论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0018-03

昆明山海棠总生物碱诱导肺腺癌A549细胞凋亡与细胞周期改变

刘乐斌[1],刘胜学[1],胡孝贞[2],杨录军[1],敖 琳[1],周燕虹[1],黄晓春[1],曹 佳[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆市卫生毒理学实验室,重庆 400038;[2]解放军第181医院B超室,桂林 541002)

提 要: 目的 为探讨昆明山海棠总生物碱(alkaloids from Tripterygium Hypoglaucum Hutch, THHa)抗肺癌机制,研究THHa诱导肺腺癌A549细胞凋亡与细胞周期改变的关系。**方法** 应用形态学观察、DNA凝胶电泳、流式细胞仪检测分析肺腺癌A549细胞凋亡及细胞周期改变。**结果** THHa能够诱导肺腺癌A549细胞凋亡并主要作用于细胞周期S期(S期细胞增多)。**结论** THHa可能通过诱导细胞凋亡而抑制A549细胞增殖,这种作用与细胞周期有关,这些有助于将来肺癌治疗方案的合理设计。

关键词: 昆明山海棠;肺腺癌A549细胞;细胞凋亡;细胞周期

中图法分类号: R282.71;R73-361;R734.2 **文献标识码**: A

Effect of alkaloids from tripterygium hypoglaucum hutch on apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line A549

LIU Le-bin[1], LIU Sheng-xue[1], HU Xiao-zhen[2], YANG Lu-jun[1], AO Lin[1], ZHOU Yan-hong[1], HUANG Xiao-chun[1], CAO Jia[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of B-mode Ultrasound Examination, The 181th Hospital of PLA, Guilin 541002, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of the alkaloids from tripterygium hypoglaucum hutch (THHa) on the apoptosis of lung cancer. **Methods** Apoptosis and cell cycle of human lung adenocarcinoma cell line A549 were detected by morphological observation, DNA electrophoresis, and flow cytometry. **Results** THHa could induce apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line and arrest the cells at S phase of cell cycle. **Conclusion** Apoptosis contributes to inhibitory effect of THHa on A549 cells. This may be helpful in designing an appropriate chemotherapeutic regimen in future.

Key words: tripterygium hypoglaucum hutch; lung adenocarcinoma A549 cell line; apoptosis; cell cycle

目前诱导或者促进肿瘤细胞凋亡、引起肿瘤细胞周期阻滞正成为肿瘤预防和治疗研究的新思路。近年来国内外的科研工作者越来越关注来自天然、疗效确切、毒副作用小的生物活性成分的研究。昆明山海棠总生物碱是从卫矛科雷公藤属植物昆明山海棠的根块和根皮中提取的主要有效成分之一。本实验室通过前期研究表明THHa对血液系统肿瘤有抗肿瘤的作用[1],之后又发现THHa对体外生长的肺腺癌具有生长抑制作用[2]。本实验以检测细胞凋亡为手段,旨在探索THHa抗肺癌的可能作用机制。

基金项目:国家自然科学基金(30100241)
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,主治医师,主要从事药物毒理学方面的研究。电话:(023)68772388,E-mail:llb158@tom.com

通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-01-19;**修回日期**:2006-06-20

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、RNase A、台盼蓝干粉、碘化丙啶、二甲基亚砜(DMSO),以上均购自美国Sigma公司,新生牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司),CK40型倒置显微镜(日本Olympus),流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司),400型台式冷冻离心机(德国Heraeus公司),数字化凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司),DTD85A型多用电泳仪(北京分析仪器配件厂)。

1.1.2 细胞及培养 A549细胞株为人肺腺癌细胞,由本校新桥医院全军呼吸内科研究所惠赠。细胞呈长梭形、叶形或多角形,贴壁生长,细胞质饱满。培养于37 ℃含5% CO_2细胞培养箱内,培养液为含10%小牛血清、100 U/ml青霉素和链霉素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 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　A549 细胞生长曲线的制作　　取待测生长状态良好细胞，800 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 洗涤 1 次，调整细胞密度为 2×10^4/ml，接种于 24 孔板，按每孔终浓度 0、12.5、25、50、100、200 μg/ml 分 6 组，每组 3 孔，每孔接种 1 ml，置 37 ℃，饱和湿度，5% CO_2 培养箱中培养 4 d，期间逐日检测 1 组，用 0.4% 台盼蓝溶液计数死活细胞，拒染为活细胞，着色为死细胞，显微镜下计数活细胞，取 3 孔的均值，绘制细胞生长曲线。

