文章编号:1000-5404(2005)19-1915-03

论著

# 昆明山海棠总生物碱对肺腺癌A549细胞株增殖抑制作用的实验研究

刘乐斌,杨录军,刘胜学,刘晋祎,敖 琳,黄晓春,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038)

**提 要: 目的** 观察昆明山海棠总生物碱(alkaloids from tripterygium hypoglaucum hutch, THHa)对人肺腺癌细胞系A549体外生长的影响。**方法** 采用MTT比色法检测THHa对A549细胞生长的抑制作用,测定其吸光度$D(490)$值;用倒置和荧光显微镜观察药物作用后A549细胞形态的变化;流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** 随着THHa浓度的增加和作用时间的延长,A549细胞增殖受到抑制,抑制率逐渐升高,具有浓度和时间依赖性。流式细胞仪结果显示,随着处理浓度和作用时间的增加,细胞的凋亡率逐渐升高。**结论** THHa能明显抑制A549细胞增殖,并可诱导A549细胞凋亡。

**关键词**: 昆明山海棠; 肺腺癌A549细胞; 增殖; 凋亡
**中图法分类号**: R285.5; R329.28; R734.2 **文献标识码**: A

# Inhibition on proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549 by alkaloids from tripterygium hypoglaucum hutch

LIU Le-bin, YANG Lu-jun, LIU Sheng-xue, LIU Jin-yi, AO Lin, HUANG Xiao-chun, CAO Jia (Department of Hygiene Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of the alkaloids from tripterygium hypoglaucum hutch (THHa) on cell proliferation and cell apoptosis in the human lung adenocarcinoma cell line——A549. **Methods** A549 cells were cocultured with THHa solution of different concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/ml) for 24, 48, 72 h and the inhibition rate of A549 cells was measured by MTT assay. Invert microscope and fluorescence microscope were used to observe the morphologic changes of A549 cells stained by Hochest 33342. The amount of apoptotic cells was measured by flow cytometry. **Results** The proliferation of A549 cells cocultured with THHa was obviously inhibited as compared with the control group. The inhibition rate of A549 cells treated with THHa increased in a time- and concentration-dependent manner and there was a significant difference between the cells cocultured with THHa and the control cells ($P<0.05$). Morphological changes of typical apoptosis in A549 cells by Hochest 33342 staining were observed under fluorescent microscope. The cell apoptosis rate by flow cytometry increased in a concentration-dependent manner. **Conclusion** THHa inhibits the proliferation of A549 cells and induces the apoptosis of the human lung adenocarcinoma cell line A549 *in vitro*.

**Key words**: tripterygium hypoglaucum hutch; lung cancer adenocarcinoma A549 cell line; proliferation; apoptosis

昆明山海棠总生物碱是从卫茅科雷公藤属植物昆明山海棠[tripterygium hypoglaucum(Level), Hutch]根茎和根皮中提取的主要有效成分之一。我室前期研究首次发现并报道了THHa对血液系统肿瘤有抗肿瘤的作用,并对其分子机制做了较深入的研究[1]。但是THHa对实体瘤特别是肺癌的作用目前国内外尚少有报道。本实验以体外培养的人肺腺癌A549细胞为研究对象,通过观察其对人肺腺癌A549细胞的生长抑制作用,探讨其可能的机制,为THHa进一步的开发与应用提供实验依据,也为肺癌的综合治疗提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 RPMI1640培养基、胰蛋白酶、二甲亚砜(DMSO)(三者均为美国Sigma公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国Biomil公司),新生牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司),Annexin V/FITC试剂盒(深圳晶美生物有限公司),倒置显微镜(日本,Olympus),Microplat Reader 550型酶联免疫检测仪(日本Bio-Rad公司),流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

1.1.2 细胞系及培养 A549细胞株为人肺腺癌细胞,由新桥医院全军呼吸内科研究所惠赠。细胞呈长梭形、叶形或多角

基金项目:国家自然科学基金资助项目(C30100241)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (C30100241)
作者简介:刘乐斌(1972-),男,湖南省桃江县人,硕士研究生,主治医师,主要从事药物毒理学方面的研究。电话:(023)68772388
通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271
收稿日期:2005-07-11;修回日期:2005-08-23

形，贴壁生长，胞浆饱满，生长舒展。培养于 37 ℃含 5% $CO_2$ 细胞培养箱内，培养液为含 10% 小牛血清和青链霉素浓度分别为 100 U/ml 和 100 μg/ml 的 RPMI1640。0.25% 胰蛋白酶消化传代。倒置显微镜下观察细胞的生长状态。

