

三叶青提取物对人肺癌 H1299 细胞凋亡的影响及机制研究

钟良瑞¹ 林 霜¹ 陈伟芳¹ 魏克民²

摘要 **目的** 探讨三叶青提取物对人肺癌 H1299 细胞增殖抑制、凋亡作用及其机制。**方法** 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 检测三叶青提取物对 H1299 细胞增殖的抑制作用;采用倒置显微镜观察三叶青提取物对 H1299 细胞形态的影响;荧光显微镜观察三叶青提取物作用细胞后经 Hoechst 33258 染色的凋亡形态变化;流式细胞仪检测细胞凋亡率;蛋白印迹法 (Western blot) 检测 pro-caspase-3、9, cle-caspase-3、9, poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 蛋白表达变化。**结果** 与对照组比较,浓度为 0.5、1、5、10 mg/mL 三叶青提取物作用 H1299 细胞后抑制率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);同时作用时间越长,抑制率越高 ($P < 0.01$)。倒置显微镜下观察给药后细胞形态明显改变,细胞减少;荧光显微镜下观察荧光染色后细胞核浓染和凋亡小体形成。流式细胞仪检测结果显示细胞凋亡率呈明显的量-效关系。Western blot 结果表明:与对照组比较,浓度为 5、10 mg/mL 三叶青提取物明显抑制 H1299 细胞中 pro-caspase-3、9 和 PARP 蛋白表达,增加 cle-caspase-3、9, cle-PARP 蛋白的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 三叶青提取物对人肺癌 H1299 细胞具有明显抑制其增殖,促进细胞凋亡作用,且其机制可能与激活 caspase 蛋白表达有关。

关键词 三叶青;人肺癌细胞;增殖;凋亡

Effect of Extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* on Apoptosis of Human Lung Carcinoma H1299 Cells and Its Mechanism Study ZHONG Liang-rui¹, LIN Shuang¹, CHEN Wei-fang¹, and WEI Ke-min² 1 Department of Oncology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310012), China; 2 Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310007), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* on the proliferation and apoptosis of human lung carcinoma H1299 cells, and to explore its mechanisms. **Methods** H1299 cells were treated with the extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* in different concentrations at different time points. Its inhibition on H1299 cell proliferation was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The morphology of the H1299 cell was observed by inverted microscope. Changes of apoptosis were observed by Hoechst 33258 methods. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. Expression changes of apoptosis-related proteins pro-caspase-3, pro-caspase-9, cle-caspase-3, cle-caspase-9, and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the inhibition rate of H1299 cells increased after acted by 0.5, 1, 5, and 10 mg/mL extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The longer the acting time, the higher the inhibition rate ($P < 0.01$). Under inverted microscope, typical morphological changes could be seen and the number of H1299 cells was reduced. Under fluorescence microscope, dark stained nucleus and formed apoptotic body could be observed. Results of flow cytometry showed that the apoptosis rate was obviously dose-effect correlated with the concentration of extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani*. Results of Western blot indicated that compared with the control group, the protein expression of pro-caspase-3, pro-caspase-9, and PARP were down-regulated and that of cle-caspase-3, cle-

基金项目:浙江省科技计划项目 (No. 2008F3036);浙江省科技厅科研院所专项基金资助项目 (No. 011F10068)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属省立同德医院肿瘤内科 (杭州 310012); 2. 浙江省中医药研究院 (杭州 310007)

通讯作者:魏克民, Tel: 0571-88849080, E-mail: wkmcyzy@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1354

caspase-9, and cle-PARP were up-regulated by 5 and 10 mg/mL extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* ($P < 0.05$). **Conclusions** Extract of *Radix Tetrastigma hemsleyani* had obvious effect in inhibiting the proliferation and inducing apoptosis of human lung carcinoma H1299 cells, which might be achieved by activating the expression of caspase protein.

