

鹤蟾片诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的实验研究

熊绍权 周岱翰 林丽珠

摘要 目的 研究鹤蟾片对 A549 人肺腺癌细胞凋亡的影响。**方法** 制备大鼠含药血清,MTT 法检测鹤蟾片含药血清对 A549 细胞的生长抑制率。利用 PI 染色观察和流式细胞术研究该含药血清对 A549 细胞凋亡的影响。RT-PCR 检测含药血清对细胞表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) mRNA 表达的调节作用。**结果** 鹤蟾片含药血清明显抑制 A549 细胞生长,并使该细胞呈凋亡形态学改变。10%、20% 含药血清组的细胞凋亡率为 20.5%、33.2%,与对照组 (6.1%) 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。含药血清组的细胞 EGFR 表达明显低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 鹤蟾片具有诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的作用,分子机制可能与抑制 EGFR 基因的转录有关。

关键词 鹤蟾片;肺癌;细胞凋亡

Apoptosis Inducing Effect of Hechanpian on Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells XIONG Shao-quan, ZHOU Dai-han, and LIN Li-zhu Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT Objective To study the apoptosis inducing effects of Hechanpian (HCP) on human lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods** HCP containing rat serum was prepared and applied on A549 cells. The cell growth inhibition rate was tested by MTT assay; the effect of HCP on cell apoptosis was observed with Propidium iodide (PI) staining and flow cytometry analysis; the mRNA expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) was detected through RT-PCR. **Results** The growth of A549 cells was obviously inhibited after being treated by HCP containing serum, and the cells presented an apoptotic change. The cell apoptosis rate after treated by serum containing 10% and 20% HCP was 20.5% and 33.2%, respectively, significantly higher than that in the control (6.1% in cells didn't treated with HCP, $P < 0.05$). Compared with control, EGFR mRNA expression in HCP treated cells was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** HCP has apoptosis inducing effect on A549 cell, and its molecular mechanism is probably correlated with the inhibition of EGFR gene transcription.

KEYWORDS Hechanpian; lung cancer; cell apoptosis

细胞凋亡是机体生长发育和新陈代谢的基本规律,也是肿瘤发生发展的重要机制。中医中药抗肿瘤及诱导细胞凋亡方面也具有重要的意义。鹤蟾片是广州中医药大学周岱翰教授 40 余年经验用方,长期用于非小细胞肺癌临床治疗,疗效肯定^[1-4]。近期基础研究证实,鹤蟾片含药血清对人肺腺癌 A549 细胞具有一定的诱导凋亡作用,其机制可能与下调表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的表达有关,现报告如下。

材料与方法

1 动物和细胞株 SD 大鼠 16 只,230 ~ 250 g,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:2001A056。A549 细胞株由广州中医药大学肿瘤实验室提供。

2 药物 鹤蟾片,主要成分为仙鹤草、干蟾皮、天冬、浙贝母、人参等,由广州中一药业有限公司提供,批号 44022453。鹤蟾片加蒸馏水配成 0.34g/mL 浓度的混悬液备用。

3 主要仪器和试剂 NU-2500E 型 CO₂ 培养箱购自 SHELAB 公司。H120 型荧光显微镜购自 Olympus 公司;ELITE ESP 型流式细胞仪购自美国 COULTER 公司;Microplate Reader 3550-UV 酶标仪购自 BOI-RAD 公司。RPMI 1640 培养基和胎牛血清、胰酶均购自

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金资助 (No. 2009442512008);中国博士后科学基金资助 (No. 20090450854)

作者单位:广州中医药大学第一附属医院肿瘤科 (广州 510405)

通讯作者:熊绍权, Tel:020-36588770, E-mail:xsq106@yahoo.com.cn

GIBCO 公司。碘化丙啶(propidium iodide, PI)分别购自 Sigma 公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)购自 Alnreseo 公司。Trizol 试剂和 one step RT-PCR 试剂盒购自 invitrogen 公司。PCR 引物由北京三博远志生物公司合成。

4 含药血清制备 SD 大鼠 16 只随机分成两组, 每组 8 只。鹤蟾片组:以鹤蟾片悬液 7 mL/kg 灌胃, 相当于 70 kg 成年人每日服用鹤蟾片 5.0 g 等效量的 5 倍;对照组:以等容积的生理盐水灌胃。每天灌胃 1 次,连续 5 天。末次给药前禁食 12 h,自由饮水,给药 1 h 后腹腔静脉无菌采血。血液 4 ℃ 静置 8 h, 1 500 r/min 离心 10 min,分离血清。血清经 56 ℃ 水浴灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20 ℃ 分装保存。

