

# 人参水提液对 TAMs 与肿瘤细胞共培养体系 肺癌 A549 细胞生物学行为的影响

高 静 毕 蕾 江玉翠 杨 焯 李变英 陈卫平

**摘要** **目的** 探讨人参水提液(water extract of ginseng, WEG)对肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)与肺癌 A549 细胞共培养体系肺癌 A549 细胞增殖、迁移及骨架蛋白 F-actin 表达等生物学行为影响。**方法** 采用佛波酯(PMA)联合 IL-4 及 IL-13 诱导人急性白血病单核细胞株(THP-1)成为 TAMs。以 TAMs 细胞上清与肺癌 A549 细胞共培养,模拟肿瘤微环境构建共培养模型。将细胞分为空白组(A549)、共培养组(TAMs + A549)、WEG 高、中、低剂量组(TAMs + A549 + WEG)。分别采用 MTT 法、实时细胞分析技术及高内涵细胞成像系统检测分析不同条件下 A549 细胞增殖、迁移和骨架蛋白 F-actin 表达情况。**结果** 与空白组比较,共培养组 A549 细胞增殖明显增加,细胞迁移能力和细胞骨架面积均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与共培养组比较,WEG 高、中、低剂量组 A549 细胞增殖和迁移能力受抑制,细胞骨架面积和微丝条数减少,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。**结论** 人参水提液在共培养体系中能有效抑制 A549 细胞增殖迁移能力,可能通过调节 TAMs 免疫活性而影响肿瘤细胞的生物学行为。

**关键词** 人参水提液;肿瘤相关巨噬细胞;肺癌 A549 细胞;共培养体系

Effect of Water Extract of Ginseng on Biological Behaviors of Lung Cancer A549 Cells and the Expression of F-actin in Co-culture System of TAMs and A549 Cells GAO Jing, BI Lei, JIANG Yu-cui, YANG Ye, LI Bian-ying, and CHEN Wei-ping College of Preclinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)

**ABSTRACT** **Objective** To study the effect of Water Extract of Ginseng (WEG) on the proliferation/metastasis of lung cancer A549 cells and the expression of F-actin in co-culture system of tumor associated macrophages (TAMs) and A549 cells. **Methods** Human acute leukemia mononuclear strain THP-1 was induced to become TAMs using Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) combined IL-4 and IL-13. The supernatant of TAMs and A549 cells were co-cultured. A co-culture model was set up by simulating microenvironment of lung cancer. Then cells were divided into the blank control group (A549), the co-culture group (A549 + TAMs), high, middle, and low dose WEG groups (TAMs + A549 + high, middle, and low dose WEG). The effects of WEG on the proliferation/metastasis of lung cancer A549 cells and the expression of F-actin under various conditions were detected using MTT method, Real time cell analysis (RTCA), and high content screening (HCS). **Results** Compared with the blank control group, the proliferation of A549 cells was obviously increased, cell migration was obviously elevated, and the area of cell skeleton was markedly enlarged in the TAMs + A549 group, with statistical difference ( $P < 0.05$ ). Compared with the TAMs + A549 group, the proliferation and migration of A549 cells were inhibited, the area of cell skeleton and the number of microfilaments were reduced dose-dependently ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** WEG could effectively inhibit the proliferation and migration of A549 cells, which might be a-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81503486, No. 81273638); 江苏省高校自然科学基金项目(No. 14KJD360004); 江苏省高校优势学科建设工程项目(中西医结合)

作者单位: 南京中医药大学基础医学院(南京 210023)

通讯作者: 陈卫平, Tel: 025-85811923, E-mail: wp2002123@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0345

chieved by adjusting immunoactivities of TAMs, and further it affected biological behaviors of tumor cells.

**KEYWORDS** Water Extract of Ginseng; tumor associated macrophages; lung cancer A549 cell; co-culture system

中医药是我国治疗恶性肿瘤独特的手段之一,在改善患者生活质量、延长生存期、缓解药物不良反应等方面具有优势,其疗效和安全性得到广泛认同<sup>[1,2]</sup>。益气扶正法是中医临床治疗恶性肿瘤重要法则之一,人参作为益气扶正代表药在临床广泛应用。研究发现,人参可调节免疫细胞,改善机体免疫功能<sup>[3]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境中的主要免疫细胞,参与肿瘤的发生、生长、侵袭和转移过程,是连接肿瘤免疫抑制状态和肿瘤进展的关键环节<sup>[4]</sup>。目前,关于人参对 TAMs 的作用研究尚少,为进一步探讨人参在肿瘤治疗中的作用及机制,本实验采用共培养模型模拟肿瘤微环境,观察人参水提液(water extract of Ginseng, WEG)对共培养体系的影响,以研究肿瘤细胞的生物学行为。