1.1.3 总生物碱的制备[2] 昆明山海棠根块粉碎后用 60% 的乙醇浸泡 7 d，滤出药液，水浴浓缩后蒸馏水稀释，加 HCl 酸化后过滤，氯仿萃取，保留水相。加 $Na_2CO_3$ 碱化，氯仿再次萃取，保留有机相。水浴挥干后得淡黄色固体，加 DMSO 溶解，分装灭菌后 -20 ℃保存。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 实验 采用 MTT 比色法[3]，略加修改。将消化计数的单细胞悬液加入 96 孔培养板中，细胞浓度为 $2\times10^4$/ml，180 μl/孔，过夜，次日加入不同浓度药物，总体积为 200 μl，参照杨录军等[4]的药物作用浓度，使其终浓度为 12.5、25、50、100、200 μg/ml。每组设 4 个复孔。同时设置调零孔（加入等体积的培养基）、对照组（只加等体积的细胞）。培养 24、48、72 h后，每孔加入 20 μl MTT 液（5 mg/ml），继续培养 4 h 后，离心终止培养，小心吸去上清液。加入 DMSO 150 μl/孔，低速震荡 10 min，使结晶物完全溶解，用 Microplat Reader 550 型酶联免疫检测仪测定每孔吸光度（$D$）值，波长定于 490 nm，实验重复 3 次。计算细胞抑制率：细胞抑制率 =［1 - 实验组 $D$(490)/对照组 $D$(490)］×100%。

1.2.2 Hochest 33342 染色 取对数生长期细胞悬液加入预先放置有盖玻片的培养皿中，待细胞爬满盖玻片后，分别加入不同浓度 THHa，终浓度为 0、12.5、25、50、100、200 μg/ml。培养 48h 后加入 Hochest 33342（储备浓度为 1 mg/ml，pH 7.0），终浓度为 10 μg/ml，37 ℃孵育 30 min。1% 多聚甲醛固定，荧光显微镜下观察并摄像。

1.2.3 流式细胞仪检测 采用 FCM 结合 PI 和 Annexin V/FITC 双标记染色测定细胞凋亡率。取对数生长期细胞，加入终浓度分别为 0、12.5、25、50、100、200 μg/ml THHa。作用 24、48 h后，0.1% 的胰酶消化收集细胞。按照 Annexin V/FITC 试剂盒说明操作，主要步骤如下：PBS 洗涤细胞 2 次，加入结合缓冲液，调整密度约 $10^6$/ml，分别加入 AnnexinV/FITC 和 PI，混匀后室温避光孵育 15 min，立即进行流式细胞仪分析。

### 1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 软件将不同时相的实验组的细胞生长抑制率与其相应阴性对照组进行方差分析；将不同浓度的 THHa 诱导 A549 细胞凋亡率与细胞增殖抑制率进行相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 THHa 对 A549 细胞形态学的影响

倒置显微镜下观察经 THHa 处理 24、48、72 h 后，可见部分细胞由贴壁脱落而呈悬浮生长，贴壁能力减弱，细胞形态变圆，体积缩小，核固缩出现，核颜色加深，折光性增强，200 μg/ml THHa 72 h 组尤为明显。不含药培养液培养的对照组细胞贴壁生长，几乎无脱落，胞浆饱满，生长舒展，相邻细胞生长融合成片。

### 2.2 THHa 体外对 A549 细胞增殖的抑制效应

MTT 法检测 THHa 对 A549 细胞作用的不同时间的生长抑制效应详见表 1。从表中可看出 THHa 对 A549 细胞有明显的生长抑制效应，其抑制作用呈浓度和时间依赖性，其抑制率随药物浓度升高和作用时间延长而增加，实验组与对照组间有显著性差异（$P<0.05$）。

**表 1 THHa 对 A549 细胞增殖的影响［$D$(490)，$\bar{x}\pm s$］**

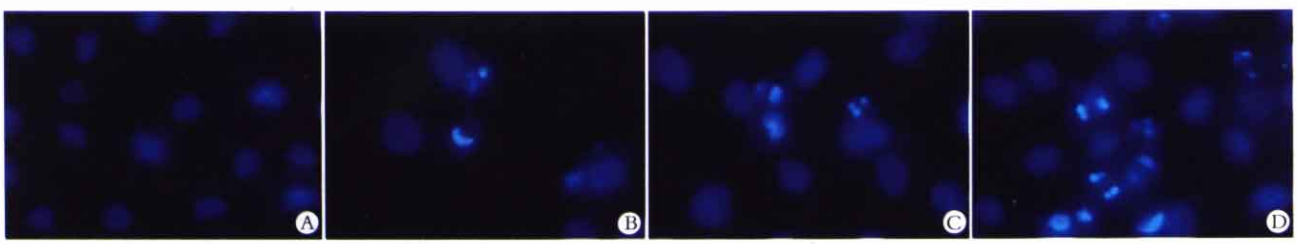
**Tab 1 Effects of cell proliferation in A549 cells by THHa［$D$(490)，$\bar{x}\pm s$］**

