

槐耳清膏对人肺腺癌 A549/DDP 细胞增殖的影响及顺铂耐药逆转作用

鲁明骞^{1,2}, 卢宏达³, 卢忠心³, 孔庆志³, 雷章³, 许新华², 徐冰清², 郭蓉²

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065;
2. 三峡大学第一临床医学院肿瘤研究所 & 宜昌市中心人民医院肿瘤内科, 湖北 宜昌 443003;
3. 武汉市中心医院 & 武汉市肿瘤研究所, 湖北 武汉 430061)

摘要:目的: 探讨槐耳清膏对人肺腺癌 A549 细胞和 A549/DDP 细胞增殖的抑制影响及其顺铂耐药细胞 A549/DDP 的逆转作用。方法: 以体外培养的人肺腺癌 A549 及 A549/DDP 细胞为实验模型, 采用 MTT 法测定不同浓度槐耳清膏对 A549 细胞及 A549/DDP 细胞的增殖抑制率, 并运用流式细胞术检测顺铂联合槐耳清膏对 A549/DDP 细胞的变化, 以及增敏作用效应。结果: 槐耳清膏对 A549 细胞及 A549/DDP 细胞的增殖有明显抑制作用, 随着药物浓度的增加, 其抑制率逐渐增加, 具有明显的量-效关系 ($P < 0.05$)。顺铂 $40 \mu\text{mol/L}$ 作用于 A549 及 A549/DDP 细胞 48 h 后, 其凋亡率分别为 $(27.61 \pm 3.45)\%$ 和 $(17.93 \pm 1.73)\%$, 两组间有统计学差异 ($P < 0.01$)。槐耳清膏 1 mg/mL 作用于人肺腺癌 A549 和 A549/DDP 细胞 40 h 后, 再以相同浓度顺铂诱导, A549 细胞凋亡率为 $(32.35 \pm 2.68)\%$, A549/DDP 细胞凋亡率为 $(30.01 \pm 3.65)\%$, 两组间无统计学意义, 但与单独 DDP 作用相比, 差异具有显著意义 ($P < 0.01$)。结论: 槐耳清膏能显著抑制人肺腺癌 A549 及 A549/DDP 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 还可以增加 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性。

关键词: 槐耳清膏; 人肺腺癌 A549/DDP 细胞; 细胞增殖; 顺铂耐药

中图分类号: R734

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2016)09-2185-03

Effect of Huaier on Proliferation and Platinum Resistance of Human Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cell Line

LU Mingqian^{1,2}, LU Hongda³, LU Zhongxin³, KONG Qingzhi³, LEI Zhang³, XU Xinhua², XU Bingqing², GUO Rong²

(1. Hubei University of Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
2. Oncology Institute of The First College of Clinical Medical Science of Three Gorges University, Department of Oncology of Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, Hubei, China
3. Wuhan Central People's Hospital, Wuhan City Oncology Institute, Wuhan 430061, Hubei, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of Huaier on proliferation and the reversal effect of Huaier on cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP. Methods: A model of cell line A549 and A549/DDP of cisplatin resistance in vitro was built. MTT was used to detect proliferation and flow cytometry (FCM) used to analyze the interaction of cisplatin and to A549/DDP cell and sensitization to cisplatin resistance. Results: Huaier inhibited the proliferation of A549 and A549/DDP cells and the inhibition rate increased with the increase of the concentration of Huaier. It was time- and dose-dependent. The inhibition rate of A549 and A549/DDP after 48 hours was different from that in the group of $40 \mu\text{mol/L}$ cisplatin [$(27.61 \pm 3.45)\%$ vs $(17.93 \pm 1.73)\%$] ($P < 0.05$). After 1 mg/mL Huaier intervening for 40 hours later, the apoptosis rate of A549/DDP induced by cisplatin and Huaier was $(30.01 \pm 3.65)\%$, not significantly different from that of A549 $(32.35 \pm 2.68)\%$ ($P > 0.05$), but was significantly different from the group of cisplatin only ($P < 0.01$). Conclusion: Huaier shows cell proliferation inhibitory and apoptosis inducing effects on human lung adenocarcinoma A549 and A549/DDP cells. Huaier improves the sensibility of A549/DDP cells to cisplatin.