5 指标检测及方法

5.1 细胞生长抑制率检测 取对数生长期的 A549 细胞,计数后以不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释至 2×10^4 /mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL。分鹤蟾片高剂量组(20%, H-HCP)、低剂量组(10%, L-HCP)和对照组,每组 5 个复孔,各组分别加入 40、20 μL 的含药血清和 40 μL 对照血清,另以对照血清 20 μL 补加到 L-HCP 组。各组再加 60 μL 无血清 RPMI 1640 培养液,使各孔血清浓度均为 20%,总液量为 200 μL。于 37 ℃ 的 5% CO₂ 孵箱培养。每隔 12 h,用 MTT 比色法检测,计算鹤蟾片含药血清的细胞生长抑制率。(1)MTT 比色法:每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),继续孵育 4 h。弃净培养基后,每孔加 DMSO 150 μL,振荡 10 min。酶标仪上测定各孔 490 nm 波长处光吸收值。(2)细胞生长抑制率计算公式:生长抑制率(%)=(对照孔测定的平均 OD 值-加药组测定的平均 OD 值)/对照孔测定的平均 OD 值 × 100%。

5.2 鹤蟾片对细胞的凋亡形态学影响 采用 PI 染色法。取对数生长期的 A549 细胞,以不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释并接种于 6 孔板,使每孔细胞数 1×10^5 ,每孔培养液 2 mL。如前分 H-HCP、L-HCP 和对照 3 组,每组 3 个复孔,分别含 400、200 μL 的含药血清和 400 μL 对照血清,另以对照血清 200 μL 补加到 L-HCP 组,使各孔血清浓度均为 20%。于 37 ℃ 的 5% CO₂ 孵箱培养 48 h。弃上清,PBS 轻洗 2 次,加用 PI 染液(PBS 配制,终浓度 10 μg/mL),孵箱避光孵育 20 min,倒置荧光显微镜下观察。

5.3 鹤蟾片对 A549 细胞凋亡率的影响 采用流式细胞术检测。如上 5.2 所示细胞分组、加血清和培养细胞。48 h 后常规收集各孔细胞。离心,弃上

清,细胞沉淀用 PBS 冲洗 2 次,70% 的预冷乙醇 2 mL, 4 ℃ 2 h。离心弃去固定液,PBS 重悬冲洗。加 1 mL PI 染液(PBS 配制,终浓度 100 μg/mL),4 ℃ 避光 30 min。流式细胞仪检测细胞凋亡率。

5.4 鹤蟾片对 A549 细胞 EGFR 基因表达的影响 采用 RT-PCR 检测。(1)总 RNA 提取:如上 5.1 所示细胞分组、加血清和培养细胞。培养 24 h 后常规收集各组细胞。Trizol 法提取以上各组细胞总 RNA。(2)One step RT-PCR 扩增 EGFR 基因。反应条件如下:50 ℃ 逆转录 30 min,94 ℃ 变性 2 min,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,循环 30 次后,72 ℃ 延伸 7 min,1% 琼脂糖凝胶电泳并成像分析。GAPDH 基因作内参对照,反应条件同 EGFR。EGFR 引物序列:上游 5'-CG-CATCCAGCAAGAATATTG-3',下游 5'-ACCGTGGGCA-CATTTTAC-3'。GAPDH 引物序列:上游 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACCACCCTGT-TGCTGTA-3'。

6 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

结 果

1 鹤蟾片含药血清对 A549 细胞生长的影响(图 1) 与对照组比较,在血清处理后 12、24、36、48、60 h, H-HCP 及 L-HCP 组的细胞生长抑制率均逐渐增大。

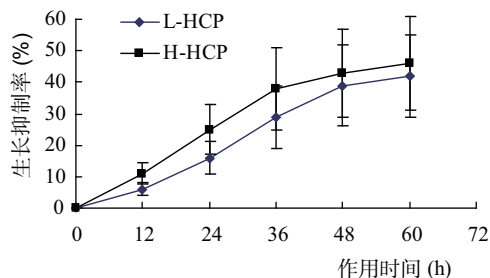
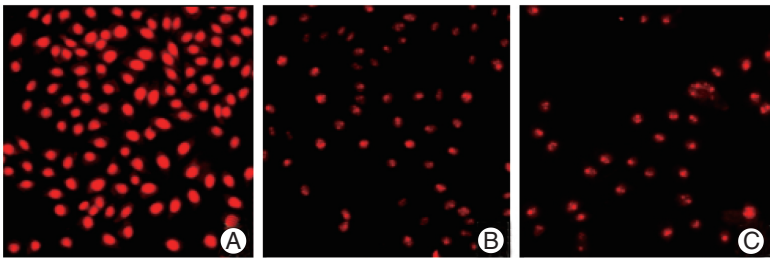


