论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0220-03

姜黄挥发油对人肺腺癌A549细胞作用的形态学研究

王海晶,杨和平 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要: 目的 研究中药姜黄提取物姜黄挥发油对人肺腺癌A549细胞的作用。**方法** 采用倒置显微镜、Giemsa染色及丫啶橙荧光染色观察不同浓度姜黄挥发油作用下人肺腺癌A549细胞形态的变化。**结果** ①倒置显微镜下见,不同浓度(0.08~1.5 μl/ml)的姜黄挥发油处理肺癌细胞24~72 h后,肺癌细胞呈散在分布,细胞稀少,大多数为圆形或椭圆形,显示细胞增殖受到抑制,上述变化与姜黄挥发油的浓度有关;②Giemsa染色实验表明,姜黄挥发油作用24~72 h后,0.8 μl/ml组和1.0 μl/ml组细胞凋亡率分别为34%和42%,与阴性对照组(13.5%)比较差异显著($P<0.01$),凋亡细胞多表现为胞体缩小、变圆,核浓缩,呈紫黑色;③丫啶橙荧光染色可较细致地显示细胞凋亡时的多种结构、形态改变,能够发现较早期的凋亡细胞,因而其敏感度可能更高。**结论** 姜黄挥发油可抑制肺癌细胞的生长和增殖,对肺癌细胞有诱导凋亡作用。

关键词: 形态学;凋亡;丫啶橙荧光染色;Giemsa染色

中图法分类号: R282.71; R73-352; R734.2 **文献标识码**: A

Effects of turmeric volatile oil on the morphology of human lung adenocarcinoma A549 cells

WANG Hai-jing, YANG He-ping (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of turmeric volatile oil extracted from curcuma on human lung adenocarcinoma A549 cell line. **Methods** The morphological changes of human lung adenocarcinoma A549 cells treated by different concentrations of turmeric volatile oil were observed by inverted microscopy, Giemsa staining, and Acridine orange staining. **Results** ① The inverted microscopy revealed that after treatment of A549 cells with different concentrations of turmeric volatile oil for 24 – 72 h or specified concentration of turmeric volatile oil for 1 – 7 d, the lung carcinoma cells were distributed sporadically, cells were scarce, and the majority of cells were in round or oval shapes, indicating that the cell proliferation was inhibited. These changes were associated with the concentration of turmetic volatile oil. ② Giemsa staining indicated that the apoptotic rates of A549 cells were 34% and 42% respectively after turmeric volatile oil treatment at the concentrations of 0.8 μl/ml and 1.0 μl/ml. There was significant difference in apoptotic rate between the treatment groups and the negative control group (13.5%, $P<0.01$). Smaller cell bodies and black condensed nuclei were found in the apoptotic cells. ③ Acridine orange staining indicated that apoptotic cells showed many multi-structures and morphologic changes of the apoptotic cells. **Conclusion** Turmeric volatile oil can inhibit the grow and proliferation of lung carcinoma cells and can induce the apoptosis of lung carcinoma cells.

Key words: morphology; apoptosis; Acridine orange; fluorescence staining; Giemsa staining

姜黄为姜科植物姜黄的干燥根茎,为常用中药,其主要成分为姜黄挥发油和姜黄素[1]。姜黄挥发油的主要成分以姜黄酮、姜黄烯、姜黄素等化合物的成分为主[2]。本研究采用形态学方法,观察姜黄挥发油影响肺癌细胞增殖、生长和凋亡的形态学变化,为不断深入探索姜黄挥发油的抗肿瘤作用提供实验依据,同时为寻找高效低毒的天然抗癌药探寻新的途径。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人肺腺癌A549细胞(新桥医院全军肿瘤治疗中心惠赠)。培养基为含10%新生小牛血清(HYCLON公司)的RPMI1640培养基(GIBCO),并加入青霉素100 U/ml和链霉素100 μg/ml。细胞置于37 ℃、5% CO_2 孵箱中,在饱和湿度下培养。隔日换液1次,每5天以1:3的比例传代1次。采用0.25%胰蛋白酶(Sigma)消化细胞。