1.2.2　Giemsa 染色观察细胞凋亡形态　　取稀释成 2×10^4/ml、处于对数生长期的细胞悬液，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、50、100、200 μg/ml。继续培养 48 h 后取出盖玻片，PBS 液洗 2 遍，甲醇固定 5 min，Giemsa 染色 15 min，晾干后中性树胶封片。显微镜下观察细胞凋亡的特征性变化。

1.2.3　DNA 凝胶电泳　　将细胞与 THHa 共同孵育 72 h 后，分别收集细胞，PBS 洗涤 2 次，离心，向细胞沉淀中加入 100 μl 柠檬酸缓冲液，Trixton X-100 0.5 μl，室温下间歇摇动 30 min，离心，取上清，加 RNase A 3 μl，37 ℃水浴 1 h，加蛋白酶 K (1 mg/ml)3 μl。56 ℃水浴 1 h，加入 1/10 体积的醋酸钠 (3 mol/L) 和 2.5 倍体积的 70% 预冷乙醇自然干燥 4 ℃过夜，沉淀 DNA，37 ℃干燥 2 h，1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V，2 h)，紫外灯下观察结果与摄像。

1.2.4　流式细胞仪检测细胞周期　　取对数生长期细胞，以 1×10^5/ml 的密度接种于 25 ml 培养瓶中，接种 24 h 待细胞完全贴壁后，分别加入 THHa 使其终浓度为 0、50、100、200 μg/ml。处理时间为 24、48、72 h。到预定时间后胰酶消化，收集细胞，PBS 液洗涤 2 次，加入 70% 冷乙醇 4 ℃固定 24 h 以上，离心去除乙醇，PBS 液洗涤 1 遍，加入 RNase A 及 Trixton，室温避光放置 30 min，加入 PI 染液混匀后上流式细胞仪做 DNA 周期分析。每个样本均获取 10 000 个细胞，采用 CellQuest 功能软件进行分析，统计出各时相细胞的百分比。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验和相关性分析。

2　结果

2.1　THHa 作用 A549 细胞的生长曲线

从图 1 可以看出对照组细胞处于对数生长期，细胞数量明显增加，而 12.5、25 μg/ml THHa 组作用 A549 细胞后，细胞开始增殖缓慢，作用 3 d 后细胞生长抑制明显，而 100、200 μg/ml 组开始即对细胞生长产生明显抑制，作用 4 d 后大部分细胞死亡。

2.2　凋亡细胞形态学观察

如图 2 所示，镜下见对照组细胞呈梭形，细胞质饱满，核均匀居中，而处理组凋亡细胞胞体缩小、细胞质红染、核浓缩，染色质边集，有的还有空泡现象。200 μg/ml 处理组染色质边集的细胞数量明显多于 50 μg/ml 和 100 μg/ml 组，提示凋亡细胞数量与作用剂量之间有明显的正相关 ($r=0.937$，$P<0.01$)。

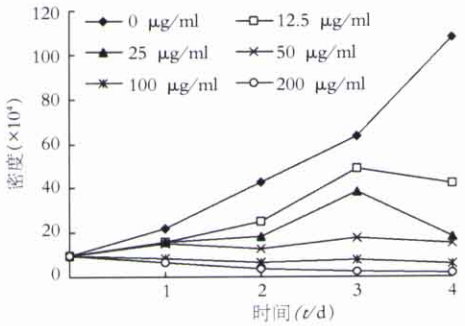
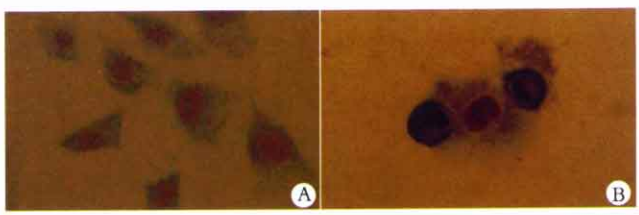


