

半夏总生物碱对人肺癌细胞增殖的抑制作用

周 茜¹,唐 瑛²,孙 欢¹,王庆敏²,雷呈祥²(1. 湖北中医药大学,湖北 武汉 430065; 2. 海军医学研究所,上海 200433)

[摘要] 目的 探讨半夏总生物碱(total alkaloids from *Pinellia Ternata*,TATP)对人肺癌细胞株 A549 增殖的影响。方法 采用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolil tetracolum,MTT)比色法以及集落形成率实验,检测不同浓度的 TATP 对 A549 细胞株的生长抑制作用。应用单细胞凝胶电泳分析检测 TATP 导致 A549 细胞的 DNA 损伤情况。结果 人肺癌细胞 A549 经 TATP 处理后,其体外增殖能力明显下降且与药物的剂量、加药时间呈正相关,与对照组比较,差异均有统计学意义。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis,SCGE)中,TATP 组细胞尾 DNA 含量、尾长及尾动量与对照组相比差异显著($P < 0.01$),且呈现浓度依赖性。结论 在体外培养的条件下,TATP 能明显抑制 A549 细胞增殖,其机制可能与 DNA 的损伤作用有关。

[关键词] 半夏总生物碱; A549 细胞株; 细胞增殖抑制; 单细胞凝胶电泳; DNA 损伤

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2013)01-0038-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.011

Proliferation inhibition of total alkaloids from *Pinellia Ternata* in human lung cancer cells

ZHOU Xi¹,TANG Ying²,SUN Huan¹,WANG Qing-min²,LEI Cheng-xiang²(1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine,Wu-han 430065 China; 2. Institute of Naval Medicine,Shanghai 200433 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the proliferation inhibition of total alkaloids from *Pinellia ternate* (TATP) in human lung cancer line A549. **Methods** The proliferation inhibition of human lung cancer cell line A549 treated with TATP was measured with methyl thiazolil tetracolum colorimetric method and plate clone formation assay. The DNA damage of A549 cell induced by TATP was detected with the single cell gel electrophoresis (SCGE). **Results** The proliferation in A549 cell treated with TATP was decreased significantly compared with control group and the proliferation inhibition was positively correlated to the TATP concentration and the reaction time. The difference between the control group and the TATP experimental groups was significant in statistic. Compared with the control group, the tail DNA content, the tail length and the tail movement of the TATP experimental groups were different significantly and presented a dose-effect relationship. **Conclusion** TATP could inhibit the proliferation of A549 cells in vitro, which might be correlated to the DNA damage induced by TAPT.

[Key words] total alkaloids from *Pinellia ternata*; human lung cancer cell strain A549; cell proliferation inhibition; SCGE; DNA damage

半夏为天南星科植物半夏(*Pinellia ternata* (Thunb) Breit)的干燥块茎,可治疗湿痰寒痰,咳喘痰多,心下痞,结胸,呕吐,痈肿痰核等^[1],临床研究发现半夏对食道癌、胃癌、舌癌、皮肤癌及恶性淋巴瘤亦有较好的疗效^[2]。半夏总生物碱(total alkaloids from *Pinellia Ternata*,TATP)是半夏的主要有效成分之一,近年来有报道发现 TATP 具有抗多种恶性肿瘤的作用,如白血病、肝癌等^[3,4],但尚未见 TATP 作用于肺癌细胞的有关报道。本研究采用

TATP 作用于人肺癌 A549 细胞株,探讨 TATP 对人肺癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 半夏总生物碱(total alkaloids from *Pinellia Ternate*,TATP)购自武汉银河化工有限公司,纯度 87%,批号:20110321。用重蒸水配制储备液 10 mg/ml,4℃保存备用。实验时,用培养基稀释至所需浓度。

1.1.2 细胞株 A549 人肺癌细胞株,本室长期培养。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM 培养基(高糖)、胎牛

