

重楼皂苷 I 对肺腺癌 A549 细胞系放射增敏作用研究

In Vitro Study of Radiosensitization of Saponin I on Lung Adenocarcinoma A549 Cell Line // ZHAO Peng-jun, FENG Jian-guo, MA Sheng-lin

赵鹏军¹, 冯建国², 马胜林³

(1. 杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 3. 杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: [目的] 探讨重楼皂苷 I 对肺腺癌 A549 细胞的体外放射增敏作用及其可能机制。[方法] 以肺腺癌 A549 细胞系为研究对象, MTT 法检测重楼皂苷 I 对 A549 细胞的抑制率, 得到重楼皂苷 I 对 A549 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 及 IC₂₀、IC₃₀, 取 IC₂₀₋₃₀ 之间的重楼皂苷 I 浓度用于放射增敏, 随机分为对照组、单纯照射组、重楼皂苷 I、重楼皂苷 I + 照射组, 描绘细胞生长曲线、计算克隆形成率、流式细胞术检测细胞周期及凋亡率, Western Blot 法检测 survivin 及 p21^{waf1/cip1} 蛋白表达。[结果] A549 细胞在经重楼皂苷 I 处理和照射后重楼皂苷 I + 照射组 A549 细胞的增殖能力明显受抑 ($P < 0.01$), 克隆形成率明显下降 (3.3%, $P < 0.01$), 流式细胞术分析显示在重楼皂苷 I + 照射组 G₂/M 期阻滞 (37.56% ± 1.99%, $P < 0.01$), 凋亡率明显升高 (9.34% ± 0.84%, $P < 0.01$)。Western Blot 检测 survivin 蛋白表达降低, 而 p21^{waf1/cip1} 蛋白表达增加。[结论] 重楼皂苷 I 具有较好的放射增敏作用, 可能通过诱导细胞凋亡, 细胞 G₂/M 期阻滞, 降低 survivin 蛋白表达, 增加 p21 蛋白表达, 从而产生放射增敏作用。

关键词: 重楼皂苷 I; 肺肿瘤; 放射敏感性

中图分类号: R73-3; R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0108-03

肺癌的主要治疗手段是手术、放疗和化疗。放化疗联合使用能够明显提高疗效, 但由于存在较大的毒副作用, 因而放射增敏剂的研究成为目前如何提高放疗疗效的研究热点。从中草药中寻找有效的放射增敏剂是一个非常前景的途径, 本实验旨在探讨重楼皂苷 I 对非小细胞肺癌细胞的体外放射增敏作用及可能机理, 为临床非小细胞肺癌治疗中应用重楼皂苷 I 来增加放射敏感性提供坚实的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株及试剂

A549 肺腺癌细胞系由浙江省肿瘤医院肿瘤研究所提供, 传代培养于加 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养。RPMI1640 培养液, 美国 GIBCO 公司产品。小牛血清,

通讯作者: 马胜林, 院长, 主任医师, 博士研究生导师, 硕士; 杭州市第一人民医院, 浙江省杭州市浣纱路 261 号 (310006);
E-mail: mashenglin@medmail.com.cn。

收稿日期: 2011-11-08; 修回日期: 2012-01-16

购于杭州四季青生物工程有限公司。重楼皂甙 I (Chonglou Saponin I), 分子式 C₄₄H₇₀O₁₆, 分子量 854, 购自浙江美迪康医药有限公司, 编号: 111590。重楼皂甙 I 粉末溶解于二甲基亚砜 (DMSO), 使用时用培养液稀释至所需浓度。MTT 为华美生物技术有限公司产品。碘化丙锭 (PI) 染色试剂盒为美国 BD 公司产品。Survivin、p21^{waf1/cip1} 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。照射源, 直线加速器。

1.2 MTT 法检测重楼皂甙 I 对 A549 细胞的抑制率

取对数生长期状态良好的细胞, 调整细胞浓度为 5 × 10⁴ 个/ml, 每孔 100 μl 接种于 96 孔板, 培养 24h 后置 4℃ 5h 同步化, 吸去原培养液, 加入含重楼皂甙 I 浓度分别是 0 μg/ml、0.5 μg/ml、1 μg/ml、2 μg/ml、4 μg/ml、6 μg/ml、8 μg/ml、16 μg/ml、32 μg/ml、64 μg/ml 的培养液每孔 100 μl, 以培养液每孔 100 μl 为对照孔, 每个浓度组设 8 个复孔, 培养 48h 后每孔加入 5mg/ml MTT 15 μl, 继续培养 4h, 去上清, 加入酸化异丙醇 100 μl, 静置 30min, 待孔底褐色结晶完全溶解, 酶标仪检测 570nm 处各孔吸光度值 A₅₇₀, 计算各

