

· 基础论著 ·

紫檀芪对人肺腺癌 A549 细胞系增殖及凋亡的影响

王宁 杨阳 段维勋 梁振兴 李悦 金振晓 陈其龙 易定华 俞世强

【摘要】 目的 探讨紫檀芪(pterostilbene, PTE)对人肺腺癌 A549 细胞系增殖及凋亡的影响。**方法** 细胞分为正常对照组、紫檀芪组(1.5、3、6 $\mu\text{mol/L}$),各组细胞分别处理 12、24、36 h。MTT 法检测各组细胞存活率;黏附实验测定各组细胞黏附率;TUNEL 法测定各组细胞凋亡率;Caspase-Glo[®]3/7 定量试剂盒测定细胞 Caspase3/7 的表达情况。**结果** MTT 结果显示紫檀芪对 A549 细胞增殖有抑制作用($P < 0.01$),其中 6 $\mu\text{mol/L}$ 处理 36 h 组抑制效果最明显,结果呈药物浓度时间依赖效应;黏附实验结果显示(24 h)紫檀芪可以显著减弱 A549 细胞黏附能力($P < 0.01$),并呈浓度依赖效应;TUNEL 检测结果显示(24 h)紫檀芪可以显著增加 A549 细胞的凋亡率($P < 0.01$);Caspase3/7 检测结果显示紫檀芪可以使 Caspase3/7 活性显著升高($P < 0.01$)。**结论** 紫檀芪可显著抑制肺腺癌 A549 细胞增殖,促进其凋亡,紫檀芪可能是肺癌治疗领域非常具有开发前景的新药。

【关键词】 肺肿瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 紫檀芪; A549 细胞系

Effects of pterostilbene on the proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cell line WANG Ning, YANG Yang, DUAN Wei-xun, LIANG Zhen-xing, LI Yue, JIN Zhen-xiao, CHEN Qi-long, YI Ding-hua, YU Shi-qiang. Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: YU Shi-qiang, Email: yushiq@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the impact of pterostilbene (PTE) on human lung cancer A549 cell line proliferation and apoptosis. **Methods** The cells were divided into the Control group and the PTE Groups (1.5, 3, 6 $\mu\text{mol/L}$), each group was treated for 12, 24 and 36 h. Adhesion assay was used to determinate the adhesive rate of cells; TUNEL was used to detect the apoptotic rate of cells; MTT method was used to detect the survival rate of cells; Special kits were used to detect the activity of Caspase 3/7. **Results** The adhesion experiment results showed that (24 h) PTE significantly weakened the adhesive capacity of A549 cells on dose-depend manner. The TUNEL results showed PTE (24 h) could significantly increased the apoptotic rate of A549 cells. The MTT results showed that PTE could inhibit the proliferation of A549 cells on dose and time-depend manners, the effect of 6 $\mu\text{mol/L}$ PTE (36 h) was the most obvious. In addition, after being treated with PTE (24 h), the apoptotic rate of cells and the activity of Caspase3/7 increased significantly. **Conclusion** PTE treatment can effectively inhibit the proliferation of A549 cells, the mechanisms of which are related to the activation of Caspase 3/7, PTE may be a potential new drug in treatment of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms; Cell proliferation; Apoptosis; Pterostilbene; A549 cell line

肺癌是最常见的恶性肿瘤,2012 年估计大约有超过 160 000 例的患者死于该疾病,且有约 226 000 例的新肺癌患者产生,因此严重危害了人类的生命健康^[1]。目前肺癌的治疗主要是手术治疗和放疗,但是大多

数化疗药物严重的不良反应给患者带来许多并发症^[2-3]。近些年来,一些天然物质(青蒿琥酯、白藜芦醇、雷公藤内酯醇等)被逐渐应用于肺腺癌的预防和治理,其效果显著且几乎无不良反应,使人们越来越重视这些物质在抗肺腺肿瘤方面的研究和应用^[4-7]。紫檀芪(Pterostilbene, PTE)广泛存在于多种小浆果和红酒中,与白藜芦醇都属于芪类化合物。目前关于白藜芦醇抗肿瘤效果和机制的研究很多,其可抑制多种恶性肿瘤细胞的生长^[8-9]。相关药理学研究表明,甲基化的芪类化合物比羟基化的芪类化合物具有更高的生物活性和生物利用度^[9]。有研究显示,紫檀芪除具有降血