### 材料与方 法

1 细胞株 人急性白血病单核细胞株 THP-1 和人肺癌细胞株 A549 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 药物 人参饮片购自铜陵禾田中药饮片公司(批号:130901);人参皂苷 Rg1(批号:201509)、人参皂苷 Re(批号:201525)及人参皂苷 Rb1(批号:201424)均购自中国食品药品鉴定研究院。

3 试剂与仪器 主要试剂:RPMI-1640 培养液(批号:8114281)及胎牛血清(批号:1221119)均购自美国 Gibco 公司;DMSO(批号:302A0324)及 4% 多聚甲醛(批号:20120421)均购自 Sigma 公司;MTT(批号:321E054, Solarbio 公司,中国);CIMP16 细胞迁移检测板(批号:20110721, Roche 公司,瑞士);细胞骨架分析试剂盒(批号:OA183099, Thermo Scientific 公司,美国);IL-12、IL-10 ELISA 试剂盒(批号:H20150911、H20150910,南京建成生物工程研究所有限公司);佛波酯(Propylene glycol methyl ether acetate, PMA, 批号:P8139, Sigma 公司);IL-13、IL-4 蛋白(批号:010623、100414,美国 Pepro-Tech 公司)。主要仪器:SpectraMax M 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);ArrayScan VTI 高内涵细胞成像系统(700 系列,美国 Thermo Scientific 公司);RTCA DP 实时细胞分析仪(美国 Roche 公司);U-3000 超高效液相色谱仪(美国 DIONEX 公司);

DFC-259 倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

4 人参质量鉴定 依据 2010 版中国药典制备对照品溶液、供试品溶液,精密吸取对照品溶液 10  $\mu$ L 与供试品溶液 10 ~ 20  $\mu$ L,注入液相色谱仪,测定分析。

5 人参水提液制备 参照参考文献[5],采用水煎方式制备人参水提液。煎煮方法流程参考文献[4]优选,称取人参饮片 20 g,加入 160 mL 蒸馏水煎煮 1 h,重复煎煮 1 次,将两次水提液水浴浓缩至 20 mL,得到 1 g/mL 人参水提原液,离心 12 000 r/min, 10 min 取上清,过滤除菌分装后 -20  $^{\circ}$ C 保存。通过 MTT 实验求得 WEG 对 TAMs 作用 48 h  $IC_{50}$  为 26.06 mg/mL,实验前配制 WEG 浓度为 5、10、20 mg/mL(分别为低、中、高剂量)。

6 TAMs 体外模型建立 参照参考文献[6,7],取对数生长期的 THP-1 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,以  $1 \times 10^9$  cells/L 密度重悬,接种于 6 孔板中。加 320 nmol/L 的 PMA 诱导细胞 48 h,期间 6 h 贴壁后以 20 ng/mL 浓度的 PMA 加入 IL-4 和 IL-13,即可得到诱导的 TAMs 细胞。TAMs 细胞主要分 M1 和 M2 两种表型,在肿瘤微环境中以 M2 型居多,IL-12、IL-10 分别为 M1 和 M2 标志物。倒置显微镜观察细胞形态,采用 ELISA 技术检测细胞上清中 IL-12、IL-10 含量,对体外模型进行鉴定。

7 上清共培养模型建立 参照参考文献[8],PBS 冲洗 3 次诱导后的 TAMs 细胞,加入用无血清 RPMI-1640 培养基配制的低、中、高不同浓度的 WEG,共培养组的 TAMs 用等体积的无血清培养基,处理 48 h 后收集上清,离心 2 000 r/min, 5 min 备用。胰酶消化 A549 细胞,接种于 96 孔板中 24 h 贴壁后,空白组用无血清培养基,共培养组用 TAMs 上清培养,WEG 组用含药 TAMs 上清 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  培养 A549 细胞 48 h 评价 A549 的生物学特性。