1.2 药物配制

姜黄药材购自重庆桐君阁大药房,经重庆市中药研究院鉴

作者简介:王海晶(1977-),女,河南省汝南县人,硕士研究生,主要从事肺癌血管生成方面的研究。电话:(023)68754121

收稿日期:2004-09-12;修回日期:2004-11-05

定符合《中国药典》2000 版姜黄项下规定。其挥发油采用水蒸气蒸馏法制取。采用^{60}Co照射消毒，置棕色瓶中密闭保存于4 ℃冰箱中。实验当天用微量进样器精确抽取 10 μl 样品，溶于 10 μl 无菌吐温 - 80 ℃中，再加生理盐水至 100 μl 体积，再将上述溶液用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度。

1.3　实验分组

姜黄挥发油试验组，分别给予不同浓度的姜黄挥发油溶液；阴性对照组为吐温-80 组，给含等量吐温-80 和生理盐水，调 pH 值与姜黄挥发油溶液相近。

1.4　姜黄挥发油对肺腺癌细胞形态影响的观测

取指数生长期 A549 细胞 1 瓶，用 0.25% 胰蛋白酶消化，消化制备成单细胞悬液，经 0.4% 台酚蓝染色后进行活细胞计数。调整细胞悬液密度为 3×10^4/ml，接种于 20 只直径为 3.5 cm 的一次性培养皿（Gibco 产品）中（内置预先消毒好的干净的 2 cm × 2 cm 的盖玻片 1 块），培养 24 h 后随机分为 4 组。弃去培养基，分别加入含有姜黄挥发油 0.4、0.6、0.8、1.0 μl/ml 和阴性对照液的培养基继续培养。然后于处理后不同时间进行不同指标的观测。

1.4.1　倒置显微镜观察　　经处理的活细胞于不同时相点，在有恒温装置的倒置显微镜下观察并摄像，记录形态学变化。

1.4.2　Giemsa 染色分析　　染色方法参照文献[3]并加以改进。细胞加样品培养 24 h 后终止培养，取出盖玻片，0.01 mol/L PBS 振洗 5 min，置于分析纯甲醇中固定 10 min 后取出，挥干甲醇。将 Giemsa 染液与 pH 为 7.2 的 Sorensen 磷酸缓冲液以 1∶9 混合成工作液，加于盖玻片上染色 10 ~ 20 min（镜下观察染色程度），待细胞充分显色后流水冲洗盖玻片，立即进行拍照和图像扫描分析。将图像分析仪的放大倍数调为 200 ×，每组细胞选取 5 幅图像，分别计算各组细胞的凋亡率。

1.4.3　荧光显微镜观察　　丫啶橙荧光染色方法参照文献[4]并加以改进。细胞加样品培养 24 h 后终止培养，取出盖玻片，0.01 mol/L PBS 振洗 5 min，置于分析纯甲醇中固定 10 min 后取出，挥干甲醇。精确称取丫啶橙 1 mg，溶于 10 ml 三蒸水中，滴加 1 滴于盖玻片上染色 10 min，流水冲洗 3 min，以甘油封片剂（甘油∶0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液 = 1∶1）封片后立即于荧光显微镜下观察，激发光波长为 502 nm。

1.5　统计学处理

以 SPSS 软件对计数资料进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　倒置显微镜观察结果

阴性对照组 A549 细胞呈圆形、椭圆形、多角形和梭形等 4 种形态。传代后 3 h 左右即可见细胞陆续贴壁，8 h 后细胞逐渐伸出胞突，变为多角形或不规则形。细胞体积增大，突起长度为胞体长度的 0.5 ~ 2 倍，细胞核增大。24 h 见有较多新分裂的小圆形细胞附着于集落表面。核仁多个，为圆形或不规则形。

姜黄挥发油处理组：0.6 μl/ml 姜黄挥发油处理 24 ~ 48 h 后，细胞较少，散在分布，大多数为圆形或椭圆形，细胞小、胞核圆。0.8 μl/ml 姜黄挥发油处理 24 ~ 48 h 后，细胞较稀疏，以梭形细胞为主，向两侧有突起，细胞浆增多，胞浆内可见空泡，核浆比例缩小。1.0 μl/ml 姜黄挥发油处理 24 ~ 48 h 后，细胞数进一步减少，胞浆内可见多个颗粒（图 1）。

