之一,也成为评价肿瘤治疗效果的指标之一。白及学名 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.F.,为兰科多年生草本球根植物,以干燥的块茎入药,用于治疗咯血,吐血,外伤出血,疮疡肿毒,皮肤皲裂等症^[3]。有文献报道,白及含有的蒽蒽果糖可抑制肿瘤细胞的生长^[4]。研究还发现,白及黏液质对大鼠瓦克癌(W256)、小鼠子宫癌(U14)、小鼠艾氏腹水癌、肝癌和肉瘤 180 均有抑制作用。这可为白及用于临床治疗肿瘤疾病提供新的理论依据^[5]。但全世界对于白及的研究还是很少,特别是抗肿瘤相关的研究,其活性成分和相关的药理作用还有待于我们继续研究^[6-7]。

随着中国对于中医药事业的重视,白及在临床的需求越来越多,用药量不断增加^[8]。白及的野生

资源越来越少,已被列为国家濒危珍稀保护植物名录^[9]。白及的药用部位为块茎,而在实际的操作过程中,白及的须根被大量浪费,在土地干旱的地区,白及的须根与块茎的比例达到1:3~1:4^[10]。研究发现,人参总皂苷在主根的含量为 5.22%,但须根却达到 11.52%^[11-12],而人参总皂苷是人参的有效成分之一。单从人参皂苷含量看,须根的药用价值比人参主根高。因此,本研究将观察白及块茎和白及须根醇提物对肺腺癌细胞 A549 增殖凋亡及相关机制的影响,并比较它们对 A549 细胞抑制增殖的作用能力,以探讨白及醇提物在诱导肺癌细胞凋亡的分子机制。

1 材料

1.1 药材

白及购自浙江中医药大学饮片厂,白及块茎及白及须根醇提物由本实验室制备。

1.2 试剂

RPMI 1640 培养基(美国 GIBCOBRL 公司,批号:13112105)、胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号:130407);Hoechst 33342 染料(Sigma

^{*} 基金项目: 2015 年公益性行业科研专项(201507002);浙江省大学生科技创新活动计划(2012R410038,2014R410044);地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201310344004)

收稿日期: 2015-06-19

作者简介: 蒋瑞彬(1991-),男,浙江台州人,在读硕士研究生,主要研究方向:天然药用资源的研究与评价。

[△]通信作者: 丁志山, E-mail: zjtcmdzs@163.com

P4170)、PI 染料(Sigma P2261);青霉素钠盐(华北制药有限公司,批号:1104303);链霉素(华北制药有限公司,批号:1107106);胰蛋白酶(杭州宏博生物工程有限公司,Amresco 分装);二甲基亚砷(DMSO)(天津市永大化学试剂有限公司,批号:20120323)。

1.3 仪器

万分之一精密电子天平(AR2130 Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);二氧化碳细胞培养箱(Thermo Electron Corporation HEPA CLASS100);倒置荧光显微镜(OLYMPUS IX71);酶标仪(Labsystems Wellscan Mk3);流式细胞仪(GAUVIA INSYTE 5);荧光定量 PCR 仪(StepOnePlus™, USA)。

1.4 细胞株

肺腺癌细胞 A549 由浙江中医药大学生物技术研究提供。

2 方法

2.1 增殖抑制实验

将经含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养的肺腺癌细胞 A549 制成 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液,按每孔 100 μL 接种于 96 孔板,于 37℃含 5% CO_2 培养箱中孵育 24h,吸掉原培养液,用不同浓度(10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每孔 100 μL 的白及块茎醇提物和须根醇提物分别处理 24、48h 后,结束前 4h 加入 1.9 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTS 液 20 μL ,继续培养 4h,于酶标仪 490nm 波长处测定吸光度(A)值,重复 3 次。细胞抑制率 = $(1 - A_{\text{加药}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$,取 3 个重复孔为平均值,计算白及块茎醇提物与须根醇提物作用 24、48h 的细胞成活率,实验重复 3 次。

2.2 Hoechst-PI 双染白及块茎醇提物与须根醇提物诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡的影响

将细胞以 $3 \times 10^3/\text{孔}$ 接入到 96 孔细胞培养板中,待其生长 24h 贴壁后,更换含有浓度为 30, 40, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;白及块茎醇提物与须根醇提物的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 48h, PBS 洗 2 遍,分别加入 Hoechst 与 PI 溶液常温避光孵育 10min,在荧光显微镜下观察凋亡细胞。