图 1 鹤蟾片含药血清对 A549 细胞生长的影响

2 鹤蟾片对 A549 细胞凋亡形态学影响 A549 细胞经含药血清作用 48 h 和 PI 染色,荧光显微镜观察显示:对照组的细胞核染色均匀,胞核大小基本一致,细胞生长正常,贴壁良好;而鹤蟾片组的细胞核多呈固缩或碎裂,可见凋亡小体。或染色质偏聚,大小不一,形态多不规则。细胞脱壁较多,生长较差(图 2)。

3 鹤蟾片对 A549 细胞的凋亡率影响(表 1) 对照组血清处理后的 A549 细胞凋亡率仅为 6.1%,而 10%、20% 含药血清组的细胞凋亡率分别达到 20.5%、33.2%,均显著高于对照组($P < 0.05$)。表明鹤蟾片具有诱导细胞凋亡作用。



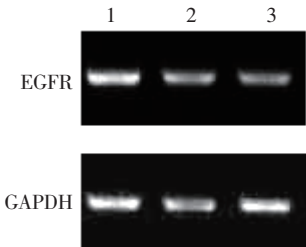
注：A 为对照组；B 为 L-HCP 组；C 为 H-HCP 组

图 2 各组 A549 细胞凋亡形态比较(PI, ×200)

表 1 鹤蟾片对 A549 细胞凋亡的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)		
组别	n	凋亡率
对照	3	6.1 ± 1.1
L-HCP	3	20.5 ± 3.6*
H-HCP	3	33.2 ± 5.9*

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

4 鹤蟾片对 A549 细胞 EGFR mRNA 表达的影响
鹤蟾片含药血清处理 A549 细胞 24 h 后,经 RT-PCR 及凝胶电泳发现:EGFR mRNA 表达水平对照组较高,条带明亮,而含药血清处理组表达水平较低,条带较暗(图 3)。半定量分析表明(表 2),L-HCP 及 H-HCP 组 EGFR mRNA 表达水平均下调,尤以 H-HCP 作用更为明显,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注：1 为对照组；2 为 L-HCP 组；3 为 H-HCP 组

图 3 EGFR 的 RT-PCR 产物分析

表 2 各组 A549 细胞 EGFR mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	EGFR/GAPDH 比值
对照	3	0.95 ± 0.23
L-HCP	3	0.62 ± 0.15
H-HCP	3	0.31 ± 0.06*

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

讨 论

诱导细胞凋亡是当前肿瘤治疗的重要策略。中医中药具有多靶点多途径抗肿瘤作用,诱导凋亡也是其抗肿瘤的重要机制之一。鹤蟾片是广州中医药大学周岱翰教授治疗肺癌 40 余年的经验用方,并已经批量生产用于临床。该方由仙鹤草、干蟾皮、天冬、浙贝母、人参等药物组成,既清热解毒、化痰散结,又补益正气、培元固本,从而抑制肿瘤生长,促进机能恢复。临床应用

治疗晚期肺癌总有效率近 70%,并具有放化疗增效和减毒作用^[1-2]。经“十五”重点攻关项目的 6 家医院进行前瞻性临床研究,对于Ⅲ、Ⅳ期非小细胞肺癌,应用鹤蟾片等中药治疗,1 年生存率及中位生存期略高于单纯化疗^[3,4]。

本研究运用中药血清药理学的方法,探讨鹤蟾片对人肺腺癌 A549 细胞的凋亡诱导作用。通过 MTT 检测发现,鹤蟾片含药血清不同程度地抑制 A549 细胞生长,20% 含药血清在作用 12 h 后即发挥较明显的生长抑制效应,作用 48 h 后的抑制率可达 43%。10% 浓度的含药血清也具有一定的生长抑制效果(图 1)。进一步分析表明,经鹤蟾片含药血清作用后的 A549 细胞形态呈现凋亡样改变,细胞核固缩或碎裂,色质偏聚,大小不一,可见凋亡小体,细胞脱壁较多,生长较差(图 2),此提示鹤蟾片可能具有诱导 A549 细胞凋亡之作用。流式细胞术分析结果则对该凋亡诱导作用予以了佐证。如表 1 所示,对照组血清处理后的细胞凋亡率仅为 6.1%,而 L-HCP 及 H-HCP 组的细胞凋亡率分别达到(20.5 ± 3.6)%、(33.2 ± 5.9)%,均显著高于对照组($P < 0.05$),进一步证实了鹤蟾片具有诱导 A549 细胞凋亡的作用。