KEYWORDS *Radix Tetrastigma hemsleyani*; human lung carcinoma cell; proliferation; apoptosis

近年来,肺癌已严重威胁人类的生命及生活质量,其发病率、病死率逐年上升^[1]。临床使用的抗肿瘤药物大多存在不良反应,影响患者生活质量^[2]。目前中药及其有效成分的抗肿瘤作用已成为研究热点。三叶青具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的作用,用于治疗高热惊厥、肺炎、哮喘、肝炎等病症^[3],其抗肿瘤作用亦越来越受到关注。因此,本实验探讨三叶青提取物对非小细胞肺癌的体外抑制增殖、促进凋亡及其作用机制具有可行性和重要意义。

材料与方法

1 细胞株 人肺癌细胞 H1299 细胞株由浙江省医学科学院提供。细胞株由浙江中医药大学实验室培养传代。

2 药物 三叶青产地浙江,购自杭州华东中药饮片有限公司,批号:120110;500 g 三叶青经乙酸乙酯提取 3 次,低温真空回收,旋转蒸发仪上浓缩成约 10 g 药液,置 -20℃ 冰箱备用。

3 主要试剂 胎牛血清由美国 Hyclone 公司提供,批号:SH30070.03;RPMI-1640 培养液由杭州吉诺生物医药技术有限公司提供,批号:GNM31800-S;CCK-8 由日本同仁化学研究所提供,批号:CK04;Hoechst 33258 染色液由碧云天生物技术研究提供,批号:C1011;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒由南京凯基生物技术有限公司提供,批号:KGA108。caspase-3(批号:9665),caspase-9(批号:9508),cle-caspase-3(批号:9664),cle-caspase-9(批号:7237),PARP(批号:9532),由美国 CST 公司提供。

4 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司,型号:3111);酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:3001);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:FACSCanto II);蛋白印记检测系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:ChemiDoc XRS System);荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:IX71)。

5 检测指标与方法

5.1 细胞培养 将 H1299 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,培养条件均为 37℃、

含 5% CO₂ 的细胞培养箱内。待细胞长满瓶底后,弃掉培养液,用胰酶消化,镜下观察到细胞分离变圆、细胞间隙增大后,停止消化,更换培养液,分瓶培养,取对数生长期细胞用于实验。

5.2 不同浓度三叶青提取物对 H1299 细胞增殖的影响 采用细胞增殖抑制试验。用细胞增殖与活性检测试剂盒 Cell Counting Kit-8(CCK-8)的方法检测细胞增殖情况。取对数生长期的 H1299 细胞,用 0.25% 胰酶消化,计数细胞密度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液,每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板,次日贴壁后更换培养液并加浓度为 0.5、1、5、10 mg/mL 三叶青提取物,对照组不含药物,分 5 组,每组设 6 个重复复孔,分别在 24、48、72 h 检测,450 nm 为检测波长,计算每组各孔吸光度 OD 值。抑制率(%) = $1 - (\text{OD 实验组} / \text{OD 对照组}) \times 100\%$ 。对照组抑制率为 0%。计算三叶青提取物对 H1299 细胞的抑制率。

5.3 不同浓度三叶青提取物处理 H1299 细胞的形态学变化 采用普通倒置显微镜观察法:将 H1299 细胞用 0.25% 胰酶消化,每孔 500 μ L 细胞悬液接种于 24 孔板中(5×10^4 /mL),次日细胞贴壁后,加浓度为 1、5、10 mg/mL 三叶青提取物,对照组不含药物,继续培养 48 h 后用倒置显微镜观察各组的不同变化。

5.4 不同浓度三叶青提取物对 H1299 细胞凋亡形态的影响 采用荧光显微镜观察凋亡细胞形态:细胞经浓度为 1、5、10 mg/mL 三叶青提取物处理 48 h 后,吸除培养液;加入多聚甲醛固定 15 min;PBS 漂洗 2 次;加入 Hoechst 33258 荧光染液,避光染色 5 min;PBS 漂洗 3 次,荧光显微镜观察细胞核的形态。

5.5 不同浓度三叶青提取物作用 H1299 细胞后凋亡率比较 采用流式细胞术检测细胞凋亡率。取对数生长期 H1299 细胞,制成 1×10^5 /mL 细胞悬液接种于 6 孔板;2 mL 细胞悬液每孔。次日细胞贴壁后,加浓度为 1、5、10 mg/mL 三叶青提取物,对照组不加药物,作用于细胞 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,终止,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,收集细胞数约 2×10^5 个,加入 500 μ L 的结合缓冲液 Bind Buffer 悬浮细胞,先后加入 5 μ L Annexin