2.3 FITC 标记的 Annexin-V/PI 双染流式细胞术分析

取经药物处理的 A549 细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集,用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000r/min 离心 5min)收集 2×10^5 细胞,加入 500 μL 的 Binding

Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide,混匀,之后室温避光反应 10min,立即用流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 阳性(早期凋亡)和 Annexin V-FITC/PI 双染阳性(晚期凋亡)细胞百分率。

2.4 二维水平细胞迁移实验

将 A549 制成 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬浮液,按苗孔 1mL 接到 24 孔细胞培养板中,于 37℃含 5% CO_2 培养箱中孵育 24h,待细胞在培养板上形成均匀的一层,用 10 μL 的移液器吸头在培养板的中轴线轻轻划上一横,用 PBS 洗去细胞残骸。分别加入含有浓度为 30, 40, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白及块茎醇提物与须根醇提物的培养液培养,在 0, 12, 24, 48h 用倒置显微镜观察细胞的迁移情况,利用目镜的刻度尺测灵划痕的宽度(S),每个孔分别测量 5 个点(两端,中间,左 1/4,右 1/4),最后平均值。细胞迁移率的计算公式如下:

$$\text{细胞迁移率} = (S_{\text{零时间点}} - S_{\text{测量点}}) / S_{\text{零时间点}} \times 100\%$$

2.5 RT-PCR 法检测 Bcl-2、Bax、ICAM-1 基因的 mRNA 表达量

细胞分别经过 30, 40, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白及须根醇提物处理 48h 后用胰酶消化离心后,采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA,后采用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录,采用荧光定量 PCR 扩增 Bcl-2、Bax、ICAM-1,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,引物参考文献[13]中的序列,引物由上海生工生物技术公司合成。Bcl-2 引物序列:上游引物为 5'-TgTgTgTg-gAgAgCgTCAACC-3',下游引物为 5'-TTCAGa-gACAgCCAggAgAAATC-3';Bax 引物序列:上游引物为 5'-TCAggATgCgTCCACCAAgAA-3',下游引物为 5'-TCCCggAggAAgTCCAATgTC-3';ICAM-1 引物序列:上游引物为 5'-TAgCCAACCAATgTgC-TATT-3',下游引物为 5'-CAgCgTAgggTAAg-gTTCTTg-3';内参(GAPDH)序列:上游引物为 5'-ATT CAACggCACAgTCAAgg-3',下游引物为 5'-gCAGAAggggCggAgATgA-3'。在荧光定量 PCR 仪中设置一下参数:94℃预变性 1 min;94℃变性 20 sec,55℃退火 20 sec,72℃延伸 20 sec,读板,共 40 个循环;融解曲线。得到每个样品的 Ct 值,以空白对照组为对照,以 GAPDH 为内参基因,计算每个样品的目的基因的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