图 1　不同浓度 THHa 作用 A549 细胞的生长曲线

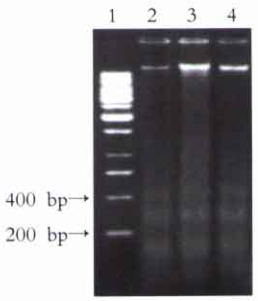


A：阴性对照组；B：50 μg/ml THHa

图 2　THHa 作用 A549 细胞 48 h 的形态学变化　(Giemsa ×400)

2.3　琼脂糖凝胶电泳

将 THHa 作用 72 h 的 A549 细胞 DNA 提取后，通过琼脂糖凝胶电泳分析，可见 50、100、200 μg/ml THHa 处理组，均出现 DNA 梯状条带，呈典型的 DNA 片段化现象，见图 3。



1：标准；2：50 μg/ml THHa；3：100 μg/ml THHa；4：200 μg/ml THHa

图 3　THHa 作用 A549 细胞 72 h 的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

2.4　流式细胞仪检测细胞周期

流式细胞仪结果显示，在多个时间点检测不同浓度的 THHa 作用 A549 细胞，细胞周期均有变化，其中以作用 24 h 后细胞周期的改变最为明显。THHa 作用肿瘤细胞 24 h 后，在 50 ~ 200 μg/ml，S 期细胞比例随剂量增加而增多，G_0/G_1 期细胞逐渐降低，表现出较好的量效关系，同时 G_2/M 期细胞也有减少。此时流式细胞仪检测表明细胞凋亡峰不明显。作用 48 h 后对照组细胞 G_1 期细胞逐渐增多，S 期细胞比例相应减少，而各个处理组与 24 h 处理组相比，S 期细胞比例减少，但与 48 h 对照组比反而呈现 S 期细胞逐渐增多的趋势，并可见到明显的亚 G 峰，凋亡率逐渐上升。到 72 h 后，对照组的 G_1 期细胞进一步增多，S 期细胞比例更少 (11.35%)，但各个处理组随着剂量增加 S 期细胞比例明显增多，与此同时凋亡率比 48 h 时明显增多，出现大量细胞死亡。见表 1。

表1 THHa 作用 A549 细胞后细胞周期分布

时间(t/h)	THHa 浓度(μg/ml)	G_0/G_1(%)	S(%)	G_2/M (%)
24	0	64.92	28.82	6.25
	50	62.83	35.34	1.83
	100	61.66	38.34	0.01
	200	57.15	42.35	0.50
48	0	78.67	16.95	4.38
	50	76.68	17.17	6.15
	100	79.02	18.19	2.79
	200	72.01	23.94	4.05
72	0	85.31	11.35	3.34
	50	77.24	16.66	6.10
	100	70.70	24.22	5.08
	200	66.62	31.09	2.29

3 讨论

随着对细胞凋亡机制的深入研究,人们发现许多化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗癌效应的。因此探索药物诱导肿瘤细胞凋亡,已成为肿瘤治疗的新方向。我室前期研究发现 THHa 对血液系统肿瘤有很强的诱导细胞凋亡的能力,那么其对实体瘤细胞株是否也具有诱导其凋亡的能力呢? 本研究通过 Giemsa 染色观测到 THHa 作用 A549 细胞后,呈现出细胞缩小、细胞质红染、核浓缩、偏位及细胞质内空泡等典型的凋亡现象;通过不同浓度 THHa 作用 A549 细胞 48 h 后提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,亦检测到了典型的凋亡梯带,进一步说明了 THHa 可诱导肿瘤细胞凋亡。