Key words: Huaier; human lung adenocarcinoma A549/DDP cell; proliferation; cisplatin resistance

收稿日期: 2016-04-21

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目 (2014CFB675); 湖北省教育厅重点项目 (D20141205); 湖北省卫计委科研基金项目 (WJ2015MB176)

作者简介: 鲁明骞 (1973-), 男, 湖北宜昌人, 副主任医师, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤中西医结合临床及基础研究。

通讯作者: 孔庆志 (1952-), 男, 湖北武汉人, 主任医师、教授, 博士研究生导师, 研究方向: 肿瘤中西医结合临床及基础研究。

肺癌是世界上死亡率最高的恶性肿瘤,全球每年约有160万新发病例,死亡约130万人^[1]。我国肺癌发病率和死亡率均居恶性肿瘤的第一位^[2]。预计2050年我国将是全球肺癌最多的国家。化疗耐药是肺癌化疗失败的主要原因之一,目前对耐药机制及其逆转耐药方法研究较多,但能应用于临床较少,效果也不明显。近年来关于槐耳清膏在恶性肿瘤中的作用受到广大研究者的重视,但其逆转肺癌耐药的研究较少。本实验以耐顺铂的人肺腺癌A549/DDP细胞为研究对象,探讨槐耳清膏对A549及A549/DDP细胞增殖的抑制作用,进一步研究槐耳清膏对耐药的肺癌细胞A549/DDP细胞的耐药的逆转机制。

1 资料与方法

1.1 药物制备 槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供,用无血清PRMI-1640培养液100 mL溶解槐耳清膏10 g,制备成浓度为0.1、1、3、6、9 mg/mL的槐耳清膏溶液待用。顺铂由齐鲁制药有限公司生产(批号:H20023460),PRMI-1640培养基为美国GIBCOBRL公司产品,PI由美国Sigma公司提供。

1.2 细胞株 人肺腺癌A549细胞株由武汉市中心医院实验室冷冻保存,在37℃和5%CO₂饱和湿度条件下,10%胎牛血清,1%双抗高糖DMEM培养,每2~3 d进行传代1次。A549/DDP细胞株由实验室自建,培养于6 μmol/L DDP的上述培养液中,实验前2 d更换为无DDP的培养液继续培养,让细胞处于对数生长期。

1.3 槐耳清膏的细胞毒作用 将呈对数生长的A549及A549/DDP细胞接种于96孔培养板(丹麦Nunc公司)中(细胞浓度为0.2 × 10⁵个/mL,100 μL/孔),培养24 h后,分别加入浓度为0.1、1.0、3.0、6.0、9.0 mg/mL的槐耳清膏PRMI-1640培养液,每浓度组设12个复孔,持续培养40 h。每孔加入1 mg/mL MTT100 μL,37℃孵育4 h后终止培养,吸弃上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)10 μL作用30 min。酶标仪测定570 nm波长的光吸收值(OD值)。不同浓度槐耳清膏对A549细胞及A549/DDP细胞的增殖抑制率计算如下:细胞增殖抑制率=(1-实验组OD值/对照组OD值) × 100%。

1.4 细胞凋亡及细胞周期检测 将A549和A549/DDP细胞接种于6孔板中,培养过夜,加入槐耳清膏1/2IC₅₀浓度及相应顺铂浓度继续培养24 h,胰酶消化后收取细胞,离心后冲洗,加入70%乙醇,于-20℃固定24 h,离心洗涤后,加入100 μL磷酸二氢钠/柠檬酸缓冲液震荡30 min,然后加入100 mg/L RNase A和10 mg/mL PI 1 mL,室温下避光染色3 h,用FACSort流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)检测细胞凋亡率。实验步骤按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法 所有数据用SPSS 13.0统计软件进行分析处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏对人肺腺癌A549及A549/DDP细胞增殖的影响 槐耳清膏各浓度组与A549及A549/DDP细胞作用后均发生细胞凋亡,浓度为0.1、1.0、3.0、6.0、9.0 mg/mL的槐耳清膏对A549细胞增殖抑制率分别为(16.3 ± 3.5)%、(28.5 ± 5.7)%、(56.8 ± 4.3)%、(74.6 ± 7.8)%、