$$\Delta\Delta\text{Ct} = [\text{待测组目的基因平均 Ct 值} - \text{待测组}]$$

内参基因平均 Ct 值]-[对照组目的基因平均 Ct 值-
对照组内参基因平均 Ct 值]。

2.6 结果统计

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析来比较各组间的差别有无显著性统计学差异。

3 结果

3.1 白及块茎醇提物及须根醇提物对肺腺癌细胞株 A549 的增值影响。

随着药物浓度的提高,白及块茎醇提物与须根醇提物都能明显降低细胞的存活率,有明显的剂量依赖关系。由图 1 可以看出,在相同的作用时间和

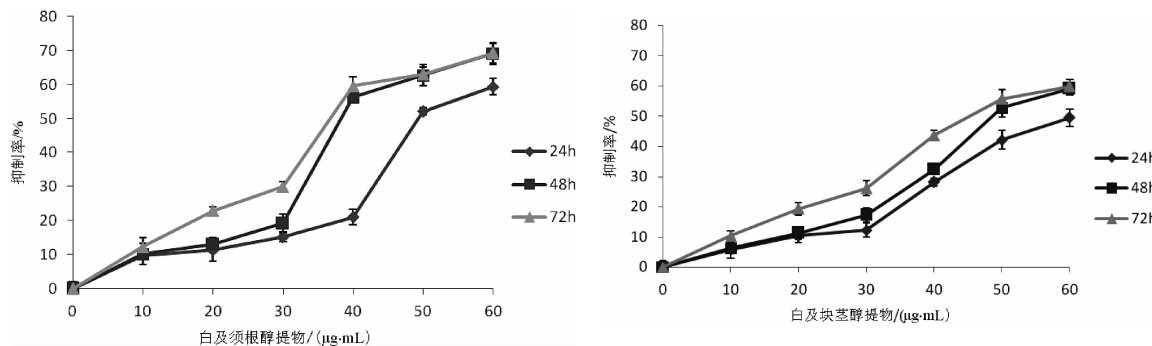


图 1 白及须根醇提物及块茎醇提物对 A549 细胞增殖的影响

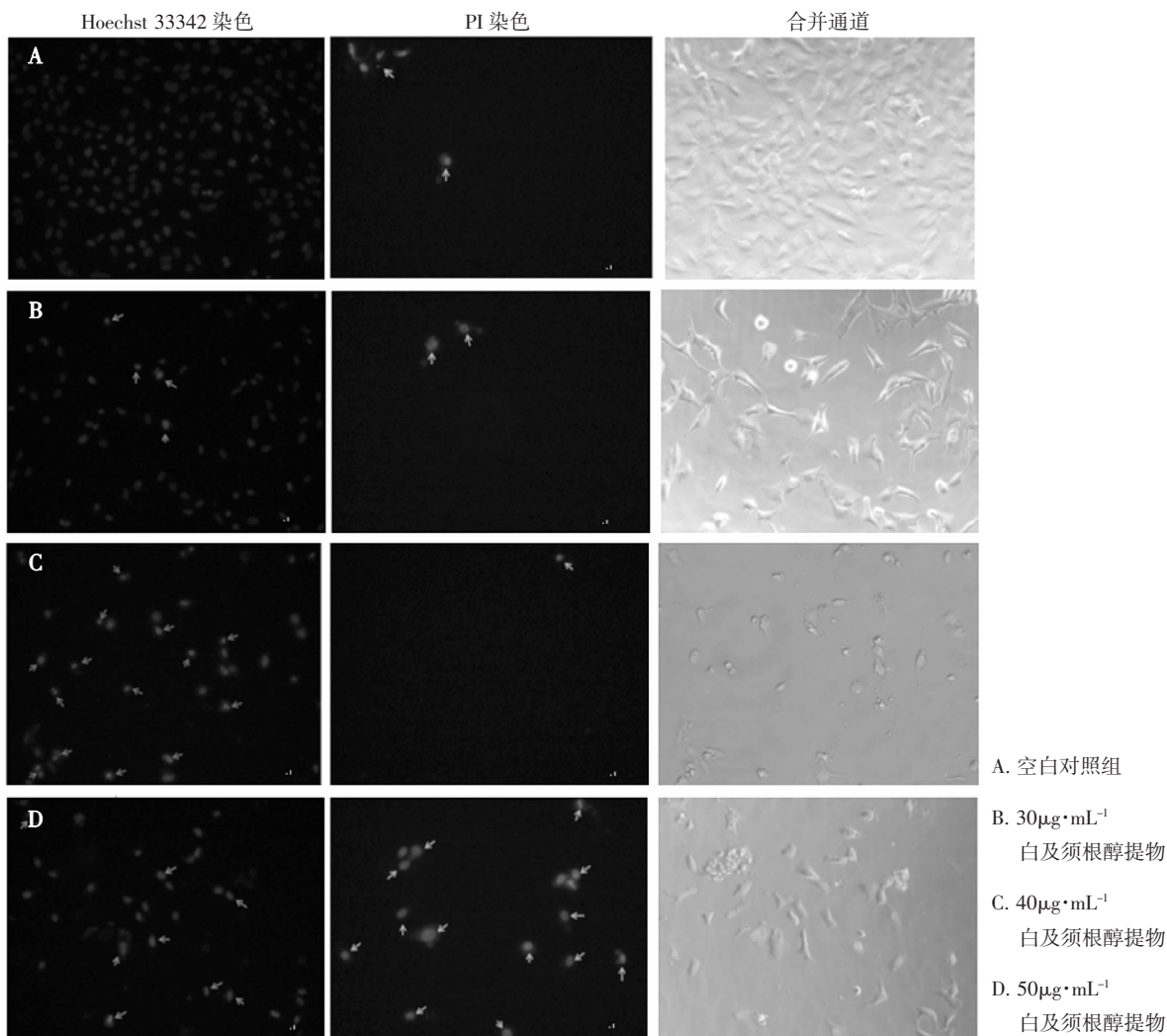


图 2 Hoechst-PI 双染白及须根醇提物诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡的影响

药物浓度的情况下,白及须根醇提物抑制 A549 细胞的增值效果明显好于白及块茎醇提物。

3.2 Hoechst-PI 双染白及须根醇提物诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡的影响

通过 Hoechst-PI 双染结果可知,随着药物浓度的升高,细胞的形态发生了明显的变化。对照组细胞呈梭形或椭圆形,胞浆饱满,核区染色均匀,给药组随着浓度升高,凋亡细胞明显增多。