EGFR 属于细胞表面受体酪氨酸激酶,在多种实体肿瘤中高表达或异常激活。40% ~ 80% 非小细胞肺癌病理标本可检测到 EGFR 基因高表达,并与患者术后的不良预后有关^[5,6]。EGFR 与多条胞内信号通路关联,一旦由配体诱发并活化,受体磷酸化后募集 Ras 和 PI3K,从而激发 MAPK 和 Akt 通路等,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖和生存^[7,8]。有研究表明,抑制 EGFR 高表达或抑制 EGFR 激酶活性,可有效诱导癌细胞凋亡,成为肿瘤治疗的重要靶点^[9,10]。在本研究中,H-HCP 及 L-HCP 均使 A549 细胞的 EGFR mRNA 表达下调,尤以 H-HCP 作用更为明显,表明鹤蟾片抑制 A549 细胞 EGFR mRNA 的转录表达,可能是其诱导细胞凋亡的分子机制。

综上所述,利用中药血清学实验方法,发现鹤蟾片

含药血清对人肺腺癌 A549 细胞具有生长抑制作用,并证实为通过诱导细胞凋亡途径,其分子机制可能与抑制 EGFR 基因的转录表达有关。

参 考 文 献

- [1] 唐立明,滕咏,张振鄂. 中药鹤蟾片放疗治疗中晚期肺癌疗效分析[J]. 实用中西医结合杂志, 1996, 9(8): 502-503.
Tang LM, Teng Y, Zhang ZE. Analysis of therapeutic efficacy of hechanpian combined with radiotherapy for the treatment of advanced lung cancer[J]. Chin J Pract Chin Modern Med, 1996, 9(8): 502-503.
- [2] 陆真权,陈焕伟. 鹤蟾片合盖诺、顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(13): 1730-1731.
Lu ZQ, Chen HW. Study of hechanpian combined with navelbine and cisplatin on late non-small-cell lung cancer[J]. Modern J Integr Chin Tradit West Med, 2006; 15(13): 1730-1731.
- [3] 周岱翰,林丽珠,周宜强,等. 中西医结合治疗非小细胞肺癌近期疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1061-1065.
Zhou DH, Lin LZ, Zhou YQ, et al. Analysis of short-term therapeutic efficacy of integrated traditional and western medicine in treating non-small cell lung cancer[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2005, 25(12): 1061-1065.
- [4] 周岱翰,林丽珠,周宜强,等. 中医药对提高非小细胞肺癌中位生存期的作用研究[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(4): 255-258.
Zhou DH, Lin LZ, Zhou YQ, et al. The role of traditional

Chinese drugs in improving median survival of patients with non-small cell lung cancer[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2005, 22(4): 255-258.

- [5] Zhang X, Chang A. Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non small cell lung cancer[J]. J Med Genet, 2007, 44(3): 166-172.
- [6] de La Motte Rouge T, Galluzzi L, Olaussen KA, et al. A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell Lung cancer cells resistant to erlotinib[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6253-6262.
- [7] Niu G, Carter WB. Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1487-1493.
- [8] Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(5): 587-595.
- [9] Sheng G, Guo J, Warner BW. Epidermal growth factor receptor signaling modulates apoptosis via p38 MAPK-dependent activation of Bax in intestinal epithelial cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 293(3): G599-606.
- [10] Kaulfuss S, Burfeind P, Gaedke J, et al. Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(4): 821-833.

(收稿:2009-10-12 修回:2010-03-18)

第二十二次全国中西医结合消化学术会议征文通知

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于 2010 年 8 月 19—22 日在苏州市召开第二十二次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病诊断和治疗新技术新理论继续教育学习班。

征文内容 中西医结合消化系肿瘤诊断与治疗;幽门螺旋杆菌(HP)相关疾病的中西医结合基础与治疗研究;功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中中西医结合基础与临床研究;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

学习班招收对象 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。

征文要求 请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编和电子信箱。稿件请附 500~800 字论文摘要,以电子邮件的形式将稿件发至 szzyy88@163.com 或 czs.xiaohua@163.com。

征文或报名联系人 沈夕坤,姚月明;地址:江苏省苏州市景德路 314 号苏州市中医院院办公室,邮编:215003;电话:0521-65225929,13606209442(沈),13962199190(姚);传真:0512-65225929。

截稿日期 2010 年 7 月 20 日。