·论著摘要·

槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A549 凋亡的实验研究

黄涛　孔庆志　卢宏达　戴观书

槐耳清膏是药用真菌槐耳菌质的热水提取物,临床上证实有一定的抗癌效果。为进一步探讨其抗癌机制,我们研究了槐耳清膏在体外诱导人肺腺癌细胞系 A549 凋亡的作用。

材料与方法　引进并培养人肺腺癌细胞系 A549 细胞株。制备不同浓度的槐耳清膏 PRMI-1640 含药培养液与接种成功、呈对数生长的 A549 细胞共同培养 24 h 后,每 6 h 进行以下观察及测定(设阳性对照组羟基喜树碱 100 μg/ml,共同孵育 10～12 h 后进行测定)[1]。(1)荧光染色:收集培养细胞,清洗并均匀涂片自然风干 24 h,置于 0.05 mg/L 的 Hoechst33258 及 0.1 mg/L 的硫柳汞的无钙、镁的磷酸缓冲染色液中作用 40 min,封片后荧光显微镜下观察、拍照、计数;(2)电子显微镜观察:同上收集细胞 6×10^6,磷酸缓冲液(PBS)清洗,戊二醛固定,再经锇酸染色、缩水包埋、切片后透射电子显微镜观察照相记录;(3)流式细胞仪分析:同法收集、清洗、固定细胞 2×10^6,离心后加入 100 μl 磷酸二氢钠/柠檬酸缓冲液室温震荡 30 min,在离心的细胞中加入含 100 mg/L 核糖核酸酶 A(Rnase A) 和 25 mg/L 碘化丙啶(PI)的染色液 1 ml 在暗处 4 ℃染色 3 h,用 FACSort 流式细胞仪分析细胞周期。实验数据通过 SPSS For Windows 软件进行统计学分析。

结果　在 Hoechst33258 荧光染色下,清膏各浓度组 24 h 后及羟基喜树碱组 10～12 h 后均可见到凋亡发生(图 1,2)。分别计数各组每 5 个高倍镜视野中的细胞总数及凋亡细胞数,计算凋亡比率可见:清膏不同浓度组均在 36 h 左右达凋亡高峰,其中 3.0 mg/ml 清膏组凋亡比率最高为 36.2%;100 μg/ml 羟基喜树碱 10～12 h 左右达凋亡高峰,凋亡率为 35.7%。两者比较差异无显著性($t = 1.67$, $P > 0.05$)。透射电子显微镜观察可见典型的细胞凋亡变化(图 3～6)。流式细胞仪分析(表 1):当槐耳清膏浓度小于 1.5 mg/ml 时主要表现为对 A549 的抑制作用,阻止 A549 由 S 期进入 G_2/M 期。当槐耳清膏浓度为 3.0 mg/ml 时细胞凋亡明显增多,表现为 G_1 峰前出现明显的 sub-G_1 峰(AO 峰),并且随时间的逐渐延长,细胞凋亡比例明显增高,培养 36 h 达高峰,为 35.8%;此后加大浓度、延长作用时间,凋亡率反而下降。3.0 mg/ml 槐耳清膏作用 36 h 时诱导 A549 细胞凋亡率与羟基喜树碱阳性对照比较,两者比较差异无显著性($t = 1.71$, $P > 0.05$)。

表 1　槐耳清膏浓度对 A549 细胞凋亡率的影响($n = 4$, %)

组别	作用时间		
	24 h	36 h	48 h
无药阴性对照组	2.0 ±0.5	3.2 ±0.8	2.4 ±0.4
1.5 mg/ml 槐耳清膏组	7.3 ±1.4	22.9 ±2.3	10.1 ±0.9
3.0 mg/ml 槐耳清膏组	12.6 ±2.0	35.8 ±3.6	19.7 ±1.6
6.0 mg/ml 槐耳清膏组	9.7 ±1.2	25.4 ±2.6	13.5 ±1.4
羟基喜树碱阳性对照组	13.1 ±2.3	35.4 ±3.4△	18.8 ±1.7

注:△36 h 3.0 mg/ml 槐耳清膏组与羟基喜树碱阳性对照组凋亡率的比较 $t = 1.71$, $P > 0.05$

讨论　槐耳清膏的主要活性成分是多糖蛋白。既往认为其不具细胞毒性,仅通过机体内环境调动免疫功能发挥作用[2,3]。本研究表明槐耳阻止 A549 由 S 期进入 G_2/M 期,表现为 G_1 峰前出现一个 sub-G_1 峰,诱发细胞凋亡。3.0 mg/ml 36 h 作用最强,此后凋亡率反而下降,这可能与细胞崩解成碎片有关。高于此浓度凋亡率反而下降说明:其凋亡作用与培养基的 pH 值(槐耳清膏 pH 值为 5.5,偏酸)、渗透压等理化因素无关。本研究多种方法均见典型凋亡发生,流式细胞仪细胞分析与荧光染色计数的凋亡比率相互吻合,两者差异无显著性($r = 0.964$, $P > 0.05$)。在诱导细胞凋亡上,槐耳清膏与羟基喜树碱相似,但无化疗药物的毒副作用,且能调节免疫,不失为一种高效低毒的抗癌新药。槐耳清膏诱导肿瘤细胞凋亡的基因学证据有待进一步研究。

(本文图 1～6 见插图 8 - 6)

参 考 文 献

1 Robert H, Jane C, Manrin M, et al, eds. ATCC cell lines and hybridomas. 8th ed. Masachusetts: Manassas Press, 1994. 100.
2 庄毅. 抗癌新药槐耳冲剂的研究. 中国药学杂志, 1998, 33: 273-275.
3 丁如宁, 郑泉, 蒋哑平, 等. 槐耳清膏及其多糖对小鼠免疫功能的影响. 南京中医药大学学报, 1996, 12: 32-33.