V-FITC 和 5 μL PI,混匀后室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪检测分析,激发波长为 488 nm。

5.6 不同浓度三叶青提取物处理后 H1299 细胞凋亡相关蛋白的影响 采用蛋白印迹法(Western blot)方法检测。冰上操作,快速刮下细胞,移至 1.5 mL离心管。每瓶细胞加 250 ~ 500 μL RIPA 裂解液,1 200 r/min 离心 5 min,收获蛋白,测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉室温下封闭 1 h,一抗室温孵育 2 ~ 3 h,二抗室温孵育 1 h。室温下,ECL 混合液滴加在 PVDF 膜上,避光反应 3 ~ 5 min,放入蛋白印记检测系统的暗箱内,在暗室中,曝光、显影、定影。以 β -actin 作为内参进行分析。

6 统计学方法 用 SPSS 13.0 统计软件分析处理。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 Dunnett 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

结 果

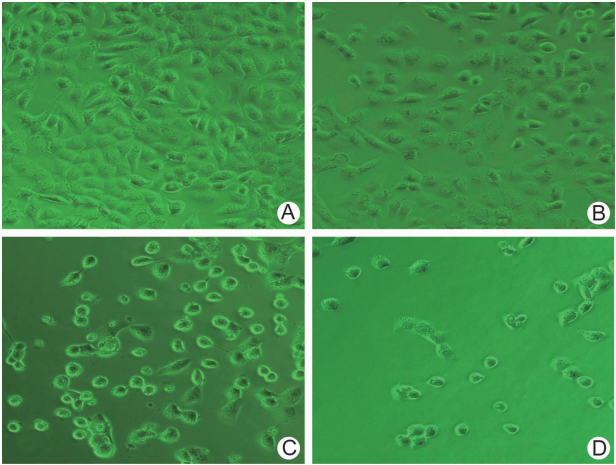
1 不同浓度三叶青提取物对 H1299 细胞抑制率的影响(表 1) 三叶青提取物对 H1299 细胞有明显增殖抑制作用,随浓度的增加、时间延长,抑制率逐渐增高,呈剂量、时间依赖性。与对照组比较,0.5、1、5、10 mg/mL 三叶青提取物作用 H1299 细胞后抑制率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);同时作用时间越长,抑制率越高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 三叶青提取物对 H1299 细胞抑制率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞增殖的抑制率		
		24 h	48 h	72 h
对照	6	0	0	0
三叶青提取物 0.5 mg/mL	6	3.95 $\pm$ 0.75 *	9.21 $\pm$ 0.89 ** Δ	21.46 $\pm$ 1.02 ** Δ
1 mg/mL	6	11.24 $\pm$ 1.64 **	20.54 $\pm$ 0.83 ** Δ	42.75 $\pm$ 1.04 ** Δ
5 mg/mL	6	24.30 $\pm$ 0.68 **	45.25 $\pm$ 1.15 ** Δ	70.31 $\pm$ 1.18 ** Δ
10 mg/mL	6	44.83 $\pm$ 1.66 **	64.46 $\pm$ 1.40 ** Δ	76.25 $\pm$ 1.37 ** Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.01$