8 MTT 法检测 A549 细胞增殖水平 取对数生长期 A549 细胞,0.25% 胰酶消化,调整浓度为  $1 \times 10^7$  cells/L 接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  恒温培养箱培养 24 h 贴壁。吸去培养液,直接给药组(A549 + WEG)加入 100  $\mu$ L 无血清培养基配制浓度为 5、10、20 mg/mL 的 WEG;空白组加入无血清培养基;共培养组加入 TAMs 上清;A549 + TAMs +

WEG 加入不同浓度的 WEG 处理 TAMs 细胞上清各 100  $\mu\text{L}$ 。48 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  孵育 4 h, 吸去上清液, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 摇床振荡 10 min, 使结晶完全溶解。酶标仪 490 nm 检测吸光值, 并计算抑制率 (IR),  $\text{IR} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ , 各组设置 5 个复孔, 重复试验 3 次取平均值。

9 实时细胞分析技术检测 A549 细胞迁移 参照参考文献 [9, 10], 取出 CIM-Plate 16 孔板, 在下板中加入 165  $\mu\text{L}$  含血清培养基, 组装上板并于上板内加入无血清培养基 30  $\mu\text{L}$ , 将 CIM-Plate 放入培养箱平衡 30 min 测基线。消化 A549 细胞, 调整浓度为  $1 \times 10^8$  cells/L, 100  $\mu\text{L}$  接种于各孔中, 6 h 贴壁后吸去上层培养液 100  $\mu\text{L}$ , 分别于空白组加入无血清培养基; 共培养组加入 TAMs 上清; WEG 各剂量组加入不同 WEG 药物浓度处理 TAMs 上清各 100  $\mu\text{L}$ 。每组设 3 个复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱培养, RTCA-DP 仪器实时监测 72 h。

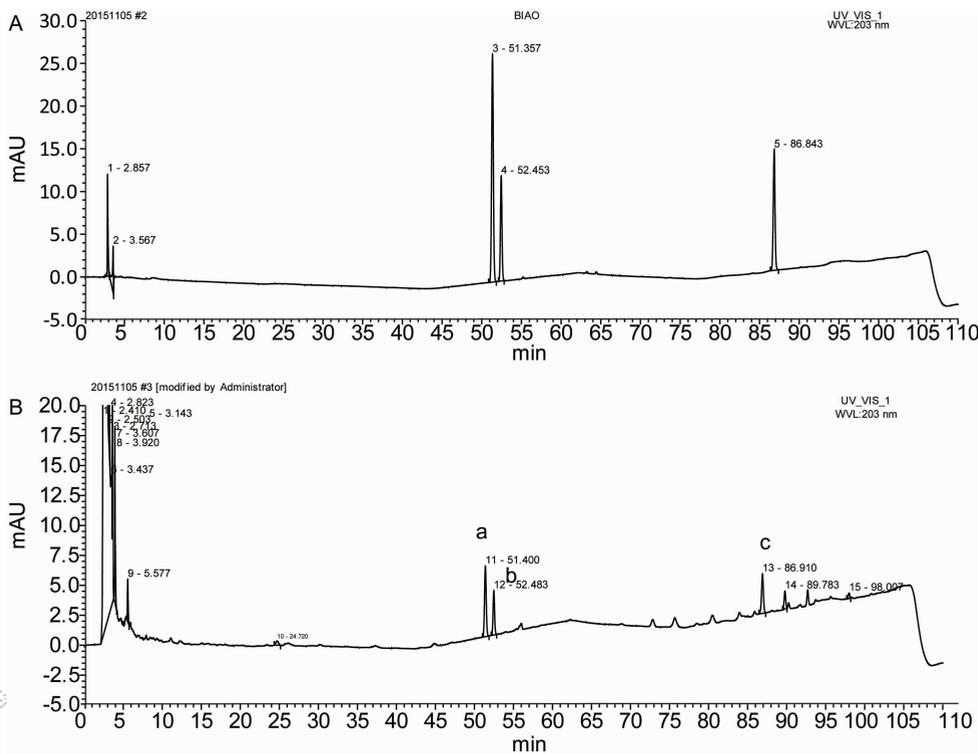
10 高内涵细胞成像系统分析 A549 细胞骨架蛋白 F-actin 水平 0.25% 胰酶消化 A549 细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  cells/L 接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱培养 24 h 贴壁。吸去培养液, 分别于空白组加入无血清培养基; 共培养组加入 TAMs 上清; WEG 各剂量组加入

