

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 06. 005

文殊兰叶氯仿提取物诱导 NCI-H460 细胞凋亡的研究

陈建荣, 杨 扬, 杨 月

Study on Apoptosis of NCI-H460 Cells Induced by Chloroform Extract of Leaves from *Crinum Asiaticum*

CHEN Jian-rong, YANG Yang, YANG Yue

1. Department of Basic Medical Sciences, Guilin Medical College, Guilin 541004, China, 2. Department of Pharmacy

Abstract: **Objective** To investigate the effect of chloroform extracts (CE) of leaves from *Crinum asiaticum* on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer(NSCLC) NCI-H460 cells. **Methods** The activity of cell growth inhibition of NCI-H460 cells was measured by MTT assay. Morphological changes of cell nuclei were observed by Hoechst 33258 staining. The expression levels of Bcl-2 and Bax proteins were examined by immunocytochemistry staining. Flow cytometry was performed to measure the cell cycle. **Results** CE displayed growth inhibitory activity against NCI-H460 cells with IC₅₀ values of 36. 22 ± 3. 04, 41. 21 ± 2. 50 and 62. 55 ± 3. 47 mg/L for 24, 48 and 72 h, respectively. The effect enhanced with an increase in the concentration of CE. The condensed chromatin, nuclear fragmentation and a large number of apoptotic bodies was observed by Hoechst 33258 staining. The percentage of apoptosis in NCI-H460 cells increased after treated with CE, compared with control. The expression level of Bax protein in NCI-H460 cells cultured with CE were higher than that of control, and the expression level of Bcl-2 protein in NCI-H460 cells dealt with CE were lower than that of control. The arrest of NCI-H460 cells in G₁/S phases was induced by CE. **Conclusion** *In vitro* CE significantly inhibited the growth of NCI-H460 cells. Antitumor mechanism of NCI-H460 cells may be associated with the changes of cell cycle and cell apoptosis.

Key words: NSCLC; NCI-H460; Leaves from *Crinum asiaticum*; Cell apoptosis

摘要: **目的** 研究文殊兰叶氯仿提取物(CE)对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞增殖和凋亡的影响。 **方法** 通过 MTT 法检测 CE 对 NCI-H460 细胞的生长抑制作用;采用 Hoechst 33258 荧光染色法检测 CE 作用后凋亡细胞形态的变化;通过免疫细胞化学检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达;采用流式细胞术(FCM)检测 CE 作用后对细胞周期的影响。 **结果** CE 抑制 NCI-H460 细胞增殖,其 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为:(36. 22 ± 3. 04)、(41. 21 ± 2. 50)、(62. 55 ± 3. 47) mg/L;荧光染色显示,经 CE 作用后的细胞出现细胞核裂解,染色质浓缩,产生凋亡小体;免疫细胞化学法显示 CE 能增强促进凋亡蛋白 Bax 和降低抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达;FCM 检测表明 CE 作用后的细胞被阻滞在 G₁/S 期。 **结论** CE 在体外能有效地抑制 NCI-H460 细胞生长,其机制可能与改变细胞周期并诱导细胞凋亡有关。

关键词: 非小细胞肺癌; NCI-H460; 文殊兰叶; 细胞凋亡

中图分类号: R734. 2; R73-36 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2011)06-0628-04

0 引言

肺癌是严重危害人类健康和生存质量的疾病。在肺癌的组织病理学分类中,75%~80%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。许

多抗肿瘤药物对正常细胞的不良反应给患者带来极大的痛苦,且肿瘤细胞易产生耐药性。因此,从天然植物中提取具有抑制肿瘤细胞生长的高效、低毒的化合物已经成为抗肿瘤研究的热点。

文殊兰(*Crinum asiaticum* L. var. *sincum*. Bak)为石蒜科,属(*Crinum*)白花文殊兰,始载于《本草纲目拾遗》。有报道称文殊兰有抗癌、镇痛、抗炎、抗拟胆碱样、保护心血管^[2-3]以及诱导肿瘤细胞凋亡等多种作用^[4-5]。此外,文殊兰全草含生物碱(主要