[基金项目] 全军中医药专项(10A023)。

[作者简介] 周 茜(1987-),女,硕士研究生。E-mail: sunhuan6689@163.com。

[通讯作者] 唐 瑛。E-mail: ying_52033@yahoo.cn。

血清、青链霉素均购自上海生工生物工程股份有限公司;胰蛋白酶购自上海实生细胞生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolil tetracolum,MTT)购自 Amresco 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;染料碘化丙啶(propidium iodide,PI)购自 Sigma 公司;Gimesa 染料,Sigma 分装。酶标仪(Thermo Scientific Multiskan MK3,芬兰),荧光显微镜(Olympus BX-51,日本),倒置显微镜(Olympus CKX41SF,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 肺癌细胞株用含 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养传代。取对数生长期细胞实验。

1.2.2 MTT 法检测不同浓度 TATP 及不同作用时间对肺癌细胞增殖的影响 取对数生长期细胞 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基制成细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μl ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱 24 h 后,除对照组只加培养基外,其余各给药组按实验设计浓度更换含药培养基,TATP 的终浓度分别为 0、2.5、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$ 。每个浓度组设 4 个复孔,分别继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μl ,继续培养 4 h 后终止培养,弃孔内上清液,每孔加入 DMSO 150 μl ,震荡 10 min,使结晶充分溶解。酶标仪测定 490 nm 波长吸光值(A),按下式计算细胞生长抑制率和药物半数抑制浓度(IC_{50}):抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光值} / \text{对照组吸光值}) \times 100\%$; $\text{IC}_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$,其中 X_m 为设计的最大浓度的对数值; i 为各浓度倍比的对数值; ΣP 为各组生长抑制率之和;0.5 为经验常数。

1.2.3 TATP 对 A549 细胞形态的影响 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 / \text{ml}$ 接种于 6 孔板,每孔 1 ml,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后,更换含药培养基,TATP 终浓度分别为 0、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$,继续培养 24 h,在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 集落形成率实验 以每孔 5×10^2 个细胞接种于 24 孔板中,培养箱中培养 24 h 后更换含药培养基,TATP 终浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$,对照组只加培养基,每组重复 6 孔,再培养 24 h,然后将培养液换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,继续培养 12 d 后用 PBS 洗涤细胞,甲醇固定,Giemsa 染液染色,在倒置显微镜下计数各孔集

落数(只计算 50 个细胞以上者),按下式计算集落形成率和相对增殖存活率:集落形成率 = 集落形成数 / 接种细胞数 $\times 100\%$;相对增殖存活率 = 实验组的集落形成数 / 阴性对照组的集落形成数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 单细胞凝胶电泳技术(Single cell gel electrophoresis,SCGE) 采用 Singh 报道的方法并略加改进^[5]。取对数生长期的细胞,以 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 细胞浓度接种于 6 孔板中,培养 24 h,更换含药培养基,TATP 终浓度为 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$,对照组只加培养基。再培养 24 h 后立即收集细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1% 正常熔点琼脂糖 100 μl 滴于洁净的磨砂载玻片上,立即盖上盖玻片,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 10 min,取下盖玻片,取 30 μl $10^6 / \text{ml}$ 细胞 DMEM 悬浮液与 140 μl LMP 琼脂糖迅速混匀,取 70 μl 滴在第一层琼脂糖上,盖上盖玻片放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 12 min,每个样本平行制样 2 个。除去盖玻片,立即浸入预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的裂解液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解 1 h。然后用冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗 2 次,每次 5 min。将载玻片置于预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的碱性电泳液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下解旋 40 min。放置于水平电泳槽中,加入预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的碱性电泳液,25 V,300 mA,室温电泳 20 min。电泳结束后,载玻片置 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 中洗涤 2 次,每次 5 min。再将玻片放入中和液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 中和 15 min。取出,让溶液滴干后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。每块胶上加 50 μl 碘化丙啶(5 mg/L),盖上盖玻片,荧光显微镜下观察、拍照(激发波长 530 nm)。随机选择 100 个细胞,用 CASP 彗星分析软件逐个分析,统计各组细胞彗尾 DNA%、尾长和尾动量。