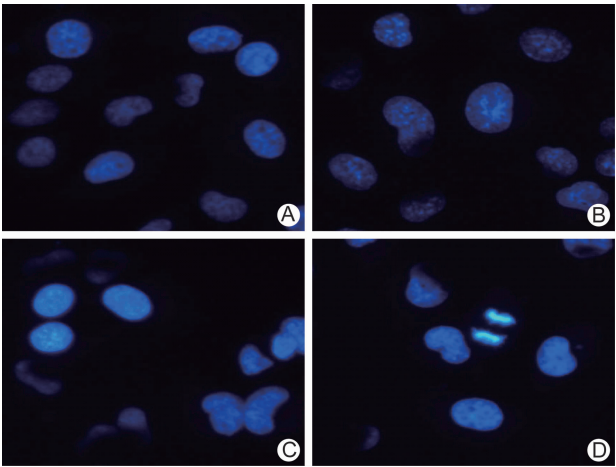
2 不同浓度三叶青提取物处理后 H1299 细胞的形态学比较(图 1) 三叶青提取物作用于 H1299 细胞 48 h 后,对照组细胞生长良好,均贴壁生长,分布均匀(图 1A)。1 mg/mL 三叶青提取物作用后,有部分细胞漂浮、部分贴壁细胞呈圆形(图 1B);自 5 mg/mL 开始细胞出现明显的变化,细胞变圆、变小、胞膜皱缩,悬浮细胞明显增多(图 1C);10 mg/mL 高浓度组细胞抑制最明显,正常细胞少见(图 1D)。



注:A 为不加药对照组;B 为三叶青提取物 1 mg/mL 组;C 为三叶青提取物 5 mg/mL 组;D 为三叶青提取物 10 mg/mL 组

图 1 不同浓度三叶青提取物作用于 H1299 细胞 48 h 的形态学变化 ($\times 100$)

3 不同浓度三叶青提取物对 H1299 细胞凋亡形态的影响(图 2) 正常细胞呈弥散均匀的荧光,当细胞发生凋亡时,由于染色质固缩而浓染使细胞内的荧光强度增强。实验结果表明:对照组细胞呈均匀蓝色荧光(图 2A);三叶青提取物 1 mg/mL 低浓度组细胞核颜色稍亮(图 2B);5 mg/mL 中浓度组部分细胞核呈致密浓染,颜色发亮(图 2C);10 mg/mL 高浓度组细胞凋亡最明显,部分细胞核亮蓝色浓集、边缘化(图 2D)。随着药物浓度的增加,细胞凋亡现象逐渐明显。



注:A 为不加药对照组;B 为三叶青提取物 1 mg/mL 组;C 为三叶青提取物 5 mg/mL 组;D 为三叶青提取物 10 mg/mL 组

图 2 不同浓度三叶青提取物作用于 H1299 细胞 48 h 的荧光凋亡形态图(Hoechst33258, $\times 200$)

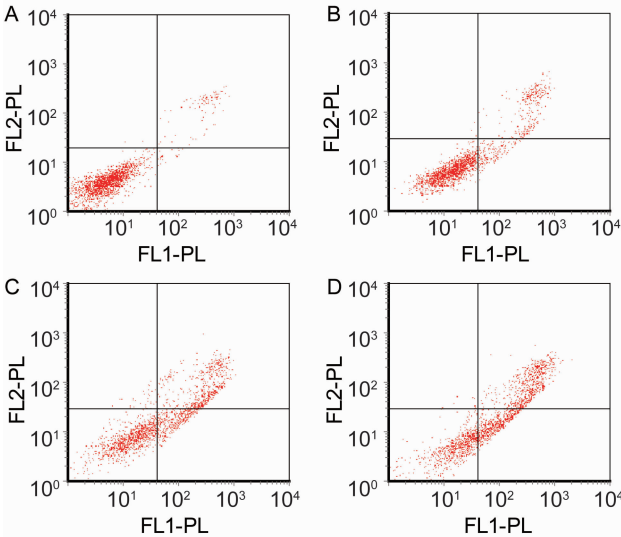
4 流式细胞仪检测三叶青提取物对 H1299 细胞凋亡的影响(表 2,图 3) 与对照组比较,经药物

处理 48 h 后细胞凋亡的比例均有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),且呈现一定的剂量 - 效应关系。

表 2 三叶青提取物作用于 H1299 细胞 48 h 后
凋亡率的比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡率
对照	6	4.59 ± 0.34
三叶青提取物 1 mg/mL	6	21.62 ± 0.39 *
5 mg/mL	6	47.66 ± 1.33 *
10 mg/mL	6	64.47 ± 1.91 *