组抑制率。A549 细胞抑制率=(对照组 A₅₇₀-试验组 A₅₇₀)/对照组 A₅₇₀。

1.3 细胞分组与照射

将细胞按 5×10^4 个/瓶接种。随机分为 4 组:对照组 (A 组)、单纯照射组 (B 组)、重楼皂甙 I (C 组)、重楼皂甙 I + 照射组 (D 组)。细胞贴壁后, C 组、D 组用含 $2 \mu\text{g/ml}$ 重楼皂甙 I 的培养液培养, A 组、B 组用培养液培养。同时 B 组、D 组予 X 射线照射, 吸收剂量率 122.09 cGy/min , 照射面积 $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, SSD 照射剂量 $D_6 \text{ Gy}$ 。每隔 24h 取细胞消化后计数。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期改变

调整细胞浓度为 10×10^4 个/瓶接种于培养瓶, 各组作用 24h, 每组 3 个样本。收集细胞, 流式细胞仪检测。

1.5 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡改变

调整细胞浓度为 10×10^4 个/瓶接种于培养瓶, 各组作用 24h, 每组 3 个样本。收集细胞, 加入 $5 \mu\text{l}$ FITC Annexin-V 和 $5 \mu\text{l}$ PI, 轻微振荡, 室温下 (25°C) 避光孵育 15min, 加入 $400 \mu\text{l}$ $1 \times \text{Binding Buffer}$, 流式细胞仪检测。

1.6 培养瓶克隆形成率

收集细胞, 接种每瓶 1×10^3 个细胞。继续培养 2 周肉眼可见白色克隆, 去培养液, 加入固定液 3ml (甲醇:冰醋酸=3:1) 固定 15min, 生理盐水冲洗 2 次, Giemsa 染液染色 30min, 生理盐水冲洗干燥后计数每瓶克隆数, 克隆形成率=每瓶克隆数/每瓶接种细胞数。

1.7 Western Blot 检测

Western Blot 检测 survivin, p21^{waf1/cip1} 蛋白表达, 按说明书操作。

1.8 统计学处理

数据使用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析。

计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。均数间两两比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测重楼皂甙 I 对 A549 细胞的抑制率

重楼皂甙 I 对 A549 细胞的半数抑制浓度 IC_{50} = $5.9614 \mu\text{g/ml}$, IC_{30} = $2.7128 \mu\text{g/ml}$, IC_{20} = $1.6440 \mu\text{g/ml}$ 。

2.2 细胞计数

随着时间的延长, 各处理组细胞生长受到抑制, 尤以 D 组明显。见表 1。

表 1 各组不同时间 A549 细胞数 ($\times 10^4$ 个, $\bar{x} \pm s$)

组别	24h	48h	72h	96h
A	30.82 ± 1.50	52.54 ± 2.11	84.94 ± 3.24	135.51 ± 5.20
B	$21.66 \pm 0.41^{*\blacktriangle}$	$28.34 \pm 1.50^{*\blacktriangle}$	$33.92 \pm 1.68^{*\blacktriangle}$	$46.68 \pm 2.79^{*\blacktriangle}$
C	$27.49 \pm 0.97^{*\blacktriangle}$	$37.03 \pm 2.00^{*\blacktriangle}$	$47.01 \pm 2.58^{*\blacktriangle}$	$62.83 \pm 2.53^{*\blacktriangle}$
D	$16.89 \pm 5.67^*$	$20.34 \pm 0.73^*$	$24.43 \pm 1.05^*$	$28.18 \pm 1.98^*$

注: $n=3$ 。★与 A 组比较, $F=217.91$, $P<0.01$; ▲与 D 组比较, $F=97.37$, $P<0.01$;