1.3 统计学处理 计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行 One-Way-ANOVA 分析,各组间均数比较时先进行正态性检验和方差齐性检验,如结果呈正态分布且方差齐,则采用成组 LSD 检验;如结果方差不齐,则采用 DunnettT3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TATP 对细胞增殖的影响 由表 1 可见,与对照组比较,TATP 浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、药物作用时间为 24 h 时无明显差异,其余各组间均有显著性差异($P < 0.05$)。不同浓度的 TATP 能有效地抑制 A549 细胞增殖,随着 TATP 浓度的增加和药物作用时间的延长,抑制作用亦明显增强,且在一定的浓度与时间范围内表现出时效与量效关系。经计算 TATP 作用于人肺癌细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 38.96、31.43、12.15 $\mu\text{g/ml}$ 。

表1 不同浓度 TATP 对 A549 细胞增殖的影响 ($n=4 \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	增殖情况(A 值)			抑制率(%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0.454 \pm 0.031	0.822 \pm 0.024	1.464 \pm 0.023	—	—	—
	2.5	0.420 \pm 0.033	0.749 \pm 0.028 ²⁾	1.242 \pm 0.016 ²⁾	7.48	8.92	15.11
	5	0.392 \pm 0.025 ¹⁾	0.681 \pm 0.022 ²⁾	1.142 \pm 0.011 ²⁾	13.54	17.19	22.09
	10	0.378 \pm 0.037 ²⁾	0.623 \pm 0.019 ²⁾	0.839 \pm 0.022 ²⁾	16.62	24.24	42.73
TATP 组	20	0.314 \pm 0.028 ²⁾	0.536 \pm 0.021 ²⁾	0.362 \pm 0.015 ²⁾	30.88	34.81	75.24
	30	0.291 \pm 0.026 ²⁾	0.424 \pm 0.018 ²⁾	0.205 \pm 0.018 ²⁾	35.92	48.52	86.03
	40	0.220 \pm 0.033 ²⁾	0.256 \pm 0.019 ²⁾	0.196 \pm 0.029 ²⁾	51.54	68.79	86.64
	50	0.208 \pm 0.019 ²⁾	0.168 \pm 0.015 ²⁾	0.182 \pm 0.026 ²⁾	54.23	79.58	87.59

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 细胞形态 人肺癌细胞 A549 为上皮样细胞, 显微镜下观察呈单层生长, 长梭形。对照组细胞饱满, 包浆透亮且细胞轮廓模糊; 随着 TATP 处理浓度的增加, 细胞形状趋于瘦长或呈卵圆形, 体积变小, 轮廓界限越来越明显, 细胞膜完整但胞内空泡增多且胞浆透明度下降, 见图 1。

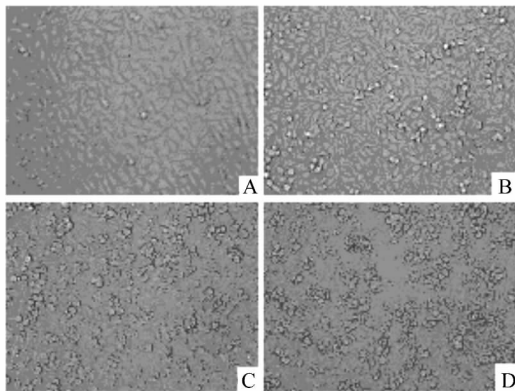


图1 不同浓度的 TATP 对 A549 细胞形态的影响 ($\times 200$)

A-对照组; B-10 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组;
C-20 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组; D-40 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组

2.3 TATP 对细胞集落形成的影响 由表 2 可知, 与对照组比较, 各剂量组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。不同浓度的 TATP 对 A549 细胞集落的形成均有抑制作用, 且随着浓度的增加, 集落形成率和相对增殖存活率明显下降。