收稿日期: 2010-08-19; 修回日期: 2011-03-18
作者单位: 1. 541004 广西桂林, 桂林医学院基础医学院, 2. 药学院
作者简介: 陈建荣(1981-), 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤病理和天然药物抗肿瘤方面的研究

是石蒜碱^[6]),并以鳞茎中含量较高,其石蒜碱对人肺癌细胞(A549)、人肠癌细胞(LOVO)人 T 细胞白血病细胞(6T-CEM^[7])和人原髓细胞白血病细胞(HL-60)^[8]均有较好的生长抑制活性,但在抑制人非小细胞肺癌(NCI-H460)的研究则较少见。本文旨在观察文殊兰叶氯仿提取物(CE)对 NCI-H460 细胞增殖和诱导细胞凋亡的影响,并初步探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞培养液 RPMI1640(Gibco 公司);优级胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);胰蛋白酶、MTT(Sigma 公司);Hoechst 33258 染色液(北京原平皓生物技术有限公司);即用型 Bcl-2、Bax 单克隆抗体及 SP 试剂盒(福州迈新);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 药物提取 文殊兰叶切碎,晾干,打成粗粉,以 6 倍量的 95%乙醇加热回流提取三次,每次 1 h,合并提取液,旋转蒸发仪回收溶剂,浓缩干燥得总提取物。将总提取物以 2% HCl 溶解、过滤。滤液用 Na₂CO₃ 调 pH=9 后用氯仿提取,氯仿层回收氯仿,浓缩干燥得文殊兰叶氯仿提取物。

1.2.2 细胞株的培养 NCI-H460 细胞株由本院药理学教研室馈赠,在 RPMI1640 中加入 10 %胎牛血清,100 u/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素,置 37℃,5% CO₂ 的培养箱中常规培养。

1.2.3 MTT 法测定 NCI-H460 细胞的增殖 取对数生长期的细胞按(3.0~5.0)×10⁴/ml 接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 180 μl;待细胞贴壁后按每孔 20μl 加药,并分以下几组(以下实验都是按此分组):空白对照组,加入 RPMI 1640 培养液;CE 组,加入 12.5、25、50、100 mg/L CE(终浓度);阳性对照组,加入 5-Fu (10 mg/L);溶媒对照组,加入 10% DMSO;阴性对照组,加 PBS。每个浓度均设 5 个复孔,37℃,5% CO₂ 分别培养 20、44、68 h 后,每孔加入 MTT(5 g/L) 20 μl,继续培养 4 h 后每孔加入 DMSO 150 μl。在微型振荡器上摇匀,用酶标仪在主波长为 490 nm 处测 OD 值,实验重复 3 次,取 3 次平均值。细胞生长抑制率(%)=(对照组 A 值-加药组 A 值)/对照组 A 值×100%^[9]。采用 Origin 7.5 软件计算半数抑制浓度 IC₅₀。

1.2.4 Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞形态 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 2.0×10⁶/ml,加 2 ml 到预先放置盖玻片的 6 孔板中,24 h 待细胞

爬片后,加入终浓度为 100、50 mg/L 的 CE,继续培养 24 h 后,吸尽培养液,用固定液固定 10 min 后,去固定液,PBS 洗两次,每次洗 3 min,加入 Hoechst 33258 染液,余按说明书操作,于倒置荧光显微镜下观察并拍照,实验重复 3 次^[1]。

1.2.5 免疫细胞化学染色检测凋亡相关因子 Bcl-2 及 Bax 的表达 取对数生长期细胞 2.0×10⁵/ml 加入 6 孔板内,每孔 1.5 ml,待细胞贴壁后加药 12.5、25、50、100 mg/L,常规培养 48 h 后,95%乙醇固定 15~30 min,PBS 冲洗 3 次×5 min,用 SP 法进行免疫细胞化学染色,分别检测细胞内 Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白的表达。实验步骤依照试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木精对比染色,中性树胶封片。以胞质内出现明显棕褐色颗粒,其强度大于背景非特异性染色者判定为阳性^[9]。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 NCI-H460 细胞,0.25%胰酶消化成单细胞悬液,以 3.0×10⁶/ml 接种于 6 孔培养板中,每孔 2 ml,常规培养,待细胞贴壁后加药。药物处理组加入终浓度分别为 12.5、25、50 mg/L 的药液,对照组加入等量的 PBS 液继续培养,于 48 h 消化收集各组细胞离心(1 000 r/min×7 min),制成单细胞悬液,用预冷的 70%乙醇固定过夜,余按试剂盒说明操作^[10]。