2.3 流式细胞术检测细胞周期

G₂/M 期比例 D 组较其他 3 组为多, D 组 ($37.56\% \pm 1.99\%$) 与 A、B、C 组相比具有统计学差异 (F 值为 39.74 , $P<0.01$)。C 组 G₂/M 期比例较 A、B 两组为多, C 组 ($21.75\% \pm 2.87\%$) 和 A、B 两组相比具有统计学差异 (F 值为 25.17 , $P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组细胞周期分布 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
A	51.43 ± 2.74	33.70 ± 3.22	14.85 ± 2.19
B	52.47 ± 2.11	38.94 ± 3.05	8.58 ± 1.18
C	50.24 ± 2.35	28.00 ± 5.22	21.75 ± 2.87
D	42.37 ± 4.76	20.06 ± 2.85	37.56 ± 1.99

2.4 Annexin-V 检测细胞凋亡率

D 组细胞凋亡率 ($9.34\% \pm 0.84\%$) 与 A 组 ($0.46\% \pm 0.13\%$)、B 组 ($1.71\% \pm 0.26\%$)、C 组 ($2.80\% \pm 0.32\%$) 相

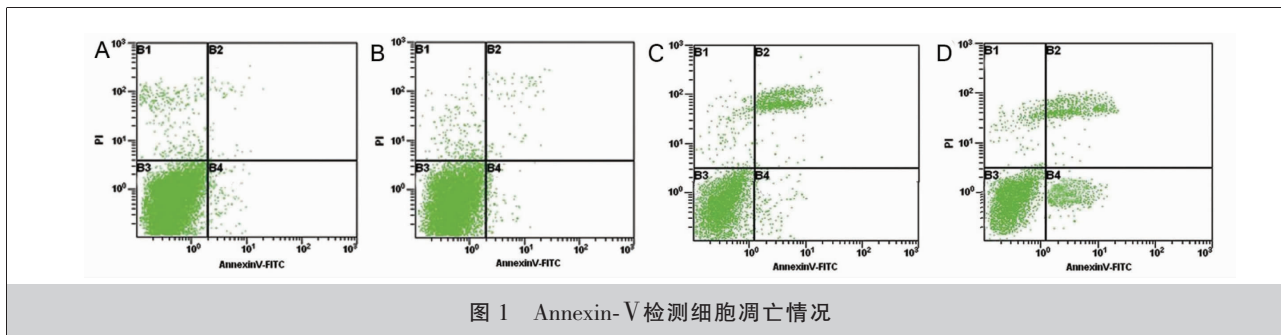


图 1 Annexin-V 检测细胞凋亡情况

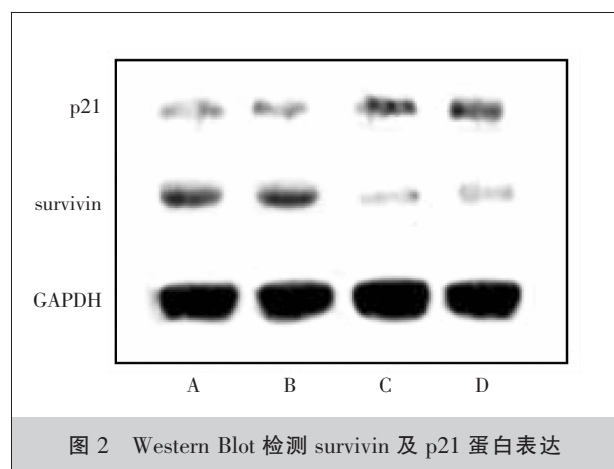
比具有统计学差异(F 值为 189.21, $P < 0.01$)。见图 1。

2.5 克隆形成率检测

各组克隆形成率平均值分别是 A 组 8.4%(84/1 000)、B 组 5.2%(52/1 000)、C 组 6.1%(61/1 000)、D 组 3.3%(33/1 000)。B 组、C 组、D 组 A549 细胞的克隆形成率与 A 组相比具有统计学差异(F 值为 123.48, $P < 0.01$)。而 B 组、C 组与 D 组相比具有统计学差异(F 值为 77.43, $P < 0.05$)。

2.6 Western Blot 检测 survivin、p21^{waf1/cip1} 蛋白表达

Western Blot 检测 survivin 及 p21^{waf1/cip1} 蛋白表达结果见图 2, 从图中可以看出, 与 A、B 组相比, C 组、D 组 survivin 蛋白表达降低, 而 p21^{waf1/cip1} 蛋白表达增加。