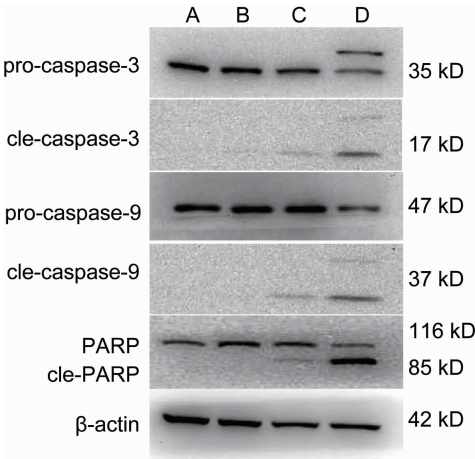
注:与对照组比较, * $P < 0.01$



注:A 为不加药对照组;B 为三叶青提取物 1 mg/mL 组;C 为三叶青提取物 5 mg/mL 组;D 为三叶青提取物 10 mg/mL 组

图 3 流式细胞仪检测不同浓度三叶青提取物
对 H1299 细胞凋亡的影响

5 不同浓度三叶青提取物对 H1299 细胞相关凋亡蛋白表达的影响 (表 3、图 4) 与对照组比较,5、10 mg/mL 三叶青提取物对 pro-caspase-3、9, PARP 蛋白表达明显降低,但对 cle-caspase-3、9, cle-PARP 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A 为不加药对照组;B 为三叶青提取物 1 mg/mL 组;C 为三叶青提取物 5 mg/mL 组;D 为三叶青提取物 10 mg/mL 组

图 4 不同浓度三叶青提取物处理细胞 48 h 后
H1299 细胞蛋白表达电泳图

讨 论

肺癌发病率高,病因及发病机制复杂。肿瘤细胞学研究表明肺癌的发生是由细胞增殖与凋亡的调节失控引起^[4]。目前中药的抗癌机制研究已取得重大突破,尤其在肺癌细胞增殖的调控与诱导细胞凋亡两方面^[5]。三叶青为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤,具有清热解毒、祛风化痰、活血化瘀、抗炎镇痛等作用^[6];抗肿瘤方面三叶青对肺癌、肝癌、胃癌等具有良好治疗效果^[7,8]。因此,本实验深入研究三叶青提取物抗肺癌的机制具有重要意义。

本实验通过体外实验 CCK-8 证实:三叶青乙酸乙酯提取物能抑制人肺癌细胞株 H1299 的增殖,且具有浓度、时间依赖性,其中三叶青提取物浓度为 10 mg/mL、作用时间为 72 h 时,对细胞的抑制率最高,表明三叶青提取物能够明显抑制肺癌细胞的增殖。细胞凋亡是一种程序性的细胞死亡,是机体生长发育、细胞分化和病理状态中细胞自主死亡的过程,并通过分子水平进行调控,在肿瘤发生发展中起重要作用^[9]。本研究通过流式细胞术 Annexin V-FITC 和 PI

表 3 各组 caspase-3、9 及 PARP 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	pro-caspase-3	cle-caspase-3	pro-caspase-9	cle-caspase-9	PARP	cle-PARP
对照	3	1.79 ± 0.12	0.46 ± 0.03	2.09 ± 0.16	0.47 ± 0.03	1.67 ± 0.13	0.41 ± 0.04
三叶青提取物 1 mg/mL	3	1.43 ± 0.09	0.51 ± 0.05	1.97 ± 0.14	0.53 ± 0.04	1.69 ± 0.12	0.56 ± 0.06
5 mg/mL	3	0.97 ± 0.07 *	0.65 ± 0.06 *	1.59 ± 0.12 *	0.71 ± 0.06 *	1.07 ± 0.08 *	0.78 ± 0.06 *
10 mg/mL	3	0.75 ± 0.05 *	0.87 ± 0.07 *	0.93 ± 0.09 *	0.92 ± 0.06 *	0.67 ± 0.05 *	1.27 ± 0.08 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

双染,显示三叶青提取物能够诱导肺癌 H1299 细胞的凋亡,且与浓度呈正相关性。在荧光显微镜下观察经 Hoechst33258 染色后的 H1299 细胞出现形态学上的改变,凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,颜色发亮,出现增强的蓝色荧光,部分细胞核中出现新月状亮蓝色荧光边集于核膜下。诱导细胞凋亡是多数抗肿瘤药物的主要机制,本研究证实三叶青提取物可以明显诱导肺癌 H1299 细胞的凋亡。