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.10.110

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070198,81102687);陕西省社会发展推动基金资助项目(2012JQ4001)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院心血管外科(王宁、杨阳、段维勋、梁振兴、金振晓、陈其龙、易定华、俞世强);第四军医大学口腔医学系 10 队(李悦)

通讯作者:俞世强,Email:yushiq@fmmu.edu.cn

糖、降血脂、抗氧化的作用外^[10-11],亦能显著抑制多种肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[12]。更值得关注的是,与白藜芦醇相比,紫檀芪具有更高的生物活性^[13],且紫檀芪具有更好的安全性^[14]。关于紫檀芪治疗肺腺癌的研究目前尚无报道,本研究将以体外培养的人肺腺癌 A549 细胞系作为研究对象,观察紫檀芪对其增殖及凋亡的影响,从而为临床药物治疗肺腺癌提供新的思路。

材料与方 法

一、细胞和材料

肺腺癌 A549 细胞购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。紫檀芪(Caspase-Glo[®] 3/7 紫檀芪)购自美国 Santa Cruz 公司;定量试剂盒购自美国 Promega 公司;TUNEL 检测试剂盒购自德国 Roche 公司;DMEM 高糖培养液购自美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;CO₂ 细胞培养箱、酶标仪购自美国 Thermo 公司;低速离心机购自美国 Beckman Coulter 公司;ZW-A 微量振荡器购自常州常州国华公司;超净工作台购自苏州净化设备仪器厂。

二、方法

1. 细胞培养: A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 在 5% CO₂, 37 °C 培养箱内培养 3~4 d。细胞黏连后,用 0.25% 胰蛋白酶消化。然后根据实验需要按照铺满的 3 倍稀释把细胞接种于不同的培养板中。细胞长到实验需要的密度后,换用无血清的 DMEM 培养 24 h,即可进行实验。

2. MTT 法检测不同浓度紫檀芪对 A549 细胞增殖的影响:实验分为 4 组(对照组,紫檀芪 1.5、3、6 μmol/L),每组 10 个复孔。各组细胞孵育 12 h、24 h、36 h 后,弃去培养液,加入 100 μl 的 DMEM 和 10 μl 的 0.5% MTT,培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μl 的 DMSO 原液,振荡 5 min,使结晶完全溶解,然后用酶标仪(波长为 490 nm)测定其吸光值(OD 值),实验重复 3 次。

3. 黏附实验测定细胞黏附能力:实验方法参照文献报道^[15],稍作改动,具体为:细胞种于 75 ml 培养瓶中,各组处理结束后,用 PBS 洗 3 遍,0.25% 胰蛋白酶进行消化,离心、重悬,每组细胞计数 1 × 10⁵/ml,种于 96 孔板,每组 10 个复孔。接种 0.5 h 后弃去培养液和未贴壁的细胞,加入 100 μl 的 DMEM 和 10 μl 的 0.5% MTT,培养箱内孵育 4 h,然后用倒置显微镜拍照,不同观察者对同一视野的细胞计数,实验重复 3 次。

4. TUNEL 法检测细胞凋亡率:制作各组细胞爬片,处理结束后用 4% 的多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗涤(5 min × 3 次),0.1% 的 Triton X-100 打孔 5 min, PBS 洗涤(5 min × 3 次)。严格按照试剂盒说明书操作,按每玻片 2 μl 的 TdT 酶、48 μl 的荧光标记液配制 TUNEL 检测液,操作过程中需要严格避光。每张玻片加 50 μl 的 TUNEL 检测液,37 °C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤(5 min × 3 次)。用石蜡封片后在荧光显微镜下观察,红色荧光,随意选取 10 个视野计数。