在药浓度为 $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞出现凋亡,细胞皱缩,核区体积变小,Hoechst 染色可见致密浓染荧光。在药浓度为 $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞开始大量死亡,PI 染色后可见强红色荧光,见图 2。

3.3 FITC 标记的 Annexin-V/PI 双染流式细胞术

由图 3 可知,白及须根醇提物诱导 A549 细胞株 Annexin-FITC 阳性(早期凋亡)和 Annexin V-FITC/PI 双染阳性(晚期凋亡)细胞百分率增高,呈现出浓度依赖性。

3.4 白及须根醇提物对 A549 迁移的影响

由图 4 可知,与对照组相比,当细胞给予 $30,40,50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白及须根醇提物时,48h 时 A549 细胞的迁移率分别为 65.1%、50.93%、24.17%,说明在 48h 内白及须根醇提物可以明显的抑制住 A549 在二维水平上的移动。

3.5 白及须根醇提物对肺腺癌 A549 细胞 Bcl-2、Bax、ICAM-1 基因 mRNA 的影响

实验结果显示白及须根醇提物能够有效的降低 ICAM-1 及 bcl-2 基因 mRNA 相对表达量,并且随着药物浓度的增加而降低,而促进细胞凋亡的基因 bax 随着药物浓度的增加其表达量增加,呈现浓度依赖效应。这就说明白及须根醇提物能够通过抑制 bcl-2 基因的表达,降低 Bcl-2 与 Bax 的比率来诱导肺腺癌细胞的凋亡,也能通过抑制 ICAM-1 基因的表达来抑制 A549 肺腺癌细胞的转移和粘附见图 5。