研究表明,增殖细胞与凋亡细胞在发生上密切相关,阻断细胞增殖周期过程可引起凋亡,而凋亡常伴随有生长阻滞,细胞增殖周期和细胞凋亡关系密切。有人认为只有 G_0/G_1 期细胞才发生凋亡,但更多学者认为,细胞周期各时相皆可发生凋亡,不同处理因素及不同细胞株凋亡有不同的周期特异性[3]。细胞增殖必须经过 G_1-S-G_2-M 4 个时期,细胞有丝分裂周期中任何时相的生物合成被阻断,均可导致细胞凋亡。Harada 等[4]在研究头花千金藤碱对人鳞状腺癌的抗癌作用中发现,头花千金藤碱可能通过 p21(WAF1)途径阻滞细胞于 G_1 期,从而诱导了肿瘤细胞的凋亡。Ramachandran 等[5]用姜黄素作用于乳腺癌细胞发现癌细胞阻滞在 S 期和 G_2/M 期。因此把细胞周期阻滞和细胞凋亡结合起来研究,将为癌症的发病学和抗肿瘤治疗研究开辟新的领域。

大量实验研究表明,许多抗癌药物对细胞周期有特异的阻断作用,这种作用受多种调控基因精细而又复杂的相互调控,调控基因最终通过受表达的蛋白来实现对细胞增殖的直接调控[6]。本研究通过流式细胞仪对细胞增殖周期进行了分析,结果提示 THHa 能够使 A549 细胞 S 期延长——S 期细胞增多。S 期延长意味着细胞增殖周期延长,增殖缓慢;S 期细胞增多有 2 种发展方向:或者在一定条件下恢复到增殖状态;或者丧失增殖能力,发生凋亡以及经分化、衰老直至死亡。在各个时间点内,我们发现在 S 期细胞比例增多的同时伴随有 G_1 期细胞比例减少的趋势,这提示 THHa 能明显地抑制细胞周期的转换。我们还发现 THHa 作用于 A549 细胞后 S 期细胞先明显增多,随后明显减少,说明细胞群被阻滞在 S 期,没有进入 G_2/ M 期,进而出现凋亡。细胞周期的阻滞先于细胞凋亡的发生,细胞周期的阻滞抑制了细胞增生,THHa 诱导细胞凋亡主要是 S 期的细胞。以上研究结果可能为临床制定化疗方案提供理论依据,提示在用 THHa 治疗肿瘤的同时,应用对 S 期肿瘤细胞敏感的药物进行肿瘤的联合化疗,可能会取得更好的疗效。我室前期研究发现,THHa 可阻滞 Jurkat 细胞于 G_0/G_1 期[7],与本次实验的结果似乎不同。我们估计可能是不同的细胞对药物敏感性的差异引起。由于真核生物的细胞周期调控非常复杂,THHa 影响肺癌细胞周期调节的靶分子机制还有待通过对有关细胞周期素、相关蛋白、激酶等去进一步探讨。

本研究对 THHa 诱导肺腺癌细胞凋亡以及周期时相性特点的阐明有助于揭示其抗肿瘤机制,推动其临床应用,为开发 THHa 的生物制剂提供理论基础。

参考文献:

[1] Fong W F, Zhuang W J, Cao J, *et al*. Apoptosis in HL-60 cells induced and c-Myc expression down-regulated by root aqueous extract from Tripterygium hypoglaucum[J]. 中草药, 2003, 34(7): 622 - 625.

[2] 刘乐斌, 杨录军, 刘胜学, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(19): 1915 - 1917.

[3] Srivastava J K, Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(2): 447 - 453.

[4] Harada K, Bando T, Yoshida H, *et al*. Characteristics of antitumour activity of cepharanthin against a human adenosquamous cell carcinoma cell line[J]. Oral Oncol, 2001, 37(8): 643 - 651.

[5] Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin [J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 54(3): 269 - 278.

[6] Janssen A, Maier T J, Schiffmann S, *et al*. Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S- or R-ibuprofen treatment[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 540(1 - 3): 24 - 33.

[7] 杨录军, 敖 琳, Nuesse Michael, 等. 昆明山海棠碱对 Jurkat 淋巴瘤细胞株的细胞周期和凋亡时相的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(17): 1505 - 1507.

(编辑 张大春)