5. Caspase3/7 活性测定:96 孔板内的各组细胞处理结束后,加入 Caspase-Glo[®] 3/7 工作液,每孔 100 μl,室温下避光孵育 1 h,酶标仪检测荧光强度。凋亡系数设为:实验组荧光强度/对照组荧光强度 × 100%。

三、统计学分析

以 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。差异显著性检验采用单因素方差分析,比较两组间差异用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTT 结果(表 1):不同浓度紫檀芪(1.5、3、6 μmol/L)孵育 12、24、36 h 后细胞存活率结果,图 1 为各组 OD 值的统计学分析图。由图可见紫檀芪可以有效抑制 A549 细胞的增殖,并呈浓度时间依赖性。

表 1 不同浓度紫檀芪处理 A549 细胞 12、24、36 h 后对细胞存活率的影响(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 12 h | 24 h | 36 h |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 0.822 ± 0.018 | 0.949 ± 0.022 | 1.115 ± 0.017 |
| 1.5 μmol/L 紫檀芪组 | 0.663 ± 0.012 ^a | 0.521 ± 0.019 ^a | 0.433 ± 0.022 ^a |
| 3 μmol/L 紫檀芪组 | 0.608 ± 0.015 ^{ab} | 0.414 ± 0.019 ^{ab} | 0.347 ± 0.025 ^{ab} |
| 6 μmol/L 紫檀芪组 | 0.541 ± 0.015 ^{abc} | 0.328 ± 0.027 ^{abc} | 0.245 ± 0.021 ^{abc} |

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 1.5 μmol/L 紫檀芪组比较,^b $P < 0.01$;与 3 μmol/L 紫檀芪组比较,^c $P < 0.01$

2. 黏附实验结果:图 2 为各组细胞经 24 h 处理,黏附 0.5 h 后细胞染色所得显微镜下照片(×200)及细胞计数统计学分析图。结果表明紫檀芪可以有效抑制 A549 细胞的黏附能力。

