

白毛藤诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其作用机制的研究[※]

● 杨旭东^{1*} 张 杰¹ 王 巍²

摘 要 目的:研究白毛藤诱导肺癌细胞凋亡的作用及其机制。方法:荧光显微镜观察不同浓度白毛藤诱导 A549 细胞凋亡的作用,RT-PCR 检测 Bcl-xl、p53 基因表达量的变化。结果:白毛藤具有诱导 A549 细胞凋亡的作用,并且上调 p53 基因、降低 Bcl-xl 基因的表达。结论:白毛藤促进 A549 细胞凋亡,其机制可能与激活 p53 基因、抑制 Bcl-xl 基因表达有关。

关键词 基因表达 细胞凋亡 白毛藤 肺肿瘤

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,对放疗、化疗敏感性均较差。因此,从传统中药中寻找高效、低毒的抗肿瘤药物已成为抗肿瘤药物研究及新药开发的重要组成部分。白毛藤(*Solamum lyratum* Thunb),系茄科植物白英的全草,具有清热利湿、消肿解毒之功效^[1]。有研究表明,其水提物有较强的肿瘤细胞增殖抑制活性^[2],但对其抗癌作用机理阐述并不明确。本研究拟观察白毛藤对肺癌细胞 A549 细胞是否具有诱导凋亡作用,并初步探讨其作用机制,为白毛藤应用于肺癌的临床治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 白毛藤全草,牡丹江保健大药房;肺癌细胞 A549 细胞株(武汉中美科技有限公司);MTT 试剂(泰伦生物科技有限公司),批号:041025;Trizol (Sigma 公司),批号:15596-018;引物核苷酸片段(上海生工生物技术有限公司)。荧光显微镜(日本),OLY-PUS。

1.2 实验分组 实验组:RPMI-1640 培养液倍比稀释的 4、6、8、16mg/ml 的白毛藤水提液。对照组:含

A549 细胞的 RPMI-1640 培养液。

1.3 细胞凋亡检测 取指数生长期的癌细胞,加入适量 0.25% 胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。用含 10% 胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 /ml 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1ml。将普通洁净盖玻片置于 37℃、5% CO₂ 培养箱。24h 后加入不同质量浓度的白毛藤;对照组加相同体积的培养液。48h 后细胞用胰酶消化,冷 PBS(pH7.2)洗 3 遍,固定液甲醇-冰醋酸(3:1),4℃ 固定 10min,弃固定液,蒸馏水洗 3 遍,室温干燥,用 5mg/L Hoechst33258 染色,37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 15min,将孔中的盖玻片取出,盖在已滴好甘油的载玻片上,置于荧光倒置显微镜上观察细胞形态并拍照。

1.4 RT-PCR 测定 Bcl-xl、p53 表达 取肿瘤细胞总 RNA,用 RT-PCR 方法检测肿瘤细胞 Bcl-xl、p53 基因表达。设计引物如下:bcl-xl 引物,上游:5'-CCCAGAAAGGATACAGCTGG-3';下游:5'-GCGATCCGACTCACCAATAC-3',扩增片段 448bp。p53 引物,上游:5'-TTCTCTCCCCA ACAATGAGG-3';下游:5'-TCTGTGAAGCAGCACCATTTC23',扩增片段 531bp。 β -actin 上游引物:5'-ATGTGGCACCA-CACCTTCTA-3',下游:5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3',扩增片段 838bp。反应条件:94℃ 预变性 5min;变性 30s (94℃),退火 30s (58℃),延伸 1min (72℃),共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。经凝胶成像系统分析,分别计算 bcl-xl、p53 与内参扩增带

※基金项目 黑龙江省卫生厅科研课题(No:2007-003)

*作者简介 杨旭东,男,讲师,药学硕士。研究方向:中药的药理与毒理研究。著有《色谱技术在医药研究中的应用》。发表论文多篇并承担多项省级科研课题。

•作者单位 1. 黑龙江省牡丹江医学院(157011); 2. 哈尔滨市中医医院(150040)