(87.4 ± 1.9)% ,对A549/DDP细胞增殖抑制率分别为(12.5 ± 2.7)%、(19.4 ± 3.6)%、(51.2 ± 3.1)%、(80.1 ± 5.4)%、(89.6 ± 1.4)%。随着浓度的增高,其细胞毒作用不断增强,但在同一浓度下槐耳清膏对A549及A549/DDP细胞的细胞毒作用无统计学差异, $P > 0.05$ 。两者IC₅₀分别为(2.84 ± 0.46)%和(2.97 ± 0.32)%。表明槐耳清膏对人肺腺癌细胞A549和A549/DDP细胞有一定抑制作用。见表1。

表1 不同浓度的槐耳清膏对A549及A549/DDP细胞的增殖影响($\bar{x} \pm s$)

组别(mg/mL)	细胞凋亡	
	A549细胞	A549/DDP细胞
0.1	16.3 ± 3.5	12.5 ± 2.7
1.0	28.5 ± 5.7	19.4 ± 3.6
3.0	56.8 ± 4.3	51.2 ± 3.1
6.0	74.6 ± 7.8	80.1 ± 5.4
9.0	87.4 ± 1.9	89.6 ± 1.4

2.2 槐耳清膏及顺铂对人肺腺癌A549细胞凋亡的交互影响 与对照组比较(未加任何药物培养),槐耳清膏1 mg/mL作用48 h后A549与A549/DDP细胞凋亡率分别为(15.4 ± 1.57)%与(3.89 ± 0.72)%和(12.42 ± 1.28)%与(3.36 ± 0.54)% ,其凋亡率明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但两组间无明显区别($P > 0.05$)。顺铂40 μmol/L作用于A549及A549/DDP细胞48 h后,其凋亡率分别为(27.61 ± 3.45)%和(17.93 ± 1.73)% ,两组间有统计学差异($P < 0.01$)。槐耳清膏1 mg/mL作用于人肺腺癌A549和A549/DDP细胞40 h后,再以相同浓度顺铂诱导, A549细胞凋亡率为(32.35 ± 2.68)% ,A549/DDP细胞凋亡率为(30.01 ± 3.65)% ,两组间无统计学意义,但与单独DDP作用相比,差异具有显著意义($P < 0.01$)。见表2。

表2 槐耳清膏及顺铂对人肺腺癌A549细胞凋亡的交互影响($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	
	A549细胞	A549/DDP细胞
No drug culture	3.89 ± 0.72	3.36 ± 0.54
Huaier	15.40 ± 1.57	12.42 ± 1.28
DDP	27.61 ± 3.45	17.93 ± 1.73
Huaier + DDP	32.35 ± 2.68	30.01 ± 3.65

3 讨论

槐耳早在我国作为中草药应用于多种疾病的治疗,其功效主要有止血、止痢、抗癌、主痔疮出血、便血、崩漏、痢疾、肝癌、肝炎等。近来研究发现槐耳清膏具有促进细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长的作用,提高患者免疫力及生活质量等,其毒副作用小,易被患者接受^[3-5]。

中西医结合治疗是肺癌综合治疗的重要手段^[6],为了从中寻找新的药物治疗靶点,细胞凋亡在恶性肿瘤中研究较广泛,活化凋亡通路,促使肿瘤细胞凋亡,是目前研究肿瘤热点。中药作为恶性肿瘤的主要补充,研究发现具有抑制肿瘤生长,促进细胞凋亡的作用^[7]。本实验以人肺腺癌A549及A549/DDP细胞为研究对象,探讨了槐耳清膏对其细胞的增殖抑制作用。流式细胞结果显示,浓度为0.1,