3. 细胞凋亡率检测结果:与对照组相比,不同浓度紫檀芪可以有效诱导 A549 细胞凋亡($P < 0.01$),并呈浓度依赖性,见图 3。

4. Caspase3/7 活性测定:与对照组相比,不同浓度紫檀芪可以使 A549 细胞 Caspase3/7 活性升高($P < 0.01$),并呈浓度依赖性,见图 4。

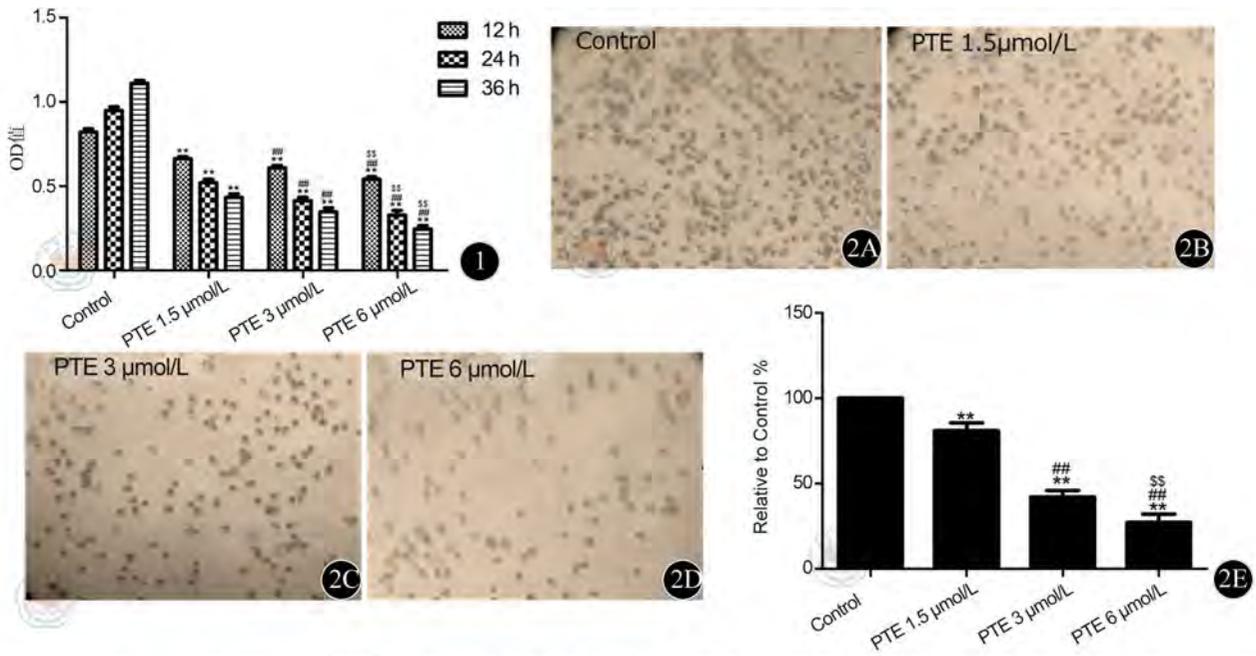


图1 不同浓度紫檀芪孵育A549细胞12、24、36 h后对细胞增殖的影响。与Control比较, ** $P < 0.01$; 与紫檀芪1.5 μmol/L比较, ## $P < 0.01$; 与紫檀芪3 μmol/L比较, ## $P < 0.01$ 。其中OD Value为吸光值 图2 不同浓度紫檀芪处理24 h对各组细胞黏附能力的影响。2A~2D为黏附0.5 h后细胞染色所得显微镜下照片(×200), 2E为细胞计数统计学分析图。与Control比较, ** $P < 0.01$; 与紫檀芪1.5 μmol/L比较, ## $P < 0.01$; 与紫檀芪3 μmol/L比较, ## $P < 0.01$