| THHa concentration (μg/ml) | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.256 0 ± 0.003 5 | 0.558 7 ± 0.004 6 | 1.051 0 ± 0.010 6 |
| 12.5 | 0.230 8 ± 0.003 9 * | 0.497 5 ± 0.007 9 * | 0.665 0 ± 0.012 4 * |
| 25 | 0.222 5 ± 0.001 0 * | 0.446 6 ± 0.007 0 * | 0.577 5 ± 0.015 7 * |
| 50 | 0.210 8 ± 0.004 7 * | 0.312 6 ± 0.001 9 * | 0.330 3 ± 0.017 9 * |
| 100 | 0.201 0 ± 0.002 9 * | 0.194 8 ± 0.002 6 * | 0.289 8 ± 0.011 6 * |
| 200 | 0.161 8 ± 0.006 7 * | 0.094 0 ± 0.009 8 * | 0.095 3 ± 0.003 2 * |

*：$P<0.05$，*vs* control（0 μg/ml THHa）

### 2.3 Hochest 33342 染色

荧光显微镜下见对照组（0 μg/ml THHa）细胞核呈弥散均匀荧光，处理组细胞核或者细胞质内可见浓染致密的颗粒状或块状增强荧光。并可以见到含 3 个以上的 DNA 荧光碎片的凋亡细胞。200 μg/ml 处理组荧光增强的细胞数量明显多于 50 μg/ml 和 100 μg/ml 组，提示荧光增强的细胞数量对剂量有一定的依赖性，见图 1。




A：0 μg/ml THHa；B：50 μg/ml THHa；C：100 μg/ml THHa；D：200 μg/ml THHa

**图 1 THHa 作用 A549 细胞 48 h 后细胞的形态学变化**（Hochest 33342 staining ×400）

**Fig 1 Morphologic changes of A549 cells after cocultured with THHa for 48 h**（Hochest 33342 staining ×400）

### 2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

对照组凋亡细胞所占比例很少（24 h 为 1.18%；48 h 为 2.84%），各个处理组与阴性对照组相比，THHa 作用 24 h 后，处理组的凋亡早期细胞百分比逐渐增多。作用 48 h 后，相同剂量组的凋亡率均有增加。提示 THHa 诱导 A549 细胞在一定范围内有时间和剂量依赖性。当药物浓度增至 200 μg/ml 时，由

PI 及 Annexin V/FITC 双标的细胞(凋亡后期继发坏死)成为主要的细胞组成。作用 24 h 和 48 h 的凋亡率与相同条件下的抑制率表现出较好的直线相关关系($r=0.883$, $P<0.01$),见表 2。

**表 2　THHa 对 A549 细胞凋亡的影响**

**Tab 2　Apoptosis rate of A549 cells cocultured with THHa of different concentrations for different time**

| THHa concentrations (μg/ml) | Apoptosis rate (%) | |
|---|---|---|
| | 24 h | 48 h |
| 0 | 1.18(118/10 041) | 2.84(302 /10 642) |
| 12.5 | 3.73(375/10 044) | 8.90(971/10 905) |
| 25 | 6.17(612/9 924) | 19.65(2 143/10 905) |
| 50 | 6.37(643 /10 097) | 20.33(2 242/11 030) |
| 100 | 18.59(1 858/9 992) | 22.99(2 508/10 907) |
| 200 | 20.16(2 007/9 975) | 28.34(3 017/10 644) |

## 3　讨论

肺癌是当今全球的主要死因,据统计近年来肺癌的发病率呈逐年上升趋势,肺癌每年发病达 1 200 万例,而每年死于肺癌的病例超过 1 100 万[5]。大多肺癌患者确诊时已属晚期无法手术,只有借助药物得以延长生命,因而化疗在肺癌的综合治疗中的地位非常重要。非小细胞性肺癌占全部肺癌的 75% ~85%,它对化疗的敏感性远远低于小细胞性肺癌,而化疗过程中耐药性的形成,使得进一步找寻和开发新的治疗非小细胞性肺癌的药物更具有现实意义[6,7]。