1.0, 3.0, 6.0, 9.0 mg/mL 的槐耳清膏对 A549 细胞增殖抑制率分别为 (16.3 ± 3.5)%、(28.5 ± 5.7)%、(56.8 ± 4.3)%、(74.6 ± 7.8)%、(87.4 ± 1.9)% ,对 A549/DDP 细胞增殖抑制率分别为 (12.5 ± 2.7)%、(19.4 ± 3.6)%、(51.2 ± 3.1)%、(80.1 ± 5.4)%、(89.6 ± 1.4)% ,随着浓度的增高,其细胞毒作用不断增强,但在同一浓度下槐耳清膏对 A549 及 A549/DDP 细胞的细胞毒作用无统计学差异, $P > 0.05$ 。两者 IC50 分别为 (2.84 ± 0.46)% 和 (2.97 ± 0.32)% ,表明槐耳清膏对人肺腺癌细胞 A549 和 A549/DDP 有一定抑制作用。Zhang N^[8] 等研究发现槐耳清膏使乳腺癌细胞的周期阻滞在 G2 期,其机理可能通过 bax - / bcl - 2 途径促进细胞凋亡,抑制细胞增殖。Wu T 等^[9] 发现槐耳清膏作用于肺腺癌 A549 细胞后,有 66 种 miRNA 出现表达差异,其中由于 miR - 26b - 5p 表达上调,从而抑制 A549 细胞增殖和诱导细胞凋亡。

与对照组比较(未加任何药物培养),槐耳清膏 1 mg/mL 作用 48 h 后 A549 与 A549/DDP 细胞凋亡率分别为 (15.4 ± 1.57)% 与 (3.89 ± 0.72)% 和 (12.42 ± 1.28)% 与 (3.36 ± 0.54)% ,其凋亡率明显增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但两组间无明显区别 ($P > 0.05$)。证明槐耳清膏无论对 A549 细胞,还是 A549/DDP 细胞,均有诱导凋亡的作用。耐药是肺癌化疗失败的主要原因,其机制与多药耐药基因有关,目前认为其机制可能与 P170 糖蛋白 (P - gp)、多药耐药相关蛋白 (MDR)、肺耐药蛋白 (LRP)、谷胱甘肽 S 转移酶、拓扑异构酶、凋亡抑制和肿瘤细胞生化特征改变等有关。顺铂是治疗肺癌的基本药物之一,其机制主要通过 DNA 形成交叉链,抑制细胞 DNA 的合成,或通过螯合作用或与细胞膜的结合作用与 DNA 发生反应到达抗癌效果,但也易产生耐药性。目前研究表明,MDR 最主要的机制是依赖 ATP 的 P - gp 蛋白的过度表达,使化疗药物从细胞内主动转运至细胞外,降低了细胞内化疗药物的有效浓度,槐耳清膏具有抑制 P - gp 转运底物,使 P - gp 功能降低,下调 MDR1/G - gp mRNA 和蛋白的表达,从而逆转耐药细胞 MDR^[10]。本实验进一步研究发现,顺铂 40 μmol/L 作用于 A549 及 A549/DDP 细胞 48 h 后,其凋亡率分别 (27.61 ± 3.45)% 和 (17.93 ± 1.73)% ,两组间有统计学差异 ($P < 0.01$)。槐耳清膏 1 mg/mL 作用于人肺腺癌 A549 和 A549/DDP 细胞 40 h 后,再以相同浓度顺铂诱导, A549 细胞凋亡率为 (32.35 ± 2.68)% ,A549/DDP 细胞凋亡率为 (30.01 ± 3.65)% ,两组间无统计学意义,但与单独 DDP 作用相比,差异具有显著意义 ($P < 0.01$)。证明槐耳清膏除具有凋亡作用外,还可使耐顺铂的 A549/DDP 抗药性发生逆转,其机制可能与槐耳清膏使细胞的极性、通透性发生变化,促使细胞外氯离子转运至细胞内,氯离子是保持顺铂构象的重要离子,从而达到进一步抗肿瘤作用。