不同浓度的 WEG 处理 TAMs 上清各 100  $\mu\text{L}$ 。每组设 5 个复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱培养 48 h 后弃去上清, 加多聚甲醛 200  $\mu\text{L}$ , 常温孵育 30 min 固定, 弃去固定液后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的  $1 \times$  Wash Buffer 重复清洗 2 次, 弃去 Wash Buffer 加入 100  $\mu\text{L}$  的  $1 \times$  permeability Buffer 室温孵育 15 min, 弃去 permeability Buffer 加入 100  $\mu\text{L}$  的  $1 \times$  Blocking Buffer 室温孵育 15 min, 弃去 Blocking Buffer 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  的一抗 F-actin 探针和 DAPI 溶液室温孵育 1 h, 弃去溶液每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的  $1 \times$  Wash Buffer 重复清洗 3 次, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$   $1 \times$  Wash Buffer 待测, 高内涵筛选 (high content screening, HCS) 拍摄细胞荧光图, 应用 HCS 分析系统对细胞骨架面积和微丝数进行统计。

11 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验; 多组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 人参质量鉴定—高效液相色谱图 (图 1) HPLC 检测人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb1 含量。标准品含量峰尖锐无其他杂峰, 表明标准

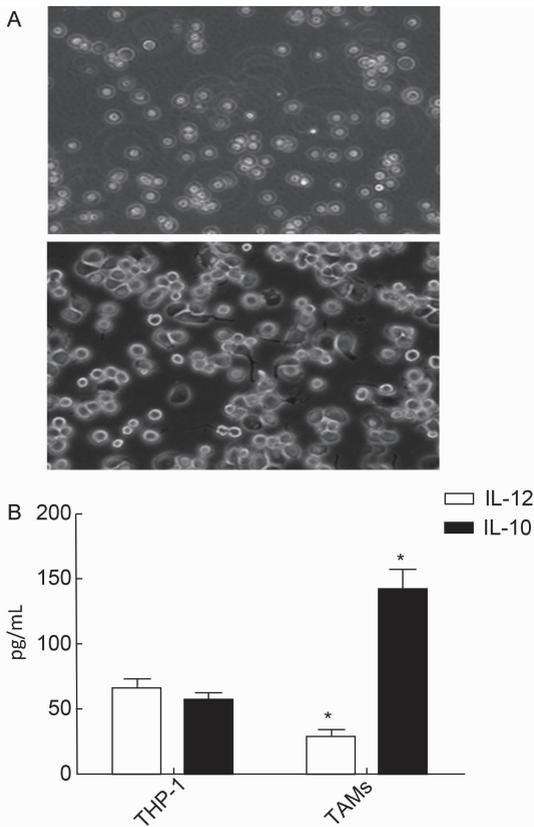


注: A 为标准品; B 为供试品; a 为人参皂苷 Rg1; b 为人参皂苷 Re; c 为人参皂苷 Rb1

图 1 标准品与供试品高效液相色谱图

品纯度高无杂物。供试品的含量峰较标准品低且于同一时间出现,周围有较少小杂峰。计算得 Rg1、Re、Rb1 含量为 1.0%、1.4%、1.2%,均符合药典标准。

2 TAMs 模型鉴定(图 2) 利用倒置显微镜观察细胞形态,THP-1 细胞为悬浮细胞,经诱导贴壁后为 TAMs 细胞。与 THP-1 细胞比较,诱导后的 TAMs 细胞 IL-10 表达水平明显升高,IL-12 表达水平降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明模型诱导成功。



注:A 为细胞形态图( $\times 20$ );上图为 THP-1 悬浮细胞,下图为诱导后 TAMs 细胞;B 为两组 IL-10 及 IL-12 表达水平,  $n=5$ ;与 THP-1 细胞比较,  $*P < 0.01$

图 2 TAMs 模型细胞形态图及各组细胞因子含量比较

3 各组 A549 细胞增殖抑制率比较(表 1) 与空白组比较,A549 + WEG 组细胞增殖抑制率降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ )。与空白组比较,共培养组 A549 细胞增殖水平增加( $P < 0.01$ );与共培养组比较,A549 + TAMs + WEG A549 组细胞增殖受抑制,且呈量效关系( $P < 0.01$ )。