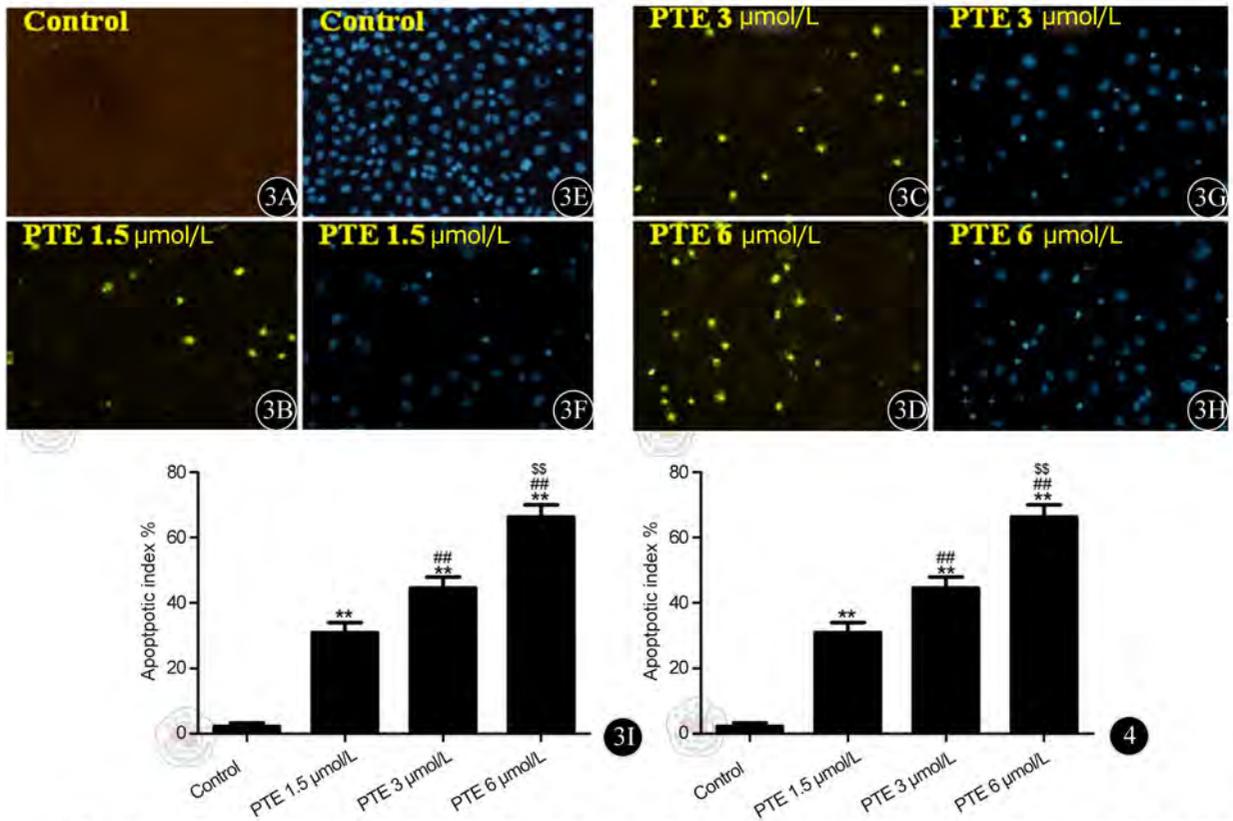


图3 不同浓度紫檀芪处理24 h对各组细胞凋亡率的影响。3A~3H为荧光显微镜下照片(×200), 绿染为凋亡细胞, 蓝染为细胞核, 3I为细胞凋亡率统计学分析图。与Control比较, ** $P < 0.01$; 与紫檀芪1.5 μmol/L比较, ## $P < 0.01$; 与紫檀芪3 μmol/L比较, ## $P < 0.01$ 图4 不同浓度紫檀芪处理24 h对各组细胞Caspase3/7活性的影响。与Control比较, ** $P < 0.01$; 与紫檀芪1.5 μmol/L比较, ## $P < 0.01$; 与紫檀芪3 μmol/L比较, ## $P < 0.01$

讨 论

随着空气污染的日益加剧和吸烟人群的逐年上升,肺癌的发病率和病死率呈现迅猛上升的趋势,有报道显示肺癌已成为我国发病率第一的恶性肿瘤^[1]。目前肺癌的传统治疗手段主要是手术治疗和放化疗,但是大多数化疗药物对中、晚期患者效果不佳,且严重的不良反应给患者带来了许多并发症^[2-3]。手术治疗虽然治疗效果显著,但是手术切口及手术后化疗会给广大患者带来巨大的生理痛苦和心理障碍,严重影响患者的生活质量和家庭幸福^[16]。近些年来一些天然物质(青蒿琥酯、白藜芦醇、雷公藤内酯醇等)被逐渐应用于肺腺癌的预防和治疗,由于其效果显著且几乎无不良反应,使人们越来越重视这些物质在抗肺腺癌方面的研究和应用^[4-7]。

紫檀芪广泛存在于自然界中,是植物在受到外来侵害时产生的一种植物抗毒素,属于抗体性物质。紫檀芪与白藜芦醇都属于芪类化合物^[17]。目前关于白藜芦醇抗肿瘤效果和机制研究很多,其可抑制多种恶性肿瘤细胞生长^[8]。相关药理学研究表明,甲基化的芪类化合物比羟基化的芪类化合物具有更高的生物活性以及生物利用度^[9]。研究证实紫檀芪对结肠癌、肝癌等多种肿瘤具有抗癌活性^[12,18-20]。此外紫檀芪还具有抗氧化、降血脂、降血糖的作用^[10-11]。本研究通过MTT和黏附实验发现:紫檀芪可以显著降低肺腺癌A549细胞的黏附能力,抑制腺癌A549细胞的存活率,并与药物浓度和作用时间存在依赖性。肿瘤的发生发展与细胞凋亡有着密切的联系^[19-21]。大量研究结果证实,细胞凋亡与肺腺癌的关系非常密切,并直接影响其预后^[15-16]。Caspase3/7属于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族,它的激活是细胞进入凋亡阶段最关键的因素之一。本研究发现紫檀芪在抑制肺腺癌A549细胞增殖、促进细胞凋亡同时,还可明显上调Caspase3/7活性,据此我们推断:紫檀芪正是通过影响凋亡信号通路继而发挥其抗肺腺癌作用。