荧光强度 × 面积的比值,得出 bcl - xl、p53 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计分析软件处理。数据以均数($\bar{x} \pm s$)表示,进行 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜检测细胞凋亡情况 荧光显微镜观察不同浓度白毛藤作用 48h 后,可见蓝色深染的凋亡细胞,并可见细胞核碎裂,细胞体积缩小。2mg/ml 白毛藤组细胞凋亡率为 8.99%;4mg/ml 白毛藤组细胞凋亡率为 9.87%;8mg/ml 白毛藤组细胞凋亡率为 12.07%;16mg/ml 白毛藤组细胞凋亡率为 14.97%;对照组细胞凋亡率为 2.06%。实验组与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 各组 Bcl - xl 和 p53 基因表达情况 与对照组相比,不同浓度白毛藤作用 48h 后,肿瘤细胞中原癌基因 bcl - xl 基因表达逐渐降低,抑癌基因 p53 基因表达逐渐增加,以 16mg/ml 组最明显,见图 1、2。



图 1 各组细胞 bcl-xl 基因表达

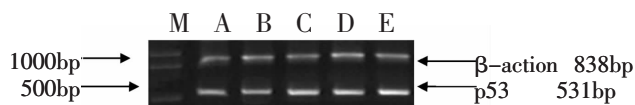


图 2 各组细胞 p53 基因表达

M.DNA Marker DL2000;A. 正常对照组;B.白毛藤 2mg/ml;
C.白毛藤 4mg/ml;D.白毛藤 8mg/ml;E.白毛藤 16mg/ml

3 讨论

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡(Programed cell death,PCD),是在精密调节下的细胞主动死亡过程,在个体发育生长过程中起重要作用。细胞凋亡的异

常与多种病理生理过程相关,如肿瘤的发生发展、动脉粥样硬化、自身免疫疾病等。bcl 基因家族是重要的凋亡调控基因,包括抑凋亡基因 bcl - 2、bcl - xl 和促凋亡基因如 bax、bak、bcl - xs 等^[3]。bcl - xl 过表达与肿瘤发生有密切关系,并能抑制化疗等引起的凋亡,而下调其表达则能促进凋亡发生^[4]。p53 基因为抑癌基因,存在于正常细胞核中,对细胞损伤分化有抑制作用,具有促进细胞凋亡的作用^[5]。p53 编码多功能的抑癌蛋白 p53,主要功能是在检测基因组损伤、启动修复损伤基因组从而维持基因组稳定,在抑制或阻止细胞转化、诱导基因组损伤的细胞凋亡等方面起到决定性作用,从而抑制肿瘤的发生、去除衰老细胞等^[6]。

本研究结果显示:①白毛藤具有促进肺癌 A549 细胞凋亡作用,且浓度越大,作用越明显。②白毛藤可明显上调肺癌 A549 细胞 p53 基因 mRNA 表达,降低 bcl - xl 基因 mRNA 表达。结果提示,白毛藤诱导肺癌 A549 细胞凋亡的分子机制可能与调控 Bcl - xl 和 p53 基因表达有关。

参考文献

- [1]冯洪钱.民间兽医本草[M].北京:科学技术文献出版社,1993:307-308.
- [2]施文荣,刘艳.白英对人急性早幼粒白血病 HL60 细胞生长的影响[J].福建中医学院学报,2002,12(1):36-38.
- [3]Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: Life and death decision[J]. Science, 2003,299: 214-215.
- [4]Pena JC, Thompson CB, Recant W, et al. Bcl - xl and bcl - 2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Cancer, 1999, 85: 164-170.
- [5]Tordan J, Galmdo MF, Piehn J H, et al. P53 expression induces apoptosis in hippocampal Pyramidal neuron cultures[J]. J Neurosci, 1997, 17:1397-1405.
- [6]Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53 - regulated genes [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008,9(5):402-412.

(上接第 37 页)

综上所述,钱乙儿科五脏证治在继承前人经验的基础上,又有所独创和发展,强调了五脏之间、五脏与自然之间是一个统一的整体。并且钱氏这种脏腑病机立论的辨证思想,对后来儿科学的发展以及

张元素易水学派的理论产生了深远的影响。

参考文献

- [1]于霞.中医儿科鼻祖—钱乙[J].中医儿

科杂志,2006,(2)2.

[2]俞景茂.钱乙小儿药证直诀类证释义[M].贵阳:贵州人民出版社,1984.

[3]马吉华.钱乙儿科论治特色[J].安徽中医学院学报,1996,15(4):11.