2.2　Giemsa 染色结果

对照组 A549 细胞 Giemsa 染色后为多角形，胞浆呈淡紫色，胞核为椭圆或类圆形，染紫红色，核仁紫黑；姜黄挥发油作用 24 h 后，凋亡细胞多表现为胞体缩小、变圆，核浓缩，呈紫黑色。细胞凋亡率统计结果：0.6 μl/ml 组、0.8 μl/ml 组和 1.0 μl/ml 组细胞凋亡率分别为 30%、34% 和 42%，与阴性组比较差异均极其显著（$P<0.01$）（图 2,3）。核碎裂及凋亡小体较多见于 1.0 μl/ml 组。

2.3　荧光显微镜观察结果

阴性对照组细胞略呈多角形；胞体舒展，形态一致；胞核为椭圆或类圆形，发黄绿色荧光，呈不十分均一的结构性显色，有时可见荧光较强的核仁；胞浆荧光为淡黄绿色。1.0 μl/ml 组细胞出现大量凋亡细胞，形态各异，大小不一。凋亡细胞胞体略有缩小，胞浆荧光无明显变化，胞核浓缩，发金黄色荧光（图 4）。凋亡细胞的胞核改变主要表现为 3 种形态：①胞核向心性浓缩，呈斑点状，核周形成轮廓清晰的完整或不完整的环形空晕；②胞核偏心性浓缩，呈半月状，对侧留下与之对称的空隙；③染色质碎裂，胞核核膜内陷、断离并最终包裹碎裂的染色质以“出芽”方式散入到胞浆之中，核浆之间无明显空隙形成。

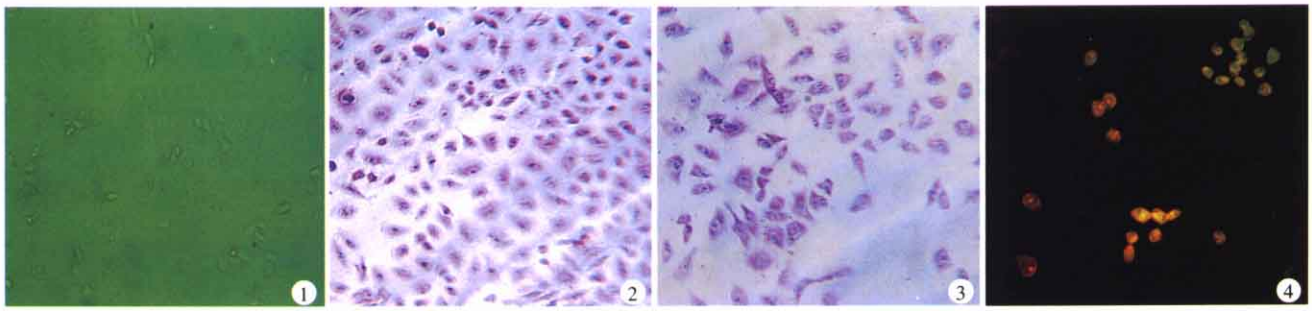


图 1　姜黄挥发油试验组 1.0 μl/ml A549 细胞（倒置显微镜 × 100）

Fig 1　Morphological changes of A549 cells in 1.0 μl/ml treatment group by inverted microscopy（inverted mircroscope × 100）

图 2　姜黄挥发油试验组 0.6 μl/ml A549 细胞（Giemsa × 100）

Fig 2　Morphological changes of A549 cells in 0.6 μl/ml treatment group by Giemsa staining（Giemsa × 100）

图 3　姜黄挥发油试验组 1.0 μl/ml A549 细胞（Giemsa × 100）

Fig 3　Morphological changes of A549 cells in 1.0 μl/ml treatment group by Giemsa staining（Giemsa × 100）

图 4　姜黄挥发油试验组 1.0 μl/ml A549 细胞（丫啶橙荧光染色法 × 100）

Fig 4　Morphological changes of A549 cells in 1.0 μl/ml treatment group by Acridine orange staining（Acridine orange × 100）

3 讨论

姜黄为植物姜黄的干燥根茎，为常用的一种活血化淤中药，具有破血行气，通经止痛，祛风疗痹等功能。其主要有效成分为挥发油和姜黄素。中药姜黄资源丰富，价格便宜，其挥发油含量高，提取方便，无副作用，研究证实姜黄挥发油具有抗菌、抗炎、去痰、止咳、平喘等作用。近年来，姜黄挥发油抗肿瘤作用引起人们极大的关注。人们先后发现姜黄挥发油能抑制人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60 和肝胚细胞癌 $HepG_2$ 细胞株的增殖，并能促进 BALB/c 小鼠脾细胞的增殖[5]。