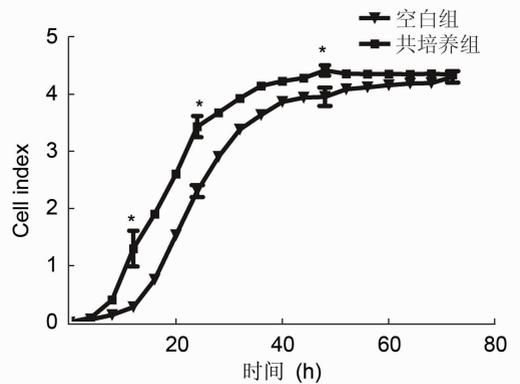
4 各组 A549 细胞迁移水平比较(图 3、4) 与空白组比较,共培养组 A549 细胞迁移能力明显升高,12、24、48 h 各时间点比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与共培养组比较,WEG 各剂量组 A549 细胞

迁移能力明显降低,于 24 h 后有明显差异,且呈量效关系( $P < 0.01$ )。

表 1 各组 A549 细胞增殖抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

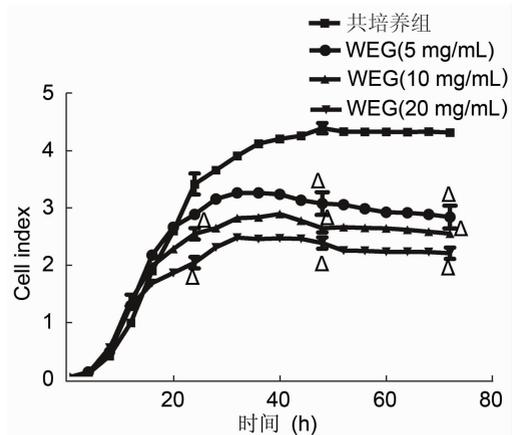
组别	n	WEG 浓度 (mg/mL)	抑制率 (%)
空白组	5	0	$0 \pm 0.109$
A549 + WEG	5	5	$-6.359 \pm 0.038^*$
	5	10	$-9.719 \pm 0.019^*$
	5	20	$-17.069 \pm 0.064^*$
共培养	5	0	$-9.613 \pm 1.385^*$
	5	5	$10.723 \pm 0.020^\Delta$
	5	10	$21.289 \pm 0.009^\Delta$
	5	20	$45.502 \pm 0.062^\Delta$

注:与空白组比较,  $*P < 0.01$ ;与共培养组比较,  $^\Delta P < 0.01$



注:与空白组比较,  $*P < 0.05$

图 3 共培养体系对 A549 细胞迁移影响的时效关系图 ( $n=3$ )



注:与共培养组比较,  $^\Delta P < 0.01$

图 4 WEG 对共培养体系中 A549 细胞迁移的时效关系图 ( $n=3$ )