昆明山海棠总生物碱是从中药昆明山海棠的根茎和根皮中提取的主要有效成分之一。生物碱在临床上治疗自身免疫性疾病的疗效较好且毒副作用较小[8],我们在前期的实验中首次发现了 THHa 作用于多种肿瘤细胞后,能通过诱导细胞凋亡的途径来促进肿瘤细胞的死亡,提示 THHa 具有抗癌活性。这与现在人们认为许多抗癌制剂大都通过凋亡途径激发细胞毒性来达到抗肿瘤目的的观点是一致的。凋亡或者细胞程序性死亡是一个生理过程,它在控制肿瘤细胞的增殖和死亡过程中起重要作用,因而细胞数目受其节制[9]。细胞增殖需要通过凋亡来维持细胞数目的恒定,滞后的细胞死亡往往导致人类多种癌症的发生[10]。恶性肿瘤发生的机制之一就是细胞增殖过度,凋亡受阻。目前人们认为化疗药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡而产生抗癌作用,因而能否引起肿瘤细胞凋亡和诱导凋亡能力高低已经成为评价化疗药物优劣的重要指标之一。

我们的实验表明,THHa 在大于 12.5 μg/ml 可明显抑制 A549 细胞增殖及诱导其凋亡,在形态学上呈现出质膜的变化,如膜不对称性和粘附性的丢失,细胞皱缩,染色质凝聚,核浓缩碎裂和凋亡小体的出现等。MTT 比色法显示 THHa 作用 A549 细胞 48、72 h 后可显著抑制其增殖,且研究中表明 THHa 的细胞毒作用与浓度正相关。流式细胞仪检测结果显示,随着 THHa 作用时间延长和药物浓度增高,凋亡细胞比例增加,存在时间与剂量依赖性。本实验应用 FCM 检测得到的凋亡率与 MTT 结果相比较,发现抑制率与凋亡率两者之间呈正的直线相关关系($P<0.01$)。实验结果表明 THHa 在体外能诱导肺癌细胞凋亡,加速肺癌细胞的死亡,提示 THHa 具有抗肺癌的生物活性。这为其可能用于肺癌的化疗提供了实验依据,也对其将来可能运用于临床治疗的剂量制定提供了一定的参考。

细胞凋亡是一个主动的多基因参与调控的细胞自杀过程。有关 THHa 诱导肿瘤细胞凋亡的机制我们曾经做过较多研究[4,11],前期实验中发现 THHa 作用 Jurkat 淋巴瘤等细胞株后可有效抑制细胞增殖并将细胞阻滞于 $G_1$ 期,不通过钙离子信号途径诱导细胞凋亡,而是能有效通过线粒体途径和 Fas 受体介导途径诱导细胞凋亡。但以前的研究着重于血液系统肿瘤,本实验表明 THHa 也可以诱导肺癌细胞凋亡,然而杨录军等在研究 100 μg/ml THHa 作用于 Jurkat 淋巴瘤细胞株 48 h 后的凋亡率约为 40%,而本实验中 A549 为实体瘤细胞株,在同样剂量相同时间下得到的凋亡率约为 23%,这是否提示诱导血液系统肿瘤的凋亡机制不同于实体瘤?这一点还有待于下一步研究。

**参考文献:**


[1] 曹　佳, Nusse M. 昆明山海棠诱导 Jurkat 等 3 个细胞株发生细胞凋亡[J]. 科学通报, 1999, 44(11): 1169 -1173.

[2] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 263 -266.

[3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 2004. 250 -252.

[4] 杨录军, 敖　琳, Nuesse M, 等. 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻及瘤细胞超微结构改变的研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(17): 1501 -1504.

[5] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, *et al*. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. J Cancer, 2001, 94(15): 153 -156.

[6] Le Chevalier T, Soria J C. Status and trends of chemotherapy for advanced NSCLC[J]. EJC Supplements, 2004, 2(4): 26 -33.

[7] Cheng Y L, Chang W L, Lee S C, *et al*. Acetone extract of Bupleurum scorzonerifolium inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells *via* inducing apoptosis and suppressing telomerase activity[J]. Life Sci, 2003, 73(18): 2383 -2394.

[8] 舒尚义. 昆明山海棠毒性及毒性成分的研究[J]. 云南中医杂志, 1983, 4(6): 43 -44.

[9] Lee E J, Lee H J, Park H J, *et al*. Induction of $G_2$/M cell cycle arrest and apoptosis by a benz[f]indole-4,9-dione analog in cultured human lung (A549) cancer cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(20): 5175 -5178.

[10] Du A Y, Zhao B X, Yin D L, *et al*. Discovery of a novel small molecule, 1-ethoxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanol, that induces apoptosis in A549 human lung cancer cells[J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(13): 4176 -4183.

[11] 敖　琳, 曹　佳, 孙华明, 等. 昆明山海棠诱导 HL-60 细胞凋亡的初步研究[J]. 中草药, 2001, 32(10): 913.


(编辑　龙　亮)