综上所述,槐耳清膏能显著抑制人肺腺癌 A549 及 A549/DDP 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,还能促进顺铂耐药的逆转,达到增敏作用,但其机制仍需进一步深入探讨。

参考文献

[1] Jemal A ,Bray F ,Center MM ,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin 2011 ,61(2) : 69 - 90.

[2] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤 2014 ,23(1) : 1 - 10.

[3] 胡保全,唐鹏,齐晓伟,等. 槐耳清膏对乳腺癌细胞系 SUM - 159 细胞干性特征的影响[J]. 第三军医大学学报 2013 ,35(11) : 1107 - 1110.

[4] 海艳洁,郑宇,庄亚严,等. 槐耳颗粒联合化疗对晚期大肠癌的初步临床研究[J]. 药物流行病学杂志 2012 ,21(2) : 53 - 55.

[5] 周平,雷秋模,曹亚丽,等. 槐耳颗粒治疗老年乳腺癌的临床疗效[J]. 中国老年学杂志 2012 ,9(32) : 3892 - 3893.

[6] Spiro SG ,Tanner NT ,Silvestri GA ,et al. Lung cancer: Progress in diagnosis ,staging and therapy [J]. Respirology ,2010 ,15(1) : 44 - 50.

[7] Mingqian Lu ,Qingzhi Kong ,Xinhua Xu ,et al. Pectolarigenin a Flavonoid Compound from Cirsium Japonicum with Potential Anti - proliferation Activity in MCF - 7 Breast Cancer Cell [J]. Trop J Pharm Res 2014 ,13(2) : 225 - 228.

[8] Zhang N ,Kong X ,Yan S ,et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis [J]. Cancer Sci 2010 ,101(11) : 2375 - 2383.

[9] Wu T ,Chen W ,Liu S ,et al. Huaier suppresses proliferation and induces apoptosis in human pulmonary cancer cells via upregulation of miR - 26b - 5p [J]. Cancer Sci ,2014 ,588(12) : 2107 - 2114.

[10] 喻喆,吴涛,张阳. 槐耳清膏体外逆转人肝癌耐药细胞 BEL - 7402/5 - Fu 多药耐药性[J]. 肿瘤学杂志 2013 ,19(6) : 443 - 447.

不育症男性的寿命较短

不育症男性患者更要注意身体保养。一项新的研究显示,与精子、精液正常的男性相比,不育男寿命往往较短。

研究发现,如果男性精液有两处以上异常,8 年期间提早死亡的风险就会比精液正常的男性高一倍以上。美国史丹佛大学医学院的研究人员对两所医院约 12 000 名男性进行了研究,这些男性年龄介于 25 岁到 50 岁。研究人员分析了这些男性的精液数量、精子质量、精子数目、精子形状,以及精子活动力等信息。

跟踪 8 年后发现,精子、精液质量较差的男性死亡率似乎较高,其死亡率为精液、精子正常者的两倍多。研究还发现,精子与精液异常之处越多,死亡机率也就越高。

研究人员表示,吸烟和糖尿病都会使死亡风险翻倍,这些因素都引起了人们的极大关注。同样地,男性不育症也会使死亡风险增加约一倍,但这一问题却常被忽视。

发表在最近出版的《人类生殖医学》期刊上的这项研究称,据部分统计,约每 7 对夫妻就有一对有不孕不育问题,而这是首次研究发现,男性不育症与死亡率密切相关。

研究人员指出,有些疾病既会损害整体身体健康,也会影响精子和精液质量,可能并不是不育症直接影响男性的寿命长短,而是这些潜在疾病使男性寿命缩短。因此,不育症男性一定要多注意自己的身体健康。