5 各组 A549 细胞骨架蛋白 F-actin 表达水平比较(图 5、6) 与空白组比较,共培养组 A549 细胞骨架微丝数量增加且结构发生重排,骨架面积增大

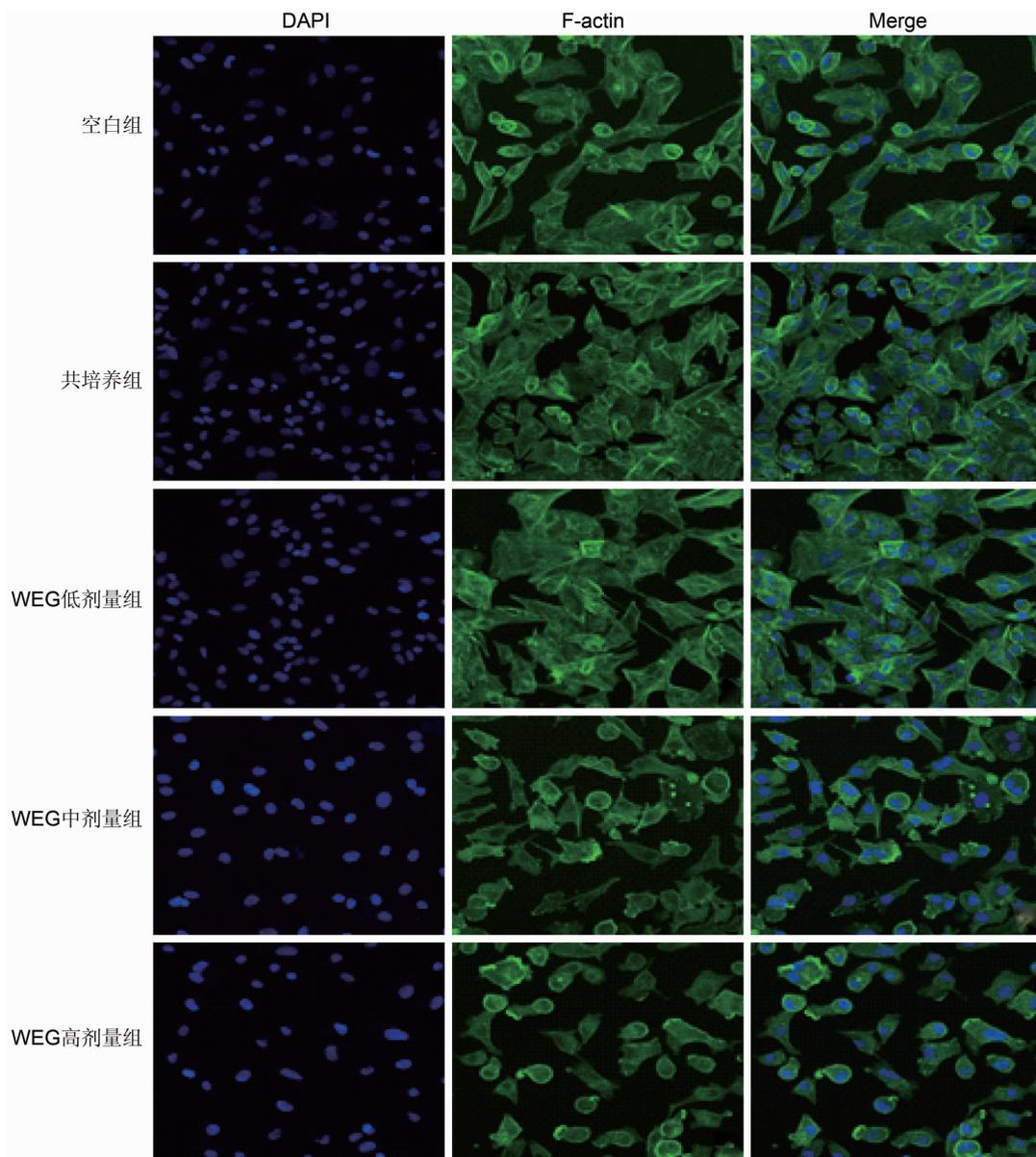
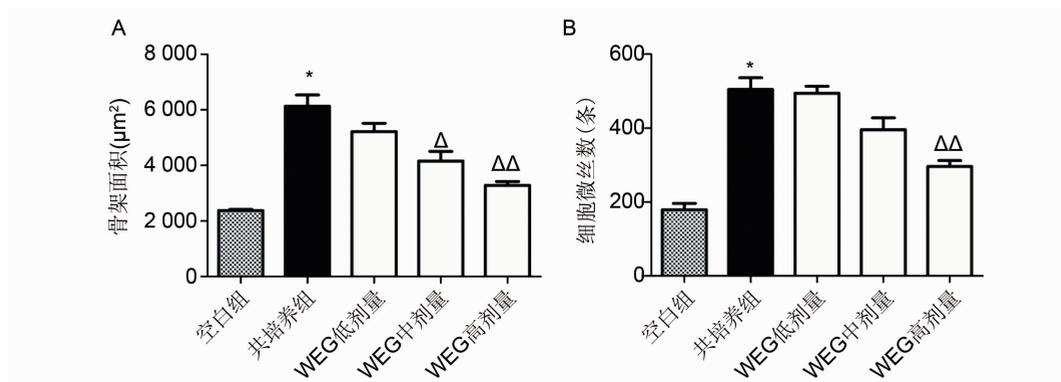


图 5 各组 A549 细胞骨架蛋白 F-actin 表达荧光图 (×100)



注:与空白组比较, \* $P < 0.01$ ;与共培养组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

图 6 各组 A549 细胞骨架面积及微丝数比较 (n = 5)

( $P < 0.01$ )。与共培养组比较, WEG 各剂量组 A549 细胞微丝肌动蛋白 F-actin 表达减少, 骨架结构重排且面积明显减少, 微丝条数亦减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## 讨 论

