

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.08.007

白龙灵沙汤提取物对 A549 人肺癌细胞凋亡的影响

陈焕朝¹,甘宁¹,姚品芳²,李劲³,李广灿²,胡志萍¹

Apoptosis of Human Lung Cancer Line A549 Induced by Bailonglingshatang Extract

CHEN Huan-chao¹,GAN Ning¹,YAO Pin-fang²,LI Jin³,LI Guang-can²,HU Zhi-ping¹

1. Intergration of Chinese and Western Medicine Section, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. The Cancer Institute of Hubei; 3. South-central University For Nationalities

Abstract: Objective To observe the effect of Bailonglingshatang(BLLST) extract on apoptosis of human lung cancer cell line A549. **Methods** The human lung cancer cell line A549 was *in vitro* co-cultured with BLLST extract for 48 and 72 h, respectively. Immunocytochemical method was used to detect the expression of bcl-2 and bax. **Results** The expression of bcl-2 was down-regulated and the expression of bax was up-regulated in A549 cells after treated by the BLLST extract. **Conclusion** BLLST extract can restrain lung cancer cell multiplication, down-regulate the expression bcl-2 and up-regulate the expression bax.

Key words: Bailonglingshatang; Human Lung Cancer line A549; bcl-2; bax

摘要:目的 探讨白龙灵沙汤提取物对 A549 人肺癌细胞凋亡的影响。**方法** 提取白龙灵沙汤中的有效成分,使之与 A549 人肺癌细胞作用 48、72 h 后,免疫细胞化学法检测 bcl-2、bax 表达。**结果** 白龙灵沙汤提取物与 A549 人肺癌细胞作用 48、72 h 后,下调 A549 人肺癌细胞 bcl-2,上调 bax 的表达。**结论** 白龙灵沙汤提取物可下调 bcl-2 和上调 bax 的表达。

关键词: 白龙灵沙汤; A549 人肺癌细胞; bcl-2; bax

中图分类号: R73-36; R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)08-0655-02

0 引言

对化疗、放疗不敏感,机体状况衰弱不能接受化疗、放疗或不能手术及术后复发转移的晚期非小细胞肺癌患者,以白龙灵沙汤为主要药物进行治疗,生活质量明显提高,收到较好的临床效果^[1]。为了进一步明确白龙灵沙汤的作用机制,我们提取白龙灵沙汤的有效成分,进行体外白龙灵沙汤治疗肺癌的实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

A549 人肺癌细胞株(由武汉大学特种生物研究所馈赠),白英、龙葵、灵芝、沙参、补骨脂(湖北省肿瘤医院中药房提供),RPMI1640 培养液(Gibco),胎牛血清(TBD);胰蛋白酶(Sigma),磷酸缓冲液(PBS),CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientific),KHB LABSYSTEMS wellscan K3 酶标仪(芬兰),bcl-

2、bax 免疫组织化学试剂盒(博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 白龙灵沙汤提取物的制备 白龙灵沙汤是由白英、龙葵、灵芝、沙参、补骨脂等组成。将每味中药粉碎,按照文献^[2-6]提取,分别得到每味药物的有效成分。将灵芝粉碎后称取 100 g 用 70% 甲醇提取然后用乙酸乙酯进行萃取得到灵芝有效成分;将北沙参干燥后称取 100 g,加入 90% 的乙醇,在 85℃ 下回流,浸提 2 次,过滤,再加入 85% 的乙醇进行醇析分离得到北沙参的有效成分;将白英粉碎,取 100 g 以 50% 乙醇提取得到白英的有效成分;取龙葵全草进行粉碎称取 100 g 用 90% 乙醇进行萃取得到龙葵有效成分;将补骨脂粉碎称取 100 g,用 95% 乙醇作为提取溶剂采用回流法提取补骨脂的有效成分。然后根据临床应用白龙灵沙汤剂量组成比例进行混合。

1.2.2 A549 人肺癌细胞的培养 将 A549 人肺癌细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.3 免疫细胞化学凋亡相关因子(bcl-2、bax)检测 用 0.125% 胰酶消化培养瓶中对数生长期的 A549 人肺癌细胞,将其移入 96 孔板内,每孔(2~4)

收稿日期:2008-07-04;修回日期:2008-11-05

作者单位:1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院中西医结合科;2. 湖北省肿瘤研究所;3. 中南民族大学

作者简介:陈焕朝(1951-),男,学士,主任医师,主要从事中西医结合防治肿瘤基础及临床研究

× 10³ 个细胞(内置有经浸酸、灭菌处理的盖玻片)贴壁生长,待其爬片生长约 60% 时,白龙灵沙汤组换液加入 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液 180 μl 及 20 μl 白龙灵沙汤提取物,对照组换液加入 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 200 μl,分别作用 48、72 h 后,按免疫组织化学染色步骤染色,以胞核中有明显 DAB 棕黄色染色者判断为阳性表达细胞。高倍镜下(×100)随机选择 100 个细胞,观察阳性细胞数,计算 bcl-2、bax 阳性细胞率,以百分率表示。