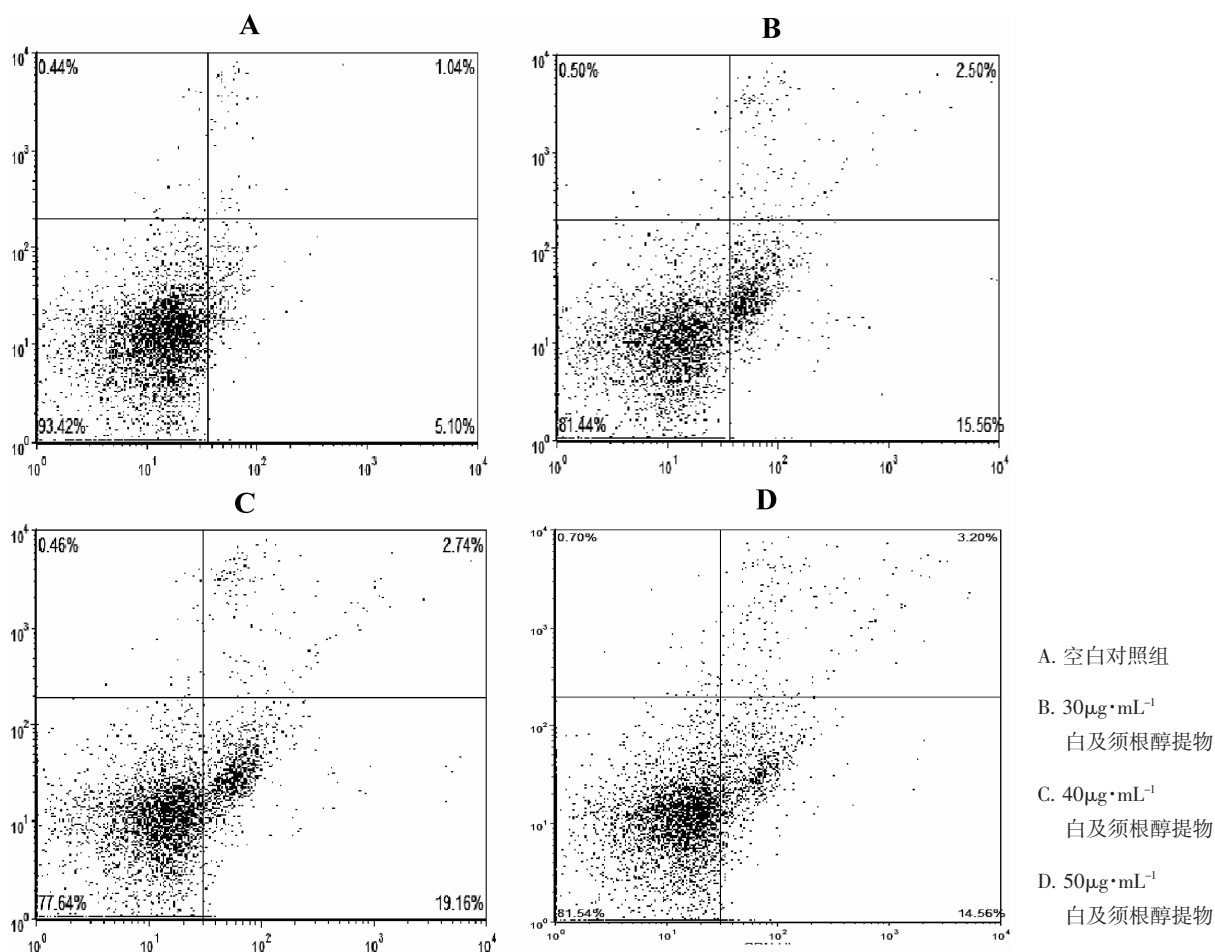


图3 Annexin-V/PI 双染细胞流式仪分析

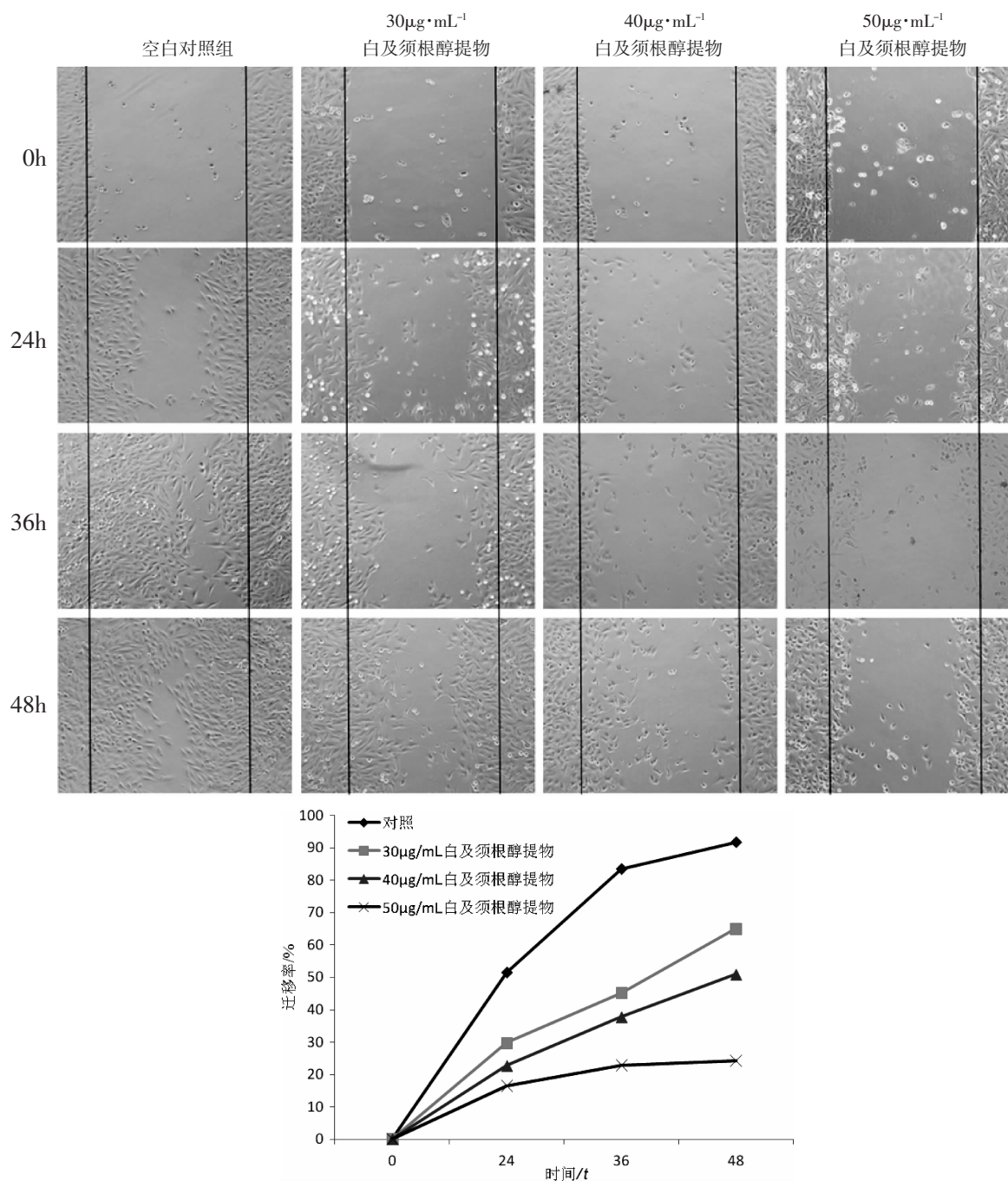


图 4 不同浓度白及须根醇提取物对 A549 细胞二维水平迁移的影响

4 讨论

白及作为我国的传统中药材,是治疗肺胃出血的要药,说明白及的作用靶点主要为肺与胃。本研究利用肺腺癌细胞,发现白及的须根醇提取物对于抑制 A549 细胞增殖的效果明显好于白及的块茎醇提取物,本研究还发现白及须根醇提取物能减少 Bcl-2 基因的表达,降低 Bcl-2 与 Bax 的比率来诱导肺腺癌

细胞的凋亡,同时通过减少 ICAM-1 基因的表达来抑制肿瘤细胞的迁移。而在实际操作过程中,白及的须根作为边角料而被大量的丢弃,根据我们的研究结果,这为以后白及的综合利用开发奠定基础。