表2 不同浓度 TATP 对 A549 细胞集落形成的影响 ($n=6 \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	集落形成数	集落形成率(%)	相对增殖存活率(%)
对照组	0	92.83 \pm 5.56 ¹⁾	18.57	—
TATP 组	10	61.17 \pm 7.96 ²⁾	12.23	65.89
	20	39.17 \pm 7.54 ²⁾	7.83	42.19
	40	14.50 \pm 4.12 ²⁾	2.90	15.62

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.4 TATP 对细胞 DNA 的损伤作用 不同浓度 TATP 对 A549 细胞 DNA 均有不同程度的损伤, 并且随着浓度的增加, 细胞拖尾越来越严重, 见图 2。用 CASP 彗星分析软件进行分析, 结果列于表 3。与对照组相比, 各剂量组间尾 DNA 含量、尾长及尾动量均有极显著性差异 ($P < 0.01$), 且呈现浓度依赖性。

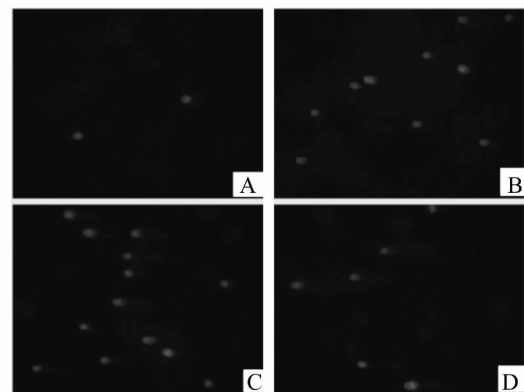


图2 不同浓度的 TATP 作用 A549 细胞拖尾情况

A-对照组; B-10 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组;
C-20 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组; D-40 $\mu\text{g/ml}$ TATP 组

表3 不同浓度 TATP 作用 A549 细胞 24 h 拖尾变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	尾 DNA 含量 (%)	尾长 (μm)	尾动量 (μm)
对照组	0	5.72 \pm 3.65	14.06 \pm 7.17	0.91 \pm 0.24
TATP 组	10	13.30 \pm 3.29 ²⁾	37.29 \pm 11.46 ²⁾	6.37 \pm 3.44 ²⁾
	20	21.57 \pm 6.81 ²⁾	51.38 \pm 19.21 ²⁾	13.51 \pm 6.39 ²⁾
	40	32.42 \pm 8.77 ²⁾	68.45 \pm 18.99 ²⁾	23.43 \pm 9.57 ²⁾

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

目前恶性肿瘤的主要治疗手段是手术、放疗和化疗, 而肿瘤细胞对多种化疗药物产生交叉耐

性又是导致化疗失败的主要原因之一^[6]。大量的实验研究表明,肺癌耐药的产生与肿瘤细胞内降低药物浓度的膜转运蛋白异常、药物靶酶的变化或突变、肿瘤细胞 DNA 损伤修复能力及抗凋亡能力异常等密切相关,而中药对肿瘤细胞内的膜转运蛋白、药物靶酶、肿瘤细胞 DNA 损伤修复能力及抗凋亡能力均有改变作用,可以逆转肿瘤细胞的耐药性^[7-10]。因此,中药在肺癌治疗中的研发与应用越来越受到重视。TATP 作为传统中药半夏的主要活性成分之一,具有很好的抗肿瘤作用。陆跃鸣等^[3]研究表明 5 种不同炮制品的 TATP 对慢性髓性白血病细胞(K562)的生长均有抑制作用。陈芳等^[4]研究发现随着 TATP 浓度的增加和加药时间的延长,其对入肝癌细胞 Bel-7402 的增殖抑制作用逐渐增强。本实验研究发现 TATP 能抑制人肺癌 A549 细胞的增殖,降低集落形成率,并对细胞 DNA 具有损伤作用。