1.3 统计学方法

实验数据采用 Origin 7.5 统计软件处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 CE 对 NCI-H460 细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测 CE 对细胞增殖的影响,结果表明 CE 能明显抑制 NCI-H460 细胞的生长,其效果与时间和浓度相关,见表 1。

表 1 CE 对 NCI-H460 细胞生长的抑制率($\bar{x} \pm s$, n=3)
Table 1 Growth inhibition of NCI-H460 cell induced by CE($\bar{x} \pm s$, n=3)

Time	IC ₅₀ (mg/L)	
	CE	5-Fu
24 h	36.22±3.04	46.76±2.24%
48 h	41.21±2.50	48.20±3.42%
72 h	62.55±3.47	24.27±2.60%

2.2 CE 诱导 NCI-H460 细胞凋亡的形态学变化 经 Hoechst 33258 染色后的 NCI-H460 细胞,对照组细胞核大小较均一,呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀;而经 CE 处理 24 h 后则观察到典型的细

胞凋亡形态学特征:细胞核出现不同程度皱缩、变形、部分细胞核染色体碎裂、体积缩小、呈致密的颗粒状、块状浓染荧光、并有凋亡小体出现,且凋亡细胞数目的多少与 CE 的浓度相关,见图 1。

2.3 免疫细胞化学染色检测 NCI-H460 细胞中凋亡相关因子 Bcl-2 及 Bax 的表达

Bcl-2、Bax 主要表达于胞质。根据实验结果阴性对照组 Bcl-2 和 Bax 几乎无表达;CE 作用组中两者的阳性细胞数明显多于阴性对照组且 Bcl-2 表达的颜色随 CE 作用的浓度增大而变淡,Bax 表达的颜色随 CE 作用的浓度增大而加深。由此可见 CE 可通过上调凋亡促进因子 Bax 同时下调凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达来促进 NCI-H460 细胞的凋亡。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

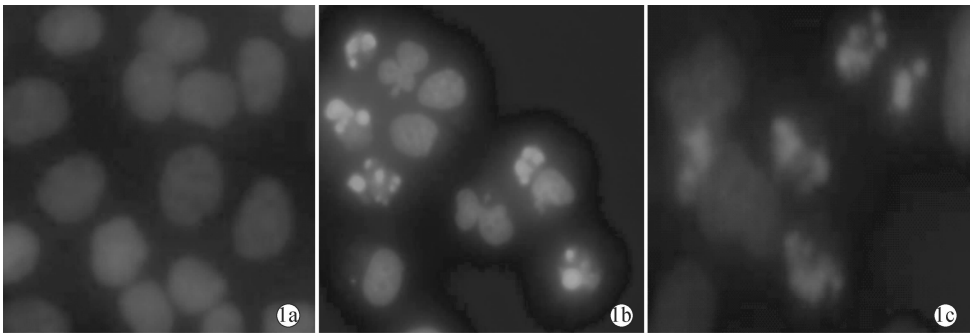
CE 作用细胞 48 h 后,NCI-H460 细胞的细胞周期发生了变化。随着 CE 作用浓度的增加,G₀/G₁ 期细胞逐渐增多,S 期的逐渐细胞减少,见图 2。结果表明 CE 能够影响 NCI-H460 细胞的细胞周期,使其被阻滞在 G₁/S 期,从而抑制细胞的增殖。