细胞凋亡出现的一个重要症状是细胞的通透性增强,并且凋亡细胞膜上的 p-糖蛋白泵功能受损而不能将 Hoechst 33342 染料排出细胞外,因此

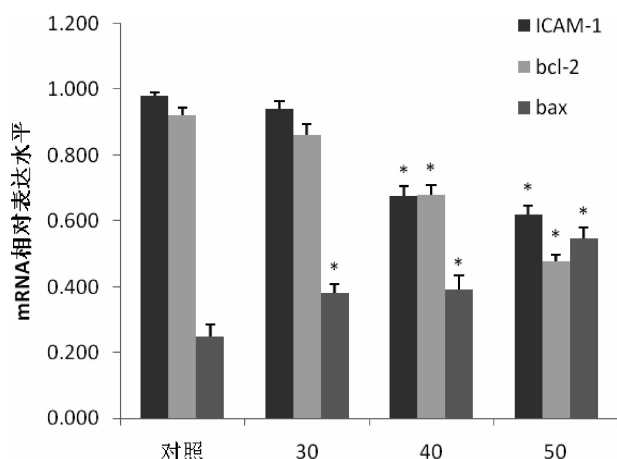


图5 不同浓度白及须根醇提物 A549 细胞中 ICAM-1、bcl-2、bax 表达的影响

注:与对照组相比,* $P < 0.05$

Hoechst 33342 能够进入到凋亡细胞要比正常细胞要多,使荧光增强,而 PI 染料不能进入具有完整细胞膜的正常细胞和凋亡细胞。通过 Hoechst 与 PI 的双染我们就很清楚的区分开正常细胞、凋亡细胞与死亡细胞。细胞的凋亡还受到很多基因的控制, Bcl-2 基因是研究最早于凋亡相关的基因,也是目前研究最热的关于调控细胞凋亡的基因, Bcl-2 主要是通过形成同源二聚体或异源二聚体来调控细胞的凋亡,当 Bax 形成同源二聚体诱导细胞凋亡, Bax 就能与 Bcl-2 形成异源二聚体来实现 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能^[14]。在线粒体上的 Bcl-2 至少在以下两个水平来调节细胞的凋亡:①通过改变线粒体膜上的电位来调控细胞的凋亡。因为在细胞的凋亡过程中,线粒体的疏基会成为包内氧化还原电位的传感器, Bcl-2 就可以抑制谷胱甘肽的外泄来降低胞内的氧化还原电位,从而抑制细胞的凋亡。② Bcl-2 能够调节线粒体膜上对某些蛋白前体的通透性, Bax 能在较广泛的 pH 范围内形成离子孔道,它能允许小分子或者是离子穿过线粒体膜进入细胞质,从而引起细胞的凋亡,而 Bcl 的作用相反,它能关闭 Bax 形成的通道,抑制细胞的凋亡,通过 Bcl-2 与 Bax 的比率来调控细胞凋亡^[15]。而 ICAM-1 是一种细胞黏附因子,它在人体的正常细胞内一般很少表达或不表达,但在一些肿瘤细胞中 ICAM-1 会过表达,所以它在肿瘤细胞的转移和黏附过程中起到很重要的作用^[16]。

综上所述,白及块茎及其须根的醇提物都能促

进肺腺癌细胞 A549 的凋亡,且须根的效果要好于块茎,所以白及须根具有一定的开发利用价值,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 张敏,白春学,张新,等. 肺腺癌 SPC-A-1 细胞表皮生长因子受体表达水平对其增殖的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志,2005,28(5):337-341.
- [2] Roberts JR, Allison DC, Donehower RC, et al. Development of polyploidization in taxol-resistant human leukemia cells in vitro[J]. Cancer Res, 1990, 50: 710-716.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:95.
- [4] 方文贤,宋崇顺,周立素. 医用中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:985-986.
- [5] 邱大琳,陈雷,李法庆. 白芨对小鼠骨髓细胞增殖和白细胞介素-2 产生的影响 [J]. 时珍国医国药,2006,17(12):2457-2458.
- [6] 宋璟璐,王龙,韩凤娟. 白芨作为抗肿瘤药物的回顾性分析[J]. 中医药信息,2013,30(3):148-150.
- [7] 林福林,杨昌云,杨薇薇,等. 中药白芨的现代研究概况 [J]. 中国医院药学杂志,2013,33(7):571-573.
- [8] 李伟平,何良艳,丁志山. 白芨的应用及资源现状[J]. 中华中医药学刊,2012,30(1):158-160.
- [9] 蒋瑞彬,徐旭栋,蓝小明,等. 野生白及 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 中华中医药学刊,2013,31(2):353-354.
- [10] Jiang F, Li W, Huang Y, et al. Antioxidant, antityrosinase and antitumor activity comparison: the potential utilization of fibrous root part of Bletillastriata(Thunb.) Reichb. f. [J]. PloS one, 2013, 8(2): e 58004.
- [11] 王启祥,吕修梅,张晋秀. 人参皂苷含量变化研究概况 [J]. 西北药学杂志,2002,17(5):233-235.
- [12] 孙成贺,王英平. HPLC-ELSD 法测定人参茎、叶、根中 7 种人参皂苷含量[J]. 特产研究,2009,31(4):54-55.
- [13] 黄恺飞. 藤黄酸诱导胃癌细胞凋亡及抗肿瘤转移的实验研究[J]. 中草药,2010,41(11):1823-1828.
- [14] Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family [J]. Nature, 1997, 387(6635):773-776.
- [15] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5381):1322-1326.
- [16] Sarecka-Hujar B, Zak I, Krauze J. Interactions between rs5498 polymorphism in the ICAM1 gene and traditional risk factors influence susceptibility to coronary artery disease[J]. Clin Exp Med, 2009, 9(2):117-124.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 21 页)

[11] 陈苇晶,胡玲,张婷,等. 从气机失调论治脾胃湿热证[J]. 新中医,2015,10(1):3-6.