本实验证实了姜黄挥发油能抑制人肺腺癌 A549 细胞的生长，通过凋亡途径诱导细胞死亡。因此，诱导凋亡是姜黄挥发油抑制肺癌细胞生长的重要机制。细胞凋亡是指在一定的生理或病理条件下，有核细胞启动细胞内特定程序，最后通过激活内源性 DNA 内切酶，导致细胞自然死亡[6]。目前发现的凋亡相关基因主要分为[7]凋亡诱导基因，包括 *ICF*(*ced*)、*Bax*、*Bak*、*Fas*、*Bad*、*bid*、*bik* 等；凋亡抑制基因，包括 *Bcl*-2、*Bcl-xl*、*Al*、*Bcl-w*、*Mcl*、*BAG*-1、*IAP* 家族(Survivin)等。以往研究证实 *Bcl-x* 能抑制细胞发生凋亡和延长细胞的存活时间，而 *Bax* 能促进细胞凋亡，两者在同一细胞的表达强弱可能是该细胞走向凋亡或是保持存活的调控因素之一[8]。杨长春等[9]探讨了黄芪、当归对体外培养的血管平滑肌细胞 FAK 表达和凋亡细胞的影响，结果发现黄芪、当归注射液可诱导 caspase-3 表达，下调 Bcl-2 表达，促进体外培养的血管平滑肌细胞的凋亡。姜黄挥发油具体通过哪种途径诱导细胞凋亡还不清楚。由于姜黄挥发油含有多种成分，可能有些化学成分结合在受体上，激活受体途径，引发 caspase(半胱天冬酶)介导的级联反应，从而诱导凋亡，但并不排除姜黄挥发油激活线粒体途径中某些基因的表达，诱导细胞凋亡的可能。另外还有一类细胞凋亡存在细胞周期特异性，如有的发生在 G_1 期和 G_2 期，有的仅仅发生在 S 期。这类细胞凋亡的发生，是细胞先被阻滞在细胞周期的某一时相，然后发生凋亡。姜黄挥发油诱导的凋亡是否存在细胞周期的特异性，有待于用细胞同步化的实验证实。

本实验表明，与 Giemsa 染色相比，丫啶橙荧光染色不但同样适用于定量分析细胞凋亡率，而且可同时较清楚地显示凋亡细胞的胞体与胞核形态，有可能发现较早期的凋亡细胞，故而敏感度可能更高；同时，由于坏死细胞的荧光染色变淡，而凋亡细胞的荧光染色则变浓，故而荧光染色还能将细胞坏死与细胞凋亡区别开来。本研究表明了姜黄挥发油具有抗肿瘤生物学活性，表现为显著的体外抑制肺腺癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡。

参考文献：

[1] 郑虎占，董泽宏. 中药现代研究与应用(第4卷)[M]. 北京：学苑出版社，1998. 3436.

[2] 候 卫，韩素丽，王鸿梅. 姜黄挥发油化学成分的分析[J]. 中草药，1999，30(1)：15.

[3] 韩 锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1997. 456.

[4] 朱立平，陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，1995. 166.

[5] 石雪蓉，顾 健，谭 睿，等. 姜黄挥发油抗肿瘤作用机制研究[J]. 中药药理与临床，2003，19(6)：15－16.

[6] Wang J，Silva J P，Gustafsson C M，*et al*. Increased *in vivo* apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2001，98(7)：4038－4043.

[7] 涂水平，江石湖，吴裕炘. 消化道肿瘤细胞凋亡相关基因治疗研究进展[J]. 国外医学消化系疾病分册，2000，20(2)：111－113.

[8] He L，Perkins G A，Poblenz A T，*et al*. Bcl-xL-overexpression blocks Bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2003，100(3)：1022－1027.

[9] 杨长春，温进坤，韩 梅，等. 黄芪、当归对血管平滑肌细胞粘着斑激酶表达和细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2003，23(3)：201－203.

(编辑 栾 嘉)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有1个、2个或3个，但“姓”只有1个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q.

本刊编辑部