肿瘤的发生多因正气不足、脏腑阴阳失调, 再受外邪致病, 最终气血阴阳紊乱、正气亏虚, 从而形成有利于肿瘤发生、发展的微环境, 因而益气扶正法成为中医治疗恶性肿瘤的主要法则之一<sup>[11,12]</sup>。人参作为益气扶正代表药且在临床肿瘤治疗中常用。郭玉明等<sup>[13]</sup>采用一维敏感字频数统计分析常用中药的用药频率, 结果显示, 人参、黄芪等补益药为治疗肺癌的首要核心药物。目前研究表明, 人参主要通过调节机体免疫系统在肿瘤治疗中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。TAMs 作为肿瘤免疫微环境中主要免疫细胞, 在肿瘤的发生、发展中起着重要的促进作用。与此同时, 肿瘤细胞通过表达免疫抑制因子调节免疫细胞, 使其表型改变免疫功能降低, 从而形成肿瘤免疫微环境的稳态。本文采用上清共培养方法, 构建 TAMs 与 A549 细胞共培养模型, 模拟肿瘤免疫微环境, 从而进一步研究人参抗肿瘤作用机制。

本实验结果显示, 共培养组 A549 细胞明显增殖, 迁移能力增强, 骨架微丝蛋白 F-actin 发生重排, 细胞骨架结构改变, 提示 TAMs 分泌于上清的细胞因子刺激 A549 细胞增殖和转移, 表明在模拟的肿瘤免疫微环境中促进了肿瘤细胞生物学行为。WEG 各剂量组 A549 细胞增殖明显抑制, 迁移能力显著降低, 骨架面积微丝条数减少, 提示 WEG 可能通过调节 TAMs 细胞因子改变其表型, 使其炎症因子分泌增多, 从而抑制 A549 细胞增殖迁移。MTT 实验中将 WEG 直接作用于 A549 细胞表现为促增殖, 可能与 WEG 中含有大量多糖成分有关, 肿瘤细胞可能通过转化多糖作为能量促进生长, 也可能与水提液中某些物质刺激了肿瘤相关的细胞生长因子有关, 进一步说明 WEG 对肿瘤细胞无直接细胞毒性作用, 而是通过调节模拟的免疫微环境发挥肿瘤治疗作用。

以上结果表明, 人参可能是通过调节 TAMs 影响肿瘤细胞的生物学行为。研究提示, 人参水提液中主要成分为多糖和皂苷, 但在肿瘤的治疗过程中其各自对免疫微环境的调节机制尚不明确, 有待进一步研究证实。

## 参 考 文 献

[1] 李红娟, 祁红霞, 张艳林. 中西医结合治疗晚期癌症疼痛

患者的临床观察及护理[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(12): 116-118.

[2] 谢守泳. 针刺联合益气养阴汤治疗晚期食管癌的临床价值探讨[J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(2): 242-244.

[3] Jiao LL, Zhang XY, Li B. Anti-tumor and immunomodulatory activities of oligosaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer [J]. Int J Biol Macromolec, 2014, 65(4): 229-233.

[4] Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis [J]. Cell, 2010, 141(1): 39-51.

[5] 陈阿丽, 崔永霞. 正交试验法优选人参水提工艺[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(9): 21-22.

[6] Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: A multi-facetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation [J]. Experientia, 1991, 47(1): 22-31.

[7] Aarons CB, Bajenova O, Andrews C, et al. Carcinoembryonic antigen-stimulated THP-1 macrophages activate endothelial cells and increase cell-cell adhesion of colorectal cancer cells [J]. Clin Exp Metastasis, 2007, 24(3): 201-209.

[8] Caris I, Tucureanu C, Lerescu L. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: *in vitro* models of macrophage-tumor environment interaction [J]. Tumori, 2011, 97(5): 647-654.

[9] Chen J, Pan TH, Devendran BD, et al. Analysis of inter-/intra-E-plate repeat ability in the real-time cell analyzer [J]. Anat Biochem, 2015, 477(2): 98-104.

[10] Ye JL, Luo Y, Fang WJ, et al. Real-time cell analysis for monitoring cholera toxin-induced human intestinal epithelial cell response [J]. Curr Microbiol, 2015, 70(4): 536-543.

[11] Zhen Z, Liu SY, Cai CJ. Traditional Chinese medicine syndrome related herbal prescriptions in treatment of malignant tumors [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(1): 19-26.

[12] 朱大鹏, 王实, 刘永军. 扶正固本汤对恶性肿瘤化疗后临床疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 12(32): 3053-3057.

[13] 郭玉明, 姜森, 郑光, 等. 基于文本挖掘技术分析治疗肺癌的中医用药规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 277-280.

(收稿: 2015-12-23 修回: 2016-06-19)