1.2.4 统计学方法 采用 SPSS 11.0 软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

免疫细胞化学结果显示,白龙灵沙汤提取物组凋亡相关因子 bcl-2 下调、bax 上调,见表 1、2。

表 1 白龙灵沙汤提取物作用 48 h 对 A549 人肺癌细胞的 bcl-2、bax 的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 The expression of bcl-2, bax in A549 cells treated by the BLLST extract for 48 hours analyzed by immunocytochemistry($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	bax (%)	bcl-2 (%)
BLLST group	43.79 ± 5.47*	26.73 ± 6.91*
Control group	26.53 ± 1.31	39.01 ± 13.98

Compared with control group, * : $P < 0.01$

表 2 白龙灵沙汤提取物作用 72 h 对 A549 人肺癌细胞的 bcl-2、bax 的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 The expression of bcl-2, bax measured by immunocyto chemistry in A549 cells treated by the BLLST extract for 72 hours ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	bax (%)	bcl-2 (%)
BLLST group	36.97 ± 6.64*	29.63 ± 2.48*
Control group	24.52 ± 3.38	44.61 ± 10.87

Compared with control group, * : $P < 0.01$

由上表可知,与对照组比较,白龙灵沙汤提取物对 A549 人肺癌细胞作用 48、72 h 后,bcl-2、bax 表达均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

白龙灵沙汤是由白英、龙葵、灵芝、补骨脂、沙参等组成,其中白英味甘、苦,性寒,具有清热解毒、祛风除湿、利水消肿之功效。药理研究表明白英中的抗肿瘤成分 β-苦茄碱具有抑瘤作用,澳洲茄碱在体外试验中有阻止癌细胞增殖的作用。龙葵味苦性寒,具有清热解毒、活血消肿的功效。药理研究表明龙葵中的龙葵碱、龙葵总碱具有抗肿瘤作用。灵芝味甘、性平,具有补气安神、止咳平喘的功效。药理

研究表明灵芝中的抗肿瘤成分灵芝多糖具有广谱抑瘤及增强免疫的作用。沙参味甘微苦、性微寒,具有养阴清肺、益胃生津的功效。药理研究表明沙参中的抗肿瘤成分具有抗突变和增强巨嗜细胞吞噬功能的作用。补骨脂性温、具有壮阳止泻的功效,补骨脂中的主要成分是补骨脂素,有研究表明^[7]补骨脂素具有明确的逆转耐药的作用。白龙灵沙汤中白英、龙葵清热解毒、抑瘤消肿共为君药,灵芝、沙参、补骨脂止咳、养阴清肺、扶正固本为臣,诸药共奏扶正消瘤的作用。

体外实验是研究中药抗肿瘤的重要方法之一,但中药尤其是中药复方由于其成分复杂,以其中的某一种成分很难代表整个药物或复方的作用,我们在尽量保存药物活性的条件下提取药物的有效成分进行研究,真实反映中药复方作用机制。

细胞凋亡(apoptosis)1972 年由英国学者 Kerr 等首先提出,是细胞受到生理或病理信号刺激后,通过启动自身内部机制。主要是通过内源性核酸内切酶激活而发生的细胞死亡过程。细胞接到信号刺激后,通过主动的生化过程而迅速走向死亡,是基因调控下的主动“细胞自杀”^[9]。bcl-2 家族基因及其编码的 bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡中起着重要作用^[9-10],在细胞凋亡的调控因子中,bcl-2 是目前发现的最重要的凋亡抑制因子^[11],可以阻断细胞凋亡^[12],而 bax 则是促细胞凋亡基因,能阻遏 bcl-2 的抑制细胞凋亡作用^[13]。

有研究表明^[14]白英水提取物抑制人肺腺癌增殖及下调 bcl-2;龙葵总碱是中药龙葵提取物中的主要有效成分,季宇彬等^[15]研究认为龙葵总碱抗肿瘤作用与龙葵总碱抑制肿瘤细胞膜钠泵及钙泵有关。唐凤德等^[16]研究表明补骨脂中的有效成分补骨脂素能够使 K562 多药耐药细胞株 bcl-2 基因蛋白表达降低。本实验结果表明经白龙灵沙汤提取物作用后,凋亡相关因子 bcl-2 下调、bax 上调。由此推测白龙灵沙汤通过下调 bcl-2、上调 bax 表达来启动细胞凋亡可能是其治疗肺癌的作用机制之一。中药复方抗肿瘤作用的机制非常复杂,对于白龙灵沙汤对肺癌细胞作用有待于更深入的研究。

参考文献:

[1] 甘宁,胡志萍,陈焕朝.白龙灵沙汤治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J].中华中西医杂志,2006,7(17):1 553-1 555.
 [2] 林志斌.灵芝的现代研究[M].2 版.北京:北京医科大学出版社,2001:167-168.
 [3] 韩重,黄霁,何珉,等.白英抗肿瘤成分提取工艺的研究[J].中草药,2006,37(10):1 500-1 502.