3 讨论

重楼皂甙 I 是从中药重楼中提取的甙体皂甙, 许多文献报道重楼皂甙具有抗肿瘤作用及免疫调节作用, 对多种肿瘤细胞及移植瘤具有明显抑制作用^[1-6], 能诱导多种肿瘤细胞凋亡。Xiao 等^[6]发现重楼皂甙 I 能抑制卵巢癌 SKOV3 细胞生长, 引起 G₂/M 期阻滞及诱导细胞凋亡。进一步研究发现, 重楼皂甙 I 作用后 BAX、细胞色素 C 蛋白水平升高, caspase-9、caspase-3 激活, 且 bcl-2、磷酸化 ERK1/2 以及磷酸化 AKT 水平降低, 抑制 ERK 通路, 诱导细胞凋亡。

Survivin 是一个重要的凋亡抑制因子, 可直接抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性, 有效阻断细胞凋亡过程, 也可以通过与细胞周期调控因子 CDK4 形成 survivin-CDK4 复合体, 使 p21 从 CDK 的复合体中释放出来并异位到线粒体而间接抑制 caspase-3 的活性, 从而发挥抑制凋亡的作用^[7,8]。P21 蛋白是

目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白, 广泛抑制各种 Cyclin-CDK 复合物, 可使细胞周期阻滞于 G₁ 期、G₂ 期或 S 期。p21 的过表达可促进凋亡的发生, 其促凋亡的机制目前尚未清楚, 可能与 DNA 修复系统的成员相互作用或对其调节的作用有关。有报道中药桂枝茯苓丸能诱导荷瘤鼠肿瘤细胞凋亡, 上调肿瘤细胞 p21 蛋白表达, 下调 survivin mRNA 表达^[9]。

本实验以 MTT 法检测重楼皂甙 I 对 A549 细胞的抑制率, 得到 IC₃₀=2.712 8 μg/ml, IC₂₀=1.644 0 μg/ml。国际上通常采用药物的 IC₂₀₋₃₀ 的浓度用于放射增敏, 因此本实验选择重楼皂甙 I 浓度 2 μg/ml。从 A549 细胞计数、克隆形成率的结果中发现, 放射线和重楼皂甙 I 联合能明显抑制 A549 细胞的分裂。流式细胞术分析结果表明重楼皂甙 I 能将细胞阻滞在 G₂/M 期, 尤其在重楼皂甙 I 联合放射线作用时 G₂/M 期阻滞更加明显。同时凋亡检测也发现重楼皂甙 I 加照射组与对照组相比出现了明显的凋亡。Western blot 法检测抗凋亡蛋白 survivin 及周期调控蛋白 p21 发现重楼皂甙 I 组和重楼皂甙 I 联合放射线能明显降低 survivin 蛋白表达, 升高 p21 蛋白表达。因而重楼皂甙 I 可能通过降低 survivin 表达促进凋亡和诱导 p21 蛋白表达引起 G₂/M 期阻滞, 以增强放射敏感性。

参考文献:

- [1] 王艳霞, 李惠芬. 重楼抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4):628-630.
- [2] 颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷对 10 种肿瘤细胞株的细胞毒谱及构效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):2057-2060.
- [3] 王羽, 张彦军, 高文远, 等. 滇重楼的抗肿瘤活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1425-1428.
- [4] 石小枫, 杜德极, 谢定成, 等. 重楼总皂甙对 H22 动物移植性肿瘤的影响 [J]. 中药材, 1992, 15(2):33-36.
- [5] 肖敏, 李建美, 张国铎, 等. 重楼复方对荷肝癌 H22 小鼠生长及生存时间的影响 [J]. 中国肿瘤, 2011, 20(1):55-58.
- [6] Xiao X, Bai P, Nguyen TMB, et al. The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(5):1179-1188.
- [7] Uren AG, Wong L, Pakusch M, et al. Survivin and the innercentromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype [J]. Curr Biol, 2000, 10(21): 1319-1328.
- [8] 王松文, 李勇, 王洁. Survivin 和 Metastin 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(12):961-964.
- [9] 王琪, 马新博, 蔡文辉, 等. 桂枝茯苓丸对荷瘤鼠 P21waf/cip 基因表达的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2009, 30(2):247-250.