本实验中用不同浓度的 TATP(2.5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理 A549 细胞,MTT 结果显示,与对照组相比,TATP 对肺癌细胞的增殖具有明显抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随着 TATP 浓度的增加、加药时间的延长,细胞增殖抑制率增加。其中,TATP 作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为:38.96、31.43、12.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$,提示较低的药物浓度也能达到较好的癌细胞增殖抑制作用。肿瘤细胞具有无限制的自我更新能力,药物干涉影响细胞集落的形成,这与肿瘤细胞的增殖、转移密切相关。因此我们又检测了 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TATP 对 A549 细胞集落形成的影响,发现 TATP 对肺癌细胞集落的形成有抑制作用,且随着剂量的增加,集落形成率和相对增殖存活率明显下降,进一步验证了 TATP 对人肺癌细胞增殖具有抑制作用。

单细胞凝胶电泳是一种高灵敏度的 DNA 断裂检测技术,广泛应用在细胞 DNA 的损伤与修复、遗传毒理、环境监测以及氧化应激和细胞凋亡等研究中^[11-14]。本实验研究结果表明,10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TATP 作用 24 h 后,与对照组相比,TATP 组尾 DNA 含量、尾长及尾动量均有极显著差异($P < 0.01$),并随着药物浓度的增加,DNA 损伤程度亦增强。

综上所述,半夏生物碱对人肺癌细胞 A549 具有明显的增殖抑制作用,并具有一定的剂量-效应关

系。其抑制作用可能通过损伤癌细胞的 DNA 来阻止细胞的分裂,增加细胞的凋亡,达到抑制癌细胞生长,但其作用的具体分子机制及体内作用情况尚待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版. 一部[S]. 2010:110.
- [2] 陈凌云,杨国祥. 半夏药理研究概况[J]. 云南中医学院学报,1997,20(4):17.
- [3] 陆跃鸣,吴皓,王耿. 半夏各炮制品总生物碱对慢性髓性白血病细胞(K562)的生长抑制作用[J]. 南京中医药大学学报,1995,11(2):84.
- [4] 陈芳,唐瑛,文晔,等. 半夏生物碱对人肝癌细胞 Bel-7402 的生长抑制作用[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(10):83.
- [5] Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis[J]. Mutation Res, 2000, 455(1-2): 111.
- [6] 燕平,李志玖,骆志国. 藤梨根提取物对人食管癌 Eca-109 细胞生长和凋亡的调节[J]. 肿瘤学杂志,2009,15(7):635.
- [7] Li XQ, Li J, Shi SB, et al. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy[J]. Int J Biol Markers, 2009, 24(4): 230.
- [8] 蒋亦燕,尹丽慧,费正华,等. 去甲斑蝥酸钠对耐顺铂肺腺癌 A549/DDP 细胞耐药相关基因表达的影响[J]. 中药药理与临床,2009,25(5):37.
- [9] 梁莉,刘叙仪,王洁,等. 马蔺子素对耐顺铂人肺腺癌细胞系 A549/DDP 耐药逆转及可能的机制[J]. 中华医学杂志,2001,81(22):1392.
- [10] 冯觉平,孔庆志,黄涛,等. 三氧化二砷逆转人肺腺癌 A549/R 细胞耐药及对 GSTs 表达的影响[J]. 肿瘤防治研究,2005,32(8):493.
- [11] 张梅春,赵子文,曾军,等. 姜黄素对耐顺铂人肺腺癌细胞 Survivin 表达及其化疗敏感性的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2007,14(19):1454.
- [12] Ross GM, Mcmillan TJ, Wilcox P, et al. The single cell micro-gel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications: Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994[J]. Mutation Res, 1995, 337(1): 57.
- [13] 蔡丽敏,李雪峰. 单细胞凝胶电泳技术在 DNA 损伤和细胞凋亡检测中的应用[J]. 华南师范大学学报,2011,03: 117.
- [14] 薛同敏,郭忠. 单细胞凝胶电泳技术应用进展[J]. 西南民族大学学报,2011,32(83):70.

[收稿日期]2012-09-26

[修回日期]2012-10-30