3 讨论

Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡的蛋白,并且 Bax 是 Bcl-2

活性的主要调控因子,这两种蛋白以线粒体为靶点共同调控着细胞对凋亡信号的敏感度^[9]。本实验发现,当 CE 的浓度达到 50 mg/L 时,能够抑制 Bcl-2 蛋白的表达同时促进 Bax 蛋白的表达;当作用浓度达到 100 mg/L 时作用更明显。这说明 CE 对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响与其浓度密切相关。在线粒体凋亡通路中,Bax 与 Bcl-2 蛋白相互结合,彼此制约,细胞凋亡与否取决于两者在细胞中的相对含量。当 Bax/Bcl-2 比值升高会促进细胞凋亡,比值降低会抑制细胞凋亡。研究结果发现,在 CE 诱导 NCI-H460 细胞凋亡中,Bcl-2 和 Bax 蛋白都发挥着不可替代的作用。

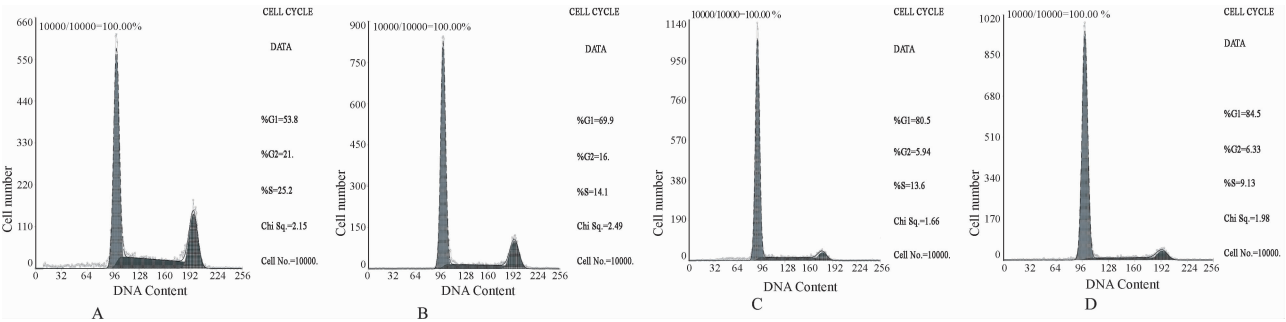
Hoechst 33258 染色后,在荧光显微镜下观察,对照组 NCI-H460 细胞的细胞核为蓝色,比较均匀,无凋亡细胞;而 50、100 mg/L CE 作用组的细胞核,染色质比较致密发亮,有的形成凋亡小体,有的细胞核断裂为不同的碎片,显示有凋亡细胞存在。采用 FCM 检测不同浓度的 CE 作用 NCI-H460 细胞 48 h 后对细胞周期的影响,可反映肿瘤细胞的增殖状态。随着 CE 作用浓度的增大,G₀/G₁ 细胞逐渐增多,S 期细胞逐渐减少,因为 G₁ 期是决定细胞增殖状态的关键阶段,存在调节细胞周期的检测点(R 点),可以阻止受伤的细胞进入 S 期,从而抑制细胞的增殖。



1a: control group ; 1b~1c: NCI-H460 treated with 50 and 100 mg/L CE for 24 h, respectively

图 1 CE 诱导的 NCI-H460 凋亡细胞形态学变化(荧光显微镜×400 倍)

Figure 1 Morphology of apoptotic NCI-H460 cells induced by CE observed by fluorescence microscopy(×400)



A: control group ; B~D: NCI-H460 treated with 12, 5, 25 and 50 mg/L CE, respectively for 48 h

图 2 CE 作用 NCI-H460 细胞后细胞周期分析

Figure 2 Cell cycle analysis of NCI-H460 cells

综上所述,文殊兰叶氯仿提取物可以抑制 NCI-H460 肿瘤细胞的增殖,并呈剂量和时间依赖性;同时它能诱导 NCI-H460 细胞的凋亡,且凋亡的程度随着 CE 浓度的增大而增大,细胞周期被阻滞于 G₁/S 期,这可能与细胞的增殖抑制有关。本课题虽然对 CE 抗肿瘤及诱导肿瘤细胞凋亡做了一些工作,但对其单体化合物以及诱导肿瘤细胞凋亡的机制有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 刘义,吴科锋,李立,等. 半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36 (1): 9-12.