细胞凋亡途径主要包括死亡受体介导的外源性途径和线粒体参与的内源性途径^[10,11]。其固有途径是通过线粒体蛋白质的释放引起的,如细胞色素 C,与 Apaf-1 及 procaspase-9 结合形成凋亡体;凋亡体诱导激活 caspase-9 和 caspase-3 从而启动细胞凋亡的 caspase 级联反应,导致细胞凋亡^[12,13]。完整的 caspase-3 和 caspase-9 没有活性,当其发生剪切后激活;细胞凋亡执行阶段时 PARP 被 caspase 降解,caspase-3 是降解 PARP 最有效的酶^[14]。PARP 参与调控细胞染色体结构稳定,还参与凋亡的调控。细胞凋亡执行阶段时 PARP 蛋白被降解,可以避免在凋亡细胞中不必要的 DNA 修复,促使核降解,使凋亡顺利进行。中药三叶青能有效抑制体外 HL60 细胞的增殖,诱导其凋亡^[15]。李华美等^[16]研究发现,三叶青提取物能抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞的生长,可能与上调 caspase-3 从而促进肿瘤细胞凋亡有关。本次实验通过 Western blot 检测结果显示与对照组比较,随三叶青提取物浓度增加,pro-caspase-3、9 和 PARP 蛋白表达降低,cle-caspase-3、9,cle-PARP 蛋白表达增加,提示三叶青提取物通过激活 caspase 蛋白诱导 H1299 细胞凋亡。

综上所述,三叶青乙酸乙酯提取物对肺癌 H1299 细胞具有抑制增殖和促进凋亡作用,通过降低 pro-caspase-3、9 和 PARP 蛋白,增加 cle-caspase-3、9 和 cle-PARP 蛋白,激活 caspase 蛋白可能是其凋亡机制之一。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] 赵兴,王立平,刘晓刚,等. 康艾注射液减轻恶性肿瘤放、

化疗毒性反应的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 756-757.

- [3] 丁刚强,郑军献,维克民,等. 三叶青提取物对肝癌细胞 HepG₂ 及原代大鼠肝细胞的体外毒作用研究[J]. 浙江预防医学, 2005, 17(9): 1-5.
- [4] 柴可群,赵同伟,卢丽琴,等. 中药抑肺饮对肺腺癌细胞 A549 裸鼠移植瘤的抑瘤作用及相关机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 442-446.
- [5] 徐颖扉,张晶,舒琦瑾. 南方红豆杉水提物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡与紫杉醇抑瘤机制不同的研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(6): 1696-1699.
- [6] 杨雄志. 中药三叶青的药理作用与临床应用[J]. 吉林中医药, 2009, 29(6): 517-518.
- [7] 李华美,浦锦宝,郑军献,等. 三叶青乙酸乙酯提取物对小鼠 Lewis 肺癌移植性肿瘤的抑制作用及免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(3): 229-230.
- [8] 冯正权,倪克锋,何煜. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(6): 669-672.
- [9] 陈主初主编. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:20-33.
- [10] Green DR. Apoptotic pathways: Ten minutes to dead[J]. Cell, 2005, 121(5): 671-674.
- [11] Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2950-2966.
- [12] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. Science, 1998, 281(5381): 1312-1316.
- [13] Hellebrand EE, Varbiro G. Development of mitochondrial permeability transition inhibitory agents: a novel drug target[J]. Drug Discov Ther, 2010, 4(2): 54-61.
- [14] 代群,陈哲,葛宇清,等. 桔梗皂苷 D 诱导人肺癌细胞 A549 的凋亡及机制[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2626-2629.
- [15] 徐彩菊,吴平国,姚亚萍,等. 三叶青提取物对白血病 HL60 细胞增殖抑制作用研究[J]. 浙江预防医学, 2011, 23(4): 20-22.
- [16] 李华美,魏克民. 三叶青乙酸乙酯提取物对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(9): 112-115.

(收稿:2013-05-04 修回:2014-07-24)