国内外研究证实,与白藜芦醇相比,紫檀芪具有更高的生物学活性^[13]。更值得关注的是,作为一种天然物质,与传统的抗肿瘤药物相比,紫檀芪的药物安全范围很大,其基本无不良反应^[14]。基于本实验研究结果,紫檀芪在肺腺癌药物治疗领域具有广阔的研究和开发前景。

参 考 文 献

- [1] Gilbert C, Yarmus L, Feller-Kopman D. Use of endobronchial ultrasound and endoscopic ultrasound to stage the mediastinum in early-stage lung cancer. *J Natl Canc Netw*, 2012, 10: 1277-1282.
- [2] Renaud S, Falcoz PE, Olland A, et al. Is radiofrequency ablation or stereotactic ablative radiotherapy the best treatment for radically treatable primary lung cancer unfit for surgery. *Interact Cardiovasc Thorac*

- [3] Surg, 2012, 2: 124.
- [4] Scotti V, Saieva C, Di Cataldo V, et al. Vinorelbine-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Tumori*, 2012, 98: 464-470.
- [5] Stakleff KS, Sloan T, Blanco D, et al. Resveratrol exerts differential effects in vitro and in vivo against ovarian cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 1333-1340.
- [6] Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 2008, 7: 1020-1035.
- [7] Vergara D, Valente CM, Tinelli A, et al. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. *Cancer Lett*, 2011, 310: 1-8.
- [8] Piotrowska H, Myszkowski, Ziolkowska A, et al. Resveratrol analogue 3,4,4',5-tremethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 263: 53-60.
- [9] Frazzi R, Valli R, Tamagnini I, et al. Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation. *Int J Cancer*, 2012, 60: 6399-6407.
- [10] Rimando AM, Cuendet M, Desmarchelier C, et al. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 3453-3457.
- [11] Wilson MA, Rimando AM, Wolkow CA. Methoxylation enhances stilbene bioactivity in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Pharmacol*, 2008, 8: 15.
- [12] Amorati R, Lucarini M, Mugnaini V, et al. Antioxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution. *J Org Chem*, 2004, 69: 7101-7107.
- [13] Zhang W, Sviripa V, Kril LM, et al. Fluorinated N,N-dialkylaminostilbenes for Wnt pathway inhibition and colon cancer repression. *J Med Chem*, 2011, 54: 1288-1251.
- [14] Ruiz MJ, Fernández M, Picó Y, et al. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 3180-3186.
- [15] Chang J, Rimando A, Pallas M, et al. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol is a potent neuromodulator in aging and Alzheimers disease. *Neurobiol Aging*, 2012, 33: 2062-2071.
- [16] Huang PH, Chen YH, Chen YL, et al. Vascular endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X. *Heart*, 2007, 93: 1064-1070.
- [17] Rimando AM, Pan Z, Polashock JJ, et al. In planta production of the highly potent resveratrol analogue pterostilbene via stilbene synthase and O-methyltransferase co-expression. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10: 269-283.
- [18] Remsberg CM, Yúñez JA, Ohgami Y, et al. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res*, 2008, 22: 169-179.
- [19] Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, et al. Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells; a side-by-side comparison. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 10964-10970.
- [20] Park HJ, Kim MJ, Ha E, et al. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine*, 2008, 15: 147-151.
- [21] Trouillas M, Saucourt C, Duval D, et al. Bcl2, a transcriptional target of p38alpha, is critical for neuronal commitment of mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 1450-1459.
- [22] Mena S, Rodríguez ML, Ponsoda X, et al. Angel L. Pterostilbene-Induced Tumor Cytotoxicity: A Lysosomal Membrane Permeabilization-Dependent Mechanism. *PLoS One*, 2012, 7: e44524.

(收稿日期:2012-12-04)

(本文编辑:戚红丹)