[2] 秦昆明,李笑,徐昭,等. 石蒜碱及其衍生物的药理作用研究概况[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2009, 23(1): 6-9.

[3] 沙美,丁林生. 文殊兰属植物中生物碱的研究进展[J]. 国外医药·植物药分册, 2001,16(5): 193-196.

[4] Yui S, Mikami M, kitahara M, et al. The inhibitory effect of lycorine on tumor cell apoptosis induced by polymorphonuclear

leukocyte-derived calprotectin [J]. Immunopharmacology, 1998, 40(2): 151-162.

[5] JAE H, JUNG K, SANG Ch, et al. The effects of crinum asiaticum on the apoptosis induction and the reversal of multidrug resistance in HL-60/MX2[J]. Toxicol Res, 2008, 24(1): 29-36.

[6] Min BS, Gao JJ, Nakamura N, et al. Cytotoxic Alkaloids and a Flavan from the Bulbs of Crinum asiaticum var. japonicum [J]. Chem Pharm Bull(Tokoy), 2001,49(9): 1217-1219.

[7] 史琪荣. 四种药用植物活性成分的系统研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2007:122-127.

[8] Liu J, Hu WX, He LF, et al. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis[J]. FEBS Lett, 2004, 578 (3): 245-250.

[9] 王光兰,崔俊生,王心蕊,等. 20(S)-人参皂苷 Rg3 诱导肺癌细胞 NCI-H460 凋亡的机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2008, 34(6): 980-984.

[10] 高爱霞. 花青素诱导 k562、NCI-H460 细胞凋亡及抑制裸鼠移植瘤生长的研究[D]. 江苏:苏州大学,2008:11-26.

[编辑:黄国玲;校对:安 凤]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志诚聘审稿专家

《肿瘤防治研究》杂志是由中华人民共和国卫生部主管、中国抗癌协会主办的肿瘤医学高级学术期刊,是传播我国肿瘤学领域最新科研成果和学术进展的重要载体,是外界了解我国肿瘤学领域的一个重要窗口。多年来,本刊一直以“百花齐放、百家争鸣”为办刊指导原则,严格执行同行审稿、编审专家组集体定稿的制度。本刊审稿专家队伍以编委为主体,由数百位具有较深学术造诣的肿瘤学各专业学者组成,这支高水平的审稿专家队伍对于《肿瘤防治研究》杂志保持学术权威性和领先地位发挥着重要的作用。

为了进一步提高审稿质量,加快审稿速度,提高论文发表时效性,满足广大作者与读者的热切需求,本刊决定面向全国公开遴选肿瘤学领域各学科(专业)审稿专家,使更多有学识、有水平,并热心期刊工作的优秀专家参与到本刊审稿工作中来,从而进一步提高本刊学术质量,更好地发挥《肿瘤防治研究》杂志作为我国肿瘤学领域主流学术期刊应有的作用。凡具备下述条件者,请和我们联系:

- 1. 学风严谨,关心并支持《肿瘤防治研究》杂志的各项工作;
- 2. 热心审稿工作并对此项工作有一定了解,有充裕的时间和充沛的精力,能承诺按时反馈审稿意见;
- 3. 有较深的学术造诣,熟悉并了解肿瘤学相关领域在国内外的现状和发展趋势;
- 4. 精于科学研究和论文写作,近年来发表过多篇学术论文或曾主编出版过学术专著;
- 5. 具有高级技术职称或博士学位;
- 6. 有相对固定的工作单位,通信方便、快捷,懂电脑操作,能进行网络审稿。

具备以上条件,并愿意承担《肿瘤防治研究》杂志审稿工作的肿瘤学各学科专家,请向编辑部索取并填写《肿瘤防治研究杂志审稿专家登记表》,连同个人简历一份,通过电子邮件发送到编辑部邮箱(hongwu1222@126.com),经审查合格后予以确认。

通信地址:武汉武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部
邮政编码:430079 电话/传真:027-87670126 联系人:刘红武
E-mail:hongwu1222@126.com
网址:http://www.zlfzyj.com http://www.zlfzyj.com.cn