[12] 章源. 陈意治疗脾胃湿热证经验 [J]. 浙江中医杂志, 2014,3(2):83-84.

[13] 刘容, 司晓莉. 葛根芩连汤对脾胃湿热证大鼠治疗作用研究[J]. 南京中医药大学学报,2014,8(3):287-290.

[14] 史文斌,沈洪. 历代脾胃湿热证研究概述[J]. 山东中医药大学学报,2013,3(3):519-520.

[15] 王翰, 陈勇毅. 清脾胃湿热证治法探要 [J]. 浙江中医杂志,2013,7(8):556-557.

(编辑:杨阳)

Xinkaikujiang Method of Rats with Spleen Stomach Damp Heat Syndrome Effect of p53 and Bcl-2 Protein in Gastric Epithelial Cells

ZHENG Chunsu, CHEN Jinfang

(College of Traditional Chinese Medicine, Fujian Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **Objective** Investigate the effect of rat spleen stomach damp heat syndrome lesions from Wang's lianpu drink effect on epithelial cells of the gastric mucosa p53, bcl-2 protein. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, normal saline group, omeprazole group, Wang's lianpu drink high, medium and low dose group 6 groups with 10 rats in each group. In addition to the normal group, the rats by intraperitoneal injection of the dosage of the 10 mL/kg, salmonella typhi, according to 5 mL/kg again after 24 hours to fill the stomach, combined with high fat and sugar diet and environment were induced copy taste hot and humid card model, such as composite factor determined by hot and humid card lesions, gastric mucosa pathological materials adopt normal chemical method to detect and analyze the rat gastric mucosa of the Bcl-2 P53 protein target. **Results** Omeprazole group, wang's Lianpu drink high, medium and low dose group and model group the Bcl-2, P53 protein expression significantly increased in the normal group ($P < 0.05$). After treatment, compared with normal saline group, omeprazole group, wang's Lianpu drink (high, medium and low dose group of the Bcl-2, P53 protein expression incremental reduction, but wang's Lianpu drink between low dose group and omeprazole group there was no significant difference ($P > 0.05$), wang's Lianpu drink high dose group is better than that of middle and low dose group and omeprazole group, difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Wang's Lianpu drink can improve the spleen and stomach damp heat syndrome of gastric mucosal epithelial lesions, its mechanism may be related to the regulation of p53 and Bcl-2 proteins.

KEY WORDS: letter of xinkaikujiang; damp-heat syndrome; rat; protein

(原文见第 12 页)

Study the Effect of Alcohol Extract of Fibrous Root Part of *Bletilla striata* on Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cancer Cell Line of A549

JIANG Ruibin, HUANG Jingjing, LI Haoyu, PAN Ping, JIANG Fusheng, QIAN Chaodong, DING Zhishan[△]
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the inhibition of Alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata* (AEFB) on proliferation and metastasis ability of A549 cells and to study their preliminary mechanism further. **Methods** MTs, Hoechst-PI staining and Flow cytometry were used to study the effects of proliferation, apoptosis by AEFB. The effect of AEFB on A549 cell migration in two dimensions, the influence of AEFB on the expression of bcl-2, bax, and ICAM-1 gene in A549 cell was evaluated by RT-PCR. **Results** We found that AEFB not only can inhibit the growth of A549 cell but also induce the cell apoptosis in dose and time dependent manner. With the increase of AEFB concentration, the expression of bcl-2, ICAM-1 gene were down-regulated and the expression of bax gene were up-regulated. **Conclusion** AEFB could inhibit the growth of A549 significantly, and has a significant role in promoting tumor cell apoptosis, and inhibit tumor cell migration. The mechanism may be related to decrease of bcl-2, ICAM-1 gene expression and increase bax gene expression.

KEY WORDS: alcohol extract of fibrous root part of *Bletilla striata*; cell apoptosis; tumor cell; migration