(收稿日期:2000-12-14)
(本文编辑:韩锟)

基金项目:武汉市卫生局科研基金资助项目(2000-148)
作者单位:430033 武汉市第四医院

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞A549凋亡的实验研究

（正文见503页）

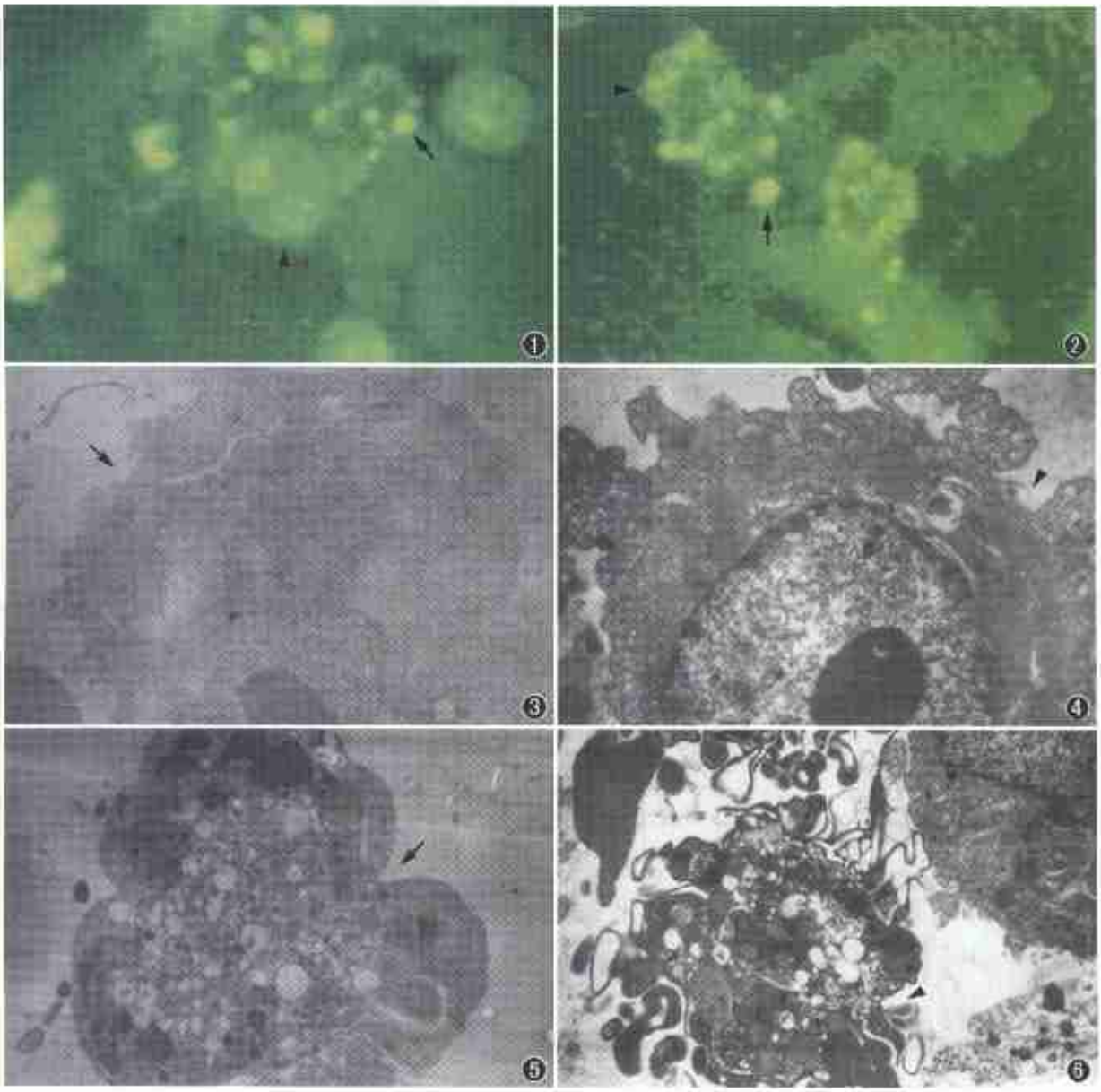

图1　正常生长的A549细胞，胞膜完整，胞核较大显示浅淡的黄绿色荧光（▲）；凋亡A549细胞亦胞膜完整，胞核浓缩，碎裂显示强黄绿色荧光（↑）　Hoechst33258荧光染色　×400　图2　凋亡小体显示小圆形强黄绿色荧光（↑）；坏死A549细胞胞膜不完整或无胞膜着色，胞核碎裂显示不规则的弱黄绿色荧光（▲）　Hoechst33258荧光染色　×400　图3　正常生长的A549细胞，细胞不规则，表面有微绒毛或伪足伸出；胞膜、核膜完整，双核，核仁清晰可见，染色质均匀分布（↑）　锇酸染色　×5 000　图4　早期凋亡胞膜完整，细胞变圆，胞核染色质结团浓聚成块聚集在核膜下呈"车轮状"（▲）　锇酸染色　×5 000　图5　中期凋亡改变，胞膜完整，微绒毛、伪足变少，细胞变圆，胞质变起呈泡状，核膜断裂，凋亡小体可见，为致密圆形小球（↑）　锇酸染色　×5 000　图6　晚期凋亡，细胞崩开始变性，凋亡细胞出现核膜断裂及染色质逸出，最后阶段出现细胞崩解，胞膜不完整或消失，线粒体及内质网肿胀，胞质内颗粒增多（▲）　